

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden cand. pharm

**Betydningen av forskjellige Klasse I PI 3-kinase isoformer
for insulinstimulert glukoseopptak og signalering
i skjelettmuskel fra rotte**



**Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige Fakultet
Universitetet i Oslo**

**Hege Standal Rui
Høsten 2007**

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden cand. pharm

**Betydningen av forskjellige Klasse I PI 3-kinase isoformer
for insulinstimulert glukoseopptak og signalering
i skjelettmuskel fra rotte**

**Arbeidet ble utført fra november 2006 til oktober 2007 ved
Arbeidsfysiologisk seksjon, Statens Arbeidsmiljøinstitutt (Stami)**

Hege Standal Rui

**Veiledere:
Seniorforsker, dr. scient Jørgen Jensen
Professor Arild C Rustan**

FORORD

Etter å ha tilbrakt ett år på Statens arbeidsmiljøinstitutt hvor jeg har utført min hovedfagsoppgave, ønsker jeg i den forbindelse å takke alle de unnværlige mennesker som har hjulpet meg underveis.

Først og fremst en stor takk til min hovedveileder, Jørgen Jensen, som er en person med enormt mye kunnskap og erfaring innenfor området jeg har arbeidet med. Han har alltid tatt seg tid til en prat, og har gitt veiledning som har gjort utførelsen av arbeidet spennende og utfordrende. Dette til tross for at han selv har en travel hverdag.

A great thanks to my "lab partner" Lai Yu Ciang for helping me with problems in the lab, discussing my results and for cheering me up when I have been frustrated. You are a great person, and I wish you good luck with your last year at Stami.

Ada Ingvaldsen, Astrid Bolling og Jorid Thrane Stuenæs har hjulpet meg med utførelsen av mitt laboratoriearbeide. Takk for rask innføring i metodene, slik at jeg tidlig kunne komme i gang med å produsere egne resultater. Dere har også hjulpet meg gjennom hele min periode på "labben". En ekstra takk til Jorid, som i tillegg har utført analyser for glykogen syntase aktivitet med mine prøver, slik at min oppgave ble enda mer utfyllende.

Takk til min familie og min kjære venninne Silje. For at dere har lyttet til meg og vært oppmuntrende når jeg har vært sliten og lei. Mamma og pappa har hjulpet meg med praktiske ting, slik at jeg har kunnet konsentrere meg maksimalt om min oppgave mot slutten.

Tusen takk for meg på Stami, og lykke til videre alle sammen!

Hege Standal Rui

Oslo, 26/10-07

INNHOLDSFORTEGNELSE

ORDFORKLARINGER.....	6
SAMMENDRAG.....	7
1 INNLEDNING.....	9
1.1 Bakgrunn.....	9
1.2 Insulinsignalering.....	11
1.3 PI 3-K.....	15
1.4 Inhibitorer.....	19
1.4.1 Uspesifikke PI 3-K-inhibitorer.....	20
1.4.2 Spesifikke PI 3-K-inhibitorer.....	21
1.4.3 PKB-inhibitor.....	23
1.4.4 Koffein.....	23
1.5 Formål.....	26
2 MATERIALER OG METODER.....	27
2.1 Rotter.....	27
2.2 Isolering og inkubering av musculus soleus.....	27
2.3 Analyse av glukoseopptak vha. ³ H-Deoxyglukose.....	31
2.4 Homogenisering av muskler til måling av proteiner.....	32
2.5 Western blotting.....	33
2.5.1 Gelstøping.....	33
2.5.2 Elektroforese.....	33
2.5.3 Blotting.....	34
2.5.4 Blokking og immunoreaksjoner med antistoff.....	35
2.6 Eksponering og fremkalling.....	35
2.7 Skanning og beregning.....	36
2.8 Bestemmelse av glykogen syntase aktivitet.....	36
2.9 Statistikk.....	37

3 RESULTATER.....	38
3.1 Effekten av wortmannin på insulinsignalering.....	38
3.2 Effekten av LY294002 på insulinsignalering.....	40
3.3 Effekten av den PI 3-K α -spesifikke inhibatoren PIK75 på insulinsignalering.....	42
3.4 Effekten av den PI 3-K β -spesifikke inhibatoren TGX221 på insulinsignalering.....	44
3.5 Effekten av PIK75/TGX221 på insulinsignalering.....	46
3.6 Effekten av den PI 3-K γ -spesifikke inhibatoren AS252424 på insulinsignalering.....	47
3.7 Effekten av den PI 3-K δ -spesifikke inhibatoren IC87114 på insulinsignalering.....	47
3.8 Effekten av PI103(α -inhibitor), TGX221, AS252424 og IC87114 på insulinsignalering.....	48
3.9 Effekten av koffein på insulinsignalering.....	49
3.10 Effekten av den spesifikke PKB-inhibatoren SN30978 på insulinsignalering.....	51
4 DISKUSJON.....	53
5 KONKLUSJON.....	62
APPENDIKS 1 – KJEMIKALIER OG UTSTYR.....	64
APPENDIKS 2 – LØSNINGER.....	66
REFERANSER.....	69

ORDFORKLARINGER

Forkortelser/uttrykk	Ordforklaringer
ANOVA	Analysis of variances
APS	Ammonium persulfat
BSA	Bovine serum albumin
DMSO	Dimetyl sulfoksid
d.p.m.	Desintegrasjoner per minutt
EC₅₀	Effective concentration 50 %: Den konsentrasjonen av et stoff som gir 50 % effekt under visse testbetingelser etter en gitt tid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GLUT4	Insulinregulerbar glukosetransportør, glukosetransportør-4
G-proteinkoblet reseptor	En stor gruppe transmembrane reseptorer som registrerer molekyler på utsiden av cellen og aktiverer signalveier inne i cellen.
GS	Glykogen syntase
GSA	Glykogen syntase aktivitet
GSK-3	Glykogen syntase kinase-3
GU	Glucose uptake (glukoseopptak)
HDL	High-density-lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroksyetyl)- 1-piperazineetansulfonsyre
IE	Internasjonale enheter
IC₅₀	Inhibitory concentration 50 %: Den konsentrasjonen av et stoff som gir 50 % hemming under visse testbetingelser etter en gitt tid.
LDL	Low-density-lipoprotein
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex-2
PBS-T	Phosphate buffered saline med Tween-20
PH-domene	Pleckstrin-homology domain: et protein på ca. 100 aminosyrer som medierer binding til membran-fosfolipider, f.eks. PIP ₃
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKB/Akt	Protein kinase B
Presipitere	Når et stoff felles ut fra en løsning
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Ser	Serine
SH2-domene	Src-homology-2 domain: et domene på ca. 100 aminosyrer som binder seg til phosphotyrosine-delen på proteiner.
Stami	Statens arbeidsmiljøinstitutt
Supernatant	Væskelaget som befinner seg over bunnfallet etter sentrifugering, krystallisering o.l.
Thr	Threonine
Tris	Trizma
UDP-glukose	Uridindifosfat-glukose

SAMMENDRAG

I dagens samfunn er diabetes et stadig voksende problem. Type 2 diabetes, også kalt ikke-insulinavhengig diabetes, kommer av insulinresistens i celler. Det viktigste vevet i kroppen med hensyn til glukoseopptak er skjelettmuskulaturen, der 70-90 % av insulinstimulert glukoseopptak skjer. Det er derfor ønskelig å finne ut mer om insulinresistens i muskelceller. Det gjenstår mye forskning på området, men det har de siste årene blitt kjent at en klasse enzymer kalt phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) er viktig for insulinstimulert glukoseopptak. Interessen for PI 3-K sin rolle innen utviklingen av diabetes har derfor blitt stor. Tidligere studier har pekt ut Klasse Ia PI 3-K som de viktigste isoformene i PI 3-K-familien med hensyn til insulinsignalerer, og PI 3-K α er antatt å ha størst betydning.

Formålet med denne hovedfagsoppgaven var å studere insulinstimulert glukoseopptak og signalering i skjelettmuskulatur med spesielt fokus på de ulike isoformene til PI 3-K. Ønsket var å undersøke om man kunne finne ut hvilken/hvilke av PI 3-K-isoformene som var viktigst mht. insulinsignalerer, og dette ble gjort ved hjelp av isoformselektive inhibitorer av PI 3-K.

Studiene ble utført på musculus soleus fra rotte. Disse musklene ble inkubert in vitro med insulin og de ulike inhibitorene. Det ble målt glukoseopptak ved hjelp av radioaktive glukosemetabolitter, mens protein-fosforylering av PKB, GSK-3 og GS ble undersøkt med western blot. Glykogen syntase aktivitet ble også målt.

Resultatene i denne oppgaven viste at wortmannin og LY294002 er i stand til å blokkere insulinstimulert glukoseopptak og insulinsignalerer i muskelceller. Når disse to inhibitorene hovedsakelig er kjent for å hemme Klasse I PI 3-K, så antas det at denne klassen er nødvendig for insulinsignalerer.

Analyser i denne oppgaven antydte at PI 3-K α er den viktigste isoformen i Klasse I PI 3-K mht. insulinsignalerer i muskelceller. Dette fordi PKB-fosforyleringen ble hemmet med 70 % ved høyeste konsentrasjon PIK75 (PI 3-K α -inhibitor). Hemming av de andre isoformene i Klasse I PI 3-K hadde ikke noen effekt for insulinsignalerer i forsøkene. Det så ut som om PIK75 også hemmet GSK-3 via en form for uspesifikk binding, siden GS fikk økt aktivitet med stigende mengde inhibitor. Selv om det ikke ble vist at β -, γ - eller δ -isoformen

var nødvendig for insulinsignalerings her, trenger ikke det å bety at de ikke har noen funksjon innen insulinsignalerings.

I et forsøk ble alle isoformene i Klasse I PI 3-K hemmet samtidig med hver sin spesifikke inhibitor, men uten at det skjedde noe med glukoseopptaket eller glykogen syntase aktivitet. Dette kan bety at andre enzymer i tillegg til Klasse I PI 3-K er med på å regulere insulinstimulering. Det kan ikke utelukkes at Klasse II PI 3-K, og da spesielt PI 3-KC2 α , kan ha en viktig rolle for insulinstimulert glukosetransport i muskel.

Koffein blokkerte insulinstimulert glukosemetabolisme, men hvilke mekanismer som ligger bak er ikke kjent. Det er usikkert om koffein har den samme virkningen på glukosemetabolismen i kroppen vår etter inntak av koffeinholdig mat og drikke.

PKB-inhibitoren viste i denne oppgaven at PKB-fosforylering medierer glukoseopptak, men klarte ikke å vise at PKB er nødvendig for aktivering av GS.

Det kan altså ikke konkluderes med at Klasse Ia PI 3-K er de viktigste isoformene som medierer insulinstimulert glukoseopptak eller insulinsignalerings i muskelceller. PI 3-K α hadde heller ikke like stor betydning for insulinsignalerings i muskel slik som tidligere antatt. Selv om forsøk i denne oppgaven viser at PKB har en rolle innen insulinsignalerings, så kan det se ut som om PKB ikke er nødvendig for alle trinn i signalveien, når redusert PKB-aktivitet ikke klarer å hemme GSA signifikant. Det var vanskelig å blokkere insulinstimulering i muskel kun ved å hemme enkelte enzymer spesifikt, men spørsmålet som da kan stilles er om disse inhibitorene har klart å hemme det man har ønsket i tilstrekkelig grad. Det er i tillegg svært mange enzymer og mediatorer som er med på å føre insulinsignaler videre i cellen, og de som har blitt omtalt i denne oppgaven er bare noen få av dem. Her har det blitt bekreftet at koffein påvirker insulinsignalerings i muskel ved høye konsentrasjoner, men om koffein påvirker glukosemetabolismen i kroppen ved fysiologiske konsentrasjoner, og om de skyldes effekter på PI 3-K, er usikkert. Det blir spennende å følge utviklingen på dette området for å se om det kan dukke opp nye legemidler mot type 2 diabetes, og om PI 3-K spiller en rolle i fremtidig behandling av denne sykdommen.

1 INNLEDNING

1.1 Bakgrunn

Diabetes er i sterk økning over hele verden. I år anslås det at 171 millioner mennesker har sykdommen (WHO). Det er estimert at antall personer med diabetes vil nå 300 millioner innen år 2020 (Cohen, 2006). Sykdommen er en av hovedårsakene til sykkelighet og dødelighet verden over (Saltiel & Kahn, 2001). Omkring 90 % av de som har diabetes har type 2 diabetes (Cohen, 2006), og mange er ennå ikke diagnostisert.

Uavhengig av matinntak har kroppen vår evnen til å holde glukosenivået i blodet innenfor et snevert grenseområde (4-8 mmol/l). Kroppens glukosemetabolisme er primært regulert av hormonet insulin som produseres i pankreas. Insulin stimulerer cellene til å ta opp glukose og lagre dette som glykogen, og dermed senke blodsukkeret etter et måltid. Et annet hormon som er med på å regulere blodsukkeret er glukagon. Glukagon skilles også ut av pankreas, og får blodsukkeret til å stige ved at det øker glykogenolyse (nedbrytning av glykogenlagre i leveren) og glukoneogenese (nydannelse av glukose). Skjelettmuskulatur står for mesteparten av kroppens insulinstimulerte glukoseopptak, og 70 - 90 % av glukosen i kroppen inkorporeres i glykogen i muskel (Jensen, 2004). Musklene er derfor det viktigste vevet i kroppen i forbindelse med opptak av glukose fra blodet. Skjelettmusklene er altså hovedsete for den nedsatte insulinfølsomheten i perifere vev som forekommer ved tilstander med insulinresistens.

Insulinresistens innebærer at den glukosesenkende effekten av en gitt insulinkonsentrasjon er mindre enn normalt. For å oppnå senking av glukosekonsentrasjonen kreves høyere insulinnivåer hos et individ med insulinresistens enn hos de med normal insulinfølsomhet. Som kompensasjon for insulinresistensen frisetter pankreas mer insulin enn normalt. Hyperinsulinemi er derfor et tegn på insulinresistens.

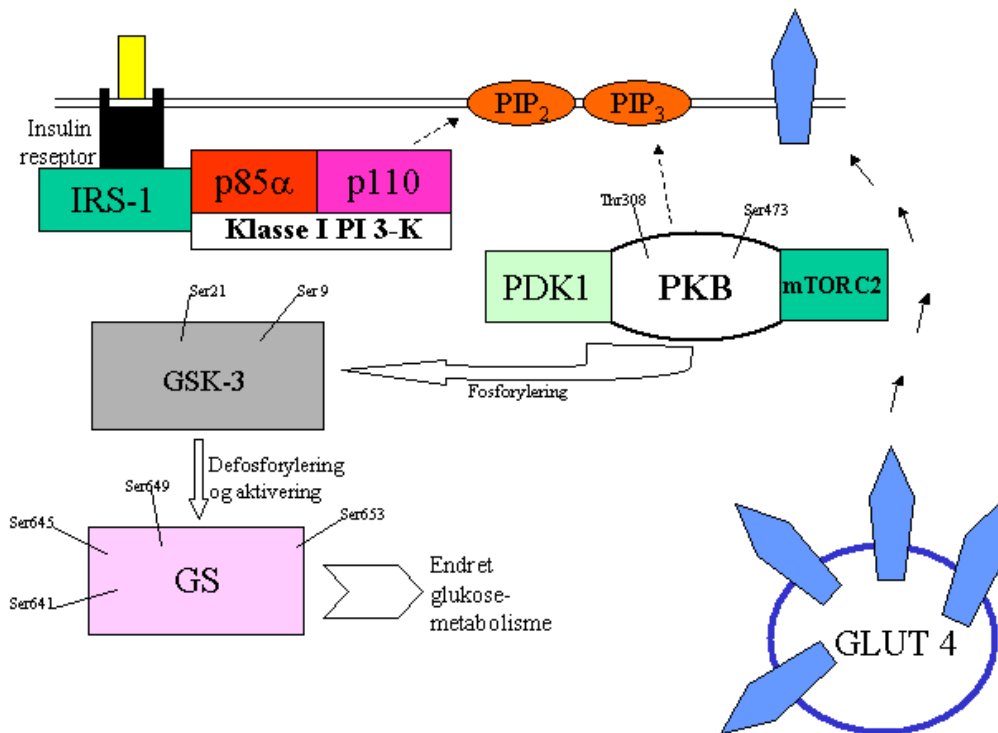
Det finnes flere risikofaktorer for å få type 2 diabetes - både genetiske faktorer og livsstilsfaktorer. De viktigste livsstilsfaktorene er overvekt og fysisk inaktivitet. Type 2 diabetes forekommer hyppigst etter fylte 40 år. Hos individer med insulinresistens finner man også ofte en abdominal fettfordistribusjon, samt dyslipidemi (høyt LDL-kolesterol, forhøyede

triglyserider og senket HDL-kolesterol) (SLV). Mange pasienter har god nytte av endringer i kosthold og økt fysisk aktivitet når de får diagnosen type 2 diabetes. Behandling med perorale antidiabetika kan lenge være tilstrekkelig. Men en etter hvert som sykdommen utvikler seg, forverres blodglukosekontrollen, og etter 5-10 år vil type 2 diabetikere som regel trenge insulintilførsel (SLV).

For å stille diagnosen diabetes er det vanlig å måle blodsukkeret i plasma. I 1998 satte Verdens helseorganisasjon (WHO) en ny terskelverdi for fastende blodglukose. Den nye verdien er 7 mmol/l. Fastende blodsukker måles om morgenen etter en natts faste. Dersom man har målt fastende blodsukker to ganger, og det er 7 mmol/l eller høyere hver gang, vil man få diagnosen diabetes. Verdier under 6 mmol/l betraktes som normalt. Blodsukker på 6 - 7 mmol/l ligger i grenseområdet, og kan være grunnlag for å undersøke hvordan kroppen håndterer en sukkerbelastning. Dette gjøres med en glukosebelastningsprøve, der den som undersøkes drikker en oppløsning med 75 g glukose (druesukker). Blodsukkeret måles så to timer senere. Personer med blodsukker på $\geq 11,1$ mmol/l får diagnosen diabetes (FHI). Andre blodprøver vil vise om man har type 1 eller type 2 diabetes. De fleste tilfellene som oppdages i voksen alder er type 2 diabetes. Verdier på 7,8 – 11,1 mmol/l etter en slik glukosebelastningsprøve er et tegn på nedsatt glukosetoleranse og tyder på et forstadium til type 2 diabetes (FHI).

Diabetes kan føre med seg komplikasjoner over tid. Hjerte-karsykdom, nyresvikt, skader i perifere nerver og blindhet som følge av retinopati kan bli noen av konsekvensene etter dårlig behandlet diabetes. Den vanligste årsaken til for tidlig død hos pasienter med type 2 diabetes er hjerte-karsykdom (SLV). Forekomst av hjerte-karsykdommer hos pasienter med type 2 diabetes er 3-5 ganger høyere enn hos individer uten diabetes (SLV). Behandling av diabetes og diabetesrelaterte senkomplikasjoner står for ca. 10 % av Europas årlige helseutgifter (Cohen, 2006). De høye kostnadene, sammen med en kraftig økning av antall nye tilfeller per år, er viktige årsaker til å investere i videre forskning innen behandling av type 2 diabetes – den ”moderne” epidemien.

1.2 Insulinsignalering



Figur 1.1 En forenklet illustrasjon av insulinsignalveien. For nærmere beskrivelse, se tekst.

Insulin produseres i bukspyttkjertelen og fraktes til insulinreseptor (IR) på utsiden av målcellene i kroppen via blodet. IR er en protein tyrosin-kinase, og består av to ekstracellulære α -subenheter og to transemembrane β -subenheter bundet sammen med disulfidbroer. Når insulin er bundet til α -subenhetene til IR fører dette til at β -subenhetene fosforylerer seg selv (autofosforylering), og den katalytiske enheten til reseptoren blir dermed aktivert. Deretter fosforyleres og aktiveres insulin reseptor substrat-1 (IRS-1). IRS-1 bidrar til økt aktivitet av phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). PI 3-K består en katalytisk og en regulatorisk subenhet. (Figur 1.1). De regulatoriske subenhetene har to SH2-domener som interagerer med phosphotyrosine-delen på IRS-1. Gjennom denne interaksjonen så rekrutteres PI 3-K til plasmamembranen, der den katalyserer konvertering av PIP₂ til PIP₃. PI 3-K aktiverer flere ulike proteiner ved å katalysere dannelsen av den sekundære budbringeren PIP₃ inne i cellen (Shepherd *et al.*, 1998). Proteiner med et PH-domene, f.eks. PKB og GSK-3, kan binde seg til PIP₃ og de vil da lokaliseres ved membranen hvor de så aktiveres (Taniguchi *et al.*, 2006). Den økte mengden PIP₃ i plasmamembranen resulterer i interaksjon med PH-domenet til Protein kinase B (PKB, også kalt Akt), og PKB lokaliseres ved membranen. Der fosforyleres PKB ved Thr³⁰⁸ av 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1).

PDK1 har også PH-domene, og er avhengig av økt mengde PIP₃ for å fosforylere PKB. PKB krever i tillegg fosforylering ved Ser⁴⁷³ for maksimal aktivering, og dette gjøres av et kinase-kompleks kalt Mammalian target of rapamycin complex-2 (mTORC2) (Pearce *et al.*, 2007). PKB består av tre isoformer (alfa, beta og gamma), men PKB α og PKB β er de viktigste PKB-isoformene i skjelettmuskulatur (Ruzzin *et al.*, 2005).

Glykogen syntase kinase-3 (GSK-3) er en serin-threonin-kinase som er med på å regulere glykogen syntase (GS). GSK-3 har to isoformer: GSK-3 α (51 kDa) og GSK-3 β (47 kDa). GSK-3 β er isoformen som antas å være viktigst mht. regulering av insulinstimulert glykogensyntese (Summers *et al.*, 1999), og ved å utføre forsøk på mus så har det blitt vist at GSK-3 β -isoformen er en viktigere aktivator av GS i muskel enn GSK-3 α -isoformen (McManus *et al.*, 2005). Enzymet er normalt aktivt, men hemmes under insulinstimulering. Når PKB er aktivert, reduserer den aktiviteten til GSK-3 ved å fosforylere GSK-3 α Ser²¹ og GSK-3 β Ser⁹. Når GSK-3 har nedsatt aktivitet, defosforyleres og aktiveres glykogen syntase (GS). Normalt fosforylerer GSK-3 GS på fire steder (Ser⁶⁴¹, Ser⁶⁴⁵, Ser⁶⁴⁹ og Ser⁶⁵³), hvilket holder GS inaktiv (McManus *et al.*, 2005). En PKB-avhengig mekanisme bidrar altså direkte til aktivering av GS via GSK-3 (se Figur 1.1).

I mennesker blir over 70 % av glukose som transporteres inn i muskelcellene lagret som glykogen (Whiteman *et al.*, 2002). Insulin promoterer glykogensyntese både ved å øke glukosetransporten og ved å aktivere GS, som katalyserer det siste og hastighetsbestemmende trinnet i glykogensyntesen. Regulering av GS er kompleks og involverer en rekke faktorer: translokering av GS til plasmamembranen, tilstedeværelse av glukosemetabolitter og insulin, hemmende fosforylering på serin av ulike kinaser, og aktiverende defosforylering på Ser/Thr (Whiteman *et al.*, 2002).

Glukosetransportør-4 (GLUT4) står hovedsakelig for opptaket av glukose i skjelettmuskulatur (Figur 1.1). Muskelcellene syntetiserer insulin-sensitive GLUT4-proteiner som lagres i vesikler inne i cellene. Under normale tilstander (dvs. uten insulinstimulering), befinner GLUT4 seg hovedsakelig inne i de intracellulære vesiklene. Insulin stimulerer glukoseopptaket i skjelettmuskulatur ved translokering av GLUT4-vesiklene ut i cellemembranen. Transportørene blir på denne måten inkorporert i membranen og fasiliterer glukoseopptak. Disse transportørene frakter glukose inn i cellene med en hastighet 10-40

ganger raskere enn uten insulin (Whiteman *et al.*, 2002). Nøyaktig hvordan insulin stimulerer translokeringen av GLUT4 til plasmamembranen er ennå ikke kjent. Det første beviset for at PI 3-K er nødvendig for denne prosessen kom fra forsøk som viste at insulinstimulert rekruttering av GLUT4 til celleoverflaten ble fullstendig hemmet ved lave konsentrasjoner wortmannin (nM) (Shepherd *et al.*, 1998) (Se avsnitt 1.4.1.).

Mye tyder på at PKB regulerer glukosetransport og glykogensyntese, og at nedregulering av PKB derfor kan være en årsak til insulinresistens. PKB har vist å spille en viktig rolle for glukosetransport ved å rekruttere GLUT4-vesikler til plasmamembranen (Kohn *et al.*, 1996). Dette ble observert etter at en type konstitutivt aktiv PKB viste at den kunne øke glukosetransport og GLUT4-translokering i adipocytter - uten at insulin var tilstede (Kohn *et al.*, 1996). Dette indikerer at PKB kan regulere glukoseopptak. Men likevel så har flere studier funnet manglende korrelasjon mellom PKB-aktivering og glukosetransport i insulinsensitive celler. For eksempel så viste et forsøk, der cellene hadde en mutert form for PKB med 80 % redusert aktivitet, at insulinstimulert glukosetransport ikke var redusert (Kitamura *et al.*, 1998). Det kan være at en økning i PKB-aktivitet bidrar til, men ikke er nødvendig for stimulering av glukosetransport. Et substrat av PKB som har blitt koblet til translokering av GLUT4 er Akt-substrat på 160 kDa (AS160). Aktivert PKB fosforylerer og hemmer AS160. Som en følge av dette, så øker AS160 aktiviteten til proteiner som er med på å reorganisere cytoskjelettet i cellene, noe som bl.a. kreves for translokering av GLUT4 (Taniguchi *et al.*, 2006). Insulin induserer en rask og doseavhengig økning i fosforylering av AS160 (Cartee & Wojtaszewski, 2007), og data fra flere forsøk tilsier at AS160 regulerer insulinstimulert glukosemetabolisme i skjelettmuskel *in vivo* (Cartee & Wojtaszewski, 2007; Kramer *et al.*, 2006). Det er også foreslått at det finnes andre signalveier parallelt med PKB som er i stand til å mediere glukoseopptak (Whiteman *et al.*, 2002). PKB sin rolle innen regulering av GS har også vært usikker av den grunn at flere signalmolekyler som er med på å regulere GS ikke reguleres av PKB (Whiteman *et al.*, 2002). For å undersøke om PKB regulerer glukosetransport og glykogen syntase aktivitet, har en spesifikk PKB-inhibitor blitt brukt i denne oppgaven (Se avsnitt 1.4.3).

Patofysiologien bak insulinresistens er kompleks. Det gjenstår mye forskning på dette området, men noen teorier har man klart å komme frem til per i dag. Flere mener at PI 3-kinase er et enzym som spiller en viktig rolle for insulins virkning i kroppen (Shepherd, 2005). Høye nivåer av sirkulerende lipider er kjent for å redusere effekten av

insulinsignalering via PI 3-K, og det finnes bevis for at ulike typer fettsyrer kan bidra til insulinresistens (Shepherd, 2005). Dette kan for eksempel skje ved at insulin gir redusert aktivering av PI 3-K. Forhøyede glukosenivåer kan også føre til forverret insulinsignalering ved at PI 3-K får redusert aktivitet etter insulinstimulering i muskel (Shepherd, 2005). En annen mulig årsak til redusert PI 3-K aktivitet er direkte hemming via komponenter man får i seg via kosten. Koffein har vist å kunne hemme PI 3-K ved konsentrasjoner som det er mulig å oppnå ved inntak av kaffe og andre koffeinholdige drikker (Shepherd, 2005). Tidligere har det blitt utført kliniske studier som har vist at inntak av koffein over tid er assosiert med en statistisk signifikant lavere risiko for å utvikle type 2 diabetes (Salazar-Martinez *et al.*, 2004; Paynter *et al.*, 2006). Siden mange drikker kaffe daglig, så kunne det være interessant å undersøke koffeins effekt på insulinstimulert glukoseopptak og glykogen syntase aktivitet i muskel. Andre stoffer som har vist å kunne indusere insulinresistens og blokkering av signalering via PI 3-K er cytokiner og adipokiner, inkludert TNF α og IL-6 (Shepherd, 2005). PI 3-K er en klasse enzymer som består av flere isoformer. Det er vist at enkelte isoformer har større betydning enn andre mht. insulinsignalering. Dette har fått stor fokus i denne oppgaven, og de ulike isoformene beskrives nærmere under neste kapittel.

I forsøk der celler inneholdt en type GSK-3 β som ikke responderte på signalering fra PKB, førte dette til konstant undertrykking av GS-aktivitet under insulinstimulering i adipocytter (Summers *et al.*, 1999). Forsøk med en type konstitutivt aktiv PKB førte til at GSK-3 var under konstant hemming, og GS ble da aktivert uten insulinstimulering i muskelceller (Ueki *et al.*, 1998). Dette tyder på at GSK-3 har en viktig rolle med å regulere GS etter insulinstimulering. Forsøk utført av Ruzzin *et al.* (Ruzzin *et al.*, 2005) på dexametason-behandlede rotter har gitt dyrene redusert insulinstimulert PKB- og GSK-3-fosorylering, glykogensyntese og glukoseopptak i skjelettmuskel (Ruzzin *et al.*, 2005). Det som var interessant i disse forsøkene, var at ved å bruke en GSK-3-inhibitor (CHIR-637) ble glykogen syntase aktivert i musklene til disse dexametason-behandlede rottene (Ruzzin *et al.*, 2005). Hemming av GSK-3 førte ikke til økning i insulinstimulert glukoseopptak (Ruzzin *et al.*, 2005). Ved å bruke andre GSK-3-inhibitorer (CT-98014 og CT-98023) er det bevist at spesifikk hemming av GSK-3 øker insulins virkning på glukosetransport i skjelettmuskel hos insulinresistente rotter (Ring *et al.*, 2003). Selektiv hemming av GSK-3 har i tillegg vist å kunne forbedre insulinsignalering og glukosemetabolisme i muskelceller fra menneske (Nikoulina *et al.*, 2002). Ut i fra disse teoriene kunne det være ønskelig å syntetisere hemmere av GSK-3, og på denne måten etterligne insulins stimulerende effekt på GS og glukoseopptak.

GSK-3-inhibitorer representerer dermed en potensiell terapeutisk behandling for type 2 diabetikere.

Etter som stadig større deler av insulinsignalveien blir kjent, dukker det opp nye komponenter som kan være potensielle mål for legemidler mot type 2 diabetes. For eksempel kunne man kanskje tenke seg å utvikle aktivatorer av PI 3-K eller PKB for å oppnå en bedret insulinsignalerings. Det har blitt demonstrert at aktivering av PI 3-K, og dermed aktivering av PKB, er essensielt for nesten all insulinindusert lipid- og glukosemetabolisme (Asano *et al.*, 2007). Dette gjelder da både glukoseopptak og glykogensyntese. Et viktig aspekt ved dette er at det finnes studier som kan tyde på at mutasjoner i et gen som koder for PI 3-K sin katalytiske subenhet gir enzymet økt aktivitet, og at dette genet ofte er funnet mutert i tumorer (Bader *et al.*, 2005). Dersom insulinresistens kan overkommes ved å bruke legemidler som øker PI 3-K sin aktivitet, så kan utvikling av kreft være en potensiell bivirkning.

1.3 PI 3-K

Det ble tidlig i 1990-årene oppdaget at insulin stimulerte PI 3-K-aktivitet i celler som kunne kobles til en lang rekke tyrosin-fosforylerte proteiner (Shepherd, 2005). En stor del av forståelsen for hvordan PI 3-K deltar i celledesignalerings er takket være de to strukturelt forskjellige cellepermeable inhibitorene wortmannin og LY294002 (Chaussade *et al.*, 2007) (Figur 1.3). De to inhibitorene har gitt oss sterke bevis for at PI 3-kinase sin aktivitet er nødvendig for en rekke effekter insulin har i celler. Det har blitt vist at wortmannin, helt nede i nM-konsentrasjon, kan hemme PI 3-K samtidig som glukoseopptaket blokkeres (Shepherd, 2005). Disse funnene har fått opp interessen for de ulike isoformene av PI 3-K: hvilke som er involvert i PI 3-K sine effekter, hvordan insulin regulerer PI 3-kinaser og om svikt av insulinsignalerings gjennom PI 3-K kan bidra til utviklingen av insulinresistens.

PI 3-kinase familien består av totalt 8 enzymer delt inn i tre klasser (I, II, og III) basert på sammenligninger av sekvensene på enzymene. Disse isoformene reguleres på ulike måter og har forskjellige substrater (Figur 1.2). PI 3-kinaser fosforylerer inositol lipider ved 3' posisjon på inositol-ringen og katalyserer syntesen av de sekundære budbringerne PI(3)P, PI(3,4)P₂ og PI(3,4,5)P₃ (Knight *et al.*, 2006). Disse tre lipidene kontrollerer diverse fysiologiske prosesser

i flere typer celler, som bl.a. inkluderer cellevekst, differensiering og insulinsignalering (Shepherd, 2005). Klasse I PI 3-kinase kan igjen deles inn i klasse Ia og Ib. Klasse Ia PI 3-kinasene er heterodimerer som består av en katalytisk (p110 α , p110 β , p110 δ) og en regulatorisk enhet som oftest er på 85 kDa. Aktivering av den katalytiske subenheten avhenger av interaksjonen mellom de to SH2-domenene til den regulatoriske subenheten og phosphotyrosine-delen på IRS-1. Eksperimenter som involverte mikroinjeksjon av antistoffer spesifikk for den katalytiske subenheten til Klasse I PI 3-K har demonstrert at disse kreves for GLUT4 translokering (Hausdorff *et al.*, 1999). Klasse I PI 3-K har i tillegg vist at de syntetiserer PIP₃ i plasmamembranen etter aktivering (Hawkins *et al.*, 2006). Det antas at det hovedsakelig er Klasse Ia PI 3-K som medierer mange av insulins effekter på glukose- og lipidmetabolismen (Shepherd *et al.*, 1998). Av Klasse Ia PI 3-kinasene er det α - og β -isoformen som er mest utbredt i insulinsensitivt vev, mens δ -isoformen hovedsakelig er uttrykt i leukocytter (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Dette er en av grunnene til at man antar at α - og β -isoformen er viktigst mht. insulinsignalering i muskel.

Klasse Ib PI 3-kinase har kun ett enzym, PI 3-K γ , som også har en katalytisk enhet på 110 kDa. I stedet for en regulatorisk enhet på 85 kDa danner den en heterodimer med et regulatorisk protein på 101 kDa. PI 3-K γ aktiveres av G-proteinkoblede reseptorer (Shepherd, 2005). Aktivering av Klasse Ib PI 3-K fører også til syntese av PIP₃ i plasmamembranen (Andrews *et al.*, 2007), slik som hos resten av Klasse I PI 3-K. PI 3-K γ er lite utbredt i insulinsensitivt vev, og det er derfor antatt lite sannsynlig at Klasse Ib PI 3-K er involvert i insulinsignalering (Shepherd, 2005). PI 3-K γ knockout-mus har vist at denne isoformen først og fremst spiller en viktig rolle for inflammasjon, og at den kreves for at motiliteten til makrofager skal fungere optimalt (Walker *et al.*, 2000). De fleste ligandene som aktiverer Klasse Ib PI 3-K er involvert i å aktivere kroppens respons på skade og infeksjon gjennom regulering av flere celletyper i immunsystemet (Andrews *et al.*, 2007; Hawkins *et al.*, 2007). Mus som mangler den katalytiske subenheten p110 γ er resistente mot utviklingen av flere inflammatoriske sykdommer (Andrews *et al.*, 2007). Disse resultatene er med på å underbygge teorien om at Klasse Ib PI 3-K sin viktigste rolle ligger i reguleringen av inflammasjon i kroppen.

Class	Structural features of catalytic subunits	Subunits			
		Catalytic	Adaptor	Regulation	Lipid substrate specificity
I		p110 α,β,δ	p85 α p55 α p50 α p85 β p55 γ	Receptor tyrosine kinases and RAS (p110 β is also regulated by G-protein-coupled receptors)	PIP ₂ PIP ₃ PI
		p110 γ	p101 p84	G-protein-coupled receptors and RAS	PIP ₂ PIP ₃ PI
II		PI3K-C2 α,β,γ	?	Receptor tyrosine kinases? G-protein-coupled receptors?	PIP ₂ PI
III		Vps34p analogues	p150	Constitutive?	PI

Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Figur 1.2 Her vises PI 3-K-proteinene inndelt i tre klasser, som varierer med hensyn til struktur, substrater, vevsdistribusjon, mekanisme for aktivering, samt funksjon. Figuren er fra en artikkel av Bader et al. (Bader *et al.*, 2005). Verken Klasse II PI 3-kinase eller Klasse III PI 3-kinase har så langt vist seg å være i stand til å produsere PIP₃, men de er alle i stand til å bruke PI som substrat til å danne phosphatidylinositol 3-phosphate PI(3)P og PI(3,4)P₂ (Knight *et al.*, 2006;Shepherd, 2005).

Hvilken rolle de ulike isoformene har, krever bruk av isoform-spesifikke inhibitorer. Siden wortmannin og LY294002 er såkalt bredspektrede inhibitorer av PI 3-K, klarer de ikke å skille mellom de 8 isoformene, og gir ingen informasjon om hvilke isoformer som er involvert i insulinsignalering. Det kan virke som om α -isoformen og β -isoformen av Klasse Ia PI 3-K har ulike roller, siden de har forskjellige kinetiske egenskaper (Shepherd, 2005). PI 3-K β er antatt å spille en viktig rolle for utvikling av trombose (Hawkins *et al.*, 2006), mens man tror PI 3-K α er den viktige isoformen med hensyn til insulinsignalering (Foukas *et al.*, 2006). Studiene på PI 3-K α ble utført på mus som hadde et mutert gen. Det muterte genet førte til at musene utviklet p110 α med svak aktivitet. Dette førte til at signalering via insulin ble redusert i form av at forsøksdyrene utviklet glukoseintoleranse, hyperinsulinemi og hadde redusert vekst (Foukas *et al.*, 2006). For å finne ut mer om dette, har det blitt brukt isoformselektive inhibitorer av Klasse Ia PI 3-kinasene for å utforske rollene til de ulike p110-isoformene. Dette inkluderer bl.a. p110 α -spesifikke inhibitorer (PIK75 og PI103), en p110 β -spesifikk inhibitor (TGX221) og en p110 δ -spesifikk inhibitor (IC87114) (Se avsnitt 1.4.2). Hemming

av p110 β eller p110 δ alene var ikke tilstrekkelig til å blokkere insulinsignalering til PKB i disse forsøkene, mens da isoformspesifikke hemmere av p110 α ble tilsatt, ble insulinsignaleringen svekket (Chaussade *et al.*, 2007). Dette styrker teorien om at p110 α er isoformen som medierer insulinsignalering. Til tross for dette så har isoformspesifikke hemmere av p110 α hatt minimal effekt på glukosemetabolismen (P. R. Shepherd, upubliserte resultater) (Shepherd, 2005). Det har også blitt gjort forsøk der genene som koder for p110 α eller p110 β var slått ut hos mus. Dette førte til at musene døde (Chaussade *et al.*, 2007). Men heterozygote mus (dvs. der ett av to gen var slettet, og dyrene uttrykte en form av p110-isoformen som hadde redusert aktivitet) har var levedyktige. Hos disse har det vært mulig å studere glukosemetabolisme og insulins effekt. Forsøkene viste at verken p110 α (+/-)- eller p110 β (+/-)-mus var insulinresistente, men kombinert heterozygot sletting av begge genene gav mus som var glukoseintolerante og hadde hyperinsulinemi (Brachmann *et al.*, 2005). Dette kan tyde på en slags form for "samarbeid" mellom disse to isoformene innen insulinsignalering.

Det finnes en studie til der det også har blitt brukt selektive PI 3-K-inhibitorer. Her klarte p110 α -inhibitorerne PI103 og PIK 75 også å blokkere insulinstimulert fosforylering av PKB i muskelceller (Knight *et al.*, 2006). Begge disse hemmer p110 β i tillegg til p110 α , men til dette kreves langt høyere konsentrasjoner (Knight *et al.*, 2006). Inhibitorer av p110 β eller p110 δ klarte ikke å påvirke insulinstimulert fosforylering av noen proteiner i PI 3-K-signalveien (Knight *et al.*, 2006). Data fra disse forsøkene indikerer også at p110 β og p110 δ har mindre betydning innen insulinsignalering i muskel sammenlignet med p110 α (Knight *et al.*, 2006). I et forsøk ble aktiviteten til p110 α og p110 β undersøkt. Kinaseaktiviteten til både p110 α og p110 β var økt etter at muskelceller var behandlet med insulin, men den relative aktiviteten til hver isoform indikerte at p110 α er den mest dominante isoformen (Knight *et al.*, 2006).

Ved å hemme PI 3-K α med PI103 og PIK75, så har man klart å blokkere produksjonen av PIP₃ i muskelceller (Knight *et al.*, 2006). Insulinstimulert produksjon av PIP₃ er mest sensitiv for p110 α -inhibitorer, og p110 β -inhibitorer har ikke vist å kunne påvirke PIP₃-produksjonen i muskelceller (Knight *et al.*, 2006). Det er foreslått at p110 β sin PIP₃-produksjon ikke kobles direkte til PKB-aktivering (Knight *et al.*, 2006). Det er undersøkt om p110 β (evt. også p110 δ)

heller bidrar til en slags basal oppsamling av PIP₃ som ikke nødvendigvis må være tilstede for at PKB skal aktiveres. Det betyr at det er et basalt nivå av PIP₃ i cellen som definerer hvor stor andel aktivt p110 α som trengs for at signalveien skal aktiveres. Denne hypotesen ble testet, og det ble funnet ut at IC₅₀ for PIK75 (målt som PKB Ser⁴⁷³-fosforylering) ble nesten åtte ganger lavere i muskelceller når p110 β/δ -inhibitoren TGX115 også var tilsatt (Knight *et al.*, 2006).

Det er i dag usikkert hva som er funksjonen til de tre isoformene i Klasse II PI 3-kinase (PI 3-KC2 α , PI 3-KC2 β og PI 3-KC2 γ). Men det har blitt gjort interessante funn når det gjelder α -isoformen. PI 3-KC2 α produserer PI(3)P etter insulinstimulering (Falasca *et al.*, 2007). Det ble vist at PI 3-KC2 α bidrar til maksimal insulin-indusert translokering av glukosetransportøren GLUT4 til plasmamembranen og påfølgende økt glukoseopptak (Falasca *et al.*, 2007). Eksogent PI(3)P har vist at det kan indusere GLUT4-translokering i celler (Falasca *et al.*, 2007). Teorien om at PI(3)P kan være nødvendig for glukosetransport har blitt forsterket etter at forsøk ble utført på celler som hadde overuttrykking av myotubularin. Myotubularin er en spesifikk PI(3)P-fosfatase. I celler der denne var overuttrykt, var GLUT4-translokering redusert under insulinstimulering (Chaussade *et al.*, 2003). Altså er det demonstrert at PI 3-KC2 α spiller en viktig rolle innen regulering av GLUT4-translokering og glukoseopptak, noe som gir denne en plass innen insulinsignalering. Klasse II PI 3-K er generelt lite sensitive for PI 3-K-inhibitorer, og PI 3-KC2 α hemmes verken av wortmannin eller LY294002 (Falasca *et al.*, 2007).

1.4 Inhibitorer

De siste årene har flere små, cellepermeable inhibitorer av protein kinaser blitt utviklet. Disse har en relativt høy grad av spesifisitet for utvalgte proteiner, og kan være svært nyttige for å identifisere disse proteinenes fysiologiske substrater og cellulære funksjoner. Å skape inhibitorer som kan skille mellom nært beslektede kinaser er en stor utfordring. De fleste protein kinase inhibitorer som har blitt laget til farmasøytiske formål virker ved å konkurrere med det ATP-bindende setet på enzymet (Walker *et al.*, 2000). Til tross for at protein kinasene har store likheter i ATP-setet, så har det likevel vært mulig å lage inhibitorer som er spesifikke fordi de har utnyttet ulikheter i måten ATP interagerer med setet på (Walker *et al.*,

2000). For eksempel så har tre forskjellige potente, selektive p110 α -inhibitorer to ting til felles. For det første så inntar de en flat konformasjon i det ATP-bindende setet, i motsetning til inhibitorer som er mindre selektive som ofte strekker seg utenfor setet (Knight *et al.*, 2006). For det andre så har det vist seg at de mest potente inhibitorene trenger inn i et dypere sete som ikke okkuperes av ATP, men som likevel hindrer enzymet i å aktiveres (Knight *et al.*, 2006).

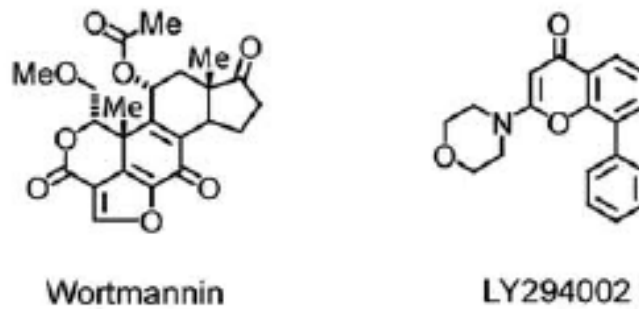
1.4.1 Uspesifikke PI 3-K-inhibitorer

Wortmannin er en uspesifikk PI 3-K-inhibitor (Figur 1.3), som i utgangspunktet er et antibiotikum produsert av soppen *Penicillium wortmanni*. Den har IC₅₀ helt nede i nM konsentrasjon for Klasse I PI 3-K og Klasse III PI 3-K (Shepherd *et al.*, 1998). IC₅₀ for Klasse II PI 3-K er høyere enn for Klasse I PI 3-K, og det kreves høyere konsentrasjoner enn det som har blitt brukt her i oppgaven for å klare å blokkere PI 3-KC2 α (Knight *et al.*, 2006). Ved konsentrasjoner på μ M-nivå kan wortmannin også hemme andre enzymer, f.eks. PI 4-kinase og mTOR, som også er med i PI 3-kinasefamilien (Bain *et al.*, 2007). LY294002 er en annen uspesifikk PI 3-K-inhibitor som har blitt laget syntetisk, men som er mindre potent enn wortmannin (Tabell 1.1). Selv om LY294002 er mindre potent, så brukes den mye innen cellebiologi som en PI 3-K-inhibitor fordi den er mer stabil i løsning enn wortmannin (Walker *et al.*, 2000). LY294002 hemmer Klasse I PI 3-K ved 10-50 μ M-konsentrasjon (Bain *et al.*, 2007). LY294002 kan også hemme andre kinaser ved samme konsentrasjoner som hemmer PI 3-K, bl.a. GSK-3 (Bain *et al.*, 2007). Klasse II PI 3-K er relativt resistente mot LY294002 (Shepherd *et al.*, 1998).

Wortmannin og LY294002 hemmer PI 3-K, samtidig som de hemmer insulinstimulert GLUT4-translokering (Shepherd *et al.*, 1998). I tillegg så blokkerer både wortmannin og LY294002 insulinstimulert aktivering av GS og glykogensyntese (Shepherd *et al.*, 1998). Dette er et tegn på at PI 3-K bidrar til økt glukoseopptak og aktivering av GS etter stimulering med insulin.

Som med alle typer inhibitorer, er det selvsagt muligheter for at wortmannin og LY294002 også hemmer andre enzymer. Derfor må man være forsiktig med å trekke altfor strenge

konklusjoner som bygger på resultater som alene er basert på disse inhibitorene. Et problem er at disse stoffene hemmer alle klassene av PI 3-K i varierende grad, så det er vanskelig å definere Klasse I PI 3-K sin rolle kun ved å bruke wortmannin og LY294002.



Figur 1.3 Strukturer av de to uspesifikke PI 3-K-inhibitorene wortmannin og LY294002 (Knight *et al.*, 2006).

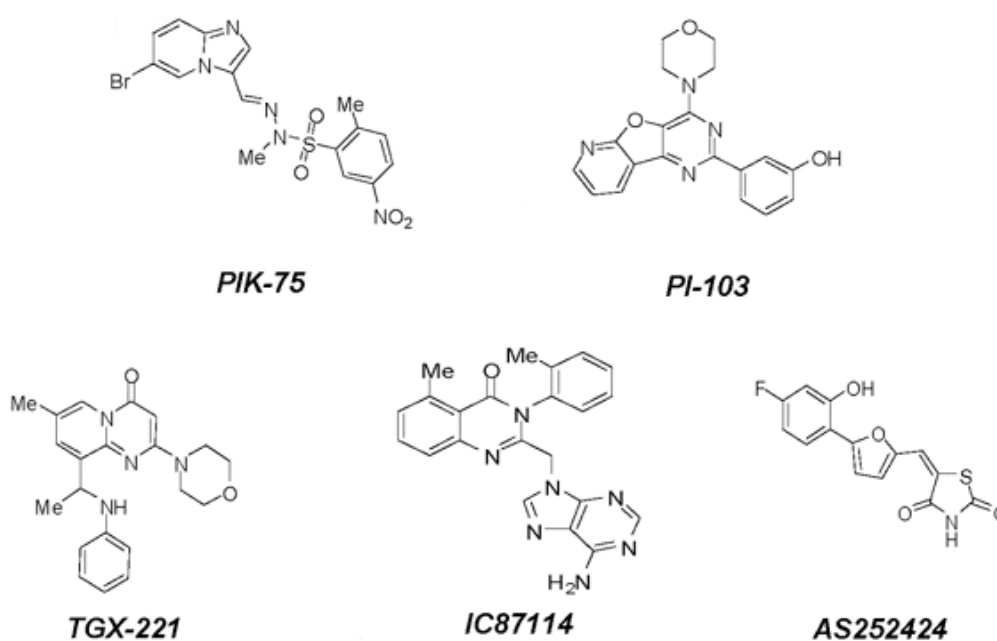
1.4.2 Spesifikke PI 3-K-inhibitorer

Det er utviklet en rekke inhibitorer som skal skille mellom de ulike PI 3-K-isoformene. De som er blitt brukt i denne oppgaven har som mål og hemme isoformene i Klasse I PI 3-K. De er tegnet i Figur 1.4, og listet opp her:

- PIK75 (p110 α -inhibitor)
- PI103 (p110 α -inhibitor)
- TGX221 (p110 β -inhibitor)
- AS252424 (p110 γ -inhibitor)
- IC87114 (p110 δ -inhibitor)

Grunnen til at isoformselektive PI 3-K-inhibitorer ofte blir brukt til studier av p110-isoformer, er fordi homozygote knockout-dyr (der gener er fjernet) ikke er levedyktige, og at p85-enheten i PI 3-K er nedregulert hos heterozygote dyr (Knight *et al.*, 2006), noe som gjør det vanskelig å se på aktiviteten til p110.

Til tross for at inhibitorene som er syntetisert skal være spesifikke, så er det noen av inhibitorene som også hemmer flere PI 3-K-isoformer eller andre proteiner (Knight *et al.*, 2006). Det er spesielt dersom man øker konsentrasjonen inhibitor at de vil kunne hemme flere PI 3-K-isoformer (Knight *et al.*, 2006). Dette kan løses ved å ikke bruke høyere konsentrasjoner enn nødvendig. Inhibitorer som hemmer p110 α har en tendens til å hemme p110 γ samtidig, mens inhibitorer av p110 β ofte hemmer p110 δ samtidig, og omvendt (Knight *et al.*, 2006). Det er altså vanskelig å finne inhibitorer som selektivt skiller mellom hemming av p110 α / p110 γ og p110 β / p110 δ . PI 3-K α -inhibitorene PI103 og PIK75 hemmer også PI 3-K β ved hhv. 10-30 og >200 ganger høyere konsentrasjon enn hva som skal til for å hemme α -isoformen (Knight *et al.*, 2006). PIK75 sin selektivitet overfor PI 3-K α er altså sterk sammenlignet med PI 3-K β .



Figur 1.4 Strukturer av isoformspesifikke PI 3-K-inhibitorer: PIK75 og PI103 (α -inhibitorer), TGX221 (β -inhibitor), AS252424 (γ -inhibitor) og IC87114 (δ -inhibitor) (Chaussade *et al.*, 2007).

Tabell 1.1 IC₅₀-verdier (nM) for Klasse I PI 3-K-inhibitorers effekt på lipid kinase aktivitet. Verdiene viser gjennomsnitt ± standardavvik, og er hentet fra en artikkel av Chaussade et al. (Chaussade *et al.*, 2007).

	p110α	p110β	p110δ
PIK75	7,8 ± 1,7	343 ± 23	907 ± 32
PI103	3,7 ± 0,5	18,2 ± 1,8	> 500
TGX221	> 1000	8,5 ± 0.9	211 ± 18
IC87114	> 1000	> 1000	60,2 ± 5,6
Wortmannin	0,57	2,33	0,40
LY294002	500	973	570

AS252424 ble testet i et annet forsøk der det ble vist at stoffet hadde svært høy spesifisitet overfor PI 3-K γ , med en IC₅₀ på 30 ± 10 nM (og IC₅₀ for Klasse I PI 3-K var > 1000 nM) (Pomel *et al.*, 2006).

1.4.3 PKB-inhibitor

SN30978 (Akti-1/2) er en selektiv inhibitor av PKB, men har størst spesifisitet overfor PKB α og PKB β (DeFeo-Jones *et al.*, 2005). Denne inhibitoren virker spesifikt på PKB ved å interagere med PH-domenet som PDK1 er avhengig av for å kunne aktivere PKB (DeFeo-Jones *et al.*, 2005). For å være sikker på at ikke PI 3-K ble hemmet av SN30978, ble PI 3-K aktivitet testet under forsøk med inhibitoren. Det ble da vist at SN30978 ikke reduserer aktiviteten til PI 3-K α ,- β eller - δ helt opp til 5 μ M konsentrasjon (samarbeid med C. Chaussade og P. R. Shepherd, University of Auckland Medical School, New Zealand).

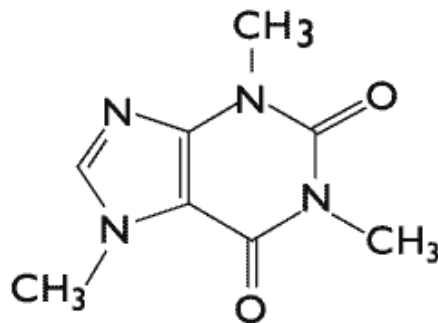
1.4.4 Koffein

Koffein og teofyllin, naturlige innholdsstoffer i kaffe og te, er klassifisert som methylxanthiner. Disse kan finnes sirkulerende i kroppen i μ M-konsentrasjoner etter inntak via kosten eller legemidler (Foukas *et al.*, 2002). For personer som drikker kaffe daglig, så

kan plasmakonsentrasjonen av koffein normalt ligge mellom 20 – 50 μM , og det er sjelden den overstiger 70 μM (Graham, 2001). Til informasjon, så vil én kopp kaffe på 150 ml kunne gi en koffeinkonsentrasjon i plasma på inntil 10 μM (Fredholm *et al.*, 1999). Koffein og teofyllin har blitt studert nøye for å forsøke å bestemme hvordan de virker i kroppen ved fysiologiske konsentrasjoner, og flere effekter har blitt knyttet til disse stoffene. Noen av disse er stimulering av muskelkontraksjon, antiinflammatoriske- og immunmodulerende effekter og endringer i glukosemetabolisme (Foukas *et al.*, 2002). I tillegg så har det lenge vært kjent at disse methylxanthinene også har en hemmende effekt på phosphoinositide-metabolisme (Foukas *et al.*, 2002), selv om det er usikkert hvordan.

Da effekten av methylxanthiner på PI 3-kinasenes enzymatiske aktivitet ble undersøkt, ble det funnet ut at koffein hemmer Klasse I PI 3-kinaser (Foukas *et al.*, 2002). Koffein hemmer de forskjellige Klasse I PI 3-K-isoformene i ulik grad:

- $\text{IC}_{50} = 400 \mu\text{M}$ for p110 α og p110 β
- $\text{IC}_{50} = 1 \text{ mM}$ for p110 γ
- $\text{IC}_{50} = 75 \mu\text{M}$ for p110 δ



Figur 1.5 Strukturformelen til koffein

Teofyllin har vist lignende effekter som koffein (Foukas *et al.*, 2002). I musculus soleus fra rotter har koffein vist å kunne blokkere insulinstimulert PKB-aktivering med IC_{50} -verdi lik hemming av PI 3-K (Foukas *et al.*, 2002). Koffein har også blokkert insulinstimulert glukosetransport (Foukas *et al.*, 2002). Disse resultatene har demonstrert at koffein, og en rekke andre methylxanthiner, er direkte inhibitorer av PI 3-K-aktivitet (Foukas *et al.*, 2002). PI 3-K δ er isoformen som hemmes kraftigst med koffein, og hemming av denne kan forklare noen av de fysiologiske og farmakologiske egenskapene koffein har iht. insulinisering (Foukas *et al.*, 2002). Det var derfor interessant å teste koffein sin effekt på insulinisering

og glukoseopptak i denne oppgaven, for å se om det kan finnes en sammenheng med kaffeinntak og insulinresistens. Dette kan sammenlignes med resultater fra IC87114 for å se om PI 3-K δ kan ha sammenheng med koffein sine effekter.

1.5 Formål

Formålet med denne oppgaven var å finne ut mer om hvilke isoformer av PI 3-kinase som medierer insulinsignalerings i celler. De ulike PI 3-K-inhibitorene som ble brukt skulle hemme alle eller enkelte isoformer av enzymet. Ved å bruke de ulike spesifikke inhibitorene, var ønsket å undersøke om PI 3-K-isoformene har varierende betydning med hensyn til ulike faktorer som glukoseopptak og regulering av forskjellige trinn i insulinsignalveien. Det var spesielt interessant å se på om Klasse Ia PI 3-K var de viktigste isoformene for insulinstimulering i muskel. En inhibitor var rettet direkte mot PKB. Koffein ble også testet, for å se hva slags effekt det har på insulinsignaleringsen.

Følgende spørsmål ble stilt:

1. Klarer man å blokkere insulinstimulert glukoseopptak og signalering med de uspesifikke PI 3-K-inhibitorene wortmannin og LY294002?
2. Er den selektive inhibitoren av PI 3-K α (PIK75) i stand til å påvirke insulinstimulert glukoseopptak og/eller signalering, slik antatt?
3. Klarer man å påvirke glukosemetabolismen med PI 3-K β -inhibitoren TGX221?
4. Påvirkes insulinstimuleringen ved tilsetning av selektive inhibitorer av PI 3-K γ eller PI 3-K δ ?
5. Hva skjer med insulinstimulert glukoseopptak og signalering etter tilsetning av koffein?
6. Klarer PKB-inhibitoren SN30978 å påvirke insulinstimulert glukoseopptak og/eller signalering?
7. Kan man så ut i fra dette si noe om Klasse Ia PI 3-K, og da særlig PI 3-K α , er isoformene som medierer insulinstimulert glukoseopptak og signalering i muskelceller?

2 MATERIALER OG METODER

2.1 Rotter

Rottene som ble benyttet i forsøkene kom fra B & K Universal (Nittedal, Norge) og var av typen Wistar, hannrotter (Figur 2.1). Det var 4 rotter pr. bur, og disse gikk sammen i dyrestallen på Statens arbeidsmiljøinstitutt frem til forsøksdagen. I dyrestallen var temperaturen $22,5 \pm 1$ °C, med en luftfuktighet på $50 \% \pm 10 \%$. Lys/mørke syklusen var 12/12 timer (lys fra 06.00 til 18.00). Rottene hadde fri tilgang til mat og vann døgnet rundt. Fôret var sammensatt av 18 % protein, 7 % fett og 75 % karbohydrater (B & K Universal). 8-12 rotter, med en gjennomsnittlig vekt på ca. 140 g, ble benyttet til hvert forsøk. Forsøkene i oppgaven var godkjent av ansvarshavende ved Statens arbeidsmiljøinstitutt, og fulgte norske lover og forskrifter som kontrollerer eksperimenter på dyr. Den norske lovgivningen på dette området er fastsatt i henhold til Europakonvensjonen for beskyttelse av vertebrale dyr for eksperimentelle og andre vitenskapelige formål av 18. mars 1986 (gjort gjeldende i Norge fra 1. januar 1991).



Figur 2.1 Wistar hannrotte

2.2 Isolering og inkubering av musculus soleus

Buffer til inkubering av muskler (Krebs-Henseleit buffer) ble laget forsøksdagen (se Appendiks 2). Før start av forsøket ble de ulike løsningene laget ved å ta uttak av bufferen og tilsette ønsket konsentrasjon inhibitor og insulin. Alle inhibitorer ble løst i DMSO*.

Løsninger uten inhibitor (kontrollprøver, og løsninger med kun insulin) ble også tilsatt DMSO for å oppnå like forutsetninger for alle musklene. Insulin (10 mU/ml) ble tilsatt alene og sammen med inhibitor. Utstyr til inkubering ble satt opp (Figur 2.2 og 2.3). Nummererte reagensrør ble fylt med 3,5 ml av de ulike innkuberingsløsningene (Figur 2.4), og i rørene ble det satt apparat for kontraksjon til å feste musklene på (Figur 2.5). Apparatur ble koblet til gass, slik at alle løsninger kontinuerlig ble gasset med 95 % O₂/5 % CO₂. Reagensrørene ble plassert i vannbad som holdt +30 °C, ca. 10 minutter før inkubering.

Rottene ble anestesert med en intraperitoneal injeksjon av ca. 10 mg pentobarbital (50 mg/ml løsning). Deretter ble rottene festet på et disseksjonsapparat for å dissekere ut m. soleus.

M. soleus, som er en skjelettmuskel, befinner seg i leggen på dyrenes bakben. Hver muskel ble delt i to på langs med muskelfibrene, og hvert dyr gav fire muskelstrips til inkubering . Musklene ble festet med nåler i sin hvilelengde. Dyrene ble avlivet rett etter uttak av muskler.

Deretter ble musklene inkubert i halvannen time (Figur 2.8):

- 30 minutter i Krebs-Henseleit buffer (forberedende inkubering)
- 30 minutter med inhibitor (pre-inkubering)*
- 30 minutter sammen med insulin og samme mengde inhibitor som i punktet over

* I forsøket med koffein ble det ikke brukt DMSO og ikke gjort pre-inkubering.

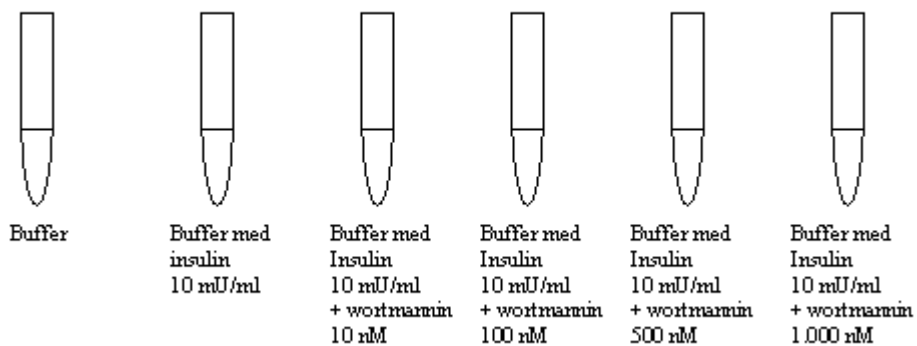
Etter inkubering ble musklene tørket forsiktig med rent trekkpapir, før de ble lagt i flytende nitrogen og fraktet til fryser (-70 °C) fram til videre analyse.



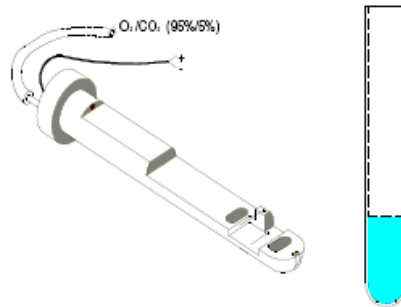
Figur 2.2 Forfatter som setter opp inkuberingsutstyr



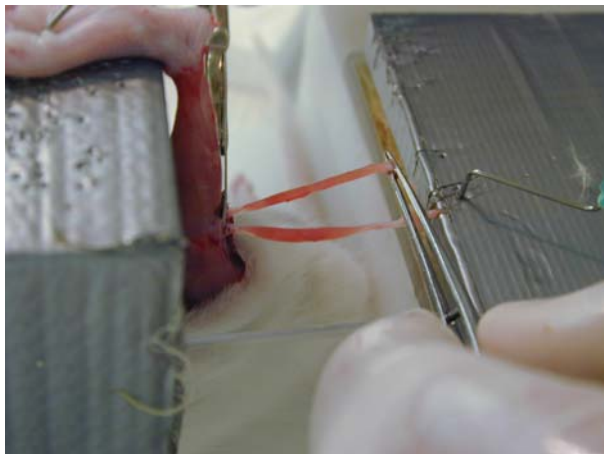
Figur 2.3 Inkuberingsutstyr klar til bruk



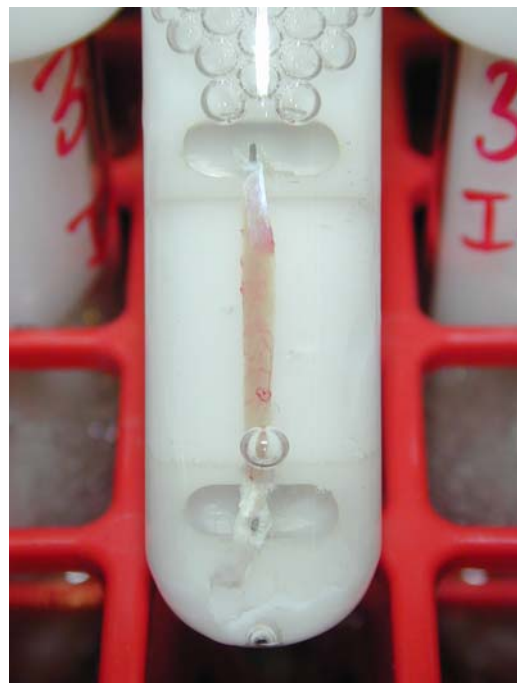
Figur 2.4 Illustrert eksempel for inkubering i ulike konsentrasjoner wortmannin



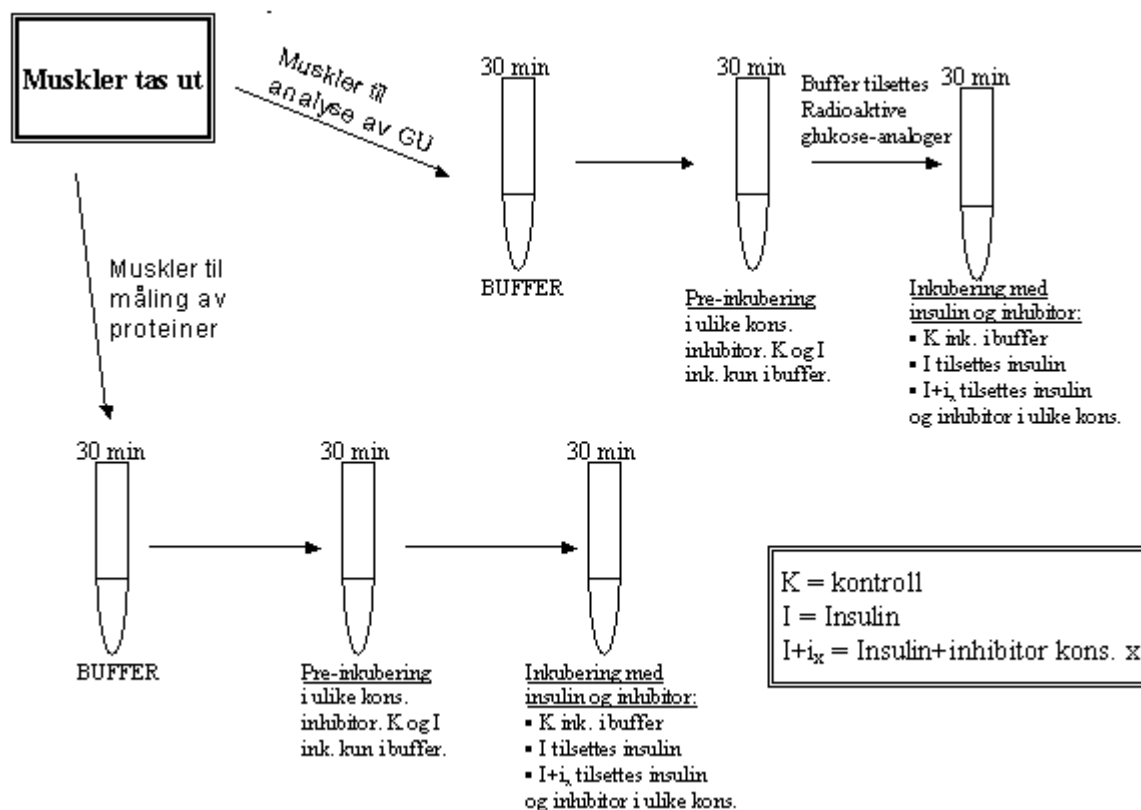
Figur 2.5 Apparat for inkubering av m. soleus.



Figur 2.6: Disseksjon av m. soleus



Figur 2.7 Inkubert muskel



Figur 2.8 Flytskjema for inkubering av muskel

2.3 Analyse av glukoseopptak vha. ³H-Deoxyglukose

Løsninger til muskler som skulle brukes til å måle glukoseopptak ble tilsatt ¹⁴C-Mannitol (0,1 µCi/ml) og ³H-Deoksyglukose (0,25 µCi/ml). Etter at musklene hadde vært inkubert med radioaktive glukose-analoger, ble musklene frysetørket i 3 timer og deretter veid. Muskelvevet ble løst i 500 µl 1 M KOH ved +70 °C i 20 minutter og mikset kraftig. Etter avkjøling ble 400 µl av hver prøve hatt i tellerør og tilsatt 3 ml tellervæske (Hionic Fluor; PerkinElmer). Disse ble mikset og satt til telling for radioaktivitet (d.p.m.) i en scintillasjonsteller (TRI-Carb 1900 TR; Packard).

Bakgrunn for beregning av glukoseopptak:

For å måle glukoseopptaket, ble inkuberingsbufferen tilsatt kjent mengde glukose, ³H-Deoxyglukose og ¹⁴C-Mannitol. Det ble antatt at glukose og ³H-Deoksyglukose ble transportert med samme kinetikk. Videre ble det antatt at konsentrasjonen av glukose,

^3H -Deoksyglukose og ^{14}C -Mannitol var den samme i ekstracellulærvæsken som i inkuberingsbufferen, og at ^{14}C -Mannitol ikke hadde gått inn i cellene under forsøket. Mengde total ^3H -Deoksyglukose i muskel (ekstra- og intracellulært) ble målt som d.p.m. Det var andelen som befant seg intracellulært som var av interesse. Andelen ^3H -Deoksyglukose som befant seg ekstracellulært ble beregnet ved hjelp av ^{14}C -Mannitol. Konsentrasjonen av ^3H -Deoksyglukose og ^{14}C -Mannitol var den samme i buffer og ekstracellulært rom, og dette ble målt ved å telle radioaktiviteten i buffer fra forsøksdagen. Når andelen intracellulært ^3H -Deoxyglukose, muskelbitens vekt og glukoseanalogens spesifikke aktivitet var kjent, kunne opptaket av ^3H -Deoxyglukose beregnes. For beregning av glukoseopptaket ble det antatt at forholdet mellom opptak av glukose og ^3H -Deoksyglukose var det samme som forholdet mellom konsentrasjonene av de to i ekstracellulærvæsken (inkuberingsbufferen). Glukoseopptaket var derfor lik opptaket av ^3H -Deoksyglukose multiplisert med forholdet mellom glukose og ^3H -Deoksyglukose i inkuberingsbufferen.

Glukoseopptaket ble regnet ut ved å legge inn tallene i regneark i Excel for Windows.

Det er svært viktig å ta forhåndsregler ved håndtering av radioaktivt materiale, så det var viktig å tenke på å:

- begrense seg til bruk av benk og utstyr merket for bruk til radioaktivt materiale
- bytte hansker ved pauser eller når arbeidsplassen blir forlatt
- ha benkepapir på arbeidsplassen
- kaste avfall (papir, rør spisser, brukte hansker) i egen avfallskontainer
- foreta grundig vask av utstyr etter bruk (glassutstyr, pipetter, stativer og lignende)

2.4 Homogenisering av muskler til måling av proteiner

Muskler som skulle homogeniseres ble først veid og delt opp i 2-3 biter ($-20\text{ }^\circ\text{C}$). Homogeniseringsbuffer ble laget samme dag og tilsatt røret med muskel i forholdet 1 : 25 (muskel (mg) : buffer (μl)) (se Appendiks 2). Muskelen ble homogenisert umiddelbart, 2 x 15 sekunder (Polytron PT1200, $+4^\circ\text{C}$). Prøvene ble rotert i 1 time i $+4\text{ }^\circ\text{C}$, og deretter sentrifugert i 10 min/ $+4\text{ }^\circ\text{C}/11500 \times g$. Supernatanten ble pipettert ut og volumet målt. Bunnfallet ble kastet. Fra hver prøveløsning ble det tatt ut 30 μl som ble fortynnet med 200 μl

deionisert vann. I tillegg ble det laget en standardrekke med 0, 5, 8, 12, 15 og 20 µg protein i kyvetten, og disse ble prøvene målt opp mot. Det ble også laget kontrollprøve av Seronorm (68,1 mg/ml) fortynnet 1 : 200 med deionisert vann. Til analyse ble det tatt ut 25 µl fra hver prøve, standarder og kontroll. Disse ble tilsatt BioRad Protein Assay og overført til plastkyvetter for bestemmelse av optisk tetthet (OD) ved 750 nm i et spektrofotometer. Etter bestemmelse av OD ble proteininnhold i homogenatene beregnet, og alle prøvene ble fortynnet til 2,5 µg/µl med homogeniseringsbufferen. 100 µl homogenat ble tatt ut (resten fryst ned -70 °C) og tilsatt 6,2 µl 2-mercaptoetanol og 25 µl 5×SDS (se Appendiks 2).

2-Mercaptoetanol knekker S-bindingene i proteinet. Prøvene ble varmet opp ved +95 °C i 5 minutter og så avkjølt. Prøvene var da klargjort til applisering på gelene. Disse ble som oftest fryst ned -20 °C og tint samme dag de skulle brukes.

2.5 Western blotting

2.5.1 Gelstøping

Western blot er en metode som brukes til å måle protein ekspresjon og fosforylering vha. antistoffer. Proteiner separeres etter molekylvekt ved hjelp av elektroforese. For å skille proteiner av ulik størrelse ble proteinene i dette forsøket kjørt gjennom en 10 % SDS-polyacrylamidgel som bestod av en separasjonsgel (nederst) og en stackinggel (øverst) (se Appendiks 2). Formålet med stackinggelen er å konsentrere prøvevolumet, slik at proteinbåndene blir så smale som mulig når de kommer til separasjonsgelen. I separasjonsgelen separeres prøvene. Gelene ble laget 1-2 dager før bruk. Til gelstøping ble det brukt utstyr fra BioRad (Modell No. Mini-PROTEAN® 3 Cell).

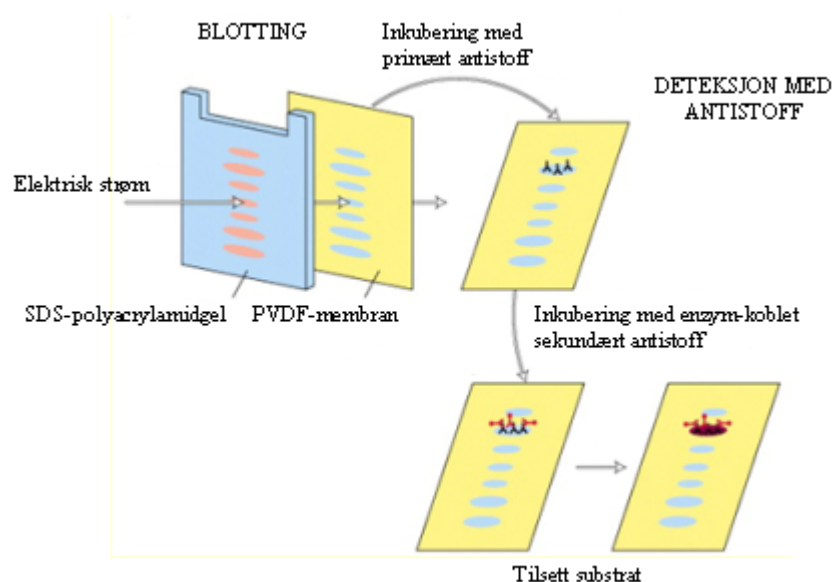
2.5.2 Elektroforese

Prøvene ble tint og blandet godt før de ble påført gelene. Det var totalt 15 brønner pr. gel, og det ble pipettert 12 µl prøve i hver brønn. I den første brønnen ble en proteinmarkør applisert, mens det i hver av de 14 andre brønnene ble påført prøver. Proteinmarkøren gjorde slik at størrelsen til proteinene i prøvene kunne anslås, siden referanseproteinenes størrelse var kjent.

To geler stod plassert sammen i en elektroforeseboks. Etter applisering av prøvene ble elektroforeseboksen fylt med elektroforesebuffer (se Appendiks 2). Totalt fire geler ble brukt per runde. Spenning ble koblet til systemet, og først ble spenningen satt til 100 V. Prøvene vandret gjennom stackinggelen. Etter 10 min ble spenningen økt til 200 V, og prøvene fortsatte gjennom separasjonsgelen i 60 min. Elektroforesens varighet avhenger av proteinenes størrelse.

2.5.3 Blotting

Da elektroforesen var ferdig skulle proteinene overføres fra gelene over til polyvinylidene fluoride (PVDF)-membraner. Prosessen kalles blotting. PVDF-membranene er hydrofobe og har høy bindingskapasitet for biomolekyler over 10 kDa. Først ble membranene ekvibrert ved å legge dem i 100 % metanol i 15 sek, i vann i 5 min, og deretter i overføringsbuffer (se Appendiks 2) minimum 10 min sammen med gelene. Det ble så laget en "blottesandwich" med filterpads-filterpapir-gel-membran-filterpapir-filterpads. Det var viktig at det ikke ble luftbobler inne i sandwichen. Blottingen foregikk i kald overføringsbuffer under omrøring. Systemet ble koblet til strøm, og konstant strøm 250 mA ble tilført i 1 time. (Se Figur 2.9.)



Figur 2.9 Blotting og deteksjon med antistoff

2.5.4 Blokking og immunoreaksjoner med antistoff

Etter blottingen, ble gelene kastet og membranene vasket 3×10 min med PBS/0,1 % Tween-20 (PBS-T; se Appendiks 2). Membranene er hydrofobe, og antistoffer vil derfor lett binde seg til dem. For å redusere uspesifikk binding av antistoffer til membranene, ble disse blokket i 5 % skummet melk løst i PBS-T, 2 timer i romtemperatur. Ledige plasser på membranene ble da blokkert av proteinene i melken.

Etter blokking ble membranene vasket 2×30 sek i PBS-T, før de ble inkubert i det ønskede primære antistoffet, som var i en løsning av 3 % BSA i PBS-T. Dette stod til inkubering over natt ved $+4^{\circ}\text{C}$ på vippebord.

Dagen etter ble membranene vasket 6×10 min i PBS-T før inkubering med egnede sekundære antistoffer. De sekundære antistoffene var i en løsning av 1 % BSA i PBS-T, laget samme dag og senest 15 minutter før bruk. Membranene ble inkubert i 1 time ved romtemperatur, og så vasket 6×10 min i PBS-T. (Se Figur 2.9.)

2.6 Eksponering og fremkalling

Membranene ble lagt på en plastplate og ECL(Enhanced Chemiluminescent)-væske ble dryppet over (Imobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore). Etter 5 minutter virketid ble membranene lagt i en plastfilm og straks fraktet til mørkerommet der western blottene ble fremkalt. Blottene ble detektert av en røntgenfilm (blåfølsom, 18×24 cm).

ECL-detektering bruker et enzym til å katalysere en reaksjon som resulterer i generasjon av synlig lys. "Horseradish peroxidase (HRP) chemiluminescent reaction" er basert på at luminol oksideres av peroksid, med HRP (enzym festet til sekundært antistoff) som katalysator. Oksidert luminol emitterer lys i det den går tilbake til sin grunntilstand. På grunn av dette dannes det derfor kun lys der prøveprotein, primært antistoff og sekundært antistoff finnes festet til membranen. Dette vil vises som bånd på filmen.

2.7 Skanning og beregning

Etter at filmene var fremkalt ble de merket med molekylvekt, prøvenummer og behandling. De ble skannet inn på PC med programmet HP Desk Scan II og klargjort i Adobe Photoshop. Analyse av båndene ble gjort i programmet Scion Image for Windows, der optisk tetthet på hvert bånd ble beregnet. Resultatene ble overført til Excel for Microsoft. Bakgrunnen på fotofilmen ble alltid trukket fra alle prøvene, for at den skulle bidra med minst mulig feil. For at ikke spredningen av resultatene skulle bli for stor, ble det gjort interne sammenligninger innenfor hver membran. Det var på hver membran 2-4 prøver som kom fra muskler inkubert med insulin uten inhibitor. Gjennomsnittet av disse ble satt lik 100 %, og resten av prøvene på membranen ble beregnet som prosentandel av dette.

2.8 Bestemmelse av glykogen syntase aktivitet

Hovedoppgaven skulle utføres på ett år, og pga. begrenset tid ble analysene av glykogen syntase aktivitet utført av Jorid Thrane Stuenæs (overingeniør, Stami). Her er en kort beskrivelse på utførelse av metoden og prinsippene bak den:

Muskelprøvene ble frysetørket, veid og homogenisert 2 x 15 sekunder (Polytron PT 1200, +4 °C) i buffer som inneholdt 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaF og 10 mM EDTA, pH 7,8. Forholdet tørrvekt : buffer var 1 : 400 (mg : µl). Homogenatet ble sentrifugert i 30 minutter ved 3000 × g (+4 °C) og supernatanten ble frosset ved -70 °C for senere analyse.

Glykogen syntase aktivitet ble målt med en filterpapirmetode beskrevet av Thomas et al. (1968) (Thomas *et al.*, 1968) med modifikasjoner som beskrevet (Jensen *et al.*, 2005). Glykogen syntase aktivitet bestemmes med den radioaktiviteten som inkorporeres i glykogen fra ¹⁴C-UDP-glukose. Med GS til stede i muskelhomogenatet vil det dannes ¹⁴C-merket glykogen som presipiteres på filterpapir. Maksimal syntase aktivitet ble målt ved mettet konsentrasjon av glukose 6-fosfat (12 mM). I tillegg ble aktiviteten ved 0,17 mM glukose 6-fosfat bestemt og fraksjonell aktivitet beregnet i prosent.

For analyse ble det tilsatt 20 µl homogenat til 40 µl analysereagens som inneholdt 25 mM Tris/HCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 45 µM UDP-glukose, 0,5 µCi·ml⁻¹ [¹⁴C]-UDP-glukose

(302 mCi·mmol⁻¹; PerkinElmer Life Sciences), 10 mg·ml⁻¹ glykogen og 0,25 mM eller 18 mM glukose 6-fosfat. Etter 8 min i vannbad ved 37 °C ble 50 µl av reaksjonsblandingen overført med pipette til et 1 x 2,5 cm filterpapir (Whatman 31ET). Filteret ble overført til iskald 66 % etanol (≈10 ml pr. filter) for å presipitere glykogen. Etter 30 minutter ble filtrene vasket 2 x 20 min i 66 % etanol ved romtemperatur for å fjerne overskudd av [¹⁴C]-UDP-glukose (≈7 ml pr. filter). Filterlappene ble tørket, overført til tellerør med 3 ml scintillasjonsvæske (Ultima Gold; PerkinElmer) og radioaktiviteten ble bestemt i scintillasjonsteller (TRI-Carb 1900 TR; Packard).

Glykogen syntase aktivitet ble regnet ut vha. regneark laget for analysen i Excel for Windows.

2.9 Statistikk

Resultater er presentert som gjennomsnitt ± SEM. For å teste om det var effekt av PI 3-K-inhibitorene, ble det brukt enveis variansanalyse (ANOVA), der det ble sett på test for lineær trend mellom snittverdiene. Der det kun var to grupper som skulle sammenlignes, ble det utført en uparret t-test for å sammenligne gruppene.

Statistisk signifikans ble akseptert på $\leq 0,05$ nivå.

Variansanalyser og t-tester ble utført ved hjelp av GraphPad InStat 3.0 for Windows.

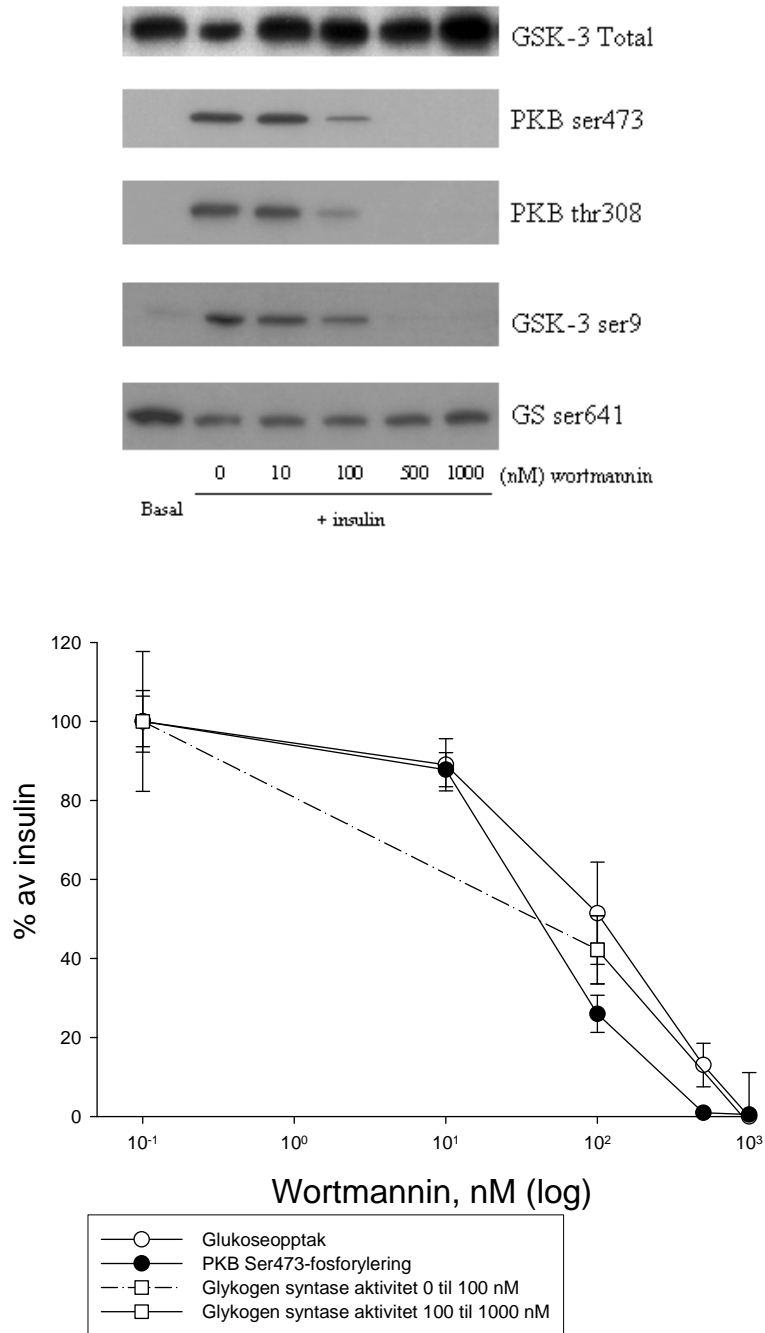
3 RESULTATER

3.1 Effekten av wortmannin på insulinsignalering

Insulin stimulerte glukoseopptaket fra $3,7 \pm 0,6$ (basalt) til $18,1 \pm 1,1$ mmol/kg tørrvekt/30 min (Tabell 3.1). Wortmannin (1000 nM) reduserte det insulinstimulerte glukoseopptaket til basalnivå, dvs. glukoseopptak uten insulinstimulering (Tabell 3.1; $P < 0,0001$). Dette viste at wortmannin var i stand til å blokkere insulinstimulert glukoseopptak fullstendig ved en konsentrasjon på 1000 nM.

PKB Ser⁴⁷³ og PKB Thr³⁰⁸-fosforylering var ikke synlig i muskel inkubert uten insulin. Insulin stimulerte helt tydelig til en økning i fosforylering av PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸ (Tabell 3.1 og Figur 3.1). Wortmannin klarte å redusere den insulinstimulerte fosforyleringen til basalnivå. PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸-fosforylering fulgte hverandre og sank på samme måte som glukoseopptaket (Tabell 3.1). Insulin økte også fosforyleringen av GSK-3 β Ser⁹. Fosforyleringen ble redusert etter hvert som wortmannin-konsentrasjonen økte. Fosforyleringen var på basalnivå ved 1000 nM (Tabell 3.1).

Insulin defosforylerte GS Ser⁶⁴¹, hvilket førte til økt enzymaktivitet (Tabell 3.1). Det kunne se ut som om GS Ser⁶⁴¹ fosforylering økte da wortmannin ble tilsatt i stigende konsentrasjoner, men stigningen var ikke helt signifikant ($P=0,051$). Når P-verdien var såpass lav, ble det likevel her tolket som en forskjell av betydning. I forsøket var det få muskler, og spredningen av resultatene ble da større. Målinger kunne bekrefte at wortmannin reduserte insulinstimulert glykogen syntase aktivering, og med 1000 nM wortmannin var aktiviteten lik den for basalt nivå (Tabell 3.1 og Figur 3.1).



Figur 3.1 Øverst: Western blot viser effekten av stigende wortmannin-konsentrasjoner på fosforylering av de ulike enzymene. Blot for hvert antistoff er fra de samme prøvene.

Antistoff for GSK-3 Total viser at totalt proteininnhold i prøvene er det samme.

Nederst: Effekten av wortmannin på glukoseopptak, PKB Ser⁴⁷³-fosforylering og glykogen syntase aktivitet. Punkter viser gjennomsnitt ± standardfeil. Insulin er satt lik 100 %, og de andre er beregnet som andel av dette. Basalverdiene er brukt som nullpunkt (som betyr at basalverdi er trukket fra samtlige andre verdier). NB: Glykogen syntase aktivitet 0 til 100 nM wortmannin har stiplet linje. Årsaken er at den kanskje ville ligget høyere dersom det var målt aktivitet ved 10 nM også. EC₅₀: GU = 130 nM, PKB Ser⁴⁷³ = 70 nM, GSA = 100 nM.

Tabell 3.1: Effekten av wortmannin på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

Wortmannin kons. (nM)	0	0	10	100	500	1.000	P-verdi Lineær trend
Ins→	-	+	+	+	+	+	
GU	3,7±0,6	18,1±1,1	16,5±0,9	11,1±1,9	5,5±0,8	2,4±0,3	<0,0001
p-PKB Ser ⁴⁷³	0,8±0,1	100±6,6	88,2±7,4	26,5±5,6	0,9±0,3	0,5±0,2	<0,0001
p-PKB Thr ³⁰⁸	3,9±2,7	100±32	87,5±39,82	26,9±13,7	1,5±0,8	2,3±2,1	<0,0001
p-GSK-3 Ser ⁹	4,3±1,8	100±6,1	91,2±10,9	40,3±6,7	5,5±1,0	2,9±0,5	<0,0001
p-GS Ser ⁶⁴¹	237±90,7	100±11,4	161,7±33,9	148,9±41,6	168,9±10,7	171,9±24,7	0,051
GSA	18,2±2,1	38,2±3,6	-	26,6±1,7	-	17,8±2,6	0,0002

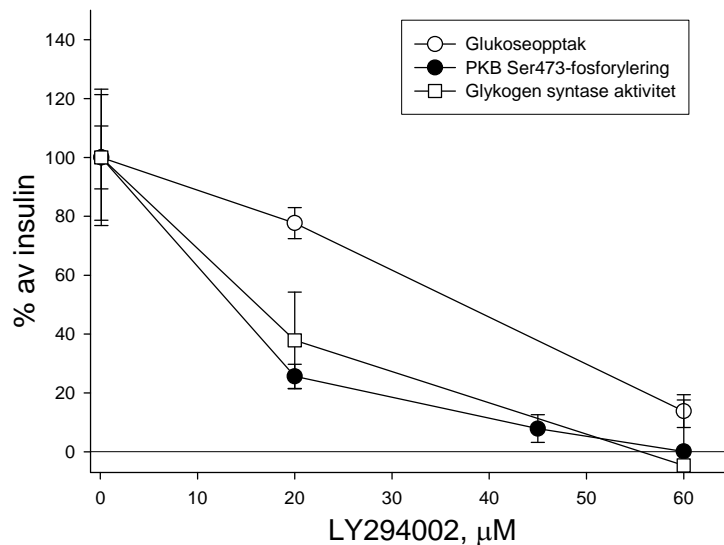
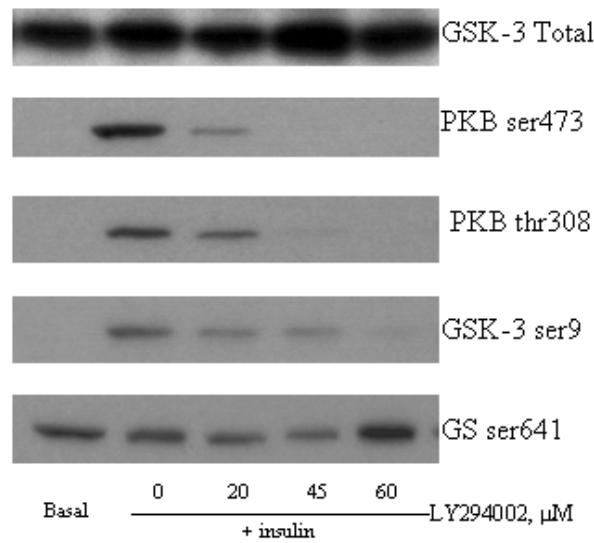
Verdiene viser gjennomsnitt ± standardfeil. Glukoseopptaket har benevning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosorylering er angitt slik at prøvene med insulin (uten inhibitor) er satt lik 100 %, og de andre verdiene er beregnet ut i fra dette. Glykogen syntase gis som fraksjonal aktivitet i prosent. Glukoseopptak: n=8. Western blot: n=4-8. Glykogen syntase aktivitet: n=4-5 (basal=10). Antall målinger er i hver gruppe.

3.2 Effekten av LY294002 på insulinsignalering

I dette eksperimentet stimulerte insulin glukoseopptaket til $14,7 \pm 1,4$ mmol/kg tørrvekt/30 min (Tabell 3.2). LY294002 hemmet insulinstimulert glukoseopptak doseavhengig, og ved 60 µM konsentrasjon var opptaket redusert til basalnivå.

LY294002 reduserte også insulinstimulert fosorylering av både PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸ doseavhengig, på samme måte for begge (Tabell 3.2, P<0,0001). Ved 60 µM var PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸-fosorylering ikke lenger målbart. Insulinstimulert GSK-3β Ser⁹ fosorylering ble redusert med økende mengde LY294002, og ved 60 µM var fosoryleringen nesten helt blokkert. Den lineære trenden var signifikant med en senkning mot høyre med økende konsentrasjon av inhibitor (P=0,001).

Glykogen syntase aktivitet fikk en kraftig økning med insulinstimulering (Tabell 3.2). Da LY294002 ble tilsatt, ble glykogen syntase aktivitet redusert med stigende konsentrasjoner av LY294002 (P=0,005). LY294002 60 µM reduserte insulinstimulert glykogen syntase aktivitet til basalnivået. Som ventet fikk GS Ser⁶⁴¹-fosorylering en reduksjon med insulinstimulering, og dermed økt aktivering. Når insulin var til stede økte GS Ser⁶⁴¹-fosorylering med økende konsentrasjon LY294002 med en signifikant stigning fra insulin og mot høyre (Tabell 3.2; P=0,002).



Figur 3.2 Øverst: Western blot viser effekten av stigende LY294002-konsentrasjoner på fosforylering av de ulike enzymene. Blot for hvert antistoff er fra de samme prøvene.

Antistoff for GSK-3 Total viser at totalt proteininnhold i prøvene er det samme.

Nederst: Effekten av LY294002 på glukoseopptak, PKB Ser⁴⁷³-fosforylering og glykogen syntase aktivitet. Punkter viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Insulin er satt lik 100 %, og de andre er beregnet som andel av dette. Basalverdiene er brukt som nullpunkt (som betyr at basalverdi er trukket fra samtlige andre verdier). EC₅₀: GU = 38 μM , PKB Ser⁴⁷³ = 13 μM , GSA = 16 μM .

Tabell 3.2: Effekten av LY294002 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

LY294002, (μM)	0	0	20	45	60	P-verdi Lineær Trend
Ins→	-	+	+	+	+	
GU	2,1 \pm 0,3	14,7 \pm 1,4	11,9 \pm 0,7	-	3,9 \pm 0,7	<0,0001
p-PKB Ser ⁴⁷³	0,5 \pm 0,5	100 \pm 23,2	25,6 \pm 4,1	7,9 \pm 4,7	0,1 \pm 0,1	<0,0001
p-PKB Thr ³⁰⁸	1,0 \pm 1,0	100 \pm 9,2	32,0 \pm 6,3	7,4 \pm 3,6	1,2 \pm 1,0	<0,0001
p-GSK-3 Ser ⁹	0 \pm 0	100 \pm 7,0	64,2 \pm 16,0	78,4 \pm 21,5	16,3 \pm 5,4	0,001
p-GS Ser ⁶⁴¹	188,8 \pm 38,4	100 \pm 12,8	112,1 \pm 12,7	140,5 \pm 25,3	192,4 \pm 23,7	0,002
GSA	18,2 \pm 2,1	32,1 \pm 3,0	23,4 \pm 2,3	-	17,5 \pm 3,1	0,005

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinoforylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glykogen syntase gis som fraksjonal aktivitet i prosent. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=6. Glykogen syntase aktivitet: n=4 (basal=10). Antall målinger er i hver gruppe.

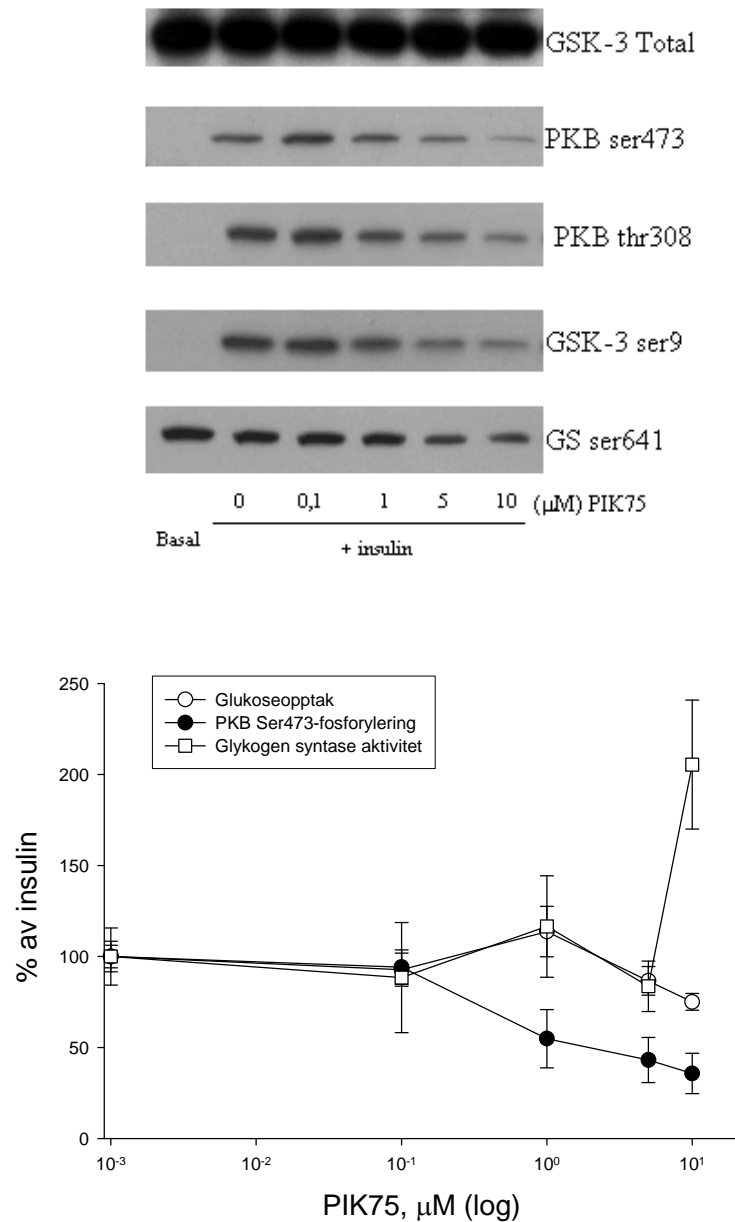
3.3 Effekten av den PI 3-K α -spesifikke inhibitoren PIK75 på insulinsignalering

Da PIK75 ble tilsatt i økende konsentrasjoner, kunne det se ut som det var en svak senkning av det insulinstimulerte glukoseopptaket, men dette var ikke signifikant (Tabell 3.3) Dette kan skyldes at verdiene for 1 μM PIK75 var høyere enn for insulin, noe som påvirket trendanalysen negativt. Evt. kunne flere prøver gitt lavere P-verdi.

ANOVA viste at insulinstimulert PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸-fosforylering sank etter som konsentrasjonen av PIK75 økte (Tabell 3.3; $P \leq 0,001$). Både PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸ sank signifikant med ca. 70 % ved høyeste konsentrasjon av PIK75. Det kunne se ut som om insulinstimulert fosforylering av GSK-3 β Ser⁹ også sank samtidig med økende konsentrasjon av PIK75, tilsynelatende med mer enn 70 % ved høyeste PIK75-konsentrasjon. Dette var ikke signifikant (Tabell 3.3; $P=0,06$). Den høye P-verdien kan skyldes få prøver, og dermed høye standardavvik, især for 0,1 μM . Det ville kreve flere prøver for å påvise at reduksjonen er signifikant.

Det skjedde en signifikant reduksjon av insulinstimulert GS Ser⁶⁴¹-fosforylering da konsentrasjonen av PIK75 steg (Tabell 3.3; $P=0,005$). Dette betyr at glykogen syntase skulle få en økt aktivitet med økende mengde inhibitor, noe man ikke forventet når PKB- og GSK-3-

aktiveringen sank. For å undersøke om dette kunne stemme, ble det testet for glykogen syntase aktivitet. Resultatene bekreftet at det var en signifikant økning i glykogen syntase aktivitet med økende mengde hemmer til stede (Tabell 3.3; $P=0,01$). GSA økte med nesten 100 % (Figur 3.3, Nederst) ved 10 μM konsentrasjon PIK75, i forhold til insulin alene.



Figur 3.3 Øverst: Western blot viser effekten av stigende PIK75-konsentrasjoner på fosforylering av de ulike enzymene. Blot for hvert antistoff er fra de samme prøvene. Antistoff for GSK-3 Total viser at totalt proteininnhold i prøvene er det samme.

Nederst: Effekten av PIK75 på glukoseopptak, PKB Ser⁴⁷³-fosforylering og glykogen syntase aktivitet. Punkter viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Insulin er satt lik 100 %, og de andre er beregnet som andel av dette. Basalverdiene er brukt som nullpunkt (som betyr at basalverdi er trukket fra samtlige andre verdier). EC_{50} : PKB Ser⁴⁷³ = 3 μM , GSA = 7,6 μM .

Tabell 3.3 Effekten av PIK75 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

PIK75 kons. (μ M)	0	0	0,1	1	5	10	P-verdi Lineær trend
Ins→	-	+	+	+	+	+	
GU	2,2 \pm 0,4	16,6 \pm 0,9	15,6 \pm 1,3	18,6 \pm 2	14,7 \pm 1,1	13,0 \pm 0,7	0,065
p-PKB Ser ⁴⁷³	0,2 \pm 0,2	100 \pm 8,5	94,2 \pm 9,5	54,8 \pm 16	43,1 \pm 12,4	35,7 \pm 11,1	<0,0001
p-PKB Thr ³⁰⁸	0,1 \pm 0,1	100 \pm 15,1	77,9 \pm 15,7	38,8 \pm 12,9	38,4 \pm 9,5	31,2 \pm 12,5	0,001
p-GSK-3 Ser ⁹	0,04 \pm 0,04	100 \pm 28,4	90,1 \pm 60,0	77,1 \pm 20,2	52,2 \pm 1,8	21,4 \pm 6,9	0,06
p-GS Ser ⁶⁴¹	100,3 \pm 25,5	100 \pm 15,6	83,0 \pm 26,8	70,0 \pm 16,5	45,9 \pm 15,3	31,6 \pm 8,8	0,005
Glykogen syntase aktivitet	18,2 \pm 2,1	32,7 \pm 2,3	31,0 \pm 4,4	35,1 \pm 4,1	30,3 \pm 2,0	48,0 \pm 5,2	0,01

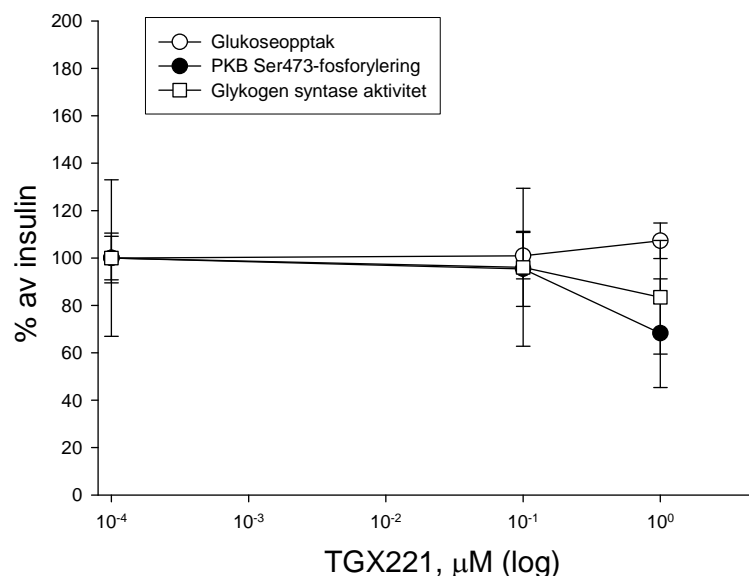
Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosorylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glykogen syntase gis som fraksjonal aktivitet i prosent. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=4/8. Glykogen syntase aktivitet: n=4/8(basal=10). Antall målinger er i hver gruppe.

3.4 Effekten av den PI 3-K β -spesifikke inhibitoren TGX221 på insulinsignalering

Det kunne ikke observeres noen signifikant endring av insulinstimulert glukoseopptak ved tilsetning av inntil 1 μ M TGX221 (Tabell 3.4; P=0,6).

Der det var tilsatt høyeste konsentrasjon av TGX221, så det ut som om både PKB Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸ og GSK-3 β Ser⁹-fosforylering var redusert med 30 %, men senkningen av fosforyleringen var ikke signifikant (Tabell 3.4; P>0,1).

Det samme gjaldt for målingene av glykogen syntase aktivitet og GS Ser⁶⁴¹-fosforylering: ingen signifikant endring (Tabell 3.4).



Figur 3.4 Effekten av TGX221 på glukoseopptak, PKB Ser⁴⁷³-fosforylering og glykogen syntase aktivitet. Punkter viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Insulin er satt lik 100 %, og de andre er beregnet som andel av dette. Basalverdiene er brukt som nullpunkt (som betyr at basalverdi er trukket fra samtlige andre verdier).

Tabell 3.4 Effekten av TGX221 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinisignalveien

TGX221 kons. (μM)	0	0	0,1	1	P- verdi Lineær trend
Ins \rightarrow	-	+	+	+	
GU	2,1 \pm 0,2	15,5 \pm 1,2	15,6 \pm 1,3	16,5 \pm 1,0	0,6
p-PKB Ser ⁴⁷³	0,2 \pm 0,2	100 \pm 10,5	95,4 \pm 15,9	68,3 \pm 22,9	0,2
p-PKB Thr ³⁰⁸	0,9 \pm 0,9	100 \pm 9,4	90,9 \pm 8,4	73,2 \pm 16,5	0,15
p-GSK-3 Ser ⁹	0 \pm 0	100 \pm 24,3	90,5 \pm 6,9	65,1 \pm 7,8	0,14
p-GS Ser ⁶⁴¹	195,2 \pm 46,6	100 \pm 29,1	102,6 \pm 32,9	70,8 \pm 9,1	0,4
Glykogen syntase aktivitet	18,2 \pm 2,1	32,8 \pm 4,8	32,3 \pm 4,9	30,4 \pm 3,5	0,7

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosforylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glykogen syntase gis som fraksjonal aktivitet i prosent. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=4. Glykogen syntase aktivitet: n=4(basal=10). Antall målinger er i hver gruppe.

3.5 Effekten av PIK75/TGX221 på insulinsignalering

Da PIK75 og TGX221 ble tilsatt samtidig, skjedde ingen endring i forhold til insulinstimulert glukoseopptak (Tabell 3.5).

Insulinstimulert fosforylering av PKB Ser⁴⁷³ (P=0,04) og Thr³⁰⁸ (P=0,08) ble hemmet 50 % med PIK75/TGX221 (Tabell 3.5). Selv om redusert fosforylering 50 % ikke er signifikant for PKB Thr³⁰⁸, forventer man at PKB skal fosforyleres på samme måte både ved Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸.

Ingen signifikant endring skjedde mht. GSK-3 β Ser⁹- eller GS Ser⁶⁴¹-fosforylering under påvirkning av insulin, da PIK75/TGX221 ble tilsatt (Tabell 3.5).

Tabell 3.5 Effekten av PIK75 sammen med TGX221 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

PIK75/TGX221 kons. (nM)	0	0	500	P-verdi Uparret t-test
Ins→	-	+	+	
GU	2,1±0,2	15,5±1,2	15,8±1,3	0,9
p-PKB Ser ⁴⁷³	0,3±0,1	100±14,7	51,4±11,2	0,04
p-PKB Thr ³⁰⁸	1,3±0,3	100±12,2	51,6±19,5	0,08
p-GSK-3 Ser ⁹	4,9±0,6	100±14,9	91,1±18,8	0,7
p-GS Ser ⁶⁴¹	193,5±14,4	100±21,7	109,4±33,7	0,8

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosforylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glykogen syntase gis som fraksjonal aktivitet i prosent. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=4. Antall målinger er i hver gruppe.

3.6 Effekten av den PI 3-K γ -spesifikke inhibatoren AS252424 på insulinsignalering

AS252424 viste ikke noen effekt på insulinstimulert glukoseopptak. Inhibitoren reduserte ikke insulinstimulert fosforylering av PKB Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸ og GSK-3 β Ser⁹ (Tabell 3.6). Det ble ikke testet for GS Ser⁶⁴¹-fosforylering eller glykogen syntase aktivitet.

Tabell 3.6 Effekten av AS252424 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

AS252424 kons. (μ M)	0	0	0,1	1
Ins \rightarrow	-	+	+	+
GU	1,5 \pm 0,2	13,7 \pm 0,6	14,2 \pm 1	13,6 \pm 0,9
p-PKB Ser ⁴⁷³	0 \pm 0	100 \pm 6,9	107,8 \pm 7,6	79,4 \pm 8,9
p-PKB Thr ³⁰⁸	0 \pm 0	100 \pm 14,9	98,8 \pm 10,9	80,0 \pm 10,6
p-GSK-3 Ser ⁹	0,9 \pm 0,9	100 \pm 11,4	119,3 \pm 19,4	105,1 \pm 13,9

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosforylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=4. Antall målinger er i hver gruppe. ANOVA ble ikke utført pga. at effekten av inhibatoren var minimal.

3.7 Effekten av den PI 3-K δ -spesifikke inhibatoren IC87114 på insulinsignalering

Insulinstimulert glukoseopptak og regulering av PKB Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸, GSK-3 β Ser⁹- og GS Ser⁶⁴¹-fosforylering fikk ingen endringer da IC87114 ble tilsatt inntil 1 μ M konsentrasjon (Tabell 3.7).

Tabell 3.7 Effekten av IC87114 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

IC87114 kons. (μ M)	0	0	0,1	1
Ins \rightarrow	-	+	+	+
GU	1,9 \pm 0,1	15,8 \pm 0,8	15,1 \pm 0,5	17,9 \pm 0,3
p-PKB Ser ⁴⁷³	0 \pm 0	100 \pm 4,4	107,7 \pm 13,1	98 \pm 4,7
p-PKB Thr ³⁰⁸	0,7 \pm 0,2	100 \pm 7,9	104,8 \pm 11,8	91,1 \pm 6,2
p-GSK-3 Ser ⁹	0 \pm 0	100 \pm 16,5	113,6 \pm 25,0	113,7 \pm 17,3
p-GS Ser ⁶⁴¹	257,2 \pm 29,2	100 \pm 11,6	100,6 \pm 17,9	106,1 \pm 15,4

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosforylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=4-8. Antall målinger er i hver gruppe. ANOVA ble ikke utført pga. at effekten av inhibatoren var minimal.

3.8 Effekten av PI103(α -inhibitor), TGX221, AS252424 og IC87114 på insulinsignalering

Ingenting skjedde mht. insulinstimulert glukoseopptak da PI103, TGX221, AS252424 og IC87114 ble tilsatt, 500 nM av hver (Tabell 3.8).

Da PI103, TGX221, AS252424 og IC87114 ble tilsatt, sank den insulinstimulerte fosforyleringen for PKB Ser⁴⁷³ signifikant til $72,2 \pm 8,3$ % ($P=0,03$), og det var også en tendens til fall for PKB Thr³⁰⁸ (Tabell 3.8; $P=0,2$). Man ventet at PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸ følger hverandre, og det tolkes slik her at P-verdien skyldes høy spredning med få resultater innen gruppene. Glukoseopptaket var altså uendret, mens PKB-fosforyleringen var redusert med ca. 30 %.

Med hensyn til insulinstimulert GSK-3 β Ser⁹- og GS Ser⁶⁴¹-fosforylering, endret dette seg ikke etter at det ble tilsatt PI103, TGX221, AS252424 og IC87114 (Tabell 3.8).

Tabell 3.8: Effekten av PI103, TGX221, AS252424 og IC87114 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

Kons. av hver inhibitor (nM)	0	0	500	P-verdi Uparret t-test
Ins→	-	+	+	
GU	1,5 \pm 0,2	13,7 \pm 0,6	15,1 \pm 0,9	0,2
p-PKB Ser ⁴⁷³	0,8 \pm 0,3	100 \pm 5,9	72,2 \pm 8,3	0,03
p-PKB Thr ³⁰⁸	3,0 \pm 1,1	100 \pm 10,4	62 \pm 24,4	0,2
p-GSK-3 Ser ⁹	2 \pm 1,2	100 \pm 31,5	81,4 \pm 19,1	0,6
p-GS Ser ⁶⁴¹	207,7 \pm 35,1	100 \pm 15,9	105,7 \pm 27,2	0,8

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosforylering er angitt på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=4. Antall målinger er i hver gruppe.

3.9 Effekten av koffein på insulinsignalering

Koffein (10 mM) reduserte det insulinstimulerte glukoseopptaket til basalnivå (Tabell 3.9; $P < 0,0001$) Reduksjonen av GU fulgte en lineær trend etter som konsentrasjonen av koffein økte.

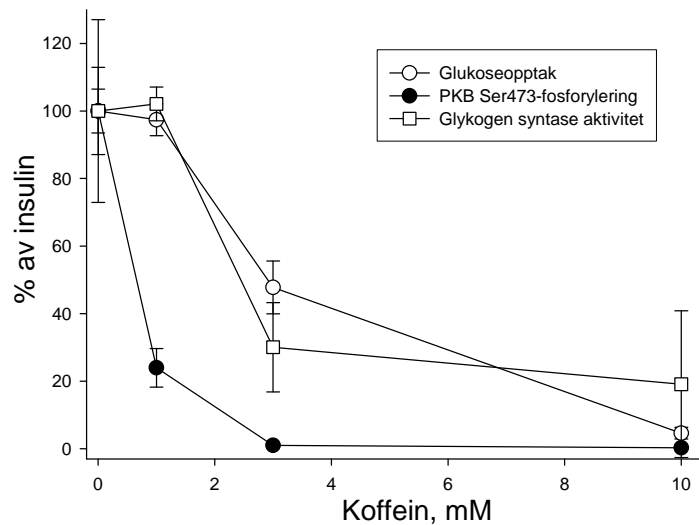
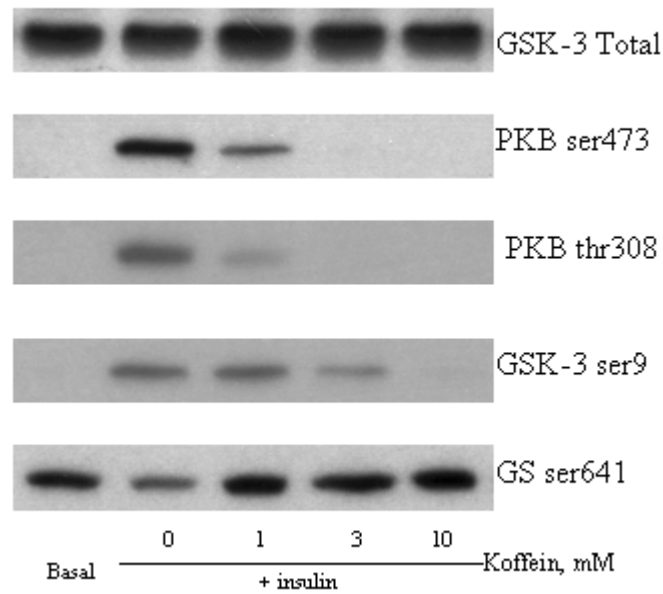
PKB Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸ og GSK-3 β Ser⁹ hadde høy fosforylering under insulinstimulering. Da koffein ble tilsatt i økende mengder, sank fosforyleringen (Tabell 3.9; $P < 0,0001$) for både PKB Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸ og GSK-3 β Ser⁹. Ved 10 mM koffein var fosforyleringen blokkert fullstendig.

Glykogen syntase aktivitet ble undersøkt, og resultatene viste 80 % reduksjon i forhold til insulinstimulert glykogen syntase aktivitet (Figur 3.9, Nederst og Tabell 3.9; $P < 0,001$). Insulinstimulert GS Ser⁶⁴¹-fosforylering hadde signifikant stigning da koffein ble tilsatt i økende konsentrasjoner (Tabell 3.9; $P = 0,01$). Ved 10 mM koffein var fosforyleringen ved GS Ser⁶⁴¹ lik basalnivå.

Tabell 3.9: Effekten av koffein på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulin-signalveien

Koffein kons. (mM)	0	0	1	3	10	P-verdi Lineær Trend
Ins→	-	+	+	+	+	
GU	3,5±0,4	18,2±1,0	17,8±0,7	10,5±1,1	4,2±0,3	<0,0001
p-PKB Ser ⁴⁷³	0,6±0,6	100±27,1	24,0±5,7	1,0±0,6	0,3±0,3	<0,0001
p-PKB Thr ³⁰⁸	0,1±0,1	100±23,6	23,3±4,6	2,2±0,7	1,3±0,4	<0,0001
p-GSK-3 Ser ⁹	1,4±1,2	100±12,6	77,8±9,6	16,3±4,3	2,5±1,0	<0,0001
p-GS Ser ⁶⁴¹	153,8±15,7	100±11,9	129,9±12,3	147,5±17,8	152,4±13,4	0,01
GSA	18,2±2,1	36,1±2,3	36,5±0,9	23,6±2,4	21,6±3,9	<0,001

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosforylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glykogen syntase gis som fraksjonal aktivitet i prosent. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=6. Glykogen syntase aktivitet: n=3-4(basal=10). Antall målinger er i hver gruppe.



Figur 3.9 Øverst: Western blot viser effekten av stigende koffein-konsentrasjoner på fosforylering av de ulike enzymene. Blot for hvert antistoff er fra de samme prøvene. Antistoff for GSK-3 Total viser at totalt proteininnhold i prøvene er det samme.

Nederst: Effekten av koffein på glukoseopptak, PKB Ser⁴⁷³-fosforylering og glykogen syntase aktivitet. Punkter viser gjennomsnitt ± standardfeil. Insulin er satt lik 100 %, og de andre er beregnet som andel av dette. Basalverdiene er brukt som nullpunkt (som betyr at basalverdi er trukket fra samtlige andre verdier). EC₅₀: GU = 3 mM, PKB Ser⁴⁷³ = 0,7 mM, GSA = 2,4 mM.

3.10 Effekten av den spesifikke PKB-inhibitoren SN30978 på insulinsignalering

SN30978 var i stand til å redusere det insulinstimulerte glukoseopptaket (Tabell 3.10; $P=0,002$), men opptaket var kun redusert 50 % ved høyeste konsentrasjon 10 μM (Figur 3.10).

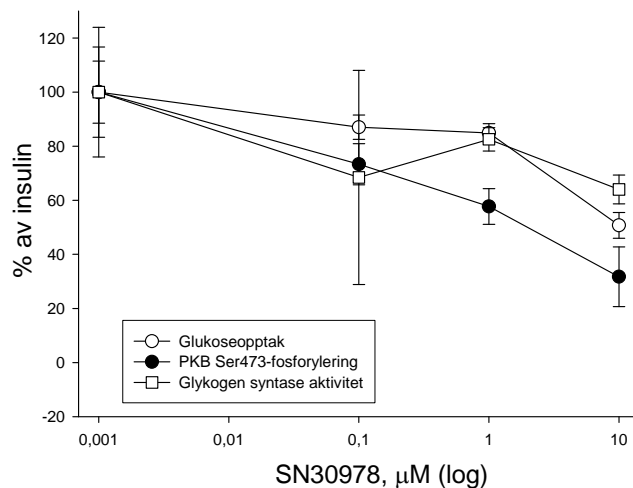
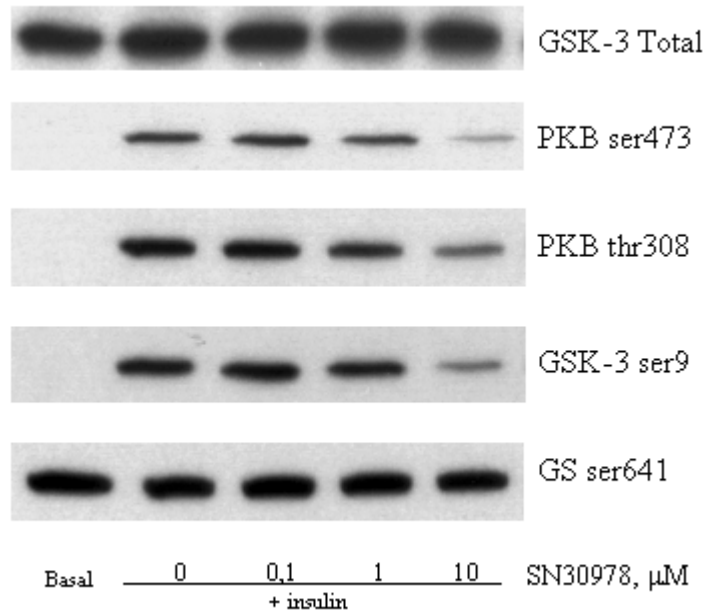
Insulinstimulert fosforylering av PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸ sank med stigende konsentrasjoner av SN30978 (Tabell 3.10; $P<0,02$). Fosforyleringen av de to setene fulgte hverandre. Ved høyeste konsentrasjon SN30978 var PKB Ser⁴⁷³ og Thr³⁰⁸-fosforylering redusert med over 60 % sammenlignet med insulin (Figur 3.10).

Verken GSK-3 β Ser⁹- fosforylering, GS Ser⁶⁴¹-fosforylering eller glykogen syntase aktivitet fikk noen signifikant endring etter tilsetning av SN30978 (Tabell 3.10).

Tabell 3.10: Effekten av SN30978 på glukoseopptak og regulering av ulike trinn i insulinsignalveien

SN30978 kons. (μM)	0	0	0,1	1	10	P-verdi
Ins→	-	+	+	+	+	Lineær trend
GU	2,0 \pm 0,7	14,7 \pm 1,5	13,0 \pm 0,6	12,8 \pm 0,4	8,4 \pm 0,6	0,002
p-PKB Ser ⁴⁷³	0 \pm 0	100 \pm 24,0	73,3 \pm 7,6	57,7 \pm 6,6	31,7 \pm 11,0	0,02
p-PKB Thr ³⁰⁸	0,4 \pm 0,4	100 \pm 15,6	73,8 \pm 5,1	51,7 \pm 6,2	36,3 \pm 8,8	0,004
p-GSK-3 Ser ⁹	0,9 \pm 0,9	100 \pm 8,4	97,2 \pm 20,4	100,4 \pm 12,3	64,7 \pm 21,1	0,1
p-GS Ser ⁶⁴¹	120,8 \pm 6,1	100 \pm 7,2	92,1 \pm 11,0	108,6 \pm 5,9	100,9 \pm 9,5	0,6
GSA	18,2 \pm 2,1	30,9 \pm 2,1	26,9 \pm 5,1	28,7 \pm 0,6	26,3 \pm 0,7	0,3

Verdiene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Glukoseopptaket har benevnning mmol/kg tørrvekt/30 min. Proteinfosforylering angis på den måten at prøvene tilsatt insulin alene ble satt lik 100 %, og de andre verdiene ble beregnet ut i fra dette. Glukoseopptak: n=4. Western blot: n=2-4. GSA: n=3-4 (basal=10). Antall målinger er i hver gruppe.



Figur 3.10 Øverst: Western blot viser effekten av stigende SN30978-konsentrasjoner på fosforylering av de ulike enzymene. Blot for hvert antistoff er fra de samme prøvene. Antistoff for GSK-3 Total viser at totalt proteininnhold i prøvene er det samme. **Nederst:** Effekten av SN30978 på glukoseopptak, PKB Ser⁴⁷³-fosforylering og glykogen syntase aktivitet. Punkter viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Insulin er satt lik 100 %, og de andre er beregnet som andel av dette. Basalverdiene er brukt som nullpunkt (som betyr at basalverdi er trukket fra samtlige andre verdier). EC_{50} : GU = 10 μM , PKB Ser⁴⁷³ = 3,7 μM .

4 DISKUSJON

Insulinresistens spiller en viktig rolle i utviklingen av type 2 diabetes, og mange faktorer kan være med på å bidra til dette. Når man tror at PI 3-K har en viktig rolle innen glukosemetabolisme, så er det fornuftig å mistenke at endringer i uttrykking eller regulering av dette enzymet kan bidra til utviklingen av insulinresistens. Det er vist at insulinresistent muskulatur har nedsatt PI 3-K aktivitet (Björnhalm *et al.*, 1997). PI 3-K regulerer mange enzymer nedstrøms i insulinsignalveien, og det kan også tenkes at ett eller flere av disse er svekket under tilstander der insulin ikke virker slik det skal på cellen. Det har blitt gjort en rekke undersøkelser på dette området, men det er fortsatt mye som gjenstår. I forsøkene som har blitt utført i denne oppgaven så har PI 3-K og PKB i muskelceller fra rotter blitt hemmet ved hjelp av forskjellige målrettede, cellepermeable inhibitorer. Ønsket med dette var å se hva slags følger dette fikk for insulinstimulert aktivisering av ulike trinn nedstrøms for PI 3-K i insulinsignalveien: PKB-fosforylering, GSK-3-fosforylering, glykogen syntase aktivitet, samt glukoseopptak.

Klasse I PI 3-K ser ut til å ha en nøkkelrolle innen regulering av insulins mange virkninger. Det viser seg også at mekanismer bak reguleringen av dets aktivitet er mye mer sammensatt enn tidligere antatt. Wortmannin og LY294002 hemmer PI 3-K, samtidig som glukoseopptak og GS hemmes (Shepherd *et al.*, 1998). Forsøkene i denne oppgaven viste det samme: hemming med wortmannin og LY294002 førte til blokkering av PKB- og GSK-3-fosforylering, samtidig som glykogen syntase aktivitet og glukoseopptak ble blokkert fullstendig. Dette støtter at Klasse I PI 3-K har en viktig rolle innen insulinsignalering. Når man så antar dette, så må det gjøres med forutsetning om at wortmannin og LY294002 kun hemmer Klasse I PI 3-K ved konsentrasjoner som ble brukt i oppgaven, og at de ikke hemmer andre enzymer som også er viktige for insulinsignalering.

Tabell 1.1 viser IC_{50} -verdier for wortmannin og LY294002, og i oppgaven er det brukt langt høyere konsentrasjoner. Det kan hende at det var andre enzymer som ble hemmet da konsentrasjonen av wortmannin og LY294002 var høy. Knight *et al.* (Knight *et al.*, 2006) har utført forsøk der de testet flere inhibitorer mht. deres spesifisitet. Wortmannin viste seg å hemme flere enzymer i PI 3-K-familien. Blant annet så ble Klasse III PI 3-K, DNA-protein

kinase og mTOR hemmet med IC_{50} under $1 \mu\text{M}$ i disse forsøkene (Knight *et al.*, 2006). Det ble brukt konsentrasjoner helt oppe i $1 \mu\text{M}$ i denne oppgaven. LY294002 hemmer også DNA-protein kinase og mTOR med IC_{50} under $100 \mu\text{M}$, mens det kreves langt høyere konsentrasjoner for å hemme Klasse II PI 3-K (Knight *et al.*, 2006). Både wortmannin og LY294002 har også vist å hemme mTOR-aktivitet ved hhv. 1 og $30 \mu\text{M}$ i andre forsøk (Brunn *et al.*, 1996). Spørsmålet er da om disse enzymene har blitt hemmet, og om disse bidro til at insulinsignaleren ble svekket i forsøkene i denne oppgaven? DNA-protein kinase er et enzym som bl.a bidrar til å reparere skadet DNA. Denne antas å ikke bidra til insulinsignaleren, siden DNA-protein kinase inhibitoren AMA-37 ikke har klart å blokkere insulinstimulert aktivering av PI 3-K-signalveien (Knight *et al.*, 2006). PKB krever mTORC2 til fosforylering ved Ser⁴⁷³ for maksimal aktivering (Pearce *et al.*, 2007), så hemming av denne kan i teorien føre til at PKB ikke aktiveres, og at enzymer nedstrøms i insulinsignalveien hemmes.

Et annet spørsmål man kan stille, er om Klasse II PI 3-K er involvert i insulinstimulert glukoseopptak, og om hemming av disse står for noen av effektene wortmannin og LY294002 har på glukosemetabolisme? Det har blitt vist at PI 3-KC2 α bidrar til maksimal insulin-indusert translokering av glukosetransportøren GLUT4 til plasmamembranen og påfølgende økt glukoseopptak (Falasca *et al.*, 2007). Dette betyr at PI 3-KC2 α er med på å mediere glukoseopptak etter insulinstimulering. Soos *et al.* (Soos *et al.*, 2001) har funnet ut at insulin aktiverer Klasse II PI 3-K i skjelettmuskel hos rotter. Dette tyder også på at enzymet er involvert i insulinsignaleren. Men så er det vist at wortmannin inntil $1 \mu\text{M}$ ikke blokkerer PI 3-KC2 α -aktivitet (Soos *et al.*, 2001). PI 3-KC2 α har vist seg å være resistent mot både wortmannin og LY294002 ved de konsentrasjoner som hemmer Klasse I PI 3-K (Domin *et al.*, 1997). Konklusjonen som da kan trekkes ut i fra resultatene i oppgaven her, er at PI 3-KC2 α alene ikke er i stand til å mediere glukoseopptak i cellen. Dette fordi disse to inhibitorene begge blokkerer glukoseopptak uten at PI 3-KC2 α er blokkert.

I adipocytter, så har translokering av GLUT4 vist seg å være relativt resistent mot wortmannin (Hausdorff *et al.*, 1999), noe som øker mistanken om at PI 3-KC2 α kan stå bak denne mekanismen. Det som også er interessant, er at wortmannin klarer å blokkere glukoseopptak uten å blokkere GLUT4-translokering (Hausdorff *et al.*, 1999). Dette kan tyde på at GLUT4-translokering ikke er tilstrekkelig for å mediere glukoseopptak, men at det kreves aktivering

av andre trinn samtidig. Det må mer forskning til for å finne PI 3-KC2 α sin rolle innen insulinsignalerer, men Klasse II PI 3-K sin betydning bør ikke undervurderes her.

Forsøkene med wortmannin og LY294002 bekreftet at Klasse I PI 3-K er viktig for insulinsignalerer i muskel. Men de forteller oss ikke noe om hvilke(n) av isoformene som medierer insulinsignalerer. I denne oppgaven ble det derfor gjort forsøk der målet var å hemme de ulike isoformene av Klasse I PI 3-K spesifikt. De ble hemmet hver for seg, og i to forsøk ble α/β - og $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ -isoformene hemmet samtidig.

Ved hjelp av inhibitoren PIK75 var ønsket å hemme PI 3-K α spesifikt. Tidligere forsøk har antydnet at PI 3-K α er den viktige isoformen for insulinsignalerer til PKB (Chaussade *et al.*, 2007), og at PI 3-K α er den viktigste isoformen med hensyn til insulinsignalerer (Foukas *et al.*, 2006). PIK75 10 μ M klarte å redusere PKB-fosforylering med 70 % i denne oppgaven. Dette tyder på at p110 α er viktig for PKB-fosforylering. Disse resultatene samsvarer også med tidligere studier, der man har klart å redusere PKB-fosforylering betydelig når p110 α er hemmet (Chaussade *et al.*, 2007).

PIK75 sin effekt på signalerer til GS var uventet i forsøkene i oppgaven. Signalerer til GSK-3 så ut til å synke på tilsvarende måte ($P = 0,06$ for lineær trend) som PKB-fosforylering, som var redusert med 70 %. Forsøk på adipocytter utført av Knight *et al.* (Knight *et al.*, 2006) viste at PIK75 hemmer fosforylering av GSK-3 α/β nesten fullstendig ved 10 μ M (Knight *et al.*, 2006), hvilket bekrefter at PIK75 kan hemme GSK-3-fosforylering. Det var derfor svært uventet at GS Ser⁶⁴¹-fosforyleringen også var redusert med nesten 70 % ved høyeste PIK75-konsentrasjon i forsøkene i oppgaven. At GS-aktivitet var økt ble bekreftet ved målinger av glykogen syntase aktivitet. GSA økte med nesten 100 % ved høyeste PIK75-konsentrasjon sammenlignet med insulinstimulert aktivitet. Det må bety at GSK-3 er nesten fullstendig blokkert ved denne konsentrasjonen. Dette kan ha ulike årsaker, men en teori er at GSK-3 hemmes uspesifikt av PIK75. Dette involverer ikke fosforylering av GSK-3 ved Ser^{21/9}, men må i tilfellet hemme GSK-3 ved hjelp av en annen mekanisme, som for eksempel kunne være hemming av et aktivt sete på enzymet. Når GSK-3 da hindres i å utøve en hemmende effekt på GS, så vil GS få økt aktivitet – her nesten doblet sammenlignet med normal insulinstimulert aktivitet (Figur 3.3, graf). Det er ikke publisert noe data som kan bekrefte dette ved det tidspunktet denne oppgaven ble skrevet.

Det har blitt vist at p110 α -inhibitorene PIK75 og PI103 kan blokkere glukoseopptak ved en konsentrasjon på 10 μ M, der reduksjonen i glukoseopptak gjenspeilet inhibitorenes evne til å blokkere PKB-fosforylering (Knight *et al.*, 2006). Men disse forsøkene ble utført på fettceller. Andre forsøk har vist at glukosemetabolismen har vært upåvirket under p110 α -hemming (P. R. Shepherd, upubliserte resultater) (Shepherd, 2005). Resultatene i denne oppgaven støtter at glukoseopptaket ikke reduseres når p110 α hemmes. Insulinstimulert glukoseopptak var tilsynelatende redusert fra $16,6 \pm 0,9$ til $13,0 \pm 0,7$ mmol/kg tørrvekt/30 min med 10 μ M PIK75. Dette fallet var ikke signifikant ($P = 0,065$ for lineær trend), men det kunne kanskje ha vært det dersom det var flere prøver med i forsøket. Dette kunne ha gitt mindre spredning på resultatene, og det er da lettere å påvise et evt. signifikant fall på glukoseopptaket. Her kunne man få svar på dette ved å utføre flere forsøk med PIK75 på glukoseopptak, men dette ble for tidkrevende for denne oppgaven. I tillegg kunne det vært forsøkt konsentrasjoner høyere enn 10 μ M, men dette vil øke risiko for uspesifikk binding og hemming av andre enzymer.

Tabell 1.1 viser at ca. 20 nM PIK75 skal være tilstrekkelig til å blokkere p110 α . Mediet musklene har blitt inkubert i har hatt langt høyere konsentrasjoner, helt opp til 10 μ M. Det er mulig at p110 α ble blokkert lenge før konsentrasjonen i inkuberingsmediet var oppe i 10 μ M. Det så ut som om det var en svak reduksjon i insulinstimulert PKB-fosforylering allerede ved 500 nM PIK75, som anslås til å ligge på omtrent 30 % (Figur 3.3, graf), men dette er usikkert og det må flere forsøk til for å kunne bevise dette.

Det skjedde ingen endring verken for insulinstimulert glukoseopptak eller signalering ved TGX221-konsentrasjoner inntil 1 μ M. TGX221 skal blokkere p110 β allerede ved 20 nM konsentrasjon i cellen (Tabell 1.1), og det antas derfor at p110 β har blitt fullstendig blokkert i dette forsøket. Selv om p110 β -inhibitorer ikke har klart å blokkere insulinsignalering i muskelceller, trenger ikke dette bety at denne isoformen ikke bidrar til insulinsignalering i disse cellene. p110 β har vist seg å være uttrykt i muskelceller (Knight *et al.*, 2006), og det er vist at kinase-aktiviteten til både p110 α og p110 β øker etter at muskelceller er behandlet med insulin (Knight *et al.*, 2006). Asano og hans samarbeidspartnere mener at p110 β kan være den primære PI 3-K-isoformen som medierer insulinsignalering i fettceller (Asano *et al.*, 2000). De viste at kinase-aktiviteten til p110 β ble kraftig økt etter insulinstimulering, mens p110 α sin aktivitet økte minimalt (Asano *et al.*, 2000). Da p110 β sin aktivitet ble hemmet ved å

bruke antistoffer, så ble insulinstimulert translokering av GLUT4 til celleoverflaten hemmet nesten fullstendig (Asano *et al.*, 2000). Funnene stemmer ikke overens med resultatene i denne oppgaven, der den p110 β -spesifikke inhibitoren TGX221 ikke fikk noen betydning for verken insulinstimulert glykogen syntase aktivitet eller glukoseopptak i muskel.

Tidligere har det blitt vist at kombinert heterozygot sletting av både p110 α (+/-) og p110 β (+/-), slik at begge enzymene får redusert aktivitet, gav mus som var glukoseintolerante og hadde hyperinsulinemi (Brachmann *et al.*, 2005). Dette kunne tyde på en slags form for "samarbeid" mellom disse to isoformene innen insulinisering, siden mus der kun ett av enzymene hadde redusert aktivitet ikke viste tegn til insulinresistens (Brachmann *et al.*, 2005). En måte å teste ut dette på var å hemme både p110 α og p110 β i samme forsøk for å undersøke om dette førte til redusert insulinisering og/eller glukoseopptak. Chaussade *et al.* (Chaussade *et al.*, 2007) har hemmet p110 α /p110 β samtidig, og de klarte å redusere signaleringen til PKB omtrent til basalnivå. I denne oppgaven ble PIK75 (α -inhibitor) og TGX221 (β -inhibitor) tilsatt samtidig (500 nM konsentrasjon av hver), for å undersøke om insulinisering ble svekket i muskelceller. 500 nM PIK75 hadde tidligere vist å redusere PKB-fosforylering ved denne konsentrasjonen (Figur 3.3, graf), og IC₅₀ for PIK75 forventes å bli redusert når en β -inhibitor tilsettes samtidig (Knight *et al.*, 2006). Glukoseopptaket ble her uendret sammenlignet med insulinstimulert glukoseopptak, mens PKB-fosforylering var redusert med ca. 50 %. Signalering til GS var uendret. Reduksjonen i PKB-fosforylering antas her å skyldes α -inhibitoren PIK75, siden resultatene ikke skiller seg mye fra resultatene til PIK75 tilsatt alene. Dette styrker p110 α sin rolle innen insulinisering, men gir ingen indikasjon på at det foreligger et samarbeid mellom p110 α og p110 β som er nødvendig for insulinisering. Det kunne vært interessant å øke konsentrasjonen av hver av inhibitorene, f.eks. til det dobbelte, for å se om dette fikk betydning for flere trinn i insuliniseringsveien. Som vi så her, så var det kun PKB-fosforyleringen som ble redusert med 500 nM. Siden PIK75 antas å stå for effekten disse inhibitorene hadde på PKB-fosforyleringen, er det lite sannsynlig at det ville påvirke andre trinn dersom man økte konsentrasjonen for begge.

Da den spesifikke PI 3-K γ -inhibitoren AS252424 ble benyttet, skjedde ingen endringer verken for PKB-fosforylering, GS-aktivitet eller glukoseopptak i muskel. Her vises det altså at Klasse Ib PI 3-K ikke medierer insulinstimulert glukoseopptak, slik som også var ventet ut i fra tidligere forsøk (Shepherd, 2005). PI 3-K γ er lite utbredt i insulinsensitivt vev

(Shepherd, 2005), og forsøk har gitt oss indikasjoner om at Klasse Ib PI 3-K hovedsakelig er med på å regulere inflammatoriske responser i kroppen (Walker *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 2007). Dersom AS252424 var i stand til å blokkere PI 3-K γ sin aktivitet, så er resultatene fra denne oppgaven med på å underbygge teorien om at Klasse Ib PI 3-K ikke deltar i regulering av glukosemetabolisme, men kan ha en viktig rolle innen reguleringen av inflammasjon i kroppen. Dersom dette er tilfelle, så kan p110 γ -inhibitorer representere en ny type legemidler mot inflammatoriske sykdommer.

Gitt at Klasse I PI 3-K, evt. bare Klasse Ia PI 3-K, er en gruppe kinaser som samarbeider og overlapper hverandre i arbeidet med å føre insulinsignalering videre i cellen. Det ville bety at det ikke er tilstrekkelig å hemme en eller to isoformer for å blokkere insulinsignalering. Dersom wortmannin og LY294002 klarer å hemme insulinsignalering og glukoseopptak fordi de hemmer alle isoformene i Klasse I PI 3-K samtidig, så burde man få samme effekt av å bruke spesifikke inhibitorer for alle fire isoformene i ett og samme forsøk. Dette ble forsøkt i denne oppgaven, men uten at resultatene ble som forventet. Den eneste effekten de spesifikke inhibitorene PI103 (p110 α), TGX221 (p110 β), AS252424 (p110 γ) og IC87114 (p110 δ) samlet hadde på insulinsignaleringen, var at PKB-fosforyleringen ble redusert med 30 %. Redusert PKB-fosforylering kan skyldes at PI103 hemmer p110 α . Verken GS Ser⁶⁴¹-fosforylering eller glukoseopptak ble endret. Årsaken til at effekten ikke ble slik som forventet, kan være at wortmannin og LY294002 sin effekt skyldes hemming av andre proteiner i insulinsignalveien, dvs. at de ikke bare hemmer Klasse I PI 3-K. Forsøket der α -, β -, γ - og δ -isoformen til PI 3-K ble hemmet samtidig tilsier at disse fire isoformene ikke er alene om å mediere insulinsignalering i muskelceller. Vel og merke må hemmingen av de fire enzymene ha vært vellykket i forsøket. Her ble det brukt en annen type α -inhibitor enn i de forrige forsøkene. Det var interessant å forsøke denne inhibitoren for å sammenligne med PIK75. Det virker som om PI103 er en mindre potent α -inhibitor, siden de begge har blitt tilsatt i 500nM konsentrasjon, og PIK75 har vist en sterkere tendens til å blokkere PKB-fosforylering ved denne konsentrasjonen (50 % for PIK75 mot 30 % for PI103).

For å hemme PI 3-K δ ble inhibitoren IC87114 benyttet, men dette gav ingen endringer i insulinsignalering. Tidligere har det blitt skrevet at δ -isoformen ikke er spesielt utbredt i insulinsensitivt vev (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997), og forsøk utført av Chaussade *et al.* har ikke vist noen endring av PKB-fosforylering når p110 δ er hemmet (Chaussade *et al.*, 2007).

Forsøk i oppgaven kan bekrefte at p110 δ ikke er viktig for insulinstimulert signalering i muskel, dersom PI 3-K δ har blitt hemmet tilstrekkelig i forsøket.

Foukas et al. (Foukas *et al.*, 2002) har studert koffeins effekt på celler, og det ble vist at koffein kan gi endringer i glukosemetabolisme i tillegg til at det har en hemmende effekt på phosphoinositide-metabolisme. De viste i tillegg at koffein kan hemme insulinstimulert PKB-fosforylering i m. soleus fra rotter, samt at koffein er i stand til å blokkere insulinstimulert glukosetransport (Foukas *et al.*, 2002). Thong et al. (Thong *et al.*, 2002) har også vist at koffein forverrer insulinstimulert glukoseopptak og glykogen syntase aktivitet i muskel, både under hvile og fysisk aktivitet. Mekanismene som ligger bak er ukjente. Koffein blokkerte insulinstimulert glukoseopptak og signalering fullstendig ved høyeste konsentrasjon (10 mM) i forsøkene utført på Stami. Denne konsentrasjonen er langt høyere enn hva som er vanlig i kroppen etter inntak av mat og drikke. Plasmakonsentrasjoner overstiger sjelden 70 μ M (Graham, 2001). Ved å se på dose-respons-kurven i figur 3.9 i resultatkapittelet, så ser man at ved så lave konsentrasjoner er det minimalt med reduksjon i insulinsignalering. Verken glukoseopptaket eller glykogen syntase aktivitet ser ut til å være påvirket ved 70 μ M konsentrasjon koffein. Resultatene viser likevel at koffein er i stand til å hemme glukoseopptak og signalering fra insulin, til tross for at man er usikre på effekten av fysiologiske konsentrasjoner i kroppen.

PI 3-K δ er isoformen i Klasse I PI 3-K som hemmes kraftigst med koffein (Foukas *et al.*, 2002), og derfor kan hemming av PI 3-K δ kanskje forklare noen av de fysiologiske egenskapene koffein har på insulinsignalering? Som sagt tidligere, så påvirket ikke hemming av PI 3-K δ insulinstimulering. Dette må bety at det er andre effekter ved koffein som gjør at insulinstimulering hemmes, og ikke hemming av PI 3-K δ . mTOR og PI 3-KC2 α skal være blokkert med 10 mM koffein (Foukas *et al.*, 2002), men om dette har noen betydning er usikkert.

Det har lenge vært diskutert om PKB er involvert i insulinresistens i skjelettmuskulatur ved tilstander som type 2 diabetes. Krook et al. (Krook *et al.*, 1998) studerte insulins effekt på PKB-aktivitet i skjelettmuskel fra seks pasienter med type 2 diabetes, samt hos seks friske individer. Det ble funnet defekter i insulinstimulert PKB-aktivitet sammen med redusert glukosetransport hos de med type 2 diabetes (Krook *et al.*, 1998), noe som antyder at redusert

PKB-aktivitet kan spille en rolle i utviklingen av insulinresistens. Forsøk har vist korrelasjon mellom reduksjonen i insulinstimulert GLUT4-translokering og glukosetransport, og en kraftig reduksjon i PKB-aktivitet (Whiteman *et al.*, 2002). Motstridende data ble funnet i forsøk utført av Kim et al. (Kim *et al.*, 1999) på muskel hos individer med type 2 diabetes. De viste at PKB-aktiviteten hos de med type 2 diabetes var lik som hos friske individer, til tross for at type 2 diabetikerne nesten hadde en halvert PI 3-K-aktivitet (Kim *et al.*, 1999).

PKB-inhibitoren SN30978 viste at PKB er nødvendig for glukoseopptak. Forsøk har vist at SN30978 ikke reduserte aktiviteten til Klasse Ia PI 3-K helt opp til 5 μ M (samarbeid med C. Chaussade og P. R. Shepherd, University of Auckland Medical School, New Zealand). Selv om det i oppgaven ble brukt konsentrasjoner helt opp til 10 μ M, antas det at Klasse Ia PI 3-K er upåvirket i forsøkene, og at effekten på glukoseopptak skyldes hemming av PKB. SN30978 reduserte PKB-fosforyleringen med 60 % ved høyeste konsentrasjon, mens glukoseopptaket var redusert med 50 %. I dette forsøket ble det vist at insulinstimulert PKB-fosforylering og glukoseopptak fulgte hverandre, og at PKB medierer glukoseopptak. Glykogen syntase aktivitet ble ikke redusert på samme måte ($P = 0,3$ for lineær trend). Siden en PKB-avhengig mekanisme direkte bidrar til aktivering av GS via GSK-3, så var det ventet at GS aktivitet skulle avta når PKB-fosforylering var redusert med 60 % ved høyeste SN30978-konsentrasjon. Hvorfor ikke GS ikke ble påvirket av redusert PKB-fosforylering er vanskelig å si. Dette er resultater som støtter at GS-fosforylering skjer via en annen mekanisme enn via PKB-signalveien.

Det er fortsatt en stor utfordring i dag å designe inhibitorer som kan skille mellom nært beslektede enzymer, slik som PI 3-K-isoformene. Det er viktig å huske på at mange av inhibitorene ikke har blitt utforsket nøye nok mht. spesifisitet og cellepermeabilitet. Cellepermeable protein kinase inhibitorer, som vi med sikkerhet visste hadde en høy spesifisitet for ønskede enzymer, ville kunne gi mer sikker informasjon om enzymenes rolle for insulinsignalering. Det å overføre detaljert kunnskap fra forsøk på celler til utviklingen av effektive legemidler er en stor utfordring for biomedisinske forskere. Farmakologi vil spille en viktig rolle når man skal møte slike utfordringer.

Det er verdt å merke seg at IC_{50}/EC_{50} -verdier fra forsøk i denne oppgaven kan variere fra verdier oppgitt i litteraturen. Dette kan komme av at metodene ikke er utført på nøyaktig

samme måte, at det er benyttet forskjellige typer vev eller at betingelsene varierer mellom laboratoriene.

For å oppsummere det som har blitt skrevet i dette kapittelet, så har wortmannin og LY294002 antydnet at Klasse I PI 3-K er nødvendig for insulinsignalering. I tillegg så har analyser i denne oppgaven pekt ut PI 3-K α som den viktigste lipid kinasen som kreves for insulinsignalering i muskelceller, men den viste likevel ikke å ha så stor betydning som tidligere antatt. Bruk av spesifikke inhibitorer for de fire isoformene i Klasse I PI 3-K gav liten effekt, noe som kan tyde på at flere enzymer i tillegg til Klasse I PI 3-K er med på å regulere insulinsignalering. Det kan ikke utelukkes at Klasse II PI 3-K, og da spesielt PI 3-KC2 α , kan ha en viktig rolle for insulinsignalering i muskel. Koffein blokkerte insulinstimulert glukosemetabolisme, men PI 3-K δ ser ikke ut til å være involvert. Det er usikkert om koffein har den samme effekten på glukosemetabolismen i kroppen vår etter inntak av koffeinholdig mat og drikke. PKB-inhibitoren viste i denne oppgaven at PKB-fosforylering medierer glukoseopptak, men klarte ikke å vise at PKB er nødvendig for aktivering av GS.

5 KONKLUSJON

På bakgrunn av forsøk med PI 3-K-inhibitorene wortmannin og LY294002, er det sterke bevis for at PI 3-kinase er nødvendig for glukoseopptak og signalering mediert av insulin. Ut i fra funn i denne oppgaven ser det ut som om Klasse 1a PI 3-K ikke er ansvarlig for de observerte effektene wortmannin og LY294002 har på insulinsignalering.

Det ble under punktet **1.5 Formål** stilt noen spørsmål med hensyn til de ulike inhibitorenes effekt på insulinsignaleringen. For å besvare spørsmålene, ble disse konklusjonene trukket:

1. PI 3-K-inhibitorene wortmannin og LY294002 blokkerte insulinstimulert glukoseopptak, PKB-fosforylering og glykogen syntase aktivering. Dose-responskurvene for GU, PKB-fosforylering og GSA lå inntil hverandre, hvilket tyder på at alle disse trinnene reguleres av PI 3-K.
2. PIK75, som hemmet PI 3-K α , hadde lite effekt på glukoseopptaket, men klarte å redusere PKB-fosforylering med 70 %. Glykogen syntase fikk en kraftig økt aktivitet med høyeste konsentrasjon PIK75, noe som kan tyde på uspesifikk binding og inaktivering av GSK-3.
3. Hemming av PI 3-K β hadde ingen effekt på verken insulinstimulert glukoseopptak eller signalering.
4. Da PI 3-K γ eller PI 3-K δ ble hemmet, hadde dette ingen effekt på insulinstimulert glukoseopptak eller signalering.
5. Koffein er i stand til å blokkere insulinstimulert glukoseopptak, PKB-fosforylering og glykogen syntase aktivering.

6. PKB-inhibitoren SN30978 reduserte insulinstimulert glukoseopptak med 50 % og PKB-fosforylering med 60 %, mens det ikke ble påvist endring ved noen andre trinn i signalveien. Dette støtter at PKB medierer glukoseopptak.

7. Funnene i denne oppgaven kan tyde på at Klasse Ia-isoformene av PI 3-kinase ikke har den betydningen man tidligere har antatt mht. insulinstimulert glukoseopptak og signalering.

APPENDIKS 1

KJEMIKALIER OG UTSTYR

Kjemikalier

Produkt	Forhandler/produsent	Produkt/katalognr.
Hemmere		
AS252424	*	-
Caffeine	Sigma-Aldrich	Sigma C-0750
IC87114	*	-
LY294002	Sigma-Aldrich	Sigma L-9908
PI103	*	-
PIK75	*	-
SN30978	*	-
TGX221	*	-
Wortmannin	Sigma-Aldrich	Sigma W-1628
Insulin		
Actrapid inj.væske 100 IE/ml	Novo Nordisk	Varenr: 014398
Radioaktivt materiale		
Mannitol, D-[1- ¹⁴ C], 3,7 MBq/ml	PerkinElmer	NEC-314
Deoxy-D-Glucose, 2-[1,2- ³ H(N)], 37 MBq/ml	PerkinElmer	NET-549
UDPG, [glucose ¹⁴ C(U)], 0,74 MBq/ml	PerkinElmer	NEC-403
Homogenisering		
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich	Sigma P-8340
Protein Standard, 80 mg/ml	Sigma-Aldrich	Sigma P-8119
Antistoffer		
Primært antistoff, PKB Ser ⁴⁷³	MedProbe	Cell Signaling Tech. #9271
Primært antistoff, PKB Thr ³⁰⁸	MedProbe	Cell Signaling Tech. #4056
Primært antistoff, GSK-3 Ser ^{21/9}	MedProbe	Cell Signaling Tech. #9331
Primært antistoff, GS Ser ⁶⁴¹	MedProbe	Cell Signaling Tech #3891.
Primært antistoff, GSK-3 Total protein	MedProbe	Upstate #05-412
Sekundært antistoff, Anti-rabbit	MedProbe	Cell Signaling Tech. #7074
Sekundært antistoff, Anti-mouse	MedProbe	Upstate #12-349
Øvrige produkter til western		
Prestained precision protein standards	BioRad	161-0373
Immobilon-P Transfer membrane, PVDF	Millipore	IPVH00010
Imobillon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore	WBKLS0500

Fremkalling		
UV+-film, Kodak X-OMAT	Jan F Andersen AS	B0004998
Fremkaller: Kodak	Jan F Andersen AS	LX-24
Fiksering: Kodak	Jan F Andersen AS	AL-4

* Inhibitor syntetisert av P. R. Shepherd, University of Auckland Medical School, New Zealand

Øvrige kjemikalier er fra Sigma eller Merck.

Utstyr

Inkuberingsutstyr for muskel (laget på Stami)
 Homogenisator (Polytron PT1200)
 Elektroforese- og blotteutstyr (BioRad)
 Scintillasjonsteller (TRI-Carb 1900 TR; Packard)

I tillegg ble det brukt standard laboratorieutstyr tilgjengelig på Stami, bl.a pipetter, glassutstyr, analysevekker, frysetørker, pH-meter og spektrofotometer.

APPENDIKS 2

LØSNINGER

Løsninger som er brukt i oppgaven er listet opp her. Oppskriftene er ikke fullstendige, men er tatt med for å illustrere hva som ble brukt under forsøkene. Alt vann som ble brukt var renset vann fra Millipore-anlegg (HPLC-kvalitet).

Buffer til inkubering av muskler (Krebs-Henseleit buffer)

Oppskrift Stock I	Kons. i løsning
NaCl	1,16 M
KCl	0,046 M
KH ₂ PO ₄	0,0116 M
NaHCO ₃	0,253 M

I renset vann

Oppskrift Stock II	Kons. i løsning
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,025 M
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,0116 M

I renset vann

Bruksferdig løsning ble laget hver forsøksdag på følgende måte:

100 ml Stock I

100 ml Stock II

800 ml renset vann

Gasset i (95 % O₂/5 % CO₂) i ca. 45 min

Deretter tilsatt:	Mengde	Kons. i løsning
BSA	900 mg	0,1%
HEPES	1072,3 mg	5 mM
Glucose monohydrate	981 mg	5,5 mM
Pyruvat	198 mg	2 mM

-pH justert til 7,4

Løsninger til Western blotting

Homogeniseringsbuffer	Kons. i løsning
H ₂ O	
1 M HEPES pH 7,4	50 mM
3 M NaCl	150 mM
100 mM Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM
500 mM NaF	30 mM
100 mM Na ₃ VO ₄	1 mM
200 mM EDTA	10 mM
250 mM Benzamidin	2,5 mM
Protease inhibitor cocktail (P-8340)	0,5 µl/10 mg muskel
Triton X-100 (tilsatt etter homogenisering)	1 %

- pH justert til 7,4

5×SDS prøvebuffer	Kons. i løsning
1,5 M Tris pH 6,8	313 mM
20 % SDS	10 %
2,5 % Bromfenolblått/glycerol	0,25 %/9,9 %
Glycerol	19 %

Stackinggel (til påføring av prøver) til Western, 4 % akrylamid, 4 geler	Total mengde
H ₂ O	6,4 ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,67 ml
20 % SDS	40 µl
40 % Acrylamid/Bis (37,5 : 1)	0,8 ml
TEMED (kons.)	8 µl
10 % APS	80 µl

Separasjonsgel til Western, 10 % akrylamid, 4 geler	Total mengde
H ₂ O	7,8 ml
1,5 M Tris pH 8,8	4 ml
20 % SDS	80 µl
40 % Acrylamid/Bis (37,5 : 1)	4 ml
TEMED (kons.)	9,6 µl
10 % APS	160 µl

Elektroforesebuffer	Kons. i løsning
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

I renset vann

Overføringsbuffer	Kons. i løsning
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Metanol	10 %

I renset vann

PBS/0,1 % Tween-20	Kons. i løsning
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	80 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	20 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,1 %

I renset vann

- pH justeres til 7,4 med NaOH

REFERANSER

Andrews S, Stephens LR, & Hawkins PT (2007). PI3K class IB pathway. *Sci STKE* **407**, (in press).

Asano T, Fujishiro M, Kushiyama A, Nakatsu Y, Yoneda M, Kamata H, & Sakoda H (2007). Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions. *Biol Pharm Bull* **30**, 1610-6.

Asano T, Kanda A, Katagiri H, Nawano M, Ogihara T, Inukai K, Anai M, Fukushima Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Hooshmand-Rad R, Heldin CH, Oka Y, & Funaki M (2000). p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. *J Biol Chem* **275**, 17671-6.

Bader AG, Kang S, Zhao L, & Vogt PK (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* **5**, 921-9.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie J, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur S, Alessi D, & Cohen P (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors; a further update. *Biochem J*, (in press).

Björnholm M, Kawano Y, Lehtihet M, & Zierath JR (1997). Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* **46**, 524-527.

Brachmann SM, Ueki K, Engelman, JA, Kahn RC, & Cantley LC (2005). Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol Cell Biol* **25**, 1596-1607.

Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence JC Jr, Abraham RT (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* **15**, 5256-67.

Cartee GD & Wojtaszewski JF (2007). Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. *Appl Biochem Biotechnol* **32**, 557-566.

Chaussade C, Pirola L, Bonnafous S, Blondeau F, Brenz-Verca S, Tronchère H, Portis F, Rusconi S, Payrastra B, Laporte J, & Van Obberghen E (2003). Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [PtdIns(3)P] phosphatase in muscle cell lines: involvement of PtdIns(3)P in insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol* **17**, 2448-60.

Chaussade C, Rewcastle GW, Kendall JA, Denny WA, Cho K, Gronning LM, Chong ML, Anagnostou S, Jackson SP, Daniele N, & Shepherd PR (2007). Evidence for functional redundancy of class-IA PI 3-kinase isoforms in insulin signalling. *Biochem J* **404**, 449-458.

Cohen P (2006). The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 867-873.

DeFeo-Jones D, Barnett SF, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Leander KR, McAvoy E, Robinson RG, Duggan ME, Lindsley CW, Zhao Z, Huber HE, & Jones RE (2005). Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members. *Mol Cancer Ther* **4**, 271-9.

Domin J, Pages F, Volinia S, Rittenhouse SE, Zvelebil MJ, Stein RC, & Waterfield MD (1997). Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J* **326**, 139-47

Falasca M, Hughes WE, Dominguez V, Sala G, Fostira F, Fang MQ, Cazzolli R, Shepherd PR, James DE, & Maffucci T (2007). The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J Biol Chem* **282**, 28226-28236.

Foukas LC, Claret M, Pearce W, Okkenhaug K, Meek S, Peskett E, Sancho S, Smith AJ, Withers DJ, Vanhaesebroeck B (2006). Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* **441**, 366-70.

Foukas LC, Daniele N, Ktori C, Anderson KE, Jensen J, & Shepherd PR (2002). Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. *J Biol Chem* **277**, 37124-37130.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, & Zvartau EE (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* **51**, 83-133.

Graham TE (2001). Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports Med* **31**, 785-807.

Hausdorff SF, Fingar DC, Morioka K, Garza LA, Whiteman EL, Summers SA, & Birnbaum MJ (1999). Identification of wortmannin-sensitive targets in 3T3-L1 adipocytes. Dissociation of insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **274**, 24677-84.

Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, & Stephens LR (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **34**, 647-62.

Hawkins PT, & Stephens LR (2007). PI3Kgamma is a key regulator of inflammatory responses and cardiovascular homeostasis. *Science* **318**, 64-6.

Jensen J (2004). Nutritional concerns in the diabetic athlete. *Curr Sports Med Rep* **3**, 192-197.

Jensen J, Ruzzin J, Jebens E, Brennesvik EO, & Knardahl S (2005). Improved insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthase activation in rat skeletal muscles after adrenaline infusion: role of glycogen content and PKB phosphorylation. *Acta Physiol Scand* **184**, 121-130.

Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, & Kahn BB (1999). Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes [see comments]. *J Clin Invest* **104**, 733-741.

Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, Hino Y, Kuroda S, Takata M, Matsumoto M, Maeda T, Konishi H, Kikkawa U, & Kasuga M (1998). Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol* **18**, 3708-3717.

Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, Loewith R, Stokoe D, Balla A, Toth B, Balla T, Weiss WA, Williams RL, & Shokat KM (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* **125**, 733-747.

Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, & Wallberg-Henriksson H (1998). Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* **47**, 1281-6.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, & Roth RA (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* **271**, 31372-31378.

Kramer HF, Witczak CA, Taylor EB, Fujii N, Hirshman MF, & Goodyear LJ (2006). AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* **281**, 31478-31485.

McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, & Alessi DR (2005). Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J* **24**, 1571-1583.

Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Carter L, Johnson K, & Henry RR (2002). Inhibition of glycogen synthase kinase 3 improves insulin action and glucose metabolism in human skeletal muscle. *Diabetes* **51**, 2190-8.

Paynter NP, Yeh HC, Voutilainen S, Schmidt MI, Heiss G, Folsom AR, Brancati FL, & Kao WH (2006). Coffee and sweetened beverage consumption and the risk of type 2 diabetes mellitus: the atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol* **164**, 1075-84.

Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AF, Gourlay R, Magnuson MA, & Alessi DR (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* **405**, 513-522.

Pomel V, Klicic J, Pomel V, Klicic J, Covini D, Church DD, Shaw JP, Roulin K, Burgat-Charvillon F, Valognes D, Camps M, Chabert C, Gillieron C, Françon B, Perrin D, Leroy D, Gretener D, Nichols A, Vitte PA, Carboni S, Rommel C, Schwarz MK, Rückle T (2006). Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase γ . *J Med Chem* **49** 3857-3871.

Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, & Harrison SD (2003). Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* **52**, 588-595.

Ruzzin J, Wagman AS, & Jensen J (2005). Glucocorticoids-induced insulin resistance: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia* **48**, 2119-2130.

Salazar-Martinez E, Willett WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann MF, Stampfer MJ, & Hu FB (2004). Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* **140**(1), 1-8.

Saltiel AR & Kahn CR (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.

Shepherd PR (2005). Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand* **183**, 3-12.

Shepherd PR, Withers DJ, & Siddle K (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* **333**, 471-490.

Soos MA, Jensen J, Brown RA, O'Rahilly S, Shepherd PR, & Whitehead JP (2001). Class II phosphoinositide 3-kinase is activated by insulin but not by contraction in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* **396**, 244-248.

Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE, & Birnbaum MJ (1999). The role of glycogen synthase kinase 3 β in insulin-stimulated glucose metabolism. *J Biol Chem* **274**, 17934-17940.

Taniguchi CM, Emanuelli B, & Kahn CR (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 85-96.

Thomas JA, Schlender KK, & Lerner J (1968). A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. *Anal Biochem* **25**, 486-499.

Thong FS, Derave W, Kiens B, Graham TE, Urso B, Wojtaszewski JF, Hansen BF, & Richter EA (2002). Caffeine-induced impairment of insulin action but not insulin signaling in human skeletal muscle is reduced by exercise. *Diabetes* **51**, 583-590.

Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BM, Coffey PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y, & Kadowaki T (1998). Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem* **273**, 5315-5322.

Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, & Waterfield MD (1997). P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4330-4335.

Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, & Williams RL (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* **6**, 909-19.

Whiteman EL, Cho H, & Birnbaum MJ (2002). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 444-451.