

# **Perilipin-2s rolle i fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel**

- Studier på muskelceller fra *Plin2*-knockout-mus

Masteroppgave for graden Master i farmasi



**Caroline Thu Loan Nguyen**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO  
Oktober 2012



# Perilipin-2s rolle i fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel

- Studier på muskelceller fra *Plin2*-knockout-mus

Masteroppgave for graden Master i farmasi

**Caroline Thu Loan Nguyen**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Veiledere

Professor Arild C. Rustan  
Professor G. Hege Thoresen  
Dr. philos Knut Tomas Dalen  
Stipendiat Siril S. Bakke

© Caroline Thu Loan Nguyen

2012

Perilipin-2s rolle i fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Caroline Thu Loan Nguyen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt i samarbeid med Avdeling for ernæringsforskning, Universitetet i Oslo i perioden august 2011 til oktober 2012.

Jeg vil gjerne takke mine veiledere, professor Arild C. Rustan, professor G. Hege Thoresen, Dr. philos Knut Tomas Dalen og stipendiat Siril S. Bakke for god veiledning og gode faglige innspill gjennom hele året som har vært. Tusen takk for all den hjelpen jeg har fått under skriveprosessen. En spesiell stor takk rettes til Arild C. Rustan for meget god oppfølging og god lab-veiledning og ikke minst for god støtte og motivasjon under hele perioden. Riktig stor takk til Hege Thoresen for gode råd og tips under hele skriveprosessen. En stor takk rettes også til Siril S. Bakke som alltid er tilgjengelig på kontoret sitt for å besvare alle mine spørsmål og ledet meg på rett spor når jeg sporet av. Hjertelig takk til Eili T. Kase for å ha hjulpet meg med qPCR når jeg følte meg mest fortap. Takk til Xiang Y. Kong for å ha lært bort de beste triksene for celledyrking av mus. Jeg vil også gjerne få takke Loes Van Houdt for god assistanse i cellarbeidet. Takk til de ”sterke” medlemmene i Muskelbuntgruppen for lærerike og koselige avbrekk i stressende tirsdagsettermiddager. En stor takk til alle på 4. etasje for godt humør og deres evne til å spre glede.

Sist og ikke minst vil jeg gjerne rette en stor takk til min kommende ektemann, Luan M. Nguyen for inspirasjon, god støtte og trøst i mine mest dystre tider. Takk for at du lyste opp hverdagen min og alltid er tilstede for å gi meg motivasjon.

Oslo, oktober 2012



Caroline T. Loan Nguyen

# Abstract

*Introduction:* Skeletal muscle is the largest tissue in the human body and is responsible for most of the lipid oxidation and insulin-stimulated glucose uptake. Changes in lipid- and glucose metabolism in skeletal muscle plays an important role for the development of insulin resistance, thus further insight into glucose and lipid metabolism in skeletal muscle could provide better insight into this disease condition. The development of insulin resistance has been linked to excessive storage of fatty acids in skeletal muscle (ectopic lipid accumulation). In recent years it has been revealed that intramyocellular lipid droplets plays an important role in lipid metabolism. Effective storage of free fatty acids in lipid droplets is believed to prevent insulin resistance in skeletal muscle. Fatty acid uptake and storage, including lipolysis of triacylglycerol from intramyocellular lipid droplets, are carefully regulated by lipid droplet associated proteins. One of the known lipid droplets associated proteins is perilipin 2 (*Plin2*) and its highly expressed in skeletal muscle. Based on these reports we studied perilipin 2's role in lipid- and glucose metabolism in skeletal muscle by comparing myotubes from *Plin2* knock out- and *Plin2* wild type mice.

*Methods:* Cultures of proliferated satellite cells (myoblasts) from *Plin2* knock out- and wild type mice were created. Satellite cells were differentiated to multinucleated myotubes before experiments were carried out. Myotubes were pretreated for 24 hours with different concentrations of oleic acid, GW501516 (PPAR $\delta$  agonist) and GW7647 (PPAR $\alpha$  agonist). Substrate oxidation assays were used to examine fatty acid- and glucose metabolism in the cells. To monitor fatty acid- and glucose metabolism, cells were incubated for 4 hours with [ $^{14}$ C]oleic acid or [ $^{14}$ C]glucose +/- oleic acid or the mitochondrial uncoupler FCCP. Accumulation and lipolysis of [ $^{14}$ C]oleic acid were studied with scintillation proximity assay (SPA) over time with different concentrations. To explore effects on *Plin3* and *Plin5* mRNA in *Plin2* wild type and knock out *Plin2* cells, we used qPCR.

*Results:* Oleic acid uptake, accumulation and oxidation were significantly lower in *Plin2* myotubes knock out compared to *Plin2* wild type myotubes. The results also showed a lower uptake, accumulation and oxidation of glucose in *Plin2* knock out myotubes compared to *Plin2* wild type myotubes. Despite this, a similar suppression of glucose oxidation by oleic acid was observed. Both basal lipolysis and total lipolysis of oleic acids was not found to be significantly different between the donors. In addition, stimulation with a PPAR $\delta$  agonist

(GW501516) caused an increased oleic acid oxidation in *Plin2* wild type myotubes, while no changes in oleic acid oxidation was observed in *Plin2* knock out myotubes.

*Discussion/Conclusion:* The results suggest a lower energy metabolism/requirement in *Plin2* knock out myotubes, hence a lower total energy metabolism. Results from this thesis suggest that *Plin2* could be involved in fatty-triacylglycerol futile cycling. In addition, results showed that PPAR $\delta$  is involved in fatty acid oxidation in skeletal muscle of mice probably by upregulation of *Plin2*.

# Sammendrag

*Innledning:* Skjelettmuskulaturen er det største vevet i menneskekroppen og er ansvarlig for mesteparten av lipidoksidasjonen og insulin-stimulert glukoseopptak og utnyttelse. Endringer i lipid- og glukosemetabolismen i skjelettmuskel spiller en viktig rolle i utvikling av insulinresistens, og dermed vil økt innsikt i energiomsetning i skjelettmuskelen kunne gi en bedre sykdomsforståelse. Utviklingen av insulinresistens er blitt koblet opp mot økt akkumulering av fettsyrer i skjelettmuskel (ektopisk lipidakkumulering). I de senere årene har det blitt avdekket at intramyocellulære lipiddråper spiller en viktigere rolle i lipidmetabolismen enn tidligere antatt. Effektiv lagring av FFA i disse lipiddråpene antas å forebygge mot utvikling av insulinresistens i skjelettmuskel. Regulering av fettsyreopptak og lagring i tillegg til lipolyse av triglyserider fra de intramyocellulære lipiddråpene foreslås å være nøye regulert av bla. lipiddråpeassosierte proteiner. En av de lipiddråpeassosierte proteinene, perilipin-2 (*Plin2*), er høyt uttrykt i skjelettmuskel. Vi har på bakgrunn av dette studert rollen til perilipin-2 i lipid- og glukosemetabolismen i skjelettmuskel ved å sammenligne myotuber fra *Plin2*-knockout- og villtypemus.

*Metode:* Kulturer av prolifererte satelittceller (myoblaster) fra *Plin2*-knockout- og villtypemus ble opprettet. Myoblastene ble differensiert til flerkjernede myotuber før det ble utført forsøk på dem. Myotubene ble forbehandlet 24 timer med ulike konsentrasjoner av oljesyre, GW501516 (PPAR $\delta$ -agonist) og GW7647 (PPAR $\alpha$ -agonist). Det ble benyttet substratoksidasjonsassay for å undersøke fettsyre- og glukosemetabolismen i myotubene. For å studere fettsyre- og glukosemetabolismen ble cellene inkubert i 4 timer med enten [ $^{14}\text{C}$ ]oljesyre eller [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]glukose +/- oljesyre eller mikondriell frikobler FCCP. Akkumulering og lipolyse av [ $^{14}\text{C}$ ]oljesyre ble studert ved hjelp av ”scintillation proximity assay” over tid med forskjellige oljesyre konsentrasjoner. Real-time qPCR ble benyttet for å studere effekter på *Plin3*- og *Plin5*-mRNA-uttrykk hos *Plin2*-villtype- og *Plin2*-knockoutmyotuber.

*Resultater:* Oljesyreopptak og oksidasjon var signifikant lavere hos *Plin2*-knockoutmyotuber sammenlignet med villtypemyotuber. Samtidig viste resultatene et lavere glukoseopptak, akkumulering og oksidasjon av glukose hos *Plin2*-knockoutmyotuber i forhold til *Plin2*-villtypemyotuber. Til tross for dette, ble det observert en lignende suppresjon av glukoseoksidasjon av oljesyre mellom *Plin2*-knockout- og *Plin2*-villtypemyotuber. Basal- og



total lipolyse av oljesyre var ikke signifikant forskjellig mellom donorene. Stimulering av cellene med en PPAR $\delta$ -agonist (GW501516) gav økt oljesyreoksidasjon i *Plin2*-villtypemyotuber, mens ingen endringer i oljesyreoksidasjon ble observert hos *Plin2*-knockoutmyotuber.

*Diskusjon/konklusjon:* Resultatene tyder på en lavere energimetabolisme (energibehov) hos *Plin2*-knockoutmyotuber, og dermed en lavere total energimetabolisme i myotubene. *Plin2* kan være involvert i en energisløsende mekanisme ("futil sykling") via fettsyre-triglyserid-syklus. I tillegg viste resultatene at PPAR $\delta$  er involvert i fettsyreoksidasjon i skjelettmuskel hos mus, trolig blant annet ved å oppregulere *Plin2*-uttrykk.

# Forkortelser

ACBP	Acyl-CoA-bindende protein
AC	Adenylylcyklase
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
ACS	Acyl-CoA syntetase
AMPK	AMP-aktivert proteinkinase
ARF	ADP ribosyleringsfaktor
ATGL	Fettvevstriglyseridlipase
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serum albumin
CA	Celle-assosiert
cAMP	Syklisk-adenosin-monofosfat
CACT	Karnitin acylkarnitintranslokase
CGI-58	Komparativ gen-identifikasjon-58
CoA	Koenzym A
CPTI/CTPII	Karnitin-palmitoyltransferase I,II
CRP	C-reaktiv protein
DAG	Diacylglycerol
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ES	Embryonale stamceller
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERK	Ekstracellulært signalregulert kinaser
ERR $\alpha$	Østrogenreseptor-relatert reseptor $\alpha$
FABP <sub>c</sub>	Fettsyrebindende protein-cytoplasma
FABP <sub>pm</sub>	Fettsyrebindende protein-plasmamembran
FADH <sub>2</sub>	Flavin-adenin-dinukleotid
FATP1	Fettsyretransport protein 1
FAT/CD36	Fettsyretranslokase/"cluster of differentiation 36"
FBS	Føtal bovint serum
FCCP	Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenylhyrazon
FFA	Frie fettsyrer
G-3-P	Glyserol 3-fosfat
GLUT4	Glukosetransportør 4
GTP	Guanosintrifosfat
HDL	High-density lipoprotein
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HK	Heksokinase
HSL	Hormonsensitiv lipase
IL-6	Interleukin-6
I $\kappa$ K- $\beta$	Inhibitorisk $\kappa$ kinase- $\beta$
IMTG	Intramyocellulære triglyserider

IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal kinase
KD	Knockdown
KMI	Kroppsmasseindeks
KO	Knockout/Utslått
LDL	Low-density lipoprotein
MAG	Monoacylglyserol
MAPK	Mitogen-aktiverte protein kinaser
MCP-1	Monocytte kjemotaktisk protein-1
MGAT	Monoacylglyserol acyltransferase
mRNA	Messenger ribonukleinsyrer
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
OA	Oljesyre
PAT	<u>P</u> erilipin, <u>A</u> DRP og <u>T</u> IP-47 relaterte proteiner
PDE	Fosfodiesterase
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK-1	Fosfor-3-fosfoinositidavhengig kinase 1
PDK4	Pyruvatdehydrogenase kinase-isozym 4
PFK	Fosfofruktokinase
PIP3	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfat
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A

PKB/Akt	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLD	Fosforlipase D
PPAR	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor
PP2A	Proteinfosfatase 2A
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
RBP-4	Retinol-bundet protein-4
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Rotasjoner per minutt
ROS	Reaktive oksygenspesies
SEM	Standardfeil
SH2	Scr homolog 2
SPA	”Scintillation proximity assay”
TAG	Triglyserider
TNF- $\alpha$	Tumor nekrosefaktor- $\alpha$
VLDL	Very low-density lipoprotein
WHO	Verdens helseorganisasjon
WT	Wild-type/Villtype
ZDF	”Zucker diabetic fatty” rottemodell

# Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Metabolsk syndrom.....	1
1.2	Visceral fedme.....	1
1.3	Insulinresistens.....	2
1.4	Skjelettmuskel.....	4
1.5	Metabolisme i skjelettmuskel.....	6
1.6	Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel.....	6
1.6.1	Transport av fettsyrer i blodet og opptak av fettsyrer i cellene.....	6
1.6.2	Lagring av fettsyrer.....	7
1.6.3	$\beta$ -oksidasjon av fettsyrer.....	9
1.6.4	Lipolyse i fett- og muskelvev.....	11
1.7	Glukosemetabolisme i skjelettmuskel.....	13
1.7.1	Opptak av glukose.....	13
1.7.2	Glykolyse.....	14
1.7.3	Lagring av glukose.....	16
1.8	Metabolsk fleksibilitet.....	16
1.9	Lipiddråper.....	17
1.9.1	Mobilisering av fett fra lipiddråper.....	18
1.9.2	Lipiddråpenes cellulære roller.....	18
1.10	Lipiddråpeassosierte proteiner.....	18
1.10.1	PAT-familien.....	18
1.10.2	Perilipin-1.....	19
1.10.3	Perilipin-2.....	20
1.10.4	Perilipin-3.....	23
1.10.5	Perilipin-4 og perilipin-5.....	23
1.11	Substanser benyttet under forsøkene.....	24
1.11.1	Insulin.....	24
1.11.2	Oljesyre.....	25
1.11.3	GW501516.....	26
1.11.4	GW7647.....	26
1.11.5	Karbonylcyanid <i>p</i> -trifluorometoksyfenylhydrazon.....	26

1.11.6	Triacsin C .....	27
1.11.7	A922500 .....	27
2	Mål for oppgaven .....	28
3	Materialer og metoder .....	29
3.1	Materialer .....	29
3.2	Cellemodell .....	30
3.3	Musekarakteristika .....	31
3.4	Isolering og opprensing av primære myoblaster fra mus .....	32
3.4.1	Hurtigopprensing og hurtigsplitt .....	34
3.4.2	Etablering av cellebank .....	34
3.4.3	Utsåing av satelittceller til forsøk .....	35
3.5	Substratoksidasjonsforsøk .....	36
3.5.1	Fettsyreoksidasjonsforsøk .....	37
3.5.2	Glukoseoksidasjonsforsøk .....	37
3.5.3	Måling av celleassosiert radioaktiv oljesyre .....	38
3.6	Scintillation proximity assay (SPA) .....	38
3.7	Proteinmåling (Bradford metoden) .....	40
3.8	Radioaktive isotoper .....	40
3.9	Kvantitativ real-time RT-PCR .....	41
3.9.1	Forbehandling og høsting av celler til mRNA kvantifisering i qPCR .....	41
3.9.2	Isolering av total RNA og kvantifisering av RNA .....	41
3.9.3	cDNA syntese .....	42
3.9.4	Kvantifisering av cDNA med qPCR .....	43
3.9.5	Kvantifisering av mRNA .....	44
3.9.6	TaqMan prober .....	45
3.9.7	SYBR Green 1 .....	46
4	Presentasjon av data og statistisk evaluering .....	48
5	Resultater .....	49
5.1	Musecelle-karakteristika .....	49
5.2	Opptak, akkumulering, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av oljesyre mellom enkeltdonorene .....	51
5.3	Effekter av forbehandling med ulike oljesyrekonentrasjoner på opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre .....	53

5.4	Effekter av GW501516 og GW7647 på opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre .....	55
5.5	Effekt av FCCP på oljesyreoksidasjon.....	57
5.6	Forskjell i opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre mellom <i>Plin2</i> -villtype- og <i>Plin2</i> -knockout-myotuber .....	60
5.7	Effekter av ulike oljesyrekonsentrasjoner på kronisk akkumulering av oljesyre.....	61
5.8	Effekter av ulike oljesyrekonsentrasjoner på basal- og total lipolyse av oljesyre .....	63
5.9	Reforestering av oljesyre.....	66
5.10	Effekt av forbehandling med ulike oljesyrekonsentrasjoner på opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose.....	67
5.11	Effekt av forbehandling med GW501516 og GW7647 på opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose.....	68
5.12	Effekt av akutt oljesyre på glukoseopptak og oksidasjon .....	71
5.13	Suppresjon av oljesyre på glukoseoksidasjon .....	73
5.14	Effekt av akutt insulin på glukoseopptak og oksidasjon .....	74
5.15	Effekt av FCCP på glukoseoksidasjon .....	75
5.16	Forskjell i opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose mellom <i>Plin2</i> -villtype- og <i>Plin2</i> knockout-myotuber.....	77
5.17	Genuttrykk med real-time qPCR.....	78
6	Diskusjon.....	80
6.1	Kort oppsummering av hovedfunnene .....	80
6.2	Effekt av <i>Plin2</i> på energimetabolismen .....	82
6.3	<i>Plin2</i> og stimulering med PPAR-agonister .....	87
6.4	Uttrykk av <i>Plin3</i> og <i>Plin5</i> ved fravær av <i>Plin2</i> .....	89
7	Konklusjon .....	90
8	Referanser.....	91
9	Appendiks.....	98
9.1	Medier til celledyrking .....	98
9.1.1	Proliferasjonsmedium.....	98
9.1.2	Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium .....	98
9.1.3	Differensieringsmedium.....	98
9.1.4	Frysemedium .....	99
9.2	0,01% kollagen I-behandlede celleflasker .....	99
9.3	Andre medier .....	99



9.3.1	1x Høstebuffer .....	99
9.3.2	DPBS m/ Hapes .....	100
9.4	Medier til substrate proximity assay (SPA) .....	100
9.4.1	Pulsmedium til substrate proximity assay .....	100
9.4.2	Colorless DMEM 1g/l fusjonsmedium .....	101
9.4.3	Chasemedium til substrate proximity assay .....	101
9.5	Akuttmedier til substratoksidasjonsforsøk .....	101
9.5.1	[1- <sup>14</sup> C]oljesyre (0,5 µCi/ml, 100 µM) .....	101
9.5.2	D-[ <sup>14</sup> C(U)]glucose (0,3 µCi/ml, 100 µM) .....	102
9.6	Kvantitativt real-time RT-PCR .....	102
9.6.1	TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression assay .....	102
9.6.2	Primere til kvantitativ real-time RT-PCR med SYBR Green 1 .....	102



# 1 Innledning

## 1.1 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom er en tilstand der en rekke risikofaktorer som høyt blodtrykk, aterogen dyslipidemi, fedme og nedsatt glukosetoleranse forekommer samtidig. Når risikofaktorene forekommer samtidig kan det gi økt risiko for utvikling av hjerte- og karsykdommer og type 2-diabetes [1, 2]. I tillegg til overnevnte risikofaktorer er metabolsk syndrom assosiert med protrombotiske og proinflammatoriske tilstander som også predisponerer for utviklingen av hjerte- og karsykdommer og insulinresistens [3].

Patogenesen for metabolsk syndrom er i dag fortsatt uklar, men insulinresistens og fedme anses som viktige faktorer for utviklingen av metabolsk syndrom. Insulinresistens og visceral fedme går oftest hånd i hånd da tilstedeværelse av den ene faktoren ofte fører til utviklingen av den andre [4]. Det eksisterer per i dag ingen medikamenter som kan behandle alle komponentene ved metabolsk syndrom samtidig, og derfor må risikofaktorene behandles hver for seg med mange ulike legemidler. Livsstilsendringer som økt fysisk aktivitet, vektreduksjon og endret kosthold er inkludert i behandling av metabolsk syndrom og er viktig for forebygging mot hjerte- og karsykdommer og type 2-diabetes [5, 6].

## 1.2 Visceral fedme

Ifølge verdens helseorganisasjon (WHO) er fedme og overvekt en tilstand med unormal eller økt fettakkumulering som kan være helseskadelig. Fedme defineres ofte som en kroppsmasseindeks (KMI)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  eller en livvidde på  $\geq 94 \text{ cm}$  hos menn og  $\geq 80 \text{ cm}$  hos kvinner [4, 7]. Overvekt og fedme er den femte ledende dødsårsaken på verdensbasis og kan bidra til utviklingen av type 2-diabetes, insulinresistens, ischemisk hjertesykdom og visse krefttyper. Hovedårsaken til utviklingen av fedme er først og fremst manglende fysisk aktivitet kombinert med økt energiinntak, men arv kan også være viktig i sykdomsbildet [7].

Det er ikke alle overvektige mennesker som utvikler insulinresistens og type 2-diabetes. Fordelingen av kroppsfettet, særlig visceral fedme har stor betydning for utviklingen av type 2-diabetes, aterosklerose og en rekke metabolsk syndrom risikofaktorer. Det viscerele fettvevet er hyperlipolytisk og medvirker til økt tilstrømming av frie fettsyrer (FFA) til blant

annet skjelettmuskulatur og lever. Høy FFA-konsentrasjon i insulinsensitive vev kan medføre til ektopisk fettakkumulering som kan forstyrre muskel- og leverfunksjonen. Økt tilstrømming av FFA til leveren bidrar til økt sekresjon av triglyseridrike lipoproteiner, redusert hepatisk degradering av apolipoprotein B, hyperinsulinemi og økt glukoseproduksjon som kan utvikle seg til glukoseintoleranse [8]. I tillegg til å fungere som et lager for overflødig energi, fungerer det viscerale fettvevet også som et endokrint organ da det er i stand til å produsere og frigi store mengder proinflammatoriske cytokiner (TNF- $\alpha$ , IL-6), hormoner (leptin) og andre faktorer (RBP-4, MCP-1) som er involvert i utviklingen av insulinresistens [9].

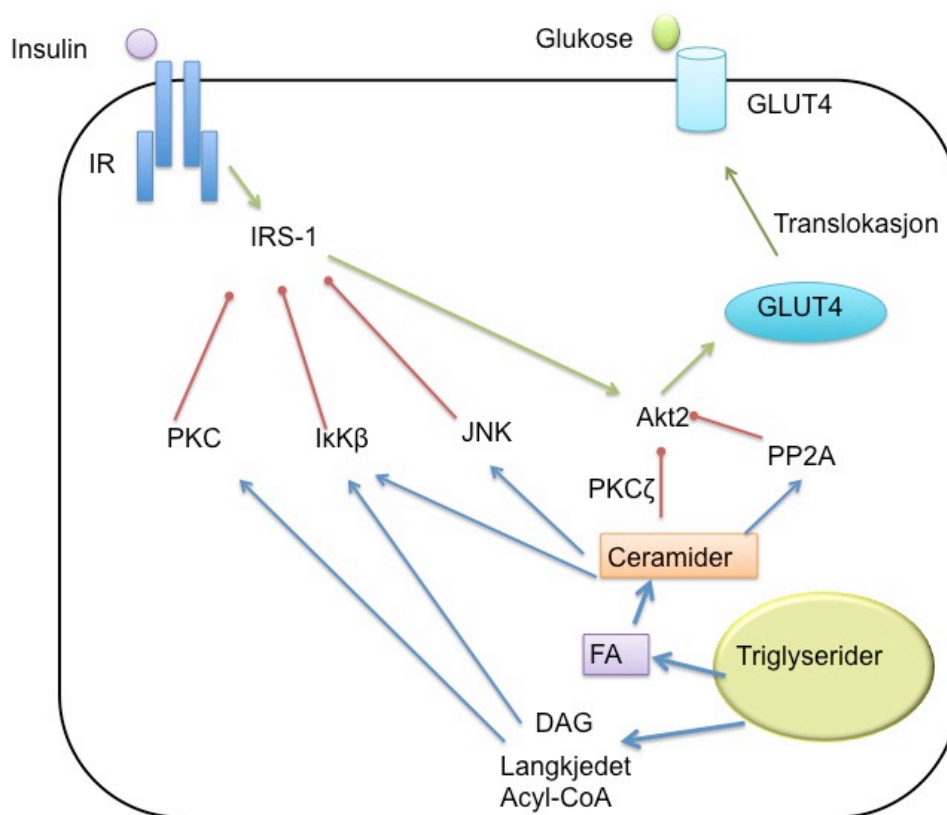
### **1.3 Insulinresistens**

Insulinresistens er en metabolsk tilstand der fysiologiske konsentrasjoner av insulin ikke gir tilstrekkelig biologisk respons i skjelettmuskel, lever og fettvev. Resultatet av insulinresistens er blant annet redusert insulin-mediert glukoseopptak i perifert vev og økt glukosefrigjøring fra lever. Kroppen vår er i stand til å kompensere for denne defekten ved å øke sekresjonen av insulin fra  $\beta$ -cellene i pankreas. Denne tilstanden betegnes ofte som hyperinsulinemi [10]. Når den kompensatoriske mekanismen svikter kan det medføre til en tilstand med hyperglykemi og svekket glukoseintoleranse. Svekket glukoseintoleranse er definert som mellomstadiet mellom normal glukosetoleranse og type 2-diabetes. Svekket glukoseintoleranse betegnes også ofte som prediabetes [11].

Insulinresistens i skjelettmuskulaturen er kritisk da skjelettmuskel er det største perifere vevet som står for fettsyreopptak, fettsyreoksidasjon og insulin-stimulert glukoseopptak [12]. Årsaken til utviklingen av insulinresistens er foreløpig ikke kartlagt, men insulinresistens er implisert som en mulig faktor i utviklingen av metabolske og kardiovaskulære sykdommer hos personer med visceral fedme [13]. Økt FFA fra det viscerale fettvevet er blitt pekt ut som en mulig syndebukk for utviklingen av insulinresistens. Det antas at FFA kan bidra til ektopisk akkumulering av lipider i insulinsensitive vev, som i lever og skjelettmuskel. Ektopisk akkumulering av lipider kan videre medføre til lipotoksitet og forstyrre insulinresponsen i skjelettmuskelen [9].

En rekke fettsyremetabolitter som diacylglyserol (DAG), ceramider og langkjedet-acyl-CoA er antatt å være involvert i utviklingen av insulinresistens i skjelettmuskulatur. Metabolittene akkumulerer i skjelettmuskelvevet ved redusert intracellulær fettsyremetabolisme samt ved

økt tilgang til FFA i skjelettmuskelen. DAG og langkjedet-acyl-CoA kan forstyrre insulinsignalerer ved å aktivere proteinkinase C (PKC) og inhibitorisk  $\kappa$  Kinase- $\beta$  ( $I\kappa\kappa\beta$ ), som induserer serine/treonin fosforylering av insulinreseptorsubstrat I (IRS-1) (Figur 1). Fosforylering av IRS-1 forhindrer videre aktivering av fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K), slik at insulinreseptorsignalerer inne i cellene svekkes og translokasjonen av glukosetransportør 4 (GLUT4) til cellemembranen reduseres. Langkjedet-acyl-CoA er også et substrat for dannelsen av DAG og ceramider [9, 12].



**Figur 1: Mulig mekanisme for insulinresistens i skjelettmuskel.** Diacylglycerol (DAG), ceramider og langkjedet-acyl-CoA er involvert i utviklingen av insulinresistens. DAG og langkjedet-acyl-CoA kan forstyrre insulinsignalerer inne i cellene ved å aktivere proteinkinase C (PKC) og inhibitorisk  $\kappa$  kinase- $\beta$  ( $I\kappa\kappa\beta$ ). PKC og  $I\kappa\kappa\beta$  er i stand til å indusere til fosforylering av insulinreseptorsubstrat 1 (IRS-1), slik at aktivering av proteinkinase B $\beta$  (PKB $\beta$ /Akt2) hemmes, og signaler til glukosetransportør 4 (GLUT4)-translokasjon til cellemembranen svekkes. Ceramider er involvert i inaktivering av PKB $\beta$ /Akt2 både via proteinfosfatase 2A (PP2A) og proteinkinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ), som også kan medføre til hemming av GLUT4-translokasjon, som kan resultere i redusert glukoseopptak inn i cellene. Det antas også at ceramider kan hemme insulinreseptorsubstrat I (IRS-1) gjennom aktivering av  $I\kappa\kappa\beta$  og c-Jun N-terminal kinase (JNK) [12].

Dannelsen av ceramider induseres først og fremst av mettede fettsyrer [12]. Ceramider antas å være involvert i en mekanisme som fører til defosforylering og inaktivering av proteinkinase B $\beta$  (PKB $\beta$ /Akt2) via aktivering av proteinfosfatase 2A (PP2A) slik at translokasjon av GLUT4 til cellemembranen begrenses (Figur 1). Ceramider er også i stand til å forhindre translokasjon av PKB $\beta$ /Akt2 via hemming av protein kinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ). En svekket PKB $\beta$ /Akt2-signaleringskan bidra til en reduksjon av insulin-stimulert glykogensyntese [14]. I tillegg spekuleres det om ceramider også er i stand til å hemme IRS-1 gjennom å aktivere Ikk $\beta$  og c-Jun N-terminal kinase (JNK) [9, 12].

Hos overvektige personer er det blitt funnet høye nivåer av sirkulerende akutfase-proteiner og inflammatoriske cytokiner. Kronisk lavgradsinflammasjon er ofte observert hos disse personene. Dette har medført en kobling mellom inflammatoriske cytokiner og utviklingen av insulinresistens [13].

Tumor nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) er et inflammatorisk cytokin som er høyt uttrykt i fettvev hos overvektige personer. Det er blitt observert at TNF- $\alpha$  nivåer økes som følge av redusert insulinsensitivitet. TNF- $\alpha$  er derfor blitt pekt ut som en mulig årsak til utvikling av insulinresistens. Blant annet er anti-TNF- $\alpha$ -antistoffer blitt gitt til overvektige gnagere, noe som har medført til en forbedret insulinsensitivitet hos disse gnagere. På en annen side er det fortsatt stor usikkerhet om hvilken rolle TNF- $\alpha$  har i systemisk insulinresistens [13]. En annen inflammatorisk cytokin som muligens er involvert i insulinresistens er interleukin-6 (IL-6). I likhet med TNF- $\alpha$  produseres og sekreseres IL-6 fra fettvev. Plasmakonsentrasjon av IL-6 henger nøye sammen med KMI og utvikling av insulinresistens. IL-6 kan blant annet direkte påvirke insulinsignaleringskan ved å indusere suppresjon av cytokin signal-3 (SOCS-3), som kan hemme autofosforylering av insulinreseptor (IR) [13]. Om inflammatoriske cytokiner faktisk kan føre til utvikling av insulinresistens er fortsatt for tidlig å si noe om. Flere studier er derfor nødvendig for å avklare hovedårsaken bak utviklingen av insulinresistens.

## 1.4 Skjelettmuskel

Skjelettmuskel er det største vevet i kroppen og utgjør 40-50% av total kroppsvekt. I tillegg til å være viktig for bevegelse er skjelettmuskel også viktig for respirasjon. Skjelettmuskel består av muskelceller, bindevev, blodårer og et nettverk av nerver. Det er flere muskelfibre som

pakkes sammen til muskelbunter ved hjelp av en grov bindevevshinne, og danner selve skjelettmuskulaturen [15]. Kollagenfibrene som finnes i bindevevshinnene går over i senene på hver sin ende av muskelen slik at hver enkel muskelfiber kobles direkte til senen [16]. Skjelettmuskelen er tverrstripet med karakteristiske repeterende mønster av lyse og mørke bånd på tvers av muskelfibrene, og er flerkjernet som følge av sammensmelting av flere myoblaster under fosterutviklingen. De mørke og lyse båndene på muskelfibrene skyldes aktin- og myosinfilamenter som er ordnet i parallelle bunter med regelmessige og repeterende enheter (sarkomer). Myosin- og aktinfilamentene utgjør bevegelsesapparatet til skjelettmuskelen [16, 17].

Mellom plasmamembranen (sarcolemma) av myofibrene og basallamina i muskelfibre eksisterer det i tillegg en gruppe myogene stamceller ofte kalt for satelittceller, som aktiveres ved skade eller ved vekst av muskelen [18]. Når satelittcellene aktiveres av ytre stimuli starter de å migrere til skadet muskelområde og differensiere til nye myoblaster som deretter fusjoneres til flerkjernede myofibre eller fusjonerer med eksisterende muskelfibre. Det finnes en liten andel av satelittceller som ikke lar seg differensieres, men som deler seg sakte til flere og nye satelittceller for å opprettholde en viss antall satelittceller som skal være tilstede til enhver tid i skjelettmuskelen [15].

Skjelettmuskelen består av to hovedtyper muskelfibre som har de samme egenskapene, men som inndeles etter hvor raskt myosin er i stand til å spalte adenosintrifosfat (ATP), og dermed hvor hurtig muskelfiberen kan kontrahere. Type I-fibre er langsomme, oksidative og svært utholdende. Type II-fibre kan deles inn i to underkategorier; type IIa-fibrer som er de raske, oksidative, men middels utholdende og type IIb-fibrer som er glykolytiske (lite oksidative) og lite utholdende. Aktiviteten av type I-fibre domineres ved moderat arbeid og aktiveres ved svake muskelkontraksjoner, mens de raske type IIb-fibre aktiveres ved økt muskelkraft, men har en kortvarig aktivitet. Fordelingen mellom de raske og langsomme fibre varierer etter muskelens oppgaver og mellom individer [19]. Det er blant annet observert en redusert oksidativ enzymaktivitet og økt glykolytisk-aktivitet i skjelettmuskelen hos overvektige individer og personer med type 2-diabetes. Dette kan skyldes en økt andel av type IIb-fibre i forhold til type I- og type IIa-fibre som er blitt funnet hos type 2-diabetikere [20, 21]. Dessuten er det funnet større andel intramyocellulære triglyserider (IMTG) hos type I-fibre i forhold til type II-fibre [12]. Det er blitt foreslått på bakgrunn av flere dyrestudier at type I-fibre øker insulinsensitiviteten fremfor type IIa-fibre, mens type IIa-fibre gir bedre

insulinsensitivitet i forhold til type IIb-fibre. Det er fortsatt ikke kjent om en reduksjon av type I-fibre skyldes selve utviklingen av fedme eller om det er en redusert andel av type I-fibre som predisponerer for fedme [20, 21].

## **1.5 Metabolisme i skjelettmuskel**

Skjelettmuskulaturen er som nevnt det største vevet i kroppen vår og er ansvarlig for mesteparten av lipidoksidasjon og insulin-stimulert glukoseopptak til sitt energiforbruk [12]. Lipid- og glukosemetabolisme i skjelettmuskulaturen spiller en viktig rolle i utvikling av insulinresistens, og økt innsikt i glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel vil derfor kunne gi en bedre sykdomsforståelse, og større mulighet for å utvikle nye effektive legemidler eller nye behandlingsformer i kampen mot insulinresistens.

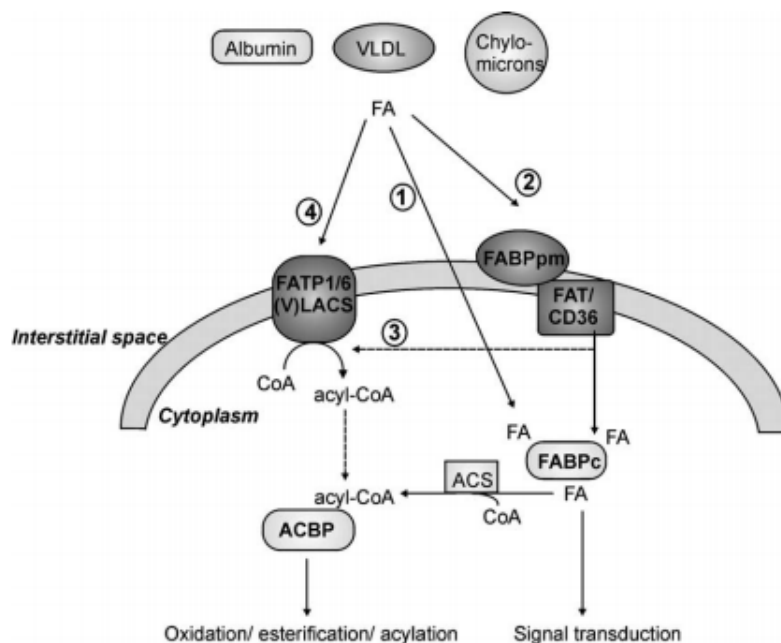
## **1.6 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel**

### **1.6.1 Transport av fettsyrer i blodet og opptak av fettsyrer i cellene**

Fettsyrer i blodsirkulasjonen eksisterer hovedsakelig i form av forestrede fettsyrer, triglyserider (TAG), kolesterolster og fosfolipider pakket inn i lipoproteiner som ”very low density lipoprotein” (VLDL), som har som oppgave å frakte fettsyrer (energi) til perifert vev. FFA eksisterer i uforestret form, bundet til albumin i blodet og dannes fra TAG i fettvev ved hydrolysering ved hjelp av lipaser eller fra lipoproteiner som sirkulerer i blodet. FFA fraktes med albumin til vev som lever og skjelettmuskel, der det blir tatt opp og lagret i intracellulære lipiddråper [22].

Fettsyreopptak gjennom cellemembranen kan skje både gjennom diffusjon og via proteinmediert transport (aktiv transport). Det er først og fremst fettsyretranslokase/”cluster of differentiation 36” (FAT/CD36), fettsyretransport protein 1 (FATP1) og fettsyrebindende protein i plasmamembran (FABPpm) som er involvert i fettsyreopptak i muskelceller (Figur 2). FAT/CD36 er involvert i kortidsregulering av fettsyreopptak i muskelceller, og forflytter seg til cellemembranen fra intracellulære lagrer ved hjelp av muskelkontraksjoner, og trolig også ved stimulering av insulin. Økt translokasjon av FAT/CD36 til cellemembranen øker hastigheten av både fettsyreopptak og fettsyremetabolisme i cellene [23, 24].





**Figur 2: Veier for fettsyreopptak gjennom muskelcellen.** Fettsyrer kan krysse cellemembranen direkte via passiv diffusjon (1), fettsyrebindende protein i plasmamembran (FABPpm) (2), fettsyretranslokase/"cluster of differentiation 36" (FAT/CD36) (3), eller ved hjelp av fettsyrebindende protein I (FATP1) (4). Etter at fettsyrer er blitt fraktet inn i cellen bindes det enten til fettsyrebindende protein i cytoplasma (FABPc) eller går direkte til AMP-bindingssetet til FATP1 og omdannes til acyl-CoA som deretter fraktes med acyl-CoA-bindende protein (ACBP) til mitokondrier for oksidasjon eller til forestring og lagring [24].

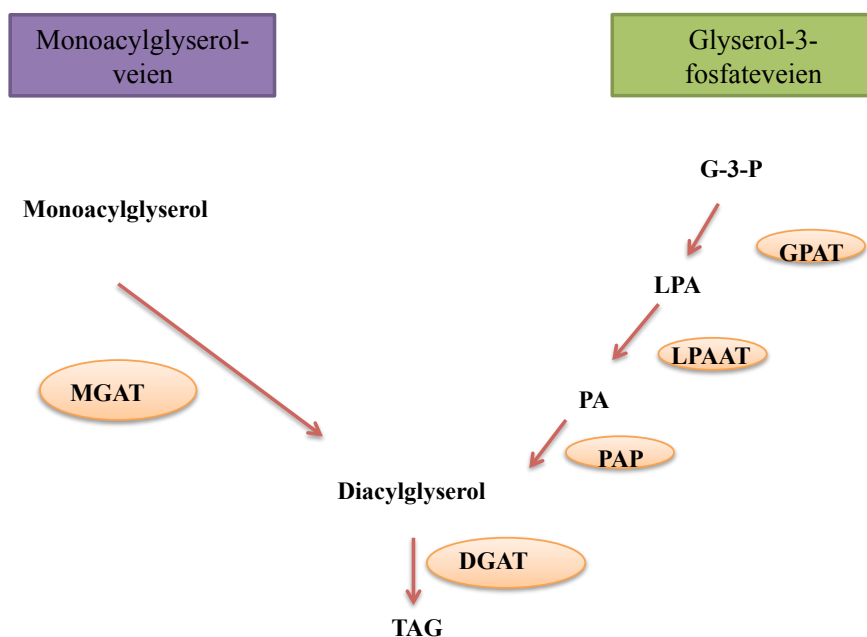
Av fettsyretransport-proteinfamilien (FATP) er FATP1 høyest uttrykt både i muskel- og fettvev. I likhet med FAT/CD36 stimuleres FATP1 til cellemembranen av insulin, og dermed øker opptaket av fettsyrer. Aktivisering av FATP1 til fettsyreopptak kan også skje gjennom andre ukjente mekanismer da det er vist at FATP1-translokasjon ikke er nødvendig for fettsyreopptak. I studier der FATP1 er fjernet påvirkes ikke basalopptaket av fettsyrer i cellene [25]. Dette gjenspeiler at opptaket av fettsyrer kan skje gjennom flere forskjellige mekanismer, og mulig også et kompleks samarbeid mellom de ulike mekanismene for fettsyreopptak.

## 1.6.2 Lagring av fettsyrer

Når fettsyrer ankommer innsiden av muskelcellen blir det fraktet videre gjennom cytoplasmaet til det ytre mitokondriemembranen ved hjelp av et vannløselig fettsyrebindende protein i cytoplasma (FABPc) og acyl-CoA-bindende protein (ACBP). I den ytre

mitokondriemembranen ligger acyl-CoA syntetase (ACS) som er klar for å omdanne fettsyrer til acyl-CoA for å gjøre det tilgjengelig for TAG-syntese og  $\beta$ -oksidasjon. FATP1 har ACS-aktivitet og er derfor også i stand til å omdanne ulike fettsyrer til acyl-CoA (Figur 2) [24]. TAG-syntesen kan foregå via to viktige biokjemiske synteseveier; monoacylglycerol (MAG)-syntesevei og glyserol-3-fosfatveien (G-3-P). De to biokjemiske synteseveier danner forskjellige intermediater i de øvre reaksjonstrinnene, men deler tilslutt et felles hastighetsbestemmende enzymatisk trinn der DAG konverteres til TAG ved hjelp av diacylglycerol acyltransferase (DGAT) (Figur 3) [26]. Det er hovedsakelig glyserol-3-fosfatveien som er den dominerende prosessen i skjelettmuskelceller da denne synteseveien foregår i nesten alle typer vev, mens monoacylglycerol-synteseveien foregår først og fremst i vev med høy TAG-synteseaktivitet som i tynntarm, lever og fettvev [27]. Det antas at monoacylglycerolveien er viktig for pakking av fett fra kosten inn i kylomikron-lipoproteiner [28].

Glukose omdannes til glyserol-3-fosfat via glykolyse i cellene. Glyserol-3-fosfat gjennomgår deretter en rekke acyleringsreaksjoner til TAG via G-3-P-veien, mens FFA og 2-monoacylglycerol først og fremst er substrater for monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) via MAG-veien [28, 29].



**Figur 3:** To viktige biokjemiske veier for TAG-syntese, monoacylglycerolveien og glyserol-3-fosfatveien. MAG-syntesevei: acetylering av monoacylglycerol (MAG) med acyl-CoA av monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) for å

danne diacylglycerol (DAG). Glycerol-3-fosfatveien (G-3-P-veien): acyl-CoA acetyleres med glyserol 3-fosfat (G-3-P) ved hjelp av glyserol-3-fosfat acyltransferase (GPAT) og danner lysofosfatidylsyre (LPA). LPA acetyleres videre av lysofosfatidylsyre acyltransferase (LPAAT) til fosfatidylsyre (PA) og deretter skjer det en defosforylering av PA til DAG. I det siste trinnet omdannes DAG til TAG av diacylglycerol acyltransferase (DGAT). Figuren er modifisert fra [26].

TAG lagres i lipiddråper i cytoplasmaet slik at det kan bli utnyttet til energi og nysyntese av membran fosfolipider og eikosanoider [30, 31].

Lipiddråper ligner lipoproteiner ved at omslutes av et fosfolipidmonolag og i stand til å oppbevare TAG, kolesterolester, retinolester og andre lipider i lipiddråpekjernen. På overflaten av lipiddråpene er det en rekke proteiner som dekker lipiddråpene. Disse proteinene er kjent som lipiddråpeproteiner. De mest omtalte og relevante proteinene i denne sammenhengen er perilipin-familien (PAT-familien). Det er fem PAT-familiemedlemmer som hittil er blitt oppdaget. PAT-proteiner er vev-spesifikke og har ulike funksjoner i forbindelsen med lagring og lipolyse (avsnitt 1.10) [31].

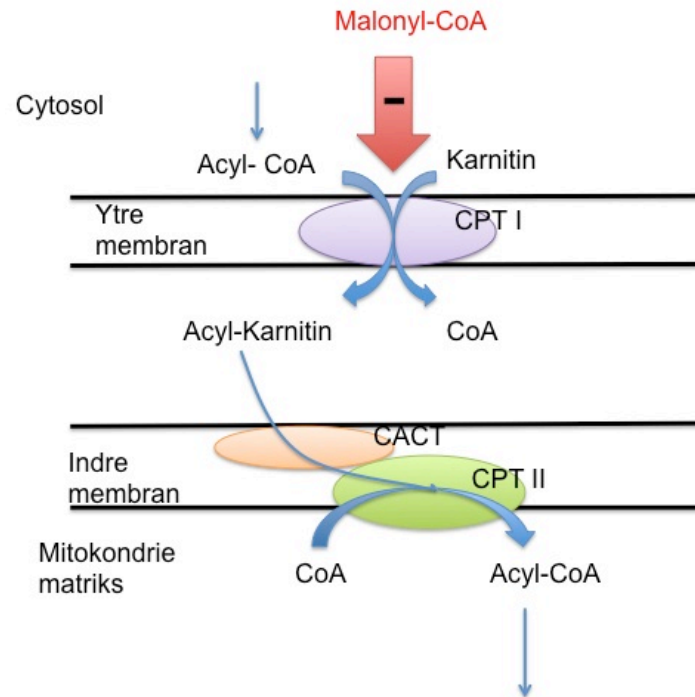
Høye nivåer av FFA inne i cellene kan forstyrre fosfolipidlaget til cellemembranen, endre lipidsignalveier og indusere apoptose. I tillegg kan FFA påvirke genuttrykk ved å oppføre seg som ligander for kjernereseptorer som peroksisom-proliferator aktiverte reseptorer (PPAR). Derfor kan forestering av FFA med glyserol og pakking av TAG i lipiddråper være gunstig for cellen, da dette beskytter cellene mot de skadelige effektene av FFA og dets toksiske metabolitter (DAG, ceramider, acyl-CoA) [31].

### **1.6.3 $\beta$ -oksidasjon av fettsyrer**

Fettsyrer er en svært viktig energikilder for oss under postprandialfasen. For at kroppen skal kunne utnytte fettsyrer som energikilde må fettsyrer først gjennomgå en prosess kalt for  $\beta$ -oksidasjon.  $\beta$ -oksidasjon av fettsyrer skjer hovedsakelig i mitokondriene, men også i mindre grad i peroksisomene [32].

Som nevnt ovenfor blir fettsyrer omdannet til langkjedet-acyl-CoA av acyl-CoA-syntetase som befinner seg på mitokondrienes yttermembran. Acyl-CoA er ikke i stand til å krysse mitokondriemembraner og må derfor fraktes inn i mitokondriet ved hjelp av en prosess involvert av karnitin-palmitoyltransferase I (CPTI), karnitin-palmitoyltransferase II (CPTII) og karnitin-acylkarnitintranslokase (CACT). For å kunne krysse mitokondriets ytre membran, konverteres fettsyren først til acylkarnitin ved hjelp av CPTI. Acylkarnitin fraktes deretter

gjennom mitokondriets indremembran ved hjelp av en reaksjon katalysert av CACT. I mitokondriematriksen konverteres acylkarnitin tilbake til sin opprinnelig langkjedet-acyl-CoA-form ved hjelp av CPT-II (Figur 4) [33, 34].



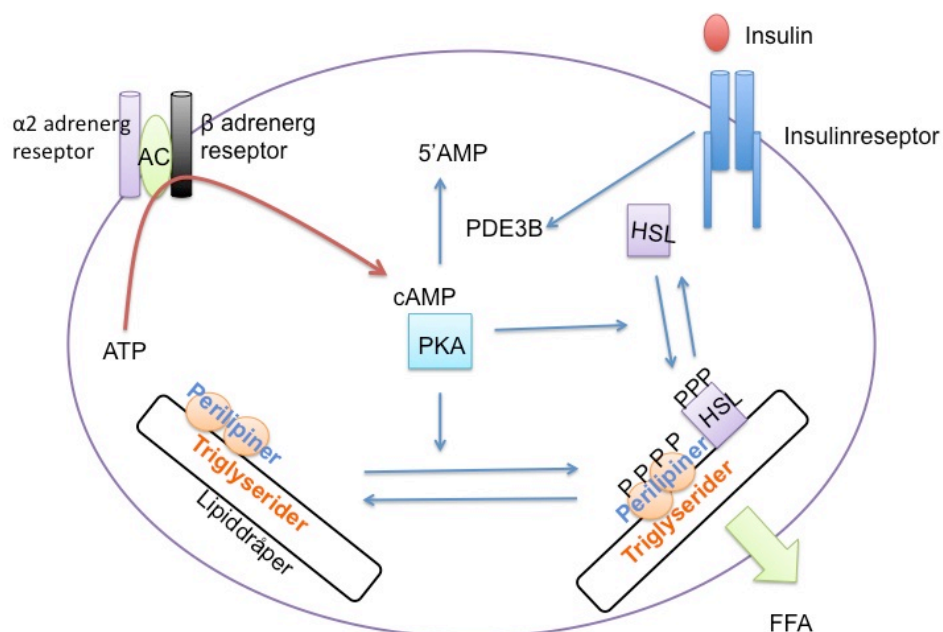
**Figur 4: Transport av acyl-CoA gjennom mitokondriemembraner.** Acyl-CoA fraktes gjennom mitokondriets ytre- og indremembran ved hjelp av karnitin-palmitoyltransferase I (CPTI), karnitin-acylkarnitintranslokase (CACT) og karnitin-palmitoyltransferase II (CPTII). Malonyl-CoA hemmer CPT-1 og forhindrer opptak av acyl-CoA inn i mitokondriet. Figuren er modifisert fra [34].

Inne i mitokondriematriksen blir acyl-CoA benyttet til  $\beta$ -oksidasjon der det brytes ned til kortere karbonkjedelengder, og tilslutt acetyl-CoA gjennom fire enzymatiske trinn. I hjerte- og skjelettmuskel går acetyl-CoA inn i Krebs syklus som deretter oksideres og danner karbondioksid ( $\text{CO}_2$ ) og høyenergiske elektroner i form av nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH), flavin-adenin-dinukleotid ( $\text{FADH}_2$ ) og guanosintrifosfat (GTP) [34, 35].  $\text{CO}_2$  frigjøres fra cellene som et avfallsprodukt, mens elektronene fra NADH,  $\text{FADH}_2$  og GTP vandrer videre til membranbundne-elektrontransportkjede (oksidativ fosforylering) og genererer energi i form av ATP og danner  $\text{H}_2\text{O}$  som et biprodukt [35]. I tilfeller der  $\beta$ -oksidasjonen skjer hurtigere enn oksidasjonen av acetyl-CoA i Krebs syklus, blir acetyl-CoA eksportert ut fra mitokondriematriksen av karnitin-acetyltransferase (CAT) og CACT. Dette er for å forhindre en opphopning av acetyl-CoA i mitokondriematriksen [34].

En feedback-kontrollmekanisme for å kontrollere  $\beta$ -oksidasjonen skjer via malonyl-CoA som er et substrat for fettsyresyntesen. Malonyl-CoA er i tillegg en fysiologisk hemmer av CPTI som forhindrer opptaket av acyl-CoA inn i mitokondrie for  $\beta$ -oksidasjon. Mens AMP-aktivert protein kinase (AMPK) reduserer dannelsen av malonyl-CoA ved å hemme acetyl-CoA karboksylase (ACC) og dermed stimulerer til økt CPTI aktivitet [34].

### 1.6.4 Lipolyse i fett- og muskelvev

Ved økt behov for energi mobiliseres fettsyrer fra fettvev via en prosess kalt for lipolyse. Lipolysen aktiveres når adrenalin og noradrenalin binder seg til  $\beta$ -adrenerge reseptorer som fører til aktivering av adenylylsyklase (AC) via Gs. AC katalyserer dannelsen av syklisk-adenosin-monofosfat (cAMP) fra ATP som igjen aktiverer proteinkinase A (PKA). PKA fosforylerer deretter hormonsensitiv lipase (HSL) i cytosol og perilipin-1 som befinner seg på overflaten av lipiddråpene. Fosforyleringen av perilipin-1 medfører til endringer av proteinsammensetningen på lipiddråpene som dermed tillater HSL å binde seg til lipiddråpeoverflaten og utøve sin hydrolyseaktivitet på TAG (Figur 5) [22, 36]. HSL-aktiviteten kan i tillegg stimuleres av PKC via aktivering av ekstracellulære signalregulert kinaser (ERK) under muskelkontraksjoner [12].



**Figur 5: Regulering av lipolyse i fettvev.** Lipolysen starter når adrenalin og noradrenalin binder seg til  $\beta$ -adrenerge-reseptorer og aktiverer syklisk-adenosin-monofosdat (cAMP) og proteinkinase A (PKA). PKA fosforylerer perilipin-1 og

hormonsensitiv lipase (HSL), slik at HSL er i stand til å utøve sin lipolyse-aktivitet på TAG i lipiddråper og frigjør frie fettsyrer i blodet. Lipolyse hemmes av insulin som aktiverer fosfodiesteraser (PDE). PDE bryter ned cAMP til 5'-adenosinmonofosfat (5'-AMP). Figuren er modifisert fra [36].

Lipolyse-aktiviteten kan hemmes av insulin ved at hormonet aktiverer fosfodiesteraser (PDE) som bryter ned cAMP. Ligander som binder seg til  $\alpha$ 2-adrenerge reseptorer, og adenosin A1-reseptorer hemmer også lipolysen (Figur 5) [36].

FFA kan også mobiliseres fra TAG lagret i skjelettmuskler, noe som utgjør opptil 50% av total fettsyreoksidasjon i skjelettmuskler ved moderat trening. Dessverre er kunnskap om regulering av lipolysen i skjelettmuskel mer sparsomt enn i fettvev [37]. I skjelettmuskler antas  $\beta$ 2-adrenergereseptor-subenheten som viktigst i forbindelsen med regulering av lipolyse. Hemming av lipolyse i skjelettmuskler er trolig i mindre grad regulert av insulin, men først og fremst regulert av substrat tilgjengelighet [38].

I skjelettmuskler er HSL ansett som en viktig lipolytisk enzym som katalyserer hydrolysen av TAG og DAG. Lipolyseaktiviteten av HSL er som tidligere nevnt avhengig av dets fosforylering og assosiering med perilipin-1 i fettvev. Perilipin-1 spiller en viktig rolle i forbindelse med lipolyse i fettvev, men er lavt uttrykt i humane muskelbiopsier [39]. Derimot er perilipin-2 og perilipin-3 hovedsakelig uttrykt i kulturer av humane myotuber [39]. Perilipin-2 kan være involvert i reguleringen av TAG-lagring og lipolyse i skjelettmuskelen, men mekanismen for dette er ikke fullstendig kartlagt [40].

Morfologiske analyser av enkelt muskelfibre har blant annet vist at HSL forflytter seg til lipiddråper som en respons på stimulering av adrenalin og muskelkontraksjoner, samtidig som det ble funnet perilipin-2 og perilipin-3 på lipiddråpeoverflaten. Det antas derfor at assosiering av HSL med perilipin-2 er vesentlig for lipolytisk regulering i skjelettmuskler da perilipin-1 ikke er tilstede i denne type vev [12]. Reguleringen av lipolyse i skjelettmuskel involverer antakelig en annen mekanisme enn den som er presentert i figur 5 [40].

En annen viktig lipase, fettvevstriglyseridlipase (ATGL) er også vist å være involvert i hydrolysering av TAG i skjelettmuskel [41]. Det antas at ATGL primært hydrolyserer den første fettsyren fra TAG, mens HSL hydrolyserer DAG til MAG. En annen teori går ut på at det er hovedsakelig HSL som hydrolyserer TAG til DAG via en katekolamin-stimulert lipolysevei, mens ATGL er ansvarlig for den basale lipolysen. I motsetning til HSL, eksisterer

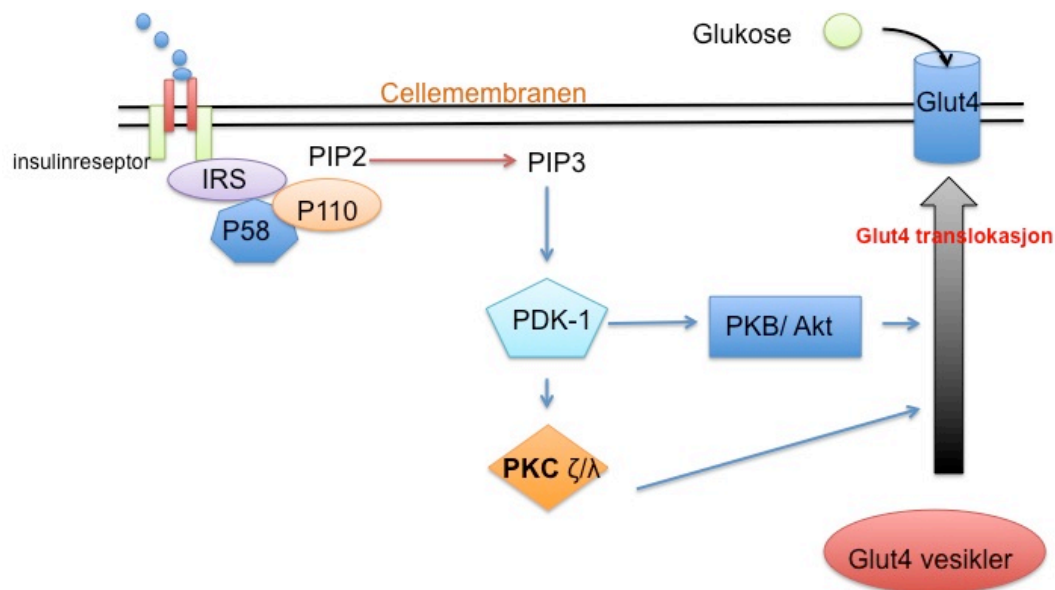
ATGL på lipiddråperoverflaten uavhengig av PKA-aktivering [31]. Reguleringen av ATGL er fortsatt lite kjent, men CGI-58 (et protein fra  $\alpha$ -og  $\beta$ -hydrolasefamilien) er blant annet foreslått å være viktig for maksimalaktivering av ATGL i skjelettmuskelen, men denne mekanismen er til nå fortsatt ukjent [40, 41].

## 1.7 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

### 1.7.1 Opptak av glukose

Glukoseopptaket i skjelettmuskelen er primært mediert via gruppe proteiner kalt for glukosetransportørfamilien (GLUT-familien). Skjelettmuskel uttrykker flere medlemmer av GLUT-familien (GLUT1, 4, 5, 8 og 11), men det er hovedsakelig GLUT4-isoformen som reguleres av insulin og muskelkontraksjoner. GLUT1-uttrykk i skjelettmuskler er 20 ganger lavere enn GLUT4 og anses som viktig for basalopptaket av glukose [42].

Ved stimulering med insulin eller muskelkontraksjoner forflyttes GLUT4 fra sine intramyocellulære vesikler til cellemembranen for å øke transporten av glukose inn i cellene. Translokasjon av GLUT4 ved stimulering av insulin starter først med binding av insulin  $\alpha$ -subenheten til IR. Bindingen av insulin til  $\alpha$ -subenheten medfører til autofosforylering av den transmembrane  $\beta$ -subenheten av IR som aktiverer sin intrinsiske tyrosinkinase-aktivitet på intracellulære substrater som insulinreseptorsubstrat-familien (IRS). I skjelettmuskelceller er hovedsakelig IRS-1 og IRS-2 isoformene rikelig uttrykt, men det er IRS-1 som er viktigst i forbindelsen med insulin-stimulert glukosetransport inn i cellene. Fosforylert IRS-1 har bindingssete for molekyler som inneholder Src homolog 2 (SH2)-domener. Den regulatoriske subenheten av PI3K, p85 kan binde seg til SH2-domenet på IRS-1 som fører til aktivering av den katalytiske subenheten av PI3K, p110. Aktivering av PI3K resulterer i rekruttering og aktivering av fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3), fosfor-3-fosfoinositid-avhengig kinase-1 (PDK-1) og proteinkinase B/Akt. PDK-1 fosforylerer og aktiverer nedstrømssignalmolekyler som Akt og protein kinase C $\zeta$ / $\lambda$  (PKC $\zeta$ / $\lambda$ ) som tilslutt resulterer i GLUT4-translokasjon til celleoverflaten (Figur 6) [42-44].



**Figur 6: Translokasjon av GLUT4-transportører.** Insulin binder seg til insulinreseptoren og fører til aktivering av insulinreseptorens intrinsiske tyrosinkinaseaktivitet og fosforylering av IRS (IRS-1 i muskelceller). Fosforylert IRS-1 tillater p58 og p110 som er den regulatoriske og katalytiske subenhetene til fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) å binde seg til IRS-1 og aktiveres. Aktivert PI3K rekrutterer deretter fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3) og fosfor 3-fosfoinositidavhengig kinase-I (PDK-1) som videre fosforylerer PKB/Akt og PKC $\zeta/\lambda$ . Resultatet av aktiverte nedstrømsproteiner er GLUT4-translokasjon til celleoverflaten fra intracellulære vesikler. Figuren er modifisert fra [43].

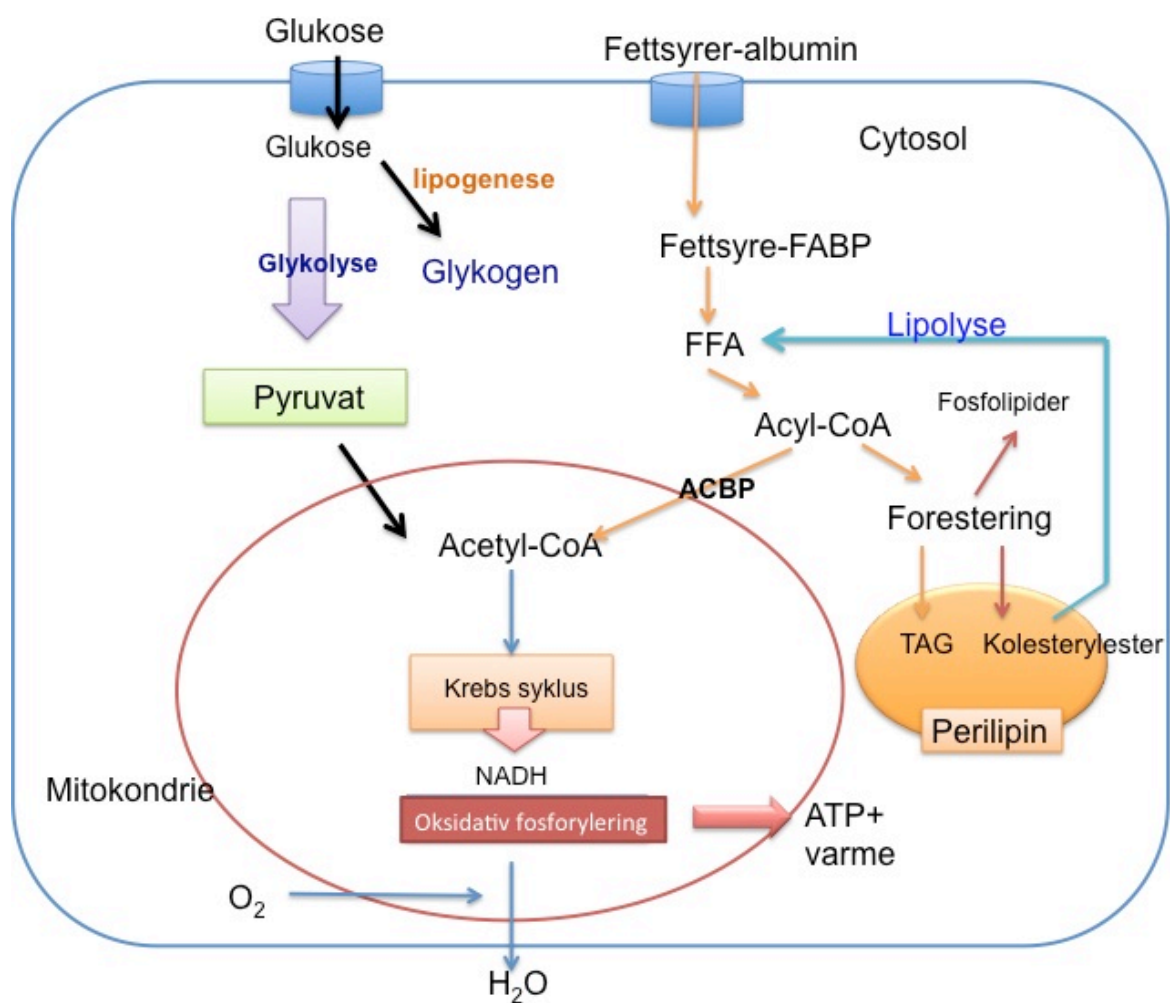
Det er lite kjennskap til hvordan muskelkontraksjoner kan bidra til økt GLUT4-translokasjon til celleoverflaten, men flere mekanismer som involverer blant annet  $\text{Ca}^{2+}$ , PKC-isoformer, AMPK, nitrogenmonoksid (NO) og mitogen-aktiverte kinaser (MAPK) er blitt foreslått. For videre lesing om de foreslåtte mekanismene for muskelkontraksjonsindusert GLUT4-translokasjon henvises det til Tremblay et al. [42].

## 1.7.2 Glykolyse

Etter at glukosen har kommet inn i cellens cytosol, starter nedbrytningsprosessen av glukose, glykolyzen. I glykolyzen kløyves et glukosemolekyl til to pyruvat molekyler gjennom en titrinnsprosess der en rekke enzymer er involvert. Heksokinase katalyserer blant annet det første trinnet i glykolyzen ved å omdanne glukose til glukose-6-fosfat. I det siste trinnet dannes pyruvat ved hjelp av pyruvatkinase (Figur 7). Glykolyzen gir tilslutt et nettoutbytte av to ATP og to NADH molekyler [35].



I en aerob metabolisme vil pyruvatmolekylene raskt bli omdannet til et  $\text{CO}_2$  molekyl, et NADH molekyl og acetyl-CoA av tre enzymatiske komplekser, kalt for pyruvatdehydrogenase kompleks (PDH) som ligger i mitokondriene. Acetyl-CoA går videre inn i Krebs syklus og genererer ATP, NADH og  $\text{FADH}_2$  på samme måte som acetyl-CoA dannet fra fettsyremetabolismen (avsnitt 1.6.3). På akkurat samme måte som ved  $\beta$ -oksidasjon av fettsyrer vil elektroner fra ATP, NADH og  $\text{FADH}_2$  generert fra glukosemetabolismen i Krebs syklus gjennomgå oksidativ fosforylering (Figur 7) [35].



**Figur 7: En forenklet oversikt over glukose- og fettsyremetabolismen.** Når glukosen kommer inn i cellens cytosol blir den straks omdannet til pyruvat via glykolyse og fraktet inn i mitokondriet. Acetyl-CoA kan dannes både fra pyruvat og fettsyrer i mitokondriene. Videre går acetyl-CoA inn i Krebs syklus der det undergår oksidativ fosforylering der det genereres store mengder ATP. Overflødig opptak av glukose kan lagres i form av glykogen via en prosess kalt lipogenese. Frie fettsyrer (FFA) kan også forestres til TAG og kolesterylester som deretter lagres i intracellulære lipiddråper. FFA benyttes også til produksjon av fosfolipider. Figuren er modifisert fra [35].

### 1.7.3 Lagring av glukose

Glukose kan lagres som glukoseenheter i store forgrenede polysakkarider (glykogen) i cytosol i muskel- og leverceller [35]. For å mobilisere glukose under faste er cellene også i stand til å nedbryte glykogen til glukose-1-fosfat som omsettes videre i glykolysen [35, 45]. Lagring av glykogen i skjelettmuskelen fungerer hovedsakelig som et energireservoar til ATP-produksjon ved muskelkontraksjoner, mens leverglykogen benyttes først og fremst til å opprettholde blodsukkeret under postprandialfasen. Når glykogenlagrene i skjelettmuskel og lever er oppbrukt, kan cellene gå over å benytte aminosyrer fra kroppens egne proteiner som kilde for å danne glukose (glukoneogenese) [46].

## 1.8 Metabolsk fleksibilitet

Metabolsk fleksibilitet beskriver skjelettmuskelens evne til å veksle mellom fettsyrer og karbohydrater som energikilde ved manglende tilgang på en av de overnevnte kildene. Friske skjelettmuskelceller kan benytte seg av fettsyrer til oksidasjon når det er lite tilgang på glukose slik som under faste. Mens oksidasjonen av fettsyrer dempes ved økt tilgang på glukose som en respons på økt insulinstimulering etter et måltid [47]. Ved svekket evne til fettsyreoksidasjon til tross for økt fettsyretilgang, og manglende evne til å veksle mellom fettsyrer og glukose som energikilde betegnes som metabolsk infleksibilitet [48]. Det er blitt vist at manglende evne til fettsyreoksidasjon under faste og redusert glukose-stimulert oksidasjon er koblet opp mot patogenesen av insulinresistens i skjelettmuskel. Ukropcova et al. [49] undersøkte humane myotuber av biopsier fra *musculus vastus lateralis* og oppdaget at kapasiteten for fettsyreoksidasjon var større i myotuber fra tynne og insulinsensitive individer enn fra overvektige individer [49, 50].

Sammenhengen bak skjelettmuskelens evne til å skifte mellom karbohydrater og fettsyrer som oksidasjonskilde ble aller første gang beskrevet av Randle et al. [51] i 1963 og omtales som ”Randle syklus”. ”Randle syklus” beskriver at økt fettsyreoksidering i skjelettmuskelen vil kunne medføre til akkumulering av acetyl-CoA og citrat som dermed hemmer PDH og fosfofruktokinase (PFK) som er viktige enzymer for titrinsreaksjonen i glykolysen. Blokkering av glykolysen kan føre opphopninger av glukose-6-fosfat slik at heksokinase (HK) hemmes, og dette resulterer i redusert glukoseopptak og oksidasjon [51, 52]. I senere studier har det derimot vist at suppresjonseffekten av fettsyrer på glukosemetabolismen først

og fremst skyldes akkumuleringen av lipidintermediater som DAG, ceramider og langkjedet acyl-CoA. Disse lipidintermediatene kan som tidligere nevnt forstyrre insulinsignalerings og dermed reduserer glukoseopptaket inn i skjelettmuskel [48].

På grunn av sammenhengen mellom utviklingen av insulinresistens og høye nivåer av FFA, er ”Randle syklus” blitt pekt ut som en mulig mekanisme for utviklingen av blant annet type 2-diabetes og insulinresistens i skjelettmuskelen. Allikevel finnes det noen studier som mener at ”Randle syklus” ikke er alene om å bidra til utviklingen av insulinresistens. Dermed ble en motsatt mekanisme kalt ”Invers Randle” postulert. I ”Invers Randle” vil derimot et overskudd av glukose kunne hemme lipidoksidasjonen. Økte nivåer av glukose vil kunne generere dannelsen av malonyl-CoA. Malonyl-CoA er som tidligere nevnt i stand til å hemme CPTI. Hemming av CPTI medfører videre til blokkering av FFA-transport inn i mitokondriene og dermed hemmes også fettsyreoksidasjonen [52].

I en *in vitro* studie utført av Ukropcova et al. [49] ble det målt suppresjon (effekten av glukose på hemming av fettsyreoksidasjon) og adapterbarhet (økning av fettsyreoksidasjon ved økt substrattilgjengelighet) i humane myotuber. Den dynamiske vekslingen mellom suppresjon og adapterbarhet beskriver *in vitro* metabolsk fleksibilitet. Suppresjonen som glukose har på fettsyreoksidasjon *in vitro* var vist å være negativt korrelert med insulinsensitivitet og metabolsk fleksibilitet *in vivo*, men var derimot positivt assosiert med kroppsfett og fastende nivåer av FFA. Adapterbarheten var positivt korrelert med insulinsensitivitet og metabolsk fleksibilitet, men negativt assosiert med kroppsfett og fastende nivåer av insulin [49]. Dette fører til en antagelse om at defekt metabolsk fleksibilitet (metabolsk infleksibilitet) hos skjelettmuskler er det første som skjer ved utviklingen av fedme og insulinresistens. Årsaken til metabolsk infleksibilitet er foreløpig ukjent, men genetiske faktorer, miljøpåvirkninger og påvirkninger fra kosten kan ikke utelukkes [49].

## 1.9 Lipiddråper

Lipiddråper finnes i alle eukaryote celler og har en kjerne av nøytrale lipider som er omgitt av et fosfolipidlag med mange ulike proteiner på overflaten. Lipiddråpenes opprinnelse er fortsatt ukjent, men man tror at de har sitt utspring fra endoplasmatisk retikulum (ER) på grunn av fosfolipidlaget som omslutter det [31, 53].

### **1.9.1 Mobilisering av fett fra lipiddråper**

Ved økt behov for næringsstoffer kan TAG fra lipiddråper brytes ned til FFA og glyserol ved en prosess kalt for lipolyse. Mens glyserol og fettsyrer er begge substrater for glukoneogenese og ketogenese i leveren, så benytter skjelettmuskelen seg av FFA til  $\beta$ -oksidasjon for å generere ATP. Cellulære lipaser som HSL og ATGL er funnet å være involvert i lipolysen (avsnitt 1.6.4) [31].

### **1.9.2 Lipiddråpenes cellulære roller**

Lipiddråper har som funksjon å lagre lipidesterer som TAG og kolesterolester inne i cellens cytosol for deretter å utnytte lipidene til energiproduksjon eller til syntese av membranfosfolipider og eikosanoider [31]. Samtidig vil lagring av TAG i lipiddråper beskytter cellene mot de toksiske produktene av triglyseridhydrolyse som DAG, FFA og langkjedet-acyl-CoA. DAG og langkjedet-acyl-CoA kan som kjent bidra til forstyrrelse i celledatering (avsnitt 1.3), mens FFA kan binde seg til PPAR-familien og påvirker genuttrykk [31]. Pakkingen av lipider i lipiddråper kan også bidra til å dirigere transporten av nøytrale lipider eller deres metabolitter til spesifikke områder i cellene. Kontrollen av FFA-inkorporering i lipiddråper og lipidmetabolisme er trolig regulert av lipiddråpeproteiner fra PAT-familien [31].

## **1.10 Lipiddråpeassosierte proteiner**

Lipiddråpeassosierte proteiner som er blitt identifisert er blant annet Rab og ADP-ribosyleringsfaktor (ARF)-familien av små GTPaser, caveolin og fosfolipase D (PLD) som er sterkt knyttet til vesikulær transport, membranfusjon og motilitet av cytoskjelettet. Men det er hovedsakelig medlemmer av PAT-familien (perilipin, ADRP og TIP-47 relaterte proteiner) som er de mest undersøkte lipiddråpeproteinene (avsnitt 1.10.1) [53].

### **1.10.1 PAT-familien**

På overflaten av lipiddråpene eksisterer det en rekke proteiner inkludert proteiner fra PAT-familien som er involvert i regulering av cellulær lipidlagring. PAT-familiemedlemmene har forskjellige størrelser, ulik affinitet for lipiddråpeoverflaten, ulik transkripsjonsregulering og ulik uttrykk i forskjellige vev. Dette tyder på ulike cellulære funksjoner i regulering av

lipiddråpetransport og lipidmetabolisme mellom disse PAT-protein-familiemedlemmene [54]. Fortsatt er den biologiske rollen og reguleringen av PAT-proteiner i skjelettmuskler ufullstendig og flere studier er nødvendig for å avklare dette. Tabell 1 viser oversikt over de forskjellige PAT-proteinene som finnes, og deres uttrykk i forskjellige vev.

**Tabell 1: Oversikt over PAT-proteiner.**

<b>Proteinnavn benyttet i denne oppgaven</b>	<b>Gen-symbol (Human/Mus)</b>	<b>Andre navn</b>	<b>Vev</b>
Perilipin-1	<i>PLIN1/Plin1</i>	Perilipin, PERI, PLIN	Fettvev, steroidogene celler [55]
Perilipin-2	<i>PLIN2/Plin2</i>	ADRP, ADFP, adipophilin	Alle typer vev [55]
Perilipin-3	<i>PLIN3/Plin3</i>	TIP47, PP17, M6PRBP1	Alle typer vev [56]
Perilipin-4	<i>PLIN4/Plin4</i>	S3-12	Fettvev, steroidogene celler[55]
Perilipin-5	<i>PLIN5/Plin5</i>	PAT1, LSDP5, OXPAT, MLDP	Hjertemuskel, langsom oksidativ muskel, leveren, hvitt og brunt fettvev, binyre, testikkel [56]

### 1.10.2 Perilipin-1

Perilipin-1 er det mest studerte proteinet av alle perilipin-proteiner og proteinets nøkkelrolle i reguleringen av lipolyse i fettvev er veletablert [57]. Perilipin-1 er først og fremst uttrykt på lipiddråper i adipocytter og hos steroidogene celler, men er derimot lite uttrykt på overflaten av lipiddråper i skjelettmuskel [55]. Uttrykket av *PLIN1*-genet reguleres av blant annet PPAR $\gamma$  og østrogenreseptorrelatert reseptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ). *PLIN1/Plin1*-genet hos mennesker og mus kan gi opphav til minst tre isoformer av perilipiner, perilipin-A, B og C. Felles for disse tre isoformer er at de deler et felles *N*-terminalområde. Perilipin-A-isoformen er den mest uttrykte isoformen blant de tre isoformene [54].

Perilipin-1 virker som et slags knutepunkt for organisering og kontroll av lipolyse-aktivitet i adipocytter. Når perilipin-A er i en hypofosforylert tilstand blokkerer den tilgang av lipaser til nøytrale lipider i lipiddråpene og dermed reduseres hydrolysen av TAG. Når perilipin-A derimot fosforyleres av PKA fremmes lipaseaktivitet ved at HSL rekrutteres til lipiddråpeoverflaten og dermed økes lipolysen [54, 55].

I basale tilstander der perilipin-A ikke er fosforylert foreligger det bundet til CGI-58 på lipiddråpeoverflaten. Binding av CGI-58 til perilipin-A forhindrer muligens CGI-58 interaksjon med ATGL. Katekolamin-stimulert lipolyse fører til aktivering av PKA etterfulgt av HSL og perilipin-A fosforylering. Dette medfører videre til dissosiasjon mellom perilipin-A og CGI-58. CGI-58 dissosiering fra perilipin-A og lipiddråpeoverflaten forårsaker trolig maksimal ATGL-aktivitet via en ukjent mekanisme. Foreslåtte mekanismer påstår blant annet at CGI-58 beveger seg ut i cytoplasma og danner komplekser med ATGL som deretter binder seg til lipiddråper uavhengig av perilipin-A. ATGL/CGI-58 komplekset kan deretter hydrolysere TAG til DAG og FFA, og HSL hydrolysere DAG til MAG og FFA. MAG hydrolyseres videre av monoglyseridlipase til glyserol og FFA. FFA og glyserol går deretter ut av fettceller og til blodsirkulasjonen [54, 56].

### 1.10.3 Perilipin-2

Perilipin-2 er et protein på 50 kDa som eksisterer på lipiddråpeoverflater i alle slags typer celler inkludert i tidlig differensieringsstadier av adipocytter, men er derimot nedregulert hos modne adipocytter. Hos modne adipocytter blir perilipin-2 erstattet med perilipin-1-proteiner. Det er særlig i type-I oksidative fibre i humane og muse-skjelettmuskler at perilipin-2 er høyest uttrykt, da de oksidative fibre har en mye høyere lipidlagringskapasitet [55, 58-60]. Det er blitt vist at perilipin-2 dekker omtrent 60% av intramyocellulære lipiddråper i biopsier fra humane skjelettmuskler [60]. Uttrykket av *Plin2* reguleres av PPAR-familien; PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  og PPAR $\gamma$ , men reguleringen er vevsspesifikk [54]. Særlig PPAR $\alpha$  er vist å oppregulere perilipin-2 i større grad enn PPAR $\beta/\delta$  og PPAR $\gamma$  i C2C12-celler (transformert skjelettmuskelcellelinje fra mus) [59].

Funksjonen til perilipin-2 i skjelettmuskel er fortsatt ikke fullstendig kartlagt, men flere studier av proteinet tyder på at proteinet begrenser lipaseinteraksjon med de nøytrale lipidene i lipiddråpene og dermed fremmer lipidakkumulering og lagring. Overuttrykk av perilipin-2 er

blitt vist å ha en korrelasjon med lipiddråpeekspandering og økt triglyseridlagring intracellulært, men mekanismene bak dette er til nå fortsatt ukjent [54].

Perilipin-2 antas å være viktig for koordinering av TAG dannelsen da det er blitt observert en økning av lipidintermediater som DAG hos *Plin2*-knockdown (KD) C2C12-celler [61]. Evnen til å kunne koordinere TAG dannelse fra FFA og til å beskytte lipiddråpene mot lipaser hos perilipin-2 antas å være viktig i forebyggingen mot insulinresistens i skjelettmuskelen. Dette skyldes hovedsakelig begrenset dannelse av lipotoksiske-intermediater som ceramider, DAG og langkjedet-acyl-CoA [58, 61]. Det kan tenkes at *Plin2* er involvert i reguleringsmekanismer som gir en adekvat balansegang mellom IMTG syntese, lipolyse og oksidasjon slik at et lavt lokalt nivå av intracellulær fettsyre opprettholdes og dermed forhindres lipotoksisitet [61]. *Plin2* kan også bidra til at toksiske lipidintermediater lagres i lipiddråper fremfor akkumulering i eller nær cellemembraner eller andre intracellulære komponenter. Dette forhindrer muligens lipotoksisitet og dermed insulinresistens i skjelettmuskelen. [62]. Det antas også at *Plin2* er viktig for lipiddråpedannelsen og lipiddråpestabilitet da det er blitt observert begrenset lipidakkumulering per myotub hos siRNA *Plin2*-KD-mus. *Plin2* er trolig involvert i lipiddråpedannelsen fra ER eller cellemembranen [61].

I en studie av Bosma et al. [61] ble C2C12-myotuber inkubert med 200  $\mu$ M oljesyre som medførte en markant triglyseridakkumulering i cellene, og økt uttrykk av perilipin-2 protein. Induksjonen av perilipin-2 uttrykket er konsentrasjonsavhengig med maksimal induksjon ved 200  $\mu$ M oljesyre [61]. Høy fettholdig diett og faste kan også medføre til økt uttrykk av *Plin2* i skjelettmuskel fra mus. Fra samme studie ble det verken observert TAG-akkumulering eller nydannelse av lipiddråper hos *Plin2*-siRNA-KD-myotuber selv ved oljesyreeksposering. Derimot var den oksidative kapasiteten hos *Plin2*-KD-C2C12-myotuber oppregulert sammenlignet med C2C12-myotuber som overuttrykker *Plin2*. Bosma et al. [61] foreslo at at myotubene hadde høyere behov for å oksidere overskuddet av FFA når perilipin-2 ikke lenger var tilstede for å inkorporere FFA i lipiddråper på en effektiv måte.

Phillips et al. [58] foreslo blant annet at insulinsensitiviteten forringes ved redusert uttrykk av perilipin-2 som skyldes dysregulert transport av fettsyrer til mitokondrier og dermed økes reaktive oksygenspesies (ROS) som kan forårsake insulinresistens. I motsetning til Bosma et al. [61] foreslo Phillips et al. [58] at perilipin-2-proteiner er i stand til å forsterke

skjelettmuskelens oksidative kapasitet fordi det muligens fremmer transporten av fettsyrer til mitokondriene for oksidasjon.

I en nyere studie av Coen et al. [63] ble det funnet lavere *PLIN2*-genuttrykk hos overvektige og insulinresistente individer sammenlignet med KMI-matchet insulinsensitive kontroller [63]. Funnene i denne studien samsvarer med funnene fra Phillips et al. [58], der det ble observert at perilipin-2-uttrykk i skjelettmuskelbiopsier oppreguleres ved forbedret insulinsensitivitet etter vekttap og farmakologisk behandling med trioglitazon og metformin [58]. Coen et al. [63] observerte i tillegg en reduksjon av type I-fibre hos overvektige insulinresistente individer etter vekttap og farmakologisk behandling. Perilipin-2 er som nevnt høyst uttrykt i de oksidative type I-fibrene og følgelig kan en reduksjon av type I-fibre også medføre til lavere perilipin-2-uttrykk [63]. Det er også blitt lagt merke til en positiv korrelasjon mellom nivået av *PLIN2* og hastigheten av glukoseforbruk [62, 63].

I en studie utført av Minnard et al. [64] tydet resultatene på en annen sammenhengen mellom insulinsensitivitet og perilipin-2-uttrykk enn det som er blitt nevnt ovenfor. For å avdekke sammenhengen mellom perilipin-2 og insulinresistens ble perilipin-2-uttrykk undersøkt i skjelettmuskler hos "Zucker diabetic fatty"-rottemodeller (ZDF). Det ble vist at nivået av perilipin-2 var mye høyere i skjelettmuskler hos ZDF-rotter sammenlignet med de tynne og friske rottene [64]. I en annen studie ble det observert at nivåer av perilipin-2 i skjelettmuskler hos type 2-diabetikere var lik som hos kontrollgruppen. De to gruppene hadde også like nivåer av IMTG, men etter 8 ukers behandling med rosiglitazoner (PPAR $\gamma$ -agonist) var nivået av perilipin-2 derimot redusert hos type 2-diabetikere, mens IMTG nivåer var uforandret. Funnene i disse studiene tyder på at høye perilipin-2-proteinnivåer er involvert i akkumulering av IMTG hos mennesker og gnagere, og er negativt korrelert med insulinstimulert glukoseopptak og insulinsensitivitet [64].

I en studie fra de Wilde et al. [59] ble det oppdaget at oljesyrebehandlede C2C12-celler hadde høyere nivåer av IMTG-lagring og perilipin-2 enn hos palmitinsyrebehandlede C2C12-celler. Studien undersøkte også PPAR-agonist effekter på perilipin-2-uttrykket hos C2C12-celler ved å inkubere cellene med GW7647 (PPAR $\alpha$ -agonist), WY14643 (PPAR $\alpha$ -agonist), GW501516 (PPAR $\beta/\delta$ -agonist) og rosiglitazon (PPAR $\gamma$ -agonist). Det de fant ut var at alle de overnevnte substratene medførte til en økning av perilipin-2-uttrykk i C2C12-celler. Det var først og fremst GW7647 som bidro til høyest oppregulering av perilipin-2-protein etterfulgt av



GW501516 og WY14643, mens rosiglitazon-stimulerte celler førte til lavest perilipin-2-proteinoppregulering [59].

#### **1.10.4 Perilipin-3**

Perilipin-3 er et protein på 47 kDa. Det er et litt mindre protein enn perilipin-2, men de deler mange likhetstrekk. Aminosekvensene til perilipin-3 og perilipin-2 er 43% identiske og perilipin-3 er også å finne i de fleste vev. Perilipin-3 skiller seg derimot fra perilipin-1 og perilipin-2 ved at det ikke reguleres av PPAR-familien, og eksisterer både bundet til lipiddråpeoverflater og i løselig form i cytosol [54, 55].

Det finnes få studier på perilipin-3 derfor er dets funksjoner lite kjent, men perilipin-3 antas først og fremst å være involvert i mannose-6-fosfat reseptor (M6PR) transport fra endosomer til golgiapparat-nettverket [54].

Proteinet er også funnet å være det dominerende PAT-proteinet på lipiddråper hos siRNA *Plin2*-knockout (KO) og villtype (WT)-fibroblaster fra mus i en studie av Sztalryd et al. [65]. I denne studien ble det observert at *Plin2*-KO-musembryonale fibroblaster (MEF) fortsatt var i stand til å opprettholde akkumuleringen av lipider i intracellulære lipiddråper til tross for siRNA *Plin2*-KO. I tillegg forble opptaket, lipogenesis og lipolysen av fettsyrer uforandret hos *Plin2*-KO-fibroblaster sammenlignet med *Plin2*-WT-fibroblaster. Disse observasjonene støtter hypotesen om at perilipin-3 er involvert i lipidmetabolismen, og at perilipin-3 trolig er i stand til å kompensere fullstendig for perilipin-2s rolle ved dets fravær [65]. Ved fravær av både perilipin-2 og perilipin-3 ble det derimot funnet endringer i lipidmetabolismen når perilipin-3 også ble nedregulert ved hjelp av siRNA hos *Plin2*-KO-MEF-cellelinjer [65].

#### **1.10.5 Perilipin-4 og perilipin-5**

Perilipin-4 er først og fremst uttrykt i hvitt fettvev og mindre grad i brunt fettvev, skjelett- og hjertemusklerv, mens perilipin-5 derimot eksisterer hovedsakelig i vev som har høy fettsyreoksidasjon slik som brunt fettvev, lever, hjertemuskel og i de sakte oksidative skjelettmuskelfibrene. Fordi perilipin-4 er høyt uttrykt i hvitt fettvev antar man at perilipin-4 fremmer langtidslagring av lipider i lipiddråpene, mens perilipin-5 som finnes i brunt fettvev fremmer en kortvarig lipidlagring som raskt kan mobiliseres til oksidasjon og termogenese [54].

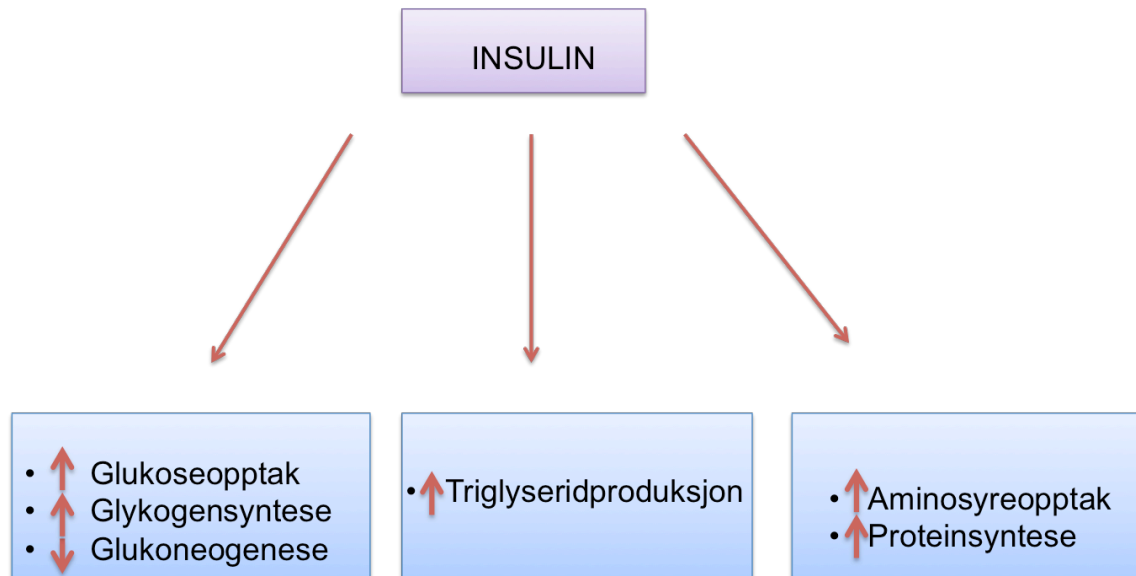
Det er blitt rapportert at perilipin-5 i muscellemodeller binder seg bedre til CGI-58 enn perilipin-1. Interaksjonen mellom perilipin-1 og CGI-58 er som tidligere nevnt viktig for lipolyse av intracellulære lipiddråper, og det antas derfor at binding av perilipin-5 og CGI-58 også er involvert i reguleringen av lipiddråper i oksidative vev. Perilipin-5 er også i stand til å binde ATGL. Bindingen til ATGL antas å begrense interaksjonen mellom ATGL og CGI-58 for å beskytte TAG i lipiddråpene mot lipolyse [66].

## **1.11 Substanser benyttet under forsøkene**

### **1.11.1 Insulin**

Insulin er et peptidhormon som dannes fra  $\beta$ -cellene i bukspyttkjertelen. Insulin består av en  $\alpha$ -kjede og en  $\beta$ -kjede som er lenket sammen ved hjelp av to disulfidbindinger. Insulin stimuleres først og fremst av glukosekonsentrasjonen i blodet der en økt blodsukkerkonsentrasjon stimulerer til økt insulinsekresjon, mens et fall i blodsukkerkonsentrasjonen fører til redusert insulinsekresjon fra  $\beta$ -cellene [67]. Sekresjonen av insulin fra  $\beta$ -cellene kan også stimuleres av hormoner som kolecystokinin (CCK), glukagonlignende peptid 1 (GLP-1), sekretin og gastrisk inhibitorisk peptid (GIP) fra tarmen [67, 68]. I tillegg deltar også det autonome nervesystemet i reguleringen av insulinsekresjonen [67].

Insulin virker ved å binde seg til insulinreseptorer med tyrosinkinaseaktivitet som autofosforyleres ved binding. Autofosforyleringen av insulinreseptor fører videre til en rekke intracellulære hendelser som tilslutt resulterer i GLUT4-translokasjon til celleoverflaten (Figur 6). Insulin er i stand til å stimulere til økt glukoseopptak i de fleste vev, men spesielt mye i skjelettmuskulaturen og i fettvevet [67]. Insulin kan også stimulere til økt TAG-produksjon i fettvev og økt glykogensyntese i leveren og skjelettmuskelen, mens det hemmer enzymer som er involvert i lipolyse (Figur 5) og glukoneogenese [67]. Figur 8 viser en kortfattet oversikt over insulins viktigste funksjoner i energiomsetningen.



**Figur 8: Kortfattet oversikt over insulins viktigste funksjoner i energiomsetningen.** Insulin stimulerer til blant annet økt glukoseopptak, glykogensyntese, triglyseridproduksjon, aminosyreopptak, proteinsyntese, mens det reduserer glukoneogenese.

### 1.11.2 Oljesyre

Oljesyre er en enumettet fettsyre (18:1, n-9). Den er en av de mest vanlige enumettede fettsyrene blant sirkulerende plasmalipider og i kosten [69]. Utviklingen av insulinresistens og type 2-diabetes er forbundet med inntak av mettede fettsyrer, mens enumettede og flerumettede fettsyrer har vist å gi gunstige effekter for helsen [70]. I en studie av de Wilde et al. [59] ble det funnet at oljesyrebehandlede C2C12-myotuber hadde høyere nivåer av IMTG i forhold til myotuber behandlet med palmitinsyre. Denne observasjonen ble også funnet i en *in vitro* studie utført av Bakke et al. [70] på humane myotuber, der inkubering med radioaktiv oljesyre medførte til høyere TAG-lagring sammenlignet med palmitinsyre. Det ble observert at perilipin-2 var høyere uttrykt hos myotuber som ble eksponert for oljesyre, samtidig som myotubene ble mer insulinsensitive sammenlignet med myotuber som ble behandlet med palmitinsyre [59]. I motsetning til de Wilde et al. [59] ble det ikke funnet noe forskjell i *PLIN2*-uttrykk mellom oljesyre og palmitinsyrebehandlede humane myotuber hos Bakke et al. [70]. Den relative mengden av *PLIN2*-uttrykk per lipiddråpe var funnet å være høyere hos palmitinsyrebehandlede celler i tillegg ble det funnet en lavere lipolyse hastighet i disse cellene [70].

### 1.11.3 GW501516

GW501516 er en høypotent og selektiv PPAR $\delta$  agonist som ble utviklet av GlaxoSmithKline. *In vitro* studier på C2C12-myotuber har vist at GW501516 induserer uttrykket av nøkkelmolekyler som er involvert i lipidutnyttelse,  $\beta$ -oksidasjon av fettsyrer og energifrikopling [71]. Det er også observert at GW501516 stimulerer til økt perilipin-2-uttrykk hos C2C12-muskelceller fra mus [59]. I tillegg er uttrykket av PPAR $\delta$  reseptorer 10-50 ganger høyere i skjelettmuskler, særlig i de oksidative myofibrene i forhold til PPAR $\alpha$  og PPAR $\gamma$  reseptorer [72]. Derfor ble GW501516 valgt ut som en passende kandidat for å studere effekten av lipid- og glukosemetabolisme ved stimulering av PPAR $\delta$  reseptorer både ved fravær og tilstedeværelse av *Plin2*-genet.

### 1.11.4 GW7647

GW7647 er en potent og selektiv PPAR $\alpha$ -agonist. PPAR $\alpha$  er rikelig uttrykt i humane skjelettmuskler [73], og har en sentral rolle i lipidmetabolismen både i humane- og museskjelettmuskel [74]. Aktivering av PPAR $\alpha$  med GW7647 er blitt vist å stimulere til lipidoksidasjon, og redusere TAG-akkumulering i *in vitro* studie med differensierte humane myotuber [74]. Fra samme cellemodell ble det observert en oppregulering av pyruvat-dehydrogenase kinase (PDK4) som er i stand til å fosforylere og hemme pyruvat-dehydrogenase kompleks. En konsekvens av hemmet pyruvat-dehydrogenase kompleks er redusert glukoseopptak [74]. GW7647 induserer til mRNA-uttrykk av mitokondrielle enzymer som fremmer fettsyrekatabolismen. GW7647 er også blitt funnet å indusere en rekke gener involvert i lipidmetabolismen deriblant *Plin2* [59, 73].

### 1.11.5 Karbonylcyanid *p*-trifluorometoksyfenylhydrazon

Karbonylcyanid *p*-trifluorometoksyfenylhydrazon (FCCP) er en potent mitokondriell protonofor som frikobler oksidativ fosforylering. FCCP virker ved å transportere protoner på tvers gjennom det indre membranen og inn i matriksen i mitokondriet som dermed fører til en kortslutning av ATP syntesen som er drevet av protonflyt gjennom ATP-syntasen. Etter å ha frigitt protoner i matriksen kan FCCP deretter gå tilbake til det opprinnelige stedet mellom det ytter- og det indremembran i mitokondriene for å fange opp flere protoner over til mitokondriematriksen [75-77]. FCCP ble benyttet i denne oppgaven for å studere maksimal

mitokondriell respiratorisk kapasitet og reservekapasiteten. Cellenes mitokondrielle reservekapasitet beregnes ved: (Total mitokondriell respiratorisk kapasitet (+ FCCP) – Basal mitokondriell respiratorisk kapasitet (- FCCP)). Reservekapasiteten er reserven cellene har til respiratorisk disposisjon for å benytte seg av ved økt behov for mitokondriell oksidasjon som for eksempel under stress [78].

### 1.11.6 Triacsin C

Triacsin C er en potent kompetitiv inhibitor av acyl-CoA syntetase og kan hemme opptil 93% av *de novo* syntese av TAG, DAG, kolesterolestere og fosfolipider. Triacsin C er i stand til å blokkere resirkuleringen av fettsyrer som dannes fra TAG hydrolysen til TAG-syntesen og oksidasjon [79]. I en studie fra Brasaemle et al. [80] ble konsekvensen av perilipin-A-uttrykk på hydrolysen av TAG studert. For å fjerne problematikken med reforestering av frigjort fettsyrer til TAG dannelsen ble det tilsatt 6  $\mu$ M triacsin C. Tilsetning av 6  $\mu$ M triacsin C reduserte TAG-syntesen opptil 85-90% hos preadipocytter som uttrykker perilipin-A og kontrollceller [80]. I studier på humane skjelettmuskler ble det blant annet vist at TAG-syntesen blokkeres opptil 99,4% ved inkubering av cellene med 10  $\mu$ M triacsin C i 3 timer [41, 70]. Reforestering av fettsyrer i cellene kan beregnes utfra differansen mellom med og uten tilsatt triacsin C. Differansen gir et mål på fettsyrer som er tilstede inne i cellene. Høy grad av reforestering av fettsyrer vil derfor gi en stor differanseverdi.

Triacsin C ble benyttet i denne oppgaven for å forhindre reforestering av fettsyrer til *de novo* syntese av TAG, DAG og kolesterolestere [81]. I tillegg kan tilsetning av  $\pm$  triacsin C gjøre det mulig å studere forskjeller i total lipolyse og reforestering mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-celler.

### 1.11.7 A922500

A922500 er en potent og selektiv DGAT-1-inhibitor. A922500 hemmer DGAT-1 som er ansvarlig for det siste trinnet i TAG-syntesen der DAG omdannes til TAG (Figur 3) [82]. Tilsetning av 1  $\mu$ M A922500 til humane myotuber har vist å medføre til ca. 90% reduksjon i TAG-dannelsen [70]. A922500 er aktuell i denne oppgaven for å undersøke om *Plin3*- og *Plin5*-mRNA-uttrykk endrer seg ved redusert TAG-dannelse.

## 2 Mål for oppgaven

Flere studier av perilipin-2s (*Plin2s*) funksjon tyder på at proteinet er viktig for lipidakkumulering (lipidlagring) i skjelettmuskler, men dets rolle er ikke fullstendig kartlagt [54, 61]. Hvordan perilipin-2-uttrykk i skjelettmuskelceller kan påvirke insulinsensitiviteten er også et omdiskutert tema [61, 63, 64]. For å undersøke perilipin-2s funksjon nærmere i blant annet skjelettmuskler har det blitt laget *Plin2*-knockout (KO)-mus. Satelittceller fra disse dyrene ble isolert, proliferert og differensiert til myotuber som ble benyttet til studier av energimetabolismen (fettsyre- og glukosemetabolismen). Resultater ble sammenlignet med myotuber fra *Plin2*-WT-mus. Ulike PPAR-agonister (GW501516 og GW7647) og varierende oljesyrekonsentrasjoner ble også tilsatt for å undersøke hvordan dette ville påvirke energimetabolismen hos *Plin2*-KO sammenlignet med *Plin2*-WT-myotuber.

Målet med masteroppgaven er følgende:

- Etablere cellebank av satelittceller (myoblaster) fra *Plin2*-WT og *Plin2*-KO-mus
- Studere akutt (4 timers) opptak og oksidasjon av radioaktivt merket oljesyre og glukose hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber etter forbehandling med GW-substrater (PPAR-agonister) og ulike oljesyrekonsentrasjoner
- Studere glukosemetabolismen (etter 4 timer) ved samtidig tilsetning av oljesyre og insulin
- Undersøke den maksimale oksidative kapasiteten og reservekapasiteten hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber for oksidasjon av oljesyre og glukose ved bruk av mitokondriell avkobler (FCCP)
- Studere tidsforløpet (i inntil 24 timer) for akkumulering av ulike konsentrasjoner av radioaktivt merket oljesyre hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber
- Studere lipolyse av radioaktiv oljesyre ( $\pm$  triacsin C) over et tidsaspekt på 6 timer og reforestering av oljesyre mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber
- Studere mRNA-uttrykk av andre periliner ved fravær av *Plin2* med qPCR

# 3 Materialer og metoder

## 3.1 Materialer

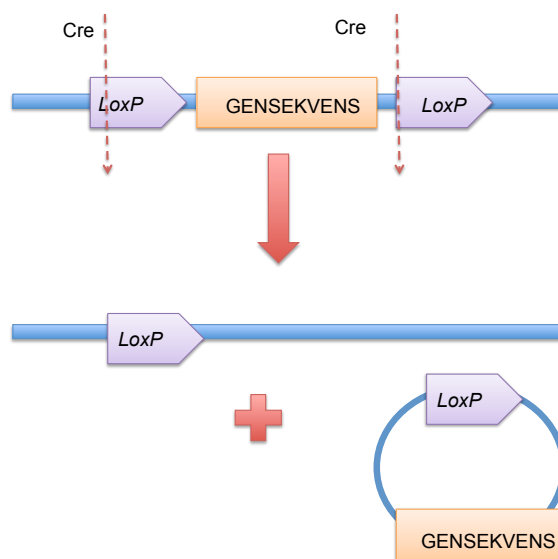
Ham's F10 Glutamax nutrient mixture, Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (1g/L glukose), Hanks Balance Salt Solution (HBSS), føtalt storfeserum (FBS), penicillin/streptomycin (penicillin/streptomycin (100U/ml / 100µg/ml), Fungizone<sup>®</sup> (250 µg/ml amphotericin), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), trypsin, hesteserum og Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS m/Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup>) ble kjøpt fra Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies (Paisley, Scotland, UK). GW 501516 ble fremstilt av Calin Ciocoiu, avdeling for farmasøytisk kjemi, farmasøytisk institutt. GW 7647 og A922500 (DGAT-1 inhibitor) (kat. nr. 10012708) ble kjøpt fra Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Insulin Actrapid Penfill<sup>®</sup> (100 IE/ml) ble kjøpt fra NovoNordisk (Bangsværd, Danmark). Collagenase II fra PAA laboratories ble kjøpt fra Pedersen og sønn AS (Norge). Liberase Reasearch Grade ble kjøpt fra Roche Applied Science (USA). L-karnitin, bovint serumalbumin (BSA), HEPES, karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrazon (FCCP), Tryptanblått 0,4% løsning, oljesyre (OA), Collagen I, og dimetylsulfoksid (DMSO) HYBRI-MAX<sup>®</sup> og triacsin C ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (54,4 mCi/mmol) og D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (3 mCi/mmol) ble kjøpt fra PerkinElmer (Boston, USA). OptiPhase Supermix<sup>®</sup>, Unifilter<sup>®</sup>-96 GF/B og TopSeal<sup>®</sup>-A gjennomsiktig film ble kjøpt fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). BD Matrigel<sup>™</sup> matriks, BD Biocoat<sup>™</sup> Collagen I 25 cm<sup>2</sup> celleflasker og BD Falcon<sup>™</sup> cell stainer 100 µM nylonfilter ble kjøpt fra BD Biosciences (Bedford, MA, USA). 96-brønners brett med flat bunn fra NUNC ble kjøpt fra Thermo Scientific (Danmark). 96-brønners Isoplate<sup>®</sup> ble kjøpt fra Wallac OY (Turku, Finland). 96-brønners Scintiplate<sup>®</sup> 96 TC var skaffet fra PerkinElmer (Groningen, Nederland). 96-brønners brett, 25 cm<sup>2</sup> celleflasker, 75 cm<sup>2</sup> celleflasker kjøpt fra NUNC (Roskilde, Danmark) 12 brønners brett Corning<sup>®</sup> 12 Well Culture Cluster var kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA). NaOH og Na<sub>2</sub> PO<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O ble kjøpt fra VWR (Poole, England). NaCl og KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ble kjøpt fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ble kjøpt fra BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Primere til myotuber fra mus (Anptl4) ble kjøpt fra Life Technologies (Carlsbad, CA). ABI Prism<sup>®</sup> Optical Adhesive sealing og ABI Prism<sup>®</sup> 96-Well Optical Reaction Plate, TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay og High Capacity cDNA Reverse Transcription kit ble kjøpt fra ABI. Phosphate

Buffered Saline uten  $Mg^{2+}$  og  $Ca^{2+}$ , Nucleic Acid Purification Elution Solution og PCR vann ble anskaffet fra Sigma-Aldrich. Andre kjemikalier og reagenser som ble benyttet var av analytisk kvalitet.

## 3.2 Cellemodell

Det ble benyttet celler fra *Plin2*-WT og *Plin2*-KO-mus i denne oppgaven. Musene som ble benyttet til isolering av cellelinjene ble avlet frem av Knut Tomas Dalen. Musene ble laget ved hjelp av *Cre/LoxP* rekombinant DNA-teknologi og utført på National Institute of Health i USA. Detaljer rundt tillagingen av *Plin2*-KO-mus er foreløpig ikke publisert, men prinsippet for *Cre/LoxP* rekombinant teknologi for utviklingen av *Plin2*-KO vil bli kort introdusert nedenfor.

*Cre/LoxP* systemet stammer fra P1 bakteriofager. Denne bakteriofagen inneholder genet *Cre* som koder for proteinet kalt Cre rekombinase som binder til et kompleks med to kopier av gjenkjennelesesekvens *LoxP* (Figur 9). Dersom de to *LoxP* setene har samme orientering i DNAet, vil sekvensen mellom de to *LoxP* setene klippes ut. *Cre/LoxP* systemet er et svært nyttig verktøy for å manipulere DNA i levende organismer. *Cre/LoxP* systemet muliggjør at en kan endre gener i levende organismer etter først å ha modifisert det normale genet ved å sette inn to strategisk plasserte *LoxP* seter. *Cre* genet og *LoxP* setene finnes ikke naturlig hos pattedyrsgenom og når de introduseres inn i mus ved hjelp av genteknologi er disse sekvensene unike [83].





**Figur 9: Cre/LoxP systemet.** *LoxP* seter kan plasseres i intronet på hver sin side av målgenet og dersom de to *LoxP* setene har samme orientering i DNAet kan det innsatte genet ”klippes” bort ved hjelp av Cre rekombinase. Figuren er modifisert fra [84].

For å lage *Plin2*-KO-mus ble det først laget en vektorlinje med endret *Plin2*-gensekvens (*Plin2*-flox vektor). *Plin2*-genet ble endret ved å sette inn et *LoxP* sete i intron 3 i *Plin2*-genet, og et annet *LoxP* sete sammen med en seleksjonsmarkør i intron 6. *Plin2*-flox vektoren ble så overført inn i embryonale stamceller (ES) fra mus ved hjelp av elektropolering, og ulike kloner ble dyrket opp i kultur. ES-klonene som har klart å ta opp vektoren (positive kloner) ble identifisert ved hjelp av Southern blotting. En av de positive klonene ble injisert inn i en blastocyst med normale ES celler. Blastocysten ble så implantert inn i en surrogatmus der blastocysten etter hvert utvikles til et embryo. Fødte mus kalles chimeraer og disse musene vil ha to genetiske forskjellige celler som følge av introduksjonen av genetisk modifiserte ES celler [85].

Ved produksjonen av *Plin2*-flox-mus ble det kun født en hannmus som har kjønnsceller som inneholder *Plin2*-floxet-gen, og denne ble avlet opp for å få flere homozygote avkom som bærer *Plin2*-floxet-gen i alle cellene. *Plin2*-floxet homozygote avkom ble identifisert med PCR-genotyping og deretter avlet videre med *Plin2*-WT-mus for å få flere mus med *Plin2*-flox allel. *Plin2*-KO-mus ble produsert ved å krysse *Plin2*-floxet-mus med mus som uttrykker Cre. Cre binder seg til *LoxP* setene og fjerner en del av *Plin2*-genet (fra intron 3 til intron 6). Dette fører til et ikke-funksjonelt *Plin2*-gen og man får heterozygote *Plin2*-null mus. Videre ble disse musene parret med andre heterozygote *Plin2*-null mus for å få *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mus som ble benyttet i studiene til denne oppgaven.

### 3.3 Musekarakteristika

Studiene i denne oppgaven ble utført på myotuber isolert fra fire ulike musedonorer. Tabell 2 viser en oversikt over kjønn og alder av donorene som ble benyttet.

**Tabell 2: Oversikt over identitet, alder og kjønn av donorene som ble benyttet i denne oppgaven.**

<b>Donor identitet</b>	<b>Navn benyttet i oppgaven</b>	<b>Alder (uker)</b>	<b>Kjønn</b>
#60970	WT17	30,5	Hunn
#60972	KO19	30,5	Hunn
#69280	WT2	9,5	Hunn
#67921	KO4	14	Hunn

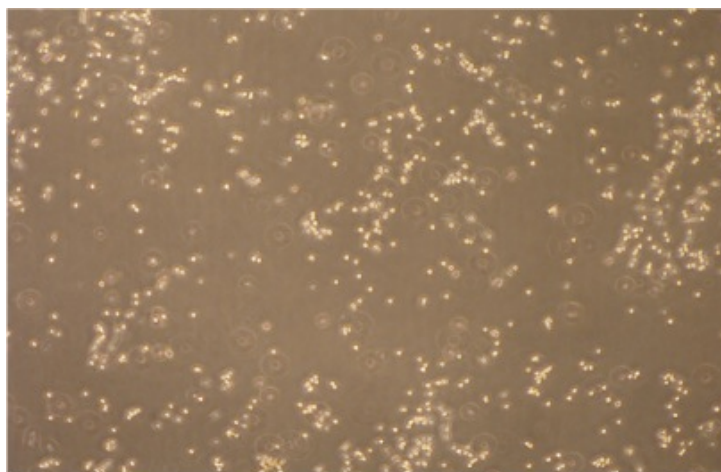
### **3.4 Isolering og opprensing av primære myoblaster fra mus**

Prosedyren for isolering av primære myoblaster fra mus ble utført etter protokollen av Springer et al. [86] med noen få modifikasjoner.

*Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-mus ble avlivet og dissekert under aseptiske forhold på ernæringsinstituttet ved Universitetet i Oslo og Folkehelseinstituttet. Muselårene ble deretter fraktet tilbake til cellelaboratoriet på Farmasøytisk institutt for videre isolering i LAF-benk. Medier og løsninger ble oppvarmet til 37°C før det ble tatt i bruk. Lårene ble først vasket 2 ganger med 10 ml HBSS og deretter ble bein og sener dissekert bort ved hjelp av skalpeller. Videre ble muskelen kuttet opp i mindre biter i 5 ml DMEM (1g/l glukose) og 2% kollagenase II for å løse opp muskelfibrene, og deretter satt på 37 °C vannbad i 90 minutter. Blandingen ble triturert hvert 15. minutt for å separere muskelfibrene fra hverandre. Cellesuspensjonen ble deretter sentrifugert ved 1800 rpm i 1 minutt og supernatanten ble fjernet. Cellepelletten ble vasket med 10 ml HBSS og sentrifugert ved 1800 rpm i 1 minutt. Sentrifugering og vasking med HBSS ble gjentatt totalt 3 ganger. Etter den fjerde tilsetningen av HBSS ble det tilsatt 10 µl liberase og deretter ble cellesuspensjonen satt på vannbad ved 37°C i 30 minutter for ytterligere nedbrytning av muskelfibrer. Det ble deretter tilsatt 1 ml FBS for å inaktivere liberase etterfulgt av sentrifugering ved 1800 rpm i 1 minutt. Supernatanten ble filtrert igjennom et filter på 100 µm for å fjerne store vevsbiter og filtratet ble sentrifugert ved 2500 rpm i 5 minutter. Cellene ble deretter resuspendert i Hams F-10-

basert proliferasjonsmedium (appendiks 9.1.1) og sådd ut i 25 cm<sup>2</sup> kollagen I-behandlede celleflasker (appendiks 9.2) og plassert i et inkubasjonsskap ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> fuktig miljø for å gi gode vekstbetingelser for cellene. Proliferasjonsmediet ble byttet ut hver andre dag med 4 ml nye proliferasjonsmedium og opprensingen av satelittcellene ble utført minst hver femte dag.

For opprensing av satelittcellene fra fibroblastene ble cellene vasket tre ganger med 2 ml HBSS. Etter den fjerde tilsetningen med 2 ml HBSS ble flaskene satt til inkubasjon ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> i 5-10 minutter. Deretter ble det dunket hardt på siden av flaskene for at satelittcellene skal løsne fra bunnen. Satelittcellene som løsnet fra bunnen ble overført til et sentrifugerør med 2 ml proliferasjonsmedium og sentrifugert ved 2500 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellene resuspendert i 4 ml proliferasjonsmedium. Videre ble celledøsningen preplatet i en NUNC celleflaske og satt i inkubatoren i 15 minutter for å fjerne fibroblastene som kleber seg til bunnen av flasken. Cellene som ikke hadde festet seg til bunnen av NUNC flasken ble sådd ut til nye 25 cm<sup>2</sup> kollagen I-behandlede celleflasker. Preplatingen sløyfes etter 3. passasje da det virket som dette ikke var like effektivt når det var få fibroblaster tilstede. Prosedyren for opprensing ble gjentatt helt til man fikk rene kulturer av satelittceller (Figur 10).



**Figur 10: Ren kultur av satelittceller etter isolering og opprensing.** De gule prikkene er satelittceller observert under mikroskopet med 4x forstørrelse.

### 3.4.1 Hurtigopprensing og hurtigsplitt

En hurtigmetode for opprensing ble også benyttet for å forenkle rensingsprosedyren. Det ble dunket kraftig på siden celleflasken for at satelittcellene skulle løsne i proliferasjonsmediet. Cellene ble deretter overført til nye kollagen I celleflasker og 1-2 ml ekstra proliferasjonsmedium ble tilsatt. Når fibroblastene ikke lenger var tilstede ble Hams F-10-basert proliferasjonsmedium byttet ut med Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium (appendiks 9.1.2). Dette mediet bidrar til en hurtigere vekst av både satelittceller og fibroblaster. Det er derfor viktig at det er rene kulturer av satelittceller før mediet tas i bruk ellers kan man få en uønsket overvekst av fibroblaster [86].

For å spare tid ble det også benyttet en enkel prosedyre for cellesplitting. Dette ble utført ved å tilsette 1 ml 0,25% trypsin og 1 ml HBSS uten  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$ . Celleflasken ble deretter plassert i inkubatoren i ca. 5 minutter før det ble tilsatt 2 ml proliferasjonsmedium for å inaktivere trypsin. 4 ml av cellesuspensjonen ble tatt over i nye celleflasker og tilsatt 6 ml ekstra proliferasjonsmedium. Trypsinet anses som tilstrekkelig fortynnet og inaktivert av serumet i proliferasjonsmedium at det ikke lenger vil kunne skade cellene over langtidsinkubering.

### 3.4.2 Etablering av cellebank

Når cellene var mellom 70-80% konfluente ble cellene splittet over til nye celleflasker ved først å vaske cellene to ganger med HBSS uten  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  etterfulgt av tilsetning med 0,25-0,5% trypsin og inkubering i 5 minutter ved  $37^{\circ}\text{C}$  for at cellene skulle løsne fra bunnen av celleflasken. Etter 5 minutters inkubering ble det dunket kraftig på siden av flasken for få løsnet flere celler. Deretter ble det tilsatt proliferasjonsmedium som tilsvarer minst like stort volum av tilsatt trypsin for å stoppe trypsinaktiviteten. Cellene ble overført til et sentrifugerør og sentrifugert ved 1800 rpm i 5 minutter, og deretter resuspendert i proliferasjonsmedium og fordelt på nye celleflasker (ca.  $1,0 \times 10^6$  celler/ $75 \text{ cm}^2$  celleflaske) eller resuspendert i frysemedium (appendiks 9.1.4). 1 ml av nedfrysingsmedium med celler ble fordelt til hvert kryorør merket med cellekode, passasje og dato. Cellene ble frosset ned ved  $-20^{\circ}\text{C}$  i 30-60 minutter og deretter ved  $-70^{\circ}\text{C}$  over natten før det ble satt inn i nitrogentank ved  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.3 Utsåing av satelittceller til forsøk

Brønnene ble behandlet med et tynt lag BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix før cellene ble sådd over i brønnene (Tabell 3). Matrigelen ble tint langsomt ved 4°C i kjøleskapet i 1 time for å forhindre geldannelse. Etter tining ble matrigelen fortynnet 1:50 i iskald DMEM (1g/l glukose). Riktig mengde matrigelfortynning ble pipettert over i brønnene og deretter lufttørket i 1 time i LAF-benk før overskuddet av matrigelfortynningen ble sugd av og kastet. Brønnene ble deretter vasket to ganger med DMEM før cellene ble sådd ut i brønnene.

**Tabell 3: Utsåingsoversikt**

Type brønn	Antall (celler/brønn)	Mengde celler (µl/brønn)	Matrigel-fortynning (µl)	Metode
96 brønner (NUNC)	10.000	100 µl	50 µl	Substratoksidasjon
96 brønner (Scintiplat® 96 TC)	10.000	100 µl	50 µl	SPA
12 brønner (Corning®)	60.000	1000 µl	500 µl	Real-time qPCR

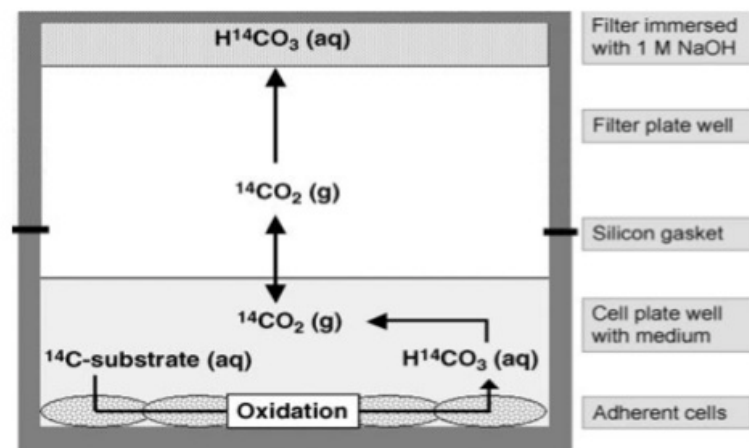
Vekstmedium ble skiftet hver andre dag til cellene oppnådde 70-80% konfluens eller viste tegn til spontandifferensiering. Deretter ble det selektive vekstmediet byttet ut med differensieringsmedium (appendiks 9.1.3) som tillater cellene å differensiere fra enkjernede satelittceller til flerkjernede myotuber.

Til substratoksidasjonsforsøkene ble cellene behandlet med GW501516 og GW7647 fra dag to og oljesyre fra dag tre under differensieringen. Selve forsøket og høsting av cellene ble utført på dag fire.

Til qPCR forsøk ble myotubene behandlet med 100  $\mu\text{M}$  oljesyre både med og uten 0,5  $\mu\text{M}$  DGAT-1-hemmer i et døgn før myotubene ble høstet på dag fire. I løpet av differensieringsperioden ble det tatt bilder av cellene under mikroskopet for å dokumentere for eventuelle endringer av cellene under behandling for de ulike substansene.

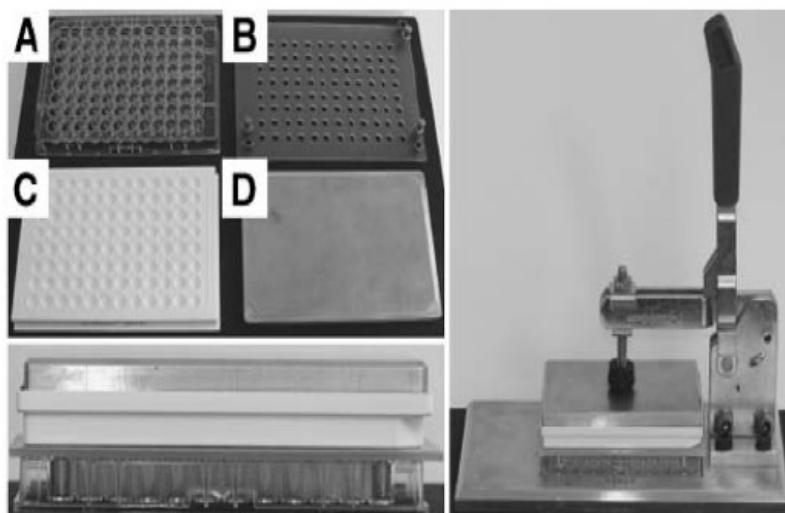
### 3.5 Substratoksidasjonsforsøk

Fettsyreoksidasjon- og glukoseoksidasjonsforsøk er basert på substratoksidasjonsmetoden som ble først beskrevet av Wensaas et al. [87]. Denne metoden går ut på at man kan måle oksidasjonen av fettsyrer og glukose ved å fange  $^{14}\text{CO}_2$  i en 96 brønners filterplate (Unifilter<sup>®</sup> GF/B) som på forhånd fuktet med 1M NaOH.  $^{14}\text{CO}_2$  som dannes som følge av oksidasjonen vil omdannes til  $\text{H}^{14}\text{CO}_3$  i kontakt med NaOH i filterplaten. Mengden  $\text{H}^{14}\text{CO}_3$  som fanges opp av filterplaten vil være mulig å måle i en  $\beta$ -scintillasjonsteller (1450 Microbeta PLUS<sup>®</sup>) som oppgir signalene som cpm (counts per minute) og det vil tilsvare mengde oksidert [ $^{14}\text{C}$ ]fettsyre (Figur 11) [87].



**Figur 11: Prinsippet for substratoksidasjonsforsøk.** Fettsyren omdannes til  $\text{CO}_2$  i cellens mitokondrie og deretter fanges opp av filterplaten fuktet med NaOH som ligger på toppen [87].

Apparatoppsettet for substratoksidasjonsforsøk kalles ofte for en ”sandwich”-oppsett, der filterplaten plasseres opp ned over cellebrettet med en silikonmatte i mellom for å sikre en lufttett oppsett. Tilsatt plasseres en tykk metallplate på toppen og klemmes til ved hjelp av et trappeapparat og ”sandwichen” plasseres i en inkubator i 4 timer (Figur 12) [87].



**Figur 12: Apparatoppsett for substratoksidasjonsforsøk.** Cellebrettet med 96 brønner fra NUNC (A) plasseres helt på bunnen i oppsettet. Deretter plasseres en silikonmatte (B) over cellebrettet med tilhørende fire skruer i hvert hjørne. Filterplaten fra Unifilter® GF/B (C) plasseres opp ned over silikonmatten. Tilslutt plasseres en tykk metallplaten (D) på toppen og klemmes til.

### 3.5.1 Fettsyreoksidasjonsforsøk

Cellene ble sådd ut i 96 brønner NUNC-plater (Tabell 3) og fikk vokse til de oppnådde 70-80% konfluens. Cellebrønnene ble forbehandlet med 10 nM GW 501516, 100 nM GW7647, 100  $\mu$ M oljesyre, 300  $\mu$ M oljesyre og 600  $\mu$ M oljesyre i et døgn før alle brønnene ble tilsatt 100  $\mu$ M oljesyre med henholdsvis de samme substratene i ytterligere et døgn. 0,1% DMSO ble benyttet som kontroll for GW-substratene. Cellene fikk differensiere i fire dager før det ble inkubert med et trappemedium som inneholder  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre  $\pm 1 \mu\text{M}$  FCCP (appendiks 9.5.1). Etter 4 timer ble cellene vasket med 150  $\mu\text{l}$  høstebuffer (appendiks 9.3.1) og lysert med 200  $\mu\text{l}$  0,1M NaOH. Filterplaten ble satt til inkubasjon ved romtemperatur i to dager før det ble satt til telling i  $\beta$ -scintillasjonstelleren.  $\beta$ -scintillasjonstelleren måler oksidasjonen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i form av  $\text{H}^{14}\text{CO}_3$ .

### 3.5.2 Glukoseoksidasjonsforsøk

Glukoseoksidasjonsforsøk er også basert på substratoksidasjonsmetoden som beskrevet ovenfor. I glukoseoksidasjonsforsøket ble cellene forbehandlet med de samme substratene som i oljesyreoksidasjonsforsøket. Cellene ble akuttbehandlet med 100  $\mu\text{M}$  D- $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose (0,3  $\mu\text{Ci/ml}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) i 4 timer for å måle glukoseoksidasjon ved fravær og tilstedeværelse av henholdsvis 100  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv oljesyre, 600  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv

oljesyre og 100 nM insulin (appendiks 9.5.2). Etter 4 timer ble cellene vasket med 150  $\mu$ l høstebuffer og lysert med 200  $\mu$ l 0,1 M NaOH og filterplaten ble inkubert i to dager i romtemperatur før telling i en  $\beta$ -scintillasjonsteller.

Glukose omdannes til acetyl-CoA via en rekke metabolske prosesser (avsnitt 1.7.2) (Figur 7). Gjennom flere metabolske trinn i sitronsyresyklusen i cellens mitokondrie omdannes acetyl-CoA videre til CO<sub>2</sub> og ATP [88]. H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> er i dette forsøket et mål på oksidert glukose.

### 3.5.3 Måling av celleassosiert radioaktiv oljesyre

Mengden [1-<sup>14</sup>C]oljesyre som er igjen inne i cellene etter substratoksidasjonsforsøkene kalles for celleassosiert radioaktivitet (CA). Celleassosiert [1-<sup>14</sup>C]oljesyre og D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose sammen med total mengde <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> kan gi oss en pekepinn på hvor mye fettsyrer eller glukose cellene har klart å ta opp under 4 timers inkubasjon. Samtidig gir CA-målingen et bilde på hvor stor andel av oljesyre og glukose *Plin2*-KO- og WT-celler er i stand til å lagre inne i cellene.

Etter å ha lysert cellene med 200  $\mu$ l 0,1M NaOH ble cellebrettet enten frosset ned ved -20°C eller plassert i inkubatorskapet ved 37°C i ca. 2 timer for at NaOH skal rekke å lysere cellene til videre CA - og proteinmåling. Deretter ble 50  $\mu$ l av cellelysatet fra hver brønn overført til Isoplate-96 fra PerkinElmer for måling av radioaktivitet. 50  $\mu$ l trappemedium som ble benyttet under selve forsøket ble også overført til Isoplate-96 for å normalisere cpm av CA- og substratoksidasjonsmålingen mot total cpm i trappemediet for å beregne nmol av substrat omsatt.

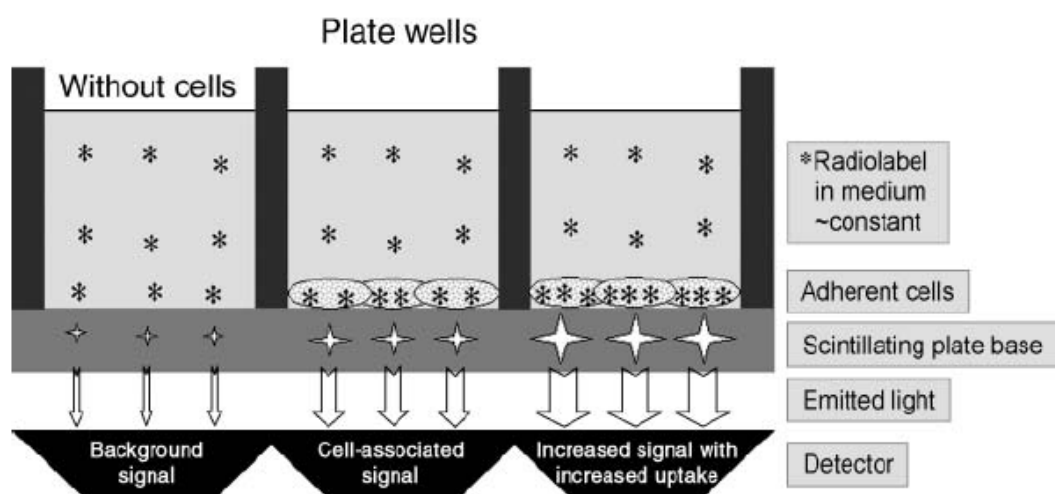
## 3.6 Scintillation proximity assay (SPA)

For å få kunnskap om forskjell i akkumulering og lipolyse av oljesyre mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mytotuber over en lengre tidsperiode, ble det benyttet en metode som kalles SPA. Akkumuleringen av oljesyre inne i cellene kan detekteres ved å benytte seg av radioaktivmerket oljesyre. Når [1-<sup>14</sup>C]oljesyre tas opp av cellene som ligger festet til bunnen av brønnene i cellebrettet vil det gi fra seg et sterkere signal til detektoren enn når oljesyren er løst i cellemediet. Detektoren måler signaler fra [1-<sup>14</sup>C]oljesyre nedenfra og detekterer av den grunn sterkere signaler når cellene tar opp og akkumulerer [1-<sup>14</sup>C]oljesyre. Når det er tilstrekkelig med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre tilstede vil signalene blir sterkere desto mer [1-<sup>14</sup>C]oljesyre



som akkumuleres i cellene, men signalene blir svakere etter vasking av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre fra cellene.  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre som fortsatt befinner seg inne i cellene etter vasking vil kunne forsvinne ut av cellene i form av oksidasjon eller lipolyse til syreløselige metabolitter. På denne måten kan man både måle akkumuleringen og lipolysen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (Figur 13) [87].

SPA-metoden gjør det enkel å måle akkumuleringen og lipolyse av fettsyrer ved ulike tidspunkter uten å høste cellene, men metoden er tidskrevende og det er ofte nødvendig med minst to dager for å kunne gjennomføre forsøket.



**Figur 13: Prinsippet for SPA.** Når  $^{14}\text{C}$ -merket oljesyre akkumuleres i cellene vil detektoren under cellebrettet registrere sterkere signaler enn når oljesyren er løst i mediet. Signalene blir sterkere jo mer cellene tar opp oljesyren [87].

Cellene ble sådd ut på Scintiplate<sup>®</sup>-96 TC og differensierte i tre dager før differensieringsmediet ble byttet ut med 50  $\mu\text{l}$ /brønn pulsmedium med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i ulike oljesyrekonentrasjoner (appendiks 9.4.1). Etter tilsetningen av pulsmidiet ble platene umiddelbart satt til telling i MicroBeta for å måle opptaket av oljesyren ved tid 0. Oljesyreopptaket ble målt ved ulike tidspunkter over 24 timer og deretter ble cellene vasket to ganger med 50  $\mu\text{l}$  varm 0,5% BSA løsning. Etter vask ble det tilsatt 50  $\mu\text{l}$ /brønn "chasemedium"  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  triacsin C (avsnitt 9.4.3) til cellene og lipolysen av oljesyren ble målt i MicroBeta ved ulike tidspunkter inntil 6 timer. Etter siste telling ble cellene vasket to ganger med 150  $\mu\text{l}$  høstebuffer og lysert med 200  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH. Cellelysate ble frosset ned ved  $-20^\circ\text{C}$  til måling av CA og proteiner senere (avsnitt 3.5.3 og avsnitt 3.7).

### 3.7 Proteinmåling (Bradford metoden)

Alle radioaktivitetstallinger i de overnevnte metodene bør relateres til antall celler som finnes i de forskjellige brønnene, men dette lar seg vanskelig gjøre da det ikke finnes noen metode som kan påvise hvor mange celler som faktisk var tilstede under forsøket. Istedenfor relateres det til mengde protein som finnes i de ulike brønnene og man kan dermed få et mer riktig estimat ved å beregne på antall nmol/mg protein.

Metoden som er blitt tatt i bruk i denne oppgaven for å måle proteinmengden kalles Bradfordmetoden. Ved å tilsette et fargestoff kalt Coomassie Brilliant Blue G-250 til cellelysatet fører dette til at fargestoffet binder seg til proteinene som er tilstede i lysatet og skifter farge fra rød til blå. Fargeendringen fører til en endring av fargestoffets absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm som detekteres av et spektrofotometer, Wallac Victor™ mikroplateleser fra PerkinElmer [89].

Cellene ble på forhånd tint i varmeskapet ved 37°C i ca. 2 timer da cellene ble lagret i fryseboksen. Etter 2 timer ble cellene homogenisert kraftig opp og ned ca. fem ganger ved hjelp av en pipette. Deretter ble 50 µl av cellelysatet overført til 96-brønners brett med flat bunn fra NUNC. De første to kolonnene på 96-brønners brettet ble tilsatt standardløsninger av BSA fortynnet i 0,1 M NaOH i konsentrasjon fra 0-160 µg/ml. Deretter ble Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate fortynnet 1:5 med destillert vann. 200 µl av fortynnet Bio-Rad Protein Assay ble tilsatt til hver brønn ved hjelp av omvendt pipettering for å unngå luftbobler. Cellene sto i Bio-Rad Protein Assay fortynning i 5-10 minutter før det ble målt absorpsjon med Wallac Victor™ mikroplateleser.

### 3.8 Radioaktive isotoper

Radioaktive isotoper som ble benyttet til denne oppgaven var følgende:

- [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (0,5 µCi/ml)
- D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (0,3 µCi/ml)

Akuttmedier som ble benyttet i oppgaven er oppgitt i appendiks 9.5.

## 3.9 Kvantitativ real-time RT-PCR

Det ble benyttet kvantitativ real-time revers-transkriptase polymerasekjedereaksjon (qPCR) med TaqMan teknologi for å undersøke effekter på genuttrykk av *Plin3* og *Plin5* hos *Plin2*-KO- og WT-muskelceller fra mus etter forbehandling av cellene med oljesyre (100  $\mu\text{M}$ ) og DGAT-1-hemmer (0,5  $\mu\text{M}$ ).

### 3.9.1 Forbehandling og høsting av celler til mRNA kvantifisering i qPCR

Cellene ble først sådd ut på et matrigelbehandlet brett med 12 brønner (avsnitt 3.4.3). Cellene fikk deretter differensiere til myotuber i tre dager myotubene ble behandlet med 100  $\mu\text{M}$  oljesyre med og uten 0,5  $\mu\text{M}$  DGAT-1-hemmer. På den fjerde dagen ble myotubene vasket en gang med 1 ml PBS og deretter tilsatt 500  $\mu\text{l}$  1:1 nucleic acid purification lysis løsning med PBS uten  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$ . For å oppnå fullstendig lysing av myotubene ble brønnen ristet forsiktig i 10-15 minutter og sjekket under mikroskopet. Videre ble lysatet overført i hvert sitt eppendorfrør og fryst ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$  og lagret frem til isolering av total RNA.

### 3.9.2 Isolering av total RNA og kvantifisering av RNA

Isolering av RNA fra cellelysatet ble utført ved hjelp av instrumentet Applied Biosystem 6100 med forhåndsinstallert program for RNA isolering. Hver enkelt prøve ble tilsatt til hver brønn i en "RNA purification tray" med 96 brønner.

Det ble utført flere vasketrinn med ulike vaskeløsninger. Tilslutt ble total RNA eluert med 100  $\mu\text{l}$  nucleic acid purification elueringsløsning. RNA ble straks satt på is for å forhindre degradering. For å oppnå et homogent RNA-prøve ble det pipettert raskt opp og ned ved hjelp av en 100  $\mu\text{l}$  automatpipette, og deretter ble det benyttet et spektrofotometer, NanoDrop-1000 for å kvantifisere RNA. 1,5-2  $\mu\text{l}$  RNase-fritt vann ble tilsatt direkte til den optiske linsen på NanoDrop-1000 for å starte apparatet. Deretter ble apparatet ble innstilt på programmet "RNA-40" for å rejustere for faktoren som benyttes til å kalkulere RNA konsentrasjonen som baseres på målt absorbans. Før prøvene kan tilsettes til den optiske linsen for absorbansmåling ble bakgrunnen nullstilt for alle bølgelengder med nucleic acid purification elueringsløsning. Tilslutt ble 1-1,5  $\mu\text{l}$  RNA prøve tilsatt direkte til den optiske linsen og målt. Renheten av RNA bestemmes av absorbansforholdet mellom 260 nm og 280 nm. En ratio under 2,0 for

RNA tyder på forurensninger mens et ratio omkring 2,1 er akseptabelt. RNA ble deretter lagret i -80°C til senere cDNA-syntese eller kan benyttes straks til cDNA-syntese.

### 3.9.3 cDNA syntese

For å kunne analysere prøvene i qPCR ble det laget cDNA fra mRNA ved hjelp av High Capacity cDNA Reverse Transcription kit fra ABI (ABI, #368814). Reverse transkriptase er et enzym som er i stand til å syntetisere cDNA fra enkeltrådige mRNA. cDNA som lages kan da benyttes som templatere til PCR amplifisering.

RNA prøvene ble først fortynnet til riktig konsentrasjon (300 ng) med RNase-fritt vann til totalvolum på 10 µl og riktig mengde ble applisert over i hver brønn i en 96 brønner PCR-plate. 2x revers transkripsjons (RT) master-mix ble blandet sammen på følgende måte:

**Tabell 4: 2x RT master-mix for 10 µl/brønn.**

Reagens	Volum (µl)
RNase-fritt vann	4,2
10x RT-buffer	2
10x Random primer	2
dNTP	0,8
Multiscribe™ RT enzym	1

10 µl fra master-mix ble tilsatt til hver brønn med 10 µl fortynnet RNA som gir et totalvolum på 20 µl til hver brønn (15 ng/µl total RNA). Brønnene forsegles deretter med en plastikkstrips og innholdet i hver brønn mikses og spinnes ned.

cDNA syntesen ble utført på ABI Veriti™ Thermal Cycler med 10 minutters annealingsfase ved 25°C, 120 minutter reverse transkripsjonsfase ved 37°C og tilslutt en 5 sekunders enzyminaktivering ved 95°C. cDNA ble deretter lagret ved -20°C.

### 3.9.4 Kvantifisering av cDNA med qPCR

2x TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, TaqMan<sup>®</sup> Gene expression assay ble tint på is ved romperatur. Etter at cDNA ble tint på is, ble det videre fortynnet 5x i RNase-fritt vann til sluttkonsentrasjon på 3 ng/μl. Blanding av 2x TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression per brønn på qPCR assay brett var følgende:

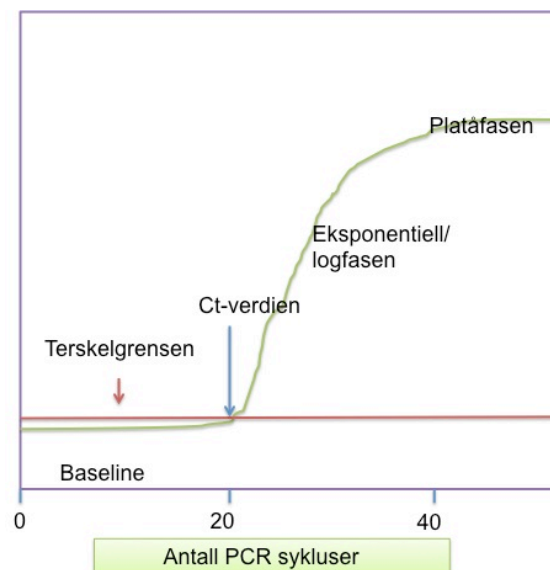
**Tabell 5: Blanding av 2x TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, TaqMan<sup>®</sup> Gene expression assay, PCR-vann og cDNA (3 ng/μl) per brønn.**

Reagens	Volum (μl)
2x TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Mastermix	10
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression assay	1
PCR-vann	4
cDNA (5x fortynnet)	5

TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assays som ble benyttet i denne oppgaven inneholder TaqMan 6-FAM<sup>™</sup> merkede TaqMan<sup>®</sup> MGB prober (appendiks 9.6.1) som kan gjenkjenne igjen *Plin2*, *Plin5*, *Plin3* eller *TBP* genet i cDNA. Det ble benyttet TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assays som er kommersiell tilgjengelige hvor sekvensen ikke oppgis av forhandler. Den eksakte sekvensen hvor assayet binder er derfor ikke kjent, men kun omtrent hvor i genet assayet binder. For oversikt over hvilke TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assay som ble benyttet se appendiks (appendiks 9.6.1). Videre ble toppen av brettet forseglet med ABI Prism<sup>®</sup> Optical Adhesive forseglingsfilm og mikset godt ved 1000 rpm i et minutt før brettet ble plassert i ABI 7900HT maskinen for DNA-amplifisering.

I en qPCR reaksjon vil mengden av et DNA-fragment dobles for hvert syklus, dermed vil det etter n sykluser være  $2^n$  kopier av DNA fragmenter tilstede. DNAene vil fortsette å dobles helt til reaksjonen når platåfasen [90]. Amplifiseringen av DNA består hovedsakelig av tre faser; baseline, eksponentiell/logfasen og platåfasen. I de tidligste syklusene (baseline) er det ikke mulig å detektere DNA amplifikasjon siden syklusene skjer under deteksjonsgrensen for instrumentet. I den eksponentielle fasen vil hastigheten av DNA amplifiseringen øke eksponentiell, da det er nok tilgang på reagenser for å danne ny DNA. Etter hvert som reagensene blir oppbrukt, er ikke lenger mulig å danne mer DNA og hastigheten på DNA

amplifikasjonen synkes. Denne fasen kalles platåfasen (Figur 14). Et fluoriserende signal som detekteres over terskelgrensen (kalkuleres av instrumentet/brukeren avhengig av baseline) danner grunnlaget for bestemmelse av Ct-verdien. Ct-verdien er det punktet der fluorescenssignaler overskrider den laveste deteksjonsgrensen (terskelverdien). Ct-verdien danner grunnlag for kvantifisering av mengden cDNA templat som er tilstede i utgangspunktet. En lav Ct-verdi indikerer at prøven i utgangspunktet inneholdt mye av et cDNA-templat i forhold til en høy Ct-verdi [91].



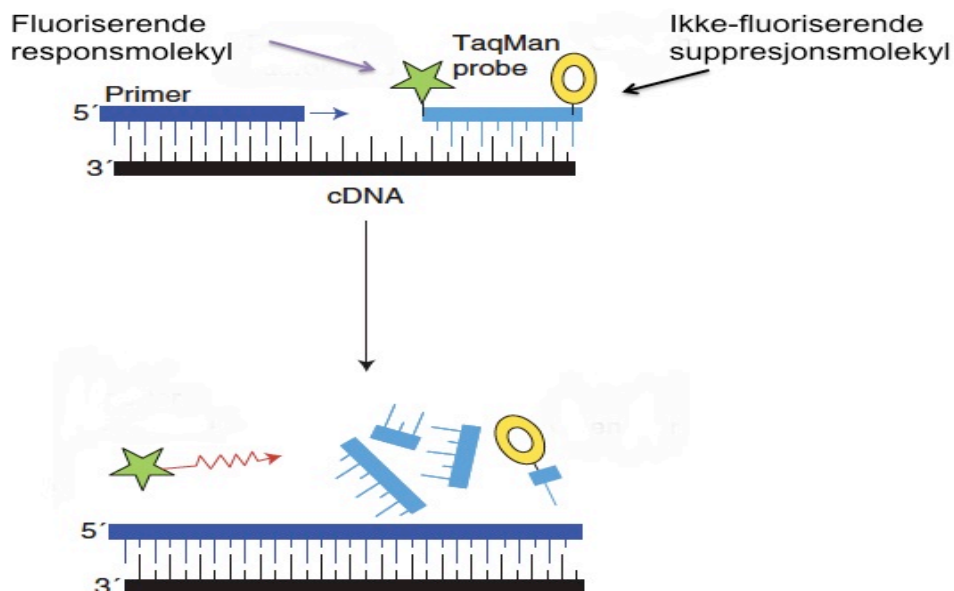
**Figur 14: qPCR amplifisering.** Amplifiseringen av cDNA til DNA består hovedsakelig av tre trinn; baseline, log/eksponentiellfasen og platåfasen (rød kurve). Det er under eksponentiellfasen at Ct-verdien bestemmes. Ct-verdien er antall sykluser som må til for å komme over terskelgrensen. I platåfasen skjer det nærmest ingen DNA amplifisering på grunn av oppbrukte reagenser. Figuren er modifisert fra [91].

### 3.9.5 Kvantifisering av mRNA

For å bestemme mRNA konsentrasjonen som var tilstede i prøven ble det tatt utgangspunkt i mengde utgangstemplat, cDNA som var tilstede. Dette ble utført ved å benytte seg av relativ kvantifisering som også er kalt for komparativ terskel metoden ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoden). Denne metoden eliminerer behovet for å lage en standardkurve, istedenfor blir mengden utgangstemplat normalisert mot et endogent ”housekeeping” gen [91]. I denne oppgaven ble det normalisert mot TATA bindende protein (*TBP*).

### 3.9.6 TaqMan prober

I denne oppgaven ble det benyttet TaqMan-prober som deteksjonskilde. TaqMan-prober består av en liten komplementær DNA-bit (et oligonukleotid) for det aktuelle genet som man ønsker å studere, som er merket med et fluoriserende resposnmolekyl på 5'enden av oligonukleotidet og et ikke fluoriserende suppressjonsmolekyl festet på 3'enden. Suppressjonsmolekylet er i stand til å absorbere fluorescensen fra det fluoriserende resposnmolekylet basert på "fluorescence resonance energy transfer" (FRET) prinsipp. Under normale omstendigheter er den fluoriserende emisjonen fra proben lav på grunn av den korte avstanden mellom resposnmolekylet og suppressjonsmolekylet. Når temperaturen stiger i en qPCR reaksjon medfører dette til denaturering av det dobbeltrådig DNAet. Etter hvert som temperaturen i qPCR instrumentet synker igjen vil TaqMan-proben og primere binder seg til dets spesifikke målsekvens på DNA-trådet. Tilslutt kløyves og fjernes TaqMan-proben fra DNAet ved hjelp av *Thermus aquatius* (Taq) DNA polymerase som har 5' til 3' exonukleaseaktivitet, slik at resposnmolekylet og suppressjonsmolekylet fysisk separeres fra hverandre. Dette resulterer i fluoriserende emisjoner som økes proporsjonal med mengden DNA som syntetiseres etter hver syklus (Figur 15) [91, 92].

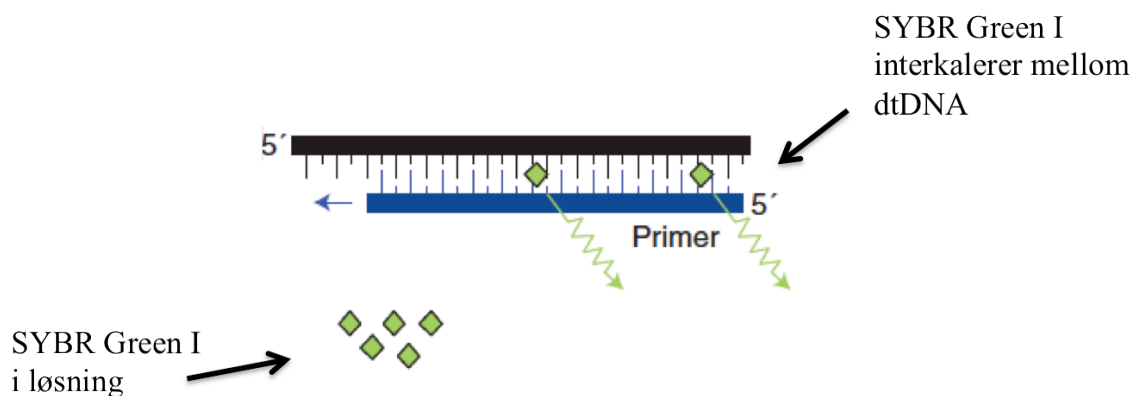


**Figur 15: Prinsippet for TaqMan assay i qPCR.** TaqMan proben består av et oligonukleotid som er festet med et fluoriserende resposnmolekyl på 5'enden og et ikke-fluoriserende suppressjonsmolekyl på 3'enden. Når de to molekylene ligger nær hverandre emitteres det ikke fluoriserende lys fordi suppressjonsmolekylet absorberer alt fluoriserende lys fra resposnmolekylet. Når TaqDNA-polymerase utøver exonuklease-aktivitet fra 5' til 3' enden på TaqManproben kløyves

proben i mindre biter slik at responsmolekylet og suppressjonsmolekylet separeres. Separasjon av suppressjonsmolekylet og responsmolekylet resulterer i fluoriserende emisjoner som kan detekteres av qPCR amplifiseringsmaskin. Figuren er modifisert fra [91].

### 3.9.7 SYBR Green 1

Et annet prinsipp for å kvantifisere mRNA i en prøve er å benytte seg av SYBR Green 1 som deteksjonskilde under DNA-amplifisering. SYBR Green 1 er et molekyl som også emitterer fluorescens, men den er ikke sekvensspesifikk. I motsetning til TaqMan prober som binder seg til enkelttrådig DNA-templater, binder SYBR Green 1 kun til dobbeltrådig DNA (dtDNA) ved å interkalere mellom de to trådene i DNAet. SYBR Green 1 emitterer lite fluorescens når det foreligger ubundet i reaksjonsløsningen og emitterer derimot en sterk fluoriserende lys ved dtDNA-binding (Figur 16). Intensiteten av fluorescensen fra SYBR Green 1 er altså avhengig av mengden dtDNA som er tilstede under qPCR reaksjonen [91].



**Figur 16: Prinsippet for SYBR Green 1.** Når SYBR Green 1 foreligger ubundet i løsningen emitteres det lite fluoriserende lys, mens det emitteres en intenst fluorescens når SYBR Green 1 binder seg til dobbeltrådig DNA (dtDNA). Figuren er modifisert fra [91].

Ulempen med SYBR Green 1 i forhold til TaqMan prober er at SYBR Green 1 metoden er lite spesifikk fordi molekylet binder seg til alt slags dtDNA som dannes under PCR reaksjonen, som for eksempel primer-dimere. Med en TaqMan probe vil ikke bindinger til primer-dimere foreligge da det kun binder seg til spesifikke sekvenser av DNA-templet for



så å emittere fluorescens etter at det kløyves av Taq DNA polymerase [91]. Fordelen med SYBR Green 1 er at det er relativt billig [91].

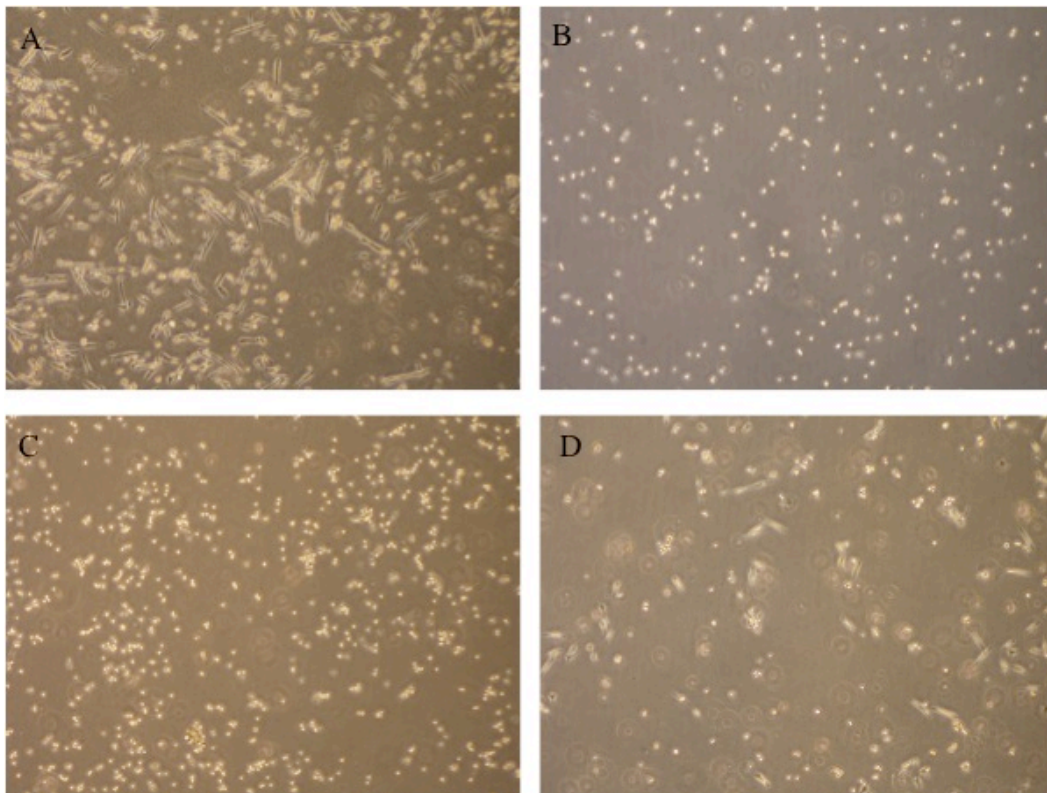
## 4 Presentasjon av data og statistisk evaluering

Dataene i denne oppgaven presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil (SEM). For substratoksidasjonsmetoden med oljesyre varierer antall forsøk (n) fra 3-5 for myotuber fra hver donor (*Plin2*-WT eller *Plin2*-KO) med 8 paralleller per forsøk (og behandling). For å sammenligne oljesyreopptak og oksidasjon mellom donorene ble alle forsøkene fra hver donor slått sammen og statistikken ble beregnet vha. ”linear blandet modell” (Linear Mixed Model (LMM) som er en ANOVA metode med Bonferroni korreksjon ved hjelp av statistikkprogramvaren SPSS (Linear Mixed Model). Tosidig paret t-test (Student’s t-test) ble benyttet ved sammenligning av ulike forbehandlinger og akuttbehandlinger. For substratoksidasjonsforsøk med glukose varierte antall forsøk (n) fra 1-12, der hvert forsøk ble utført med minst 4 paralleller for hver behandling. LMM ble benyttet der det ikke var mulig å benytte seg av tosidig paret t-test på to data fra samme donor med ulikt antall forsøk. Ved sammenligning av datasett fra de to donorgrupper (WT vs. KO) ble det benyttet tosidig uparet t-test. For SPA metoden ble det kun utført et forsøk for hver donor med 8-12 paralleller, og data analysert LMM med Bonferroni korreksjon. Signifikansnivå ( $\alpha$ );  $p \leq 0,05$  ble benyttet i denne masteroppgaven.

# 5 Resultater

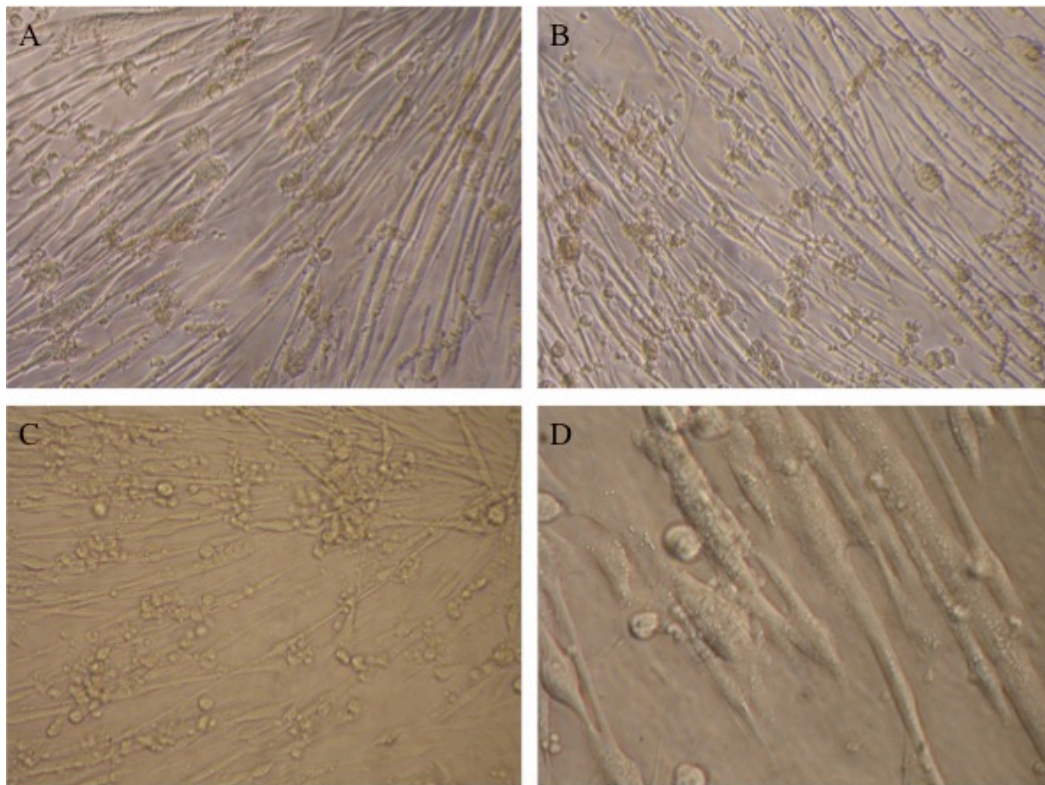
## 5.1 Musecelle-karakteristika

I denne oppgaven ble det benyttet satelittceller fra fire donorer, hvorav to var *Plin2*-WT-mus og to var *Plin2*-KO-mus. Både under opprensingen og forsøkene ble det tydelig observert forskjellige grad av differensieringsevne mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-donorer, men også innad donorer med samme egenskap. Under opprensingen prolifererte satelittcellene raskere hos donor KO19 i forhold til WT17, WT2 og KO4, noe som medførte tendenser til rask spontantdifferensiering hos donor KO19 (Figur 17A). Problemet hos donor KO19 lot seg raskt løse med hyppige splittings. Donor WT2 hadde også problemer med spontantdifferensiering under isolering og oppskalering noe som gjorde oppskaleringsarbeidet for donor WT2 komplisert (Figur 17D). Det løste seg heller ikke med hyppige splittings for donor WT2 fordi spontantdifferensieringen hos denne donoren ikke skyldes konfluens. Donor WT17 og donor KO4 prolifererte sakte under oppskalering, men tok igjen donor KO19 etterhvert (Figur 17B og C).



**Figur 17: Satelittceller under isolering.** Rene satelittceller som er blitt isolert fra muskelfibre (biopsier) fra de fire ulike donorer; KO19 (A), KO4 (B), WT17 (C) og WT2 (D). Bildene er tatt med 4x forstørrelse.

Ved utsåing til forsøk fikk cellene vokse i tre dager før de fleste av cellene begynte å differensiere av seg selv. Bildene nedenfor (Figur 18) viser ferdig differensierte myotuber for de fire donorene ved dag fire like før forsøk. Satelittceller fra de fire donorene fikk differensiere tilstrekkelig i inntil fire dager, og dannet lange og fine nettverk av myotuber (Figur 18A) og (Figur 18B). Differensieringstid på fem dager ble også utprøvd på donor KO19 og donor WT17, men det viste seg at cellene løsnet fra cellebrettet og døde innen den tid.



**Figur 18: Differensierte myotuber fra *Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-mus på dag fire.** Differensierte myotuber fra donor KO19 (A), KO4 (B), WT17 (C) og WT 2 (D). Bilde A, B og C er tatt med 20x forstørrelse og bilde D er tatt med 40x forstørrelse.

## 5.2 Opptak, akkumulering, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av oljesyre mellom enkeltdonorene

I oljesyreoksidasjonsforsøkene ble et ulikt antall forsøk utført for hver av de fire donorene (Tabell 6). Dette skyldes at cellene som ble benyttet hadde forskjellig proliferasjonshastighet under oppskaleringen, og førte til begrenset tilgjengelighet på noen av cellelinjene under forsøkene.

**Tabell 6: Oversikt over donortyper og antall oljesyreoksidasjonsforsøk (n) fra hver av donorene**

Donortype	Antall forsøk (n)
KO19	5
KO4	3
WT17	4
WT2	3

På grunn av ulikt antall forsøk og forskjellige proliferasjons- og differensieringsevne mellom donorene var det derfor ønskelig å undersøke om det også var forskjeller i evnen til oljesyreopptak og oksidasjon mellom de fire donorene. Dette ble beregnet for å avdekke om det forelå store individuelle forskjeller innenfor WT-donorene og KO-donorene slik at det kan tas med i betraktning ved tolkning av de produserte dataene.

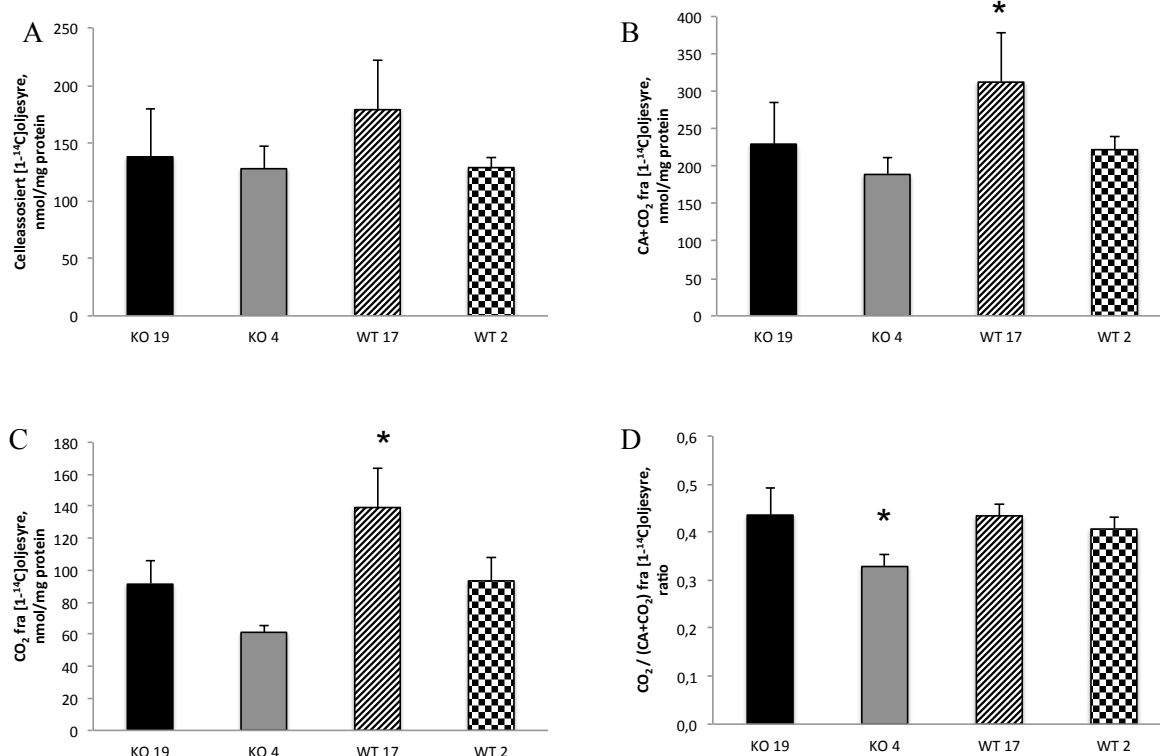
Akkumulering og oksidasjon av radioaktiv oljesyre ble målt etter 4 timers inkubasjon med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (appendiks 9.5.1). Dataene som presenteres viser samlet effekt på oljesyreopptak og oljesyreoksidasjon basert på alle forbehandlingene for hver av fire donorer (Figur 19).

Data fra oljesyreakkumulering viste tendens til høyere akkumulering hos donor WT17 sammenlignet med donor KO4 ( $p = 0,1$ ), men det var ingen signifikante forskjeller mellom donor WT17 og de respektive donorene (Figur 19A). Akkumulering av oljesyre viser kun [1-<sup>14</sup>C]oljesyre som er inne i cellene 4 timer etter forsøksstart. For å få et innblikk i cellenes evne til oljesyreopptak i løpet av de 4 timene ble CA- og CO<sub>2</sub>-data addert for å få et estimat på det totale oljesyreopptaket under hele forsøket. Det gjennomsnittlige [1-<sup>14</sup>C]oljesyreopptaket fra

hver donor viste at myotuber fra donor WT17 hadde en signifikant høyere oljesyreopptak enn myotuber fra KO19 ( $p = 0,02$ ), KO4 ( $p = 0,001$ ) og WT2 ( $p = 0,02$ ) (Figur 19B). Mens oljesyreopptaket for myotuber fra donor KO19, KO4 og WT2 så ikke ut til å være forskjellige.

Oksidasjonen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i myotubene, målt som mengde frigjort  $\text{CO}_2$  per nmol/mg protein, viste en signifikant høyere oksidasjon hos donor WT17 sammenlignet med donor WT2 ( $p < 0,01$ ), KO19 ( $p < 0,01$ ) og KO4 ( $p = 0,004$ ). Donor KO4 hadde en tendens til lavere  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreoksidasjon enn KO19 ( $p = 0,08$ ) og WT2 ( $p = 0,10$ ), men disse forskjellene var ikke signifikante. Det var derimot ingen forskjell i oljesyreoksidasjon hos KO19 og WT2 (Figur 19C).

Den andelen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre som ble oksidert i forhold til det totale opptaket i myotubene ble beregnet ved å dividere fettsyreoksidasjon med totalopptaket ( $(\text{CO}_2/(\text{CA}+\text{CO}_2))$ ). Andelen av oljesyre som ble oksidert i forhold til opptaket kalles for fraksjonell oksidasjon. Den fraksjonelle oksidasjonen for donor KO4 var omtrent 30% i forhold til de tre andre donorer med fraksjonell oksidasjon på omkring 40% (Figur 19D). Statistiske beregninger viste at den fraksjonelle oksidasjonen for donor KO4 var signifikant lavere enn de andre donorene ( $p < 0,05$ ), mens ingen forskjeller ble funnet i den fraksjonelle oksidasjonen mellom de tre andre donorene.



**Figur 19: Gjennomsnittlig akkumulering, opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i myotuber fra hver av de fire donorene.** Akkumulering (CA) av oljesyre (A), oljesyreopptak CA+CO<sub>2</sub> (B), oljesyreoksidasjon CO<sub>2</sub> (C) og fraksjonell oksidasjon CO<sub>2</sub>/(CA+CO<sub>2</sub>) (D) i myotuber hos donor KO19, KO4, WT17 og WT2 basert på alle forbehandlinger. Myotubene ble forbehandlet i to dager med 0,1% DMSO som kontroll, 10 nM GW501516, 100 nM GW7647, 100 μM oljesyre, 300 μM oljesyre og 600 μM oljesyre. Et døgn før forsøket ble 100 μM oljesyre tilsatt myotubene for å oppregulere *Plin2*-uttrykk. På forsøksdagen ble cellene inkubert med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (0,5 μCi/ml, 100 μM) i 4 timer. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av Linear Mixed Model (ANOVA) med Bonferroni korreksjon i SPSS. Dataene er vist her med n = 3-5 forsøk og som gjennomsnitt ± SEM, \*p ≤ 0,05 mot alle donorer.

### 5.3 Effekter av forbehandling med ulike oljesyre konsentrasjoner på opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre

I en tidligere studie på C2C12-celler er det blitt vist at oljesyrebehandling gir høyere IMTG-lagring samtidig som det induserer til høyere nivåer av perilipin-2 protein sammenlignet med palmitinsyrebehandling [59]. Derfor var det ønskelig å studere om forbehandlinger med ulike oljesyre konsentrasjoner gir en doseavhengig respons på [1-<sup>14</sup>C]oljesyreopptak, akkumulering og oksidasjon hos *Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-myotuber.

Myotubene ble forbehandlet med henholdsvis 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  og 600  $\mu\text{M}$  oljesyre i et døgn (24 timer) før det ble akuttbehandlet med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) i 4 timer. Etter 4 timer ble data for oksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) og akkumulering (CA) av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i myotubene samlet inn ved å lysere cellene og deretter målt for radioaktivitet. Dataene for hver donortype ble slått sammen med henholdsvis åtte forsøk for *Plin2*-KO-donortypen og syv forsøk for *Plin2*-WT-donortypen.

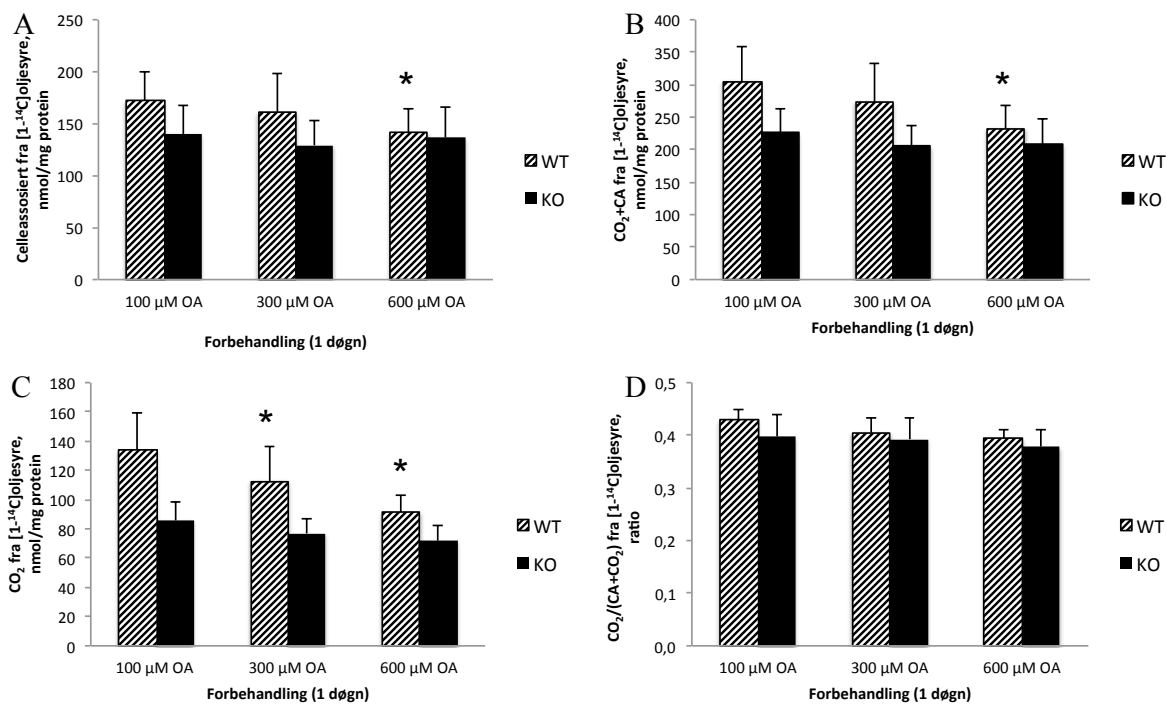
Resultatet for oljesyreakkumulering (CA) viser en signifikant reduksjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre akkumulering etter forbehandling med 600  $\mu\text{M}$  oljesyre i forhold til 100  $\mu\text{M}$  oljesyre hos WT-myotuber ( $p = 0,004$ ). Samtidig var det også tendens til lavere  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreakkumulering etter forbehandling med 300  $\mu\text{M}$  oljesyre i forhold til 100  $\mu\text{M}$  oljesyre hos KO-myotuber ( $p = 0,06$ ) (Figur 20A).

Opptaket av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble beregnet ved å legge sammen dataene for oljesyreoksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) og akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (CA). Dataene fra  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreopptaket viste også i likhet med dataene fra akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (CA), en signifikant reduksjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreopptak etter forbehandling med 600  $\mu\text{M}$  oljesyre i forhold til 100  $\mu\text{M}$  oljesyre hos WT-myotuber ( $p = 0,001$ ), mens det derimot ikke er blitt funnet en lignende reduksjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreopptak ved økende konsentrasjon av oljesyre hos KO-myotuber (Figur 20B).

Oksidasjonen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre, representert som  $\text{CO}_2$ , tyder på en doseavhengig reduksjon av oksidasjon etter forbehandling med økende oljesyrekonsentrasjon hos WT-myotuber. Både forbehandling med 300  $\mu\text{M}$  oljesyre og 600  $\mu\text{M}$  oljesyre gav statistisk signifikante reduksjoner i oksidasjonen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i forhold til 100  $\mu\text{M}$  oljesyre ( $p = 0,02$ ,  $p = 0,024$ ). Hos KO-myotuber derimot ble det ikke observert den samme doseavhengige reduksjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreoksidasjon ved økende konsentrasjon av oljesyre (Figur 20C).

Den fraksjonelle oljesyreoksidasjonen beregnes ved å dividere oljesyreoksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) med oljesyreopptak ( $\text{CO}_2 + \text{CA}$ ). Fraksjonell oksidasjon er et parameter som beskriver hvor stor andel av totalopptaket av oljesyre som ble oksidert. Statistiske analyser av den fraksjonelle oksidasjonen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre viste ingen antydninger til endret  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreoksidasjon ved økende oljesyrekonsentrasjon hos KO-myotuber. Hos WT-myotuber ble det observert en tendens til lavere fraksjonell oksidasjon etter forbehandling med 600  $\mu\text{M}$  oljesyre i forhold til 100  $\mu\text{M}$  oljesyre ( $p = 0,06$ ) (Figur 20D).





**Figur 20: Opptak, akkumulering, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber etter forbehandlinger av tre ulike oljesyrekonentrasjoner.** Akkumulering (CA) av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre etter forbehandling med 100 μM, 300 μM og 600 μM oljesyre (A), oljesyreopptak CA+CO<sub>2</sub> etter forbehandling med 100 μM, 300 μM og 600 μM oljesyre (B), oljesyreoksidasjon CO<sub>2</sub> etter forbehandling med 100 μM, 300 μM og 600 μM oljesyre (C) og fraksjonell oksidasjon CO<sub>2</sub>/(CA+CO<sub>2</sub>) etter forbehandling med 100 μM, 300 μM og 600 μM oljesyre (D) hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber. Myotubene ble forbehandlet i et døgn (24 timer) med 100 μM, 300 μM og 600 μM oljesyre og deretter inkubert med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (0,5 μCi/ml, 100 μM) i 4 timer. Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM, n = 7-8. Statistiske analyser er utført ved hjelp av tosidig paret t-test \*p ≤ 0,05 mot *Plin2*-WT 100 μM oljesyre.

## 5.4 Effekter av GW501516 og GW7647 på opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre

GW501516 og GW7647 er henholdsvis PPAR $\delta$ - og PPAR $\alpha$ -agonister som virker på PPAR-kjernereseptorer (avsnitt 1.11.3 og avsnitt 1.11.4). Substratene har vist å øke uttrykket av perilipin-2 proteiner hos C2C12-celler [59]. Det er derfor ønskelig å undersøke hvordan en oppreguleringen av perilipin-2 proteiner stimulert av PPAR-agonister (PPAR $\delta$  og PPAR $\alpha$ ) påvirker akkumuleringen, opptaket og oksidasjonen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber.

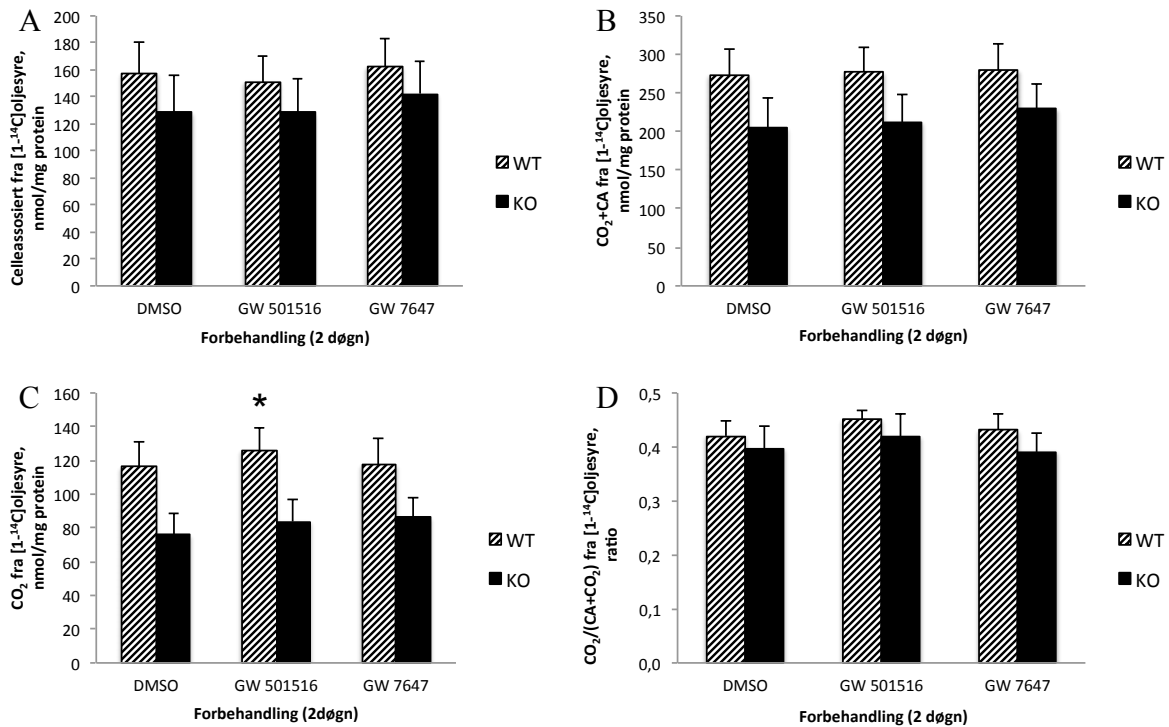
Myotubene fra WT- og KO-mus ble forbehandlet med GW501516 (10 nM) og GW7647 (100 nM) i to døgn. I et døgn før forsøket ble det tilsatt 100 μM oljesyre til alle brønnene.

Kontrollen for GW-substratene var myotuber forbehandlet med 0,1% DMSO i to døgn, derav et døgn forbehandling med 100  $\mu$ M oljesyre. Etter to døgn ble cellene inkubert i 4 timer i et akuttmedium som inneholdt [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre (0,5  $\mu$ Ci/ml, 100  $\mu$ M oljesyre).

Resultatet etter to døgns forbehandling med GW501516 og GW7647 i WT- og KO-myotuber viste ingen signifikante forskjeller i akkumuleringen og opptaket av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre sammenlignet med kontrollen (0,1% DMSO) (Figur 21A og B).

Det ble observert en signifikant økning av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyreoksidasjon hos WT-myotuber etter forbehandling med GW501516 i forhold til kontroll ( $p = 0,03$ ), mens ingen endringer i oljesyreoksidasjon ble observert etter forbehandling med GW7647. Resultatet for KO-myotuber viste ingen forandringer i [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyreoksidasjon verken etter forbehandling med GW501516 eller GW7647 (Figur 21C).

Resultatet for fraksjonell oksidasjon av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre viste ingen signifikante forskjeller etter forbehandling med henholdsvis GW501516 og GW7647 mot 0,1% DMSO hos WT- og KO-myotuber. Men det er blitt funnet en tendens til økt fraksjonell oksidasjon med GW501516-forbehandling i forhold til kontrollen (0,1% DMSO) ( $p = 0,07$ ) hos myotuber fra WT (Figur 21D).



**Figur 21: Opptak, akkumulering, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av [ $1-^{14}\text{C}$ ]oljesyre i *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber etter forbehandling med 0,1% DMSO (kontroll), GW501516 og GW7647. Akkumulering (CA) (A), totalopptaket (CA+ $\text{CO}_2$ ) (B), oksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) (C) og fraksjonell oksidasjon ( $\text{CO}_2/(\text{CA} + \text{CO}_2)$ ) (D) av [ $1-^{14}\text{C}$ ]oljesyre (0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 100  $\mu\text{M}$  oljesyre) etter forbehandling med 0,1% DMSO, 10 nM GW501516 og 100 nM GW7647 hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM, n = 7-8. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig paret t-test, \*p  $\leq$  0,05 mot kontroll (0,1% DMSO) WT.**

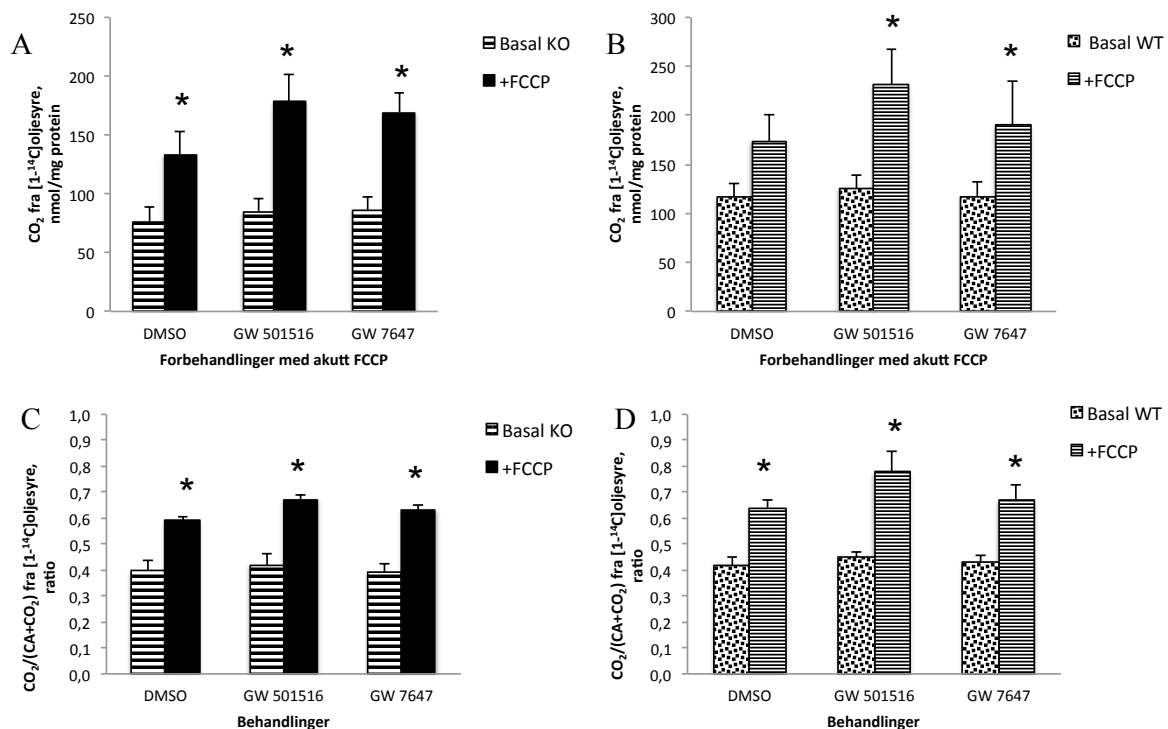
## 5.5 Effekt av FCCP på oljesyreoksidasjon

I studiet av lipidoksidasjon var det også ønskelig å undersøke den maksimale oksidative kapasiteten i myotuber hos *Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-mus, og om det virkelig forelå en høyere oksidativ kapasitet hos WT-myotuber som har *Plin2*-genet intakt i forhold til KO-myotuber, slik som det ble foreslått av Phillips et al. [58]. Den maksimale oksidative kapasiteten ble undersøkt ved å inkubere myotubene med [ $1-^{14}\text{C}$ ]oljesyre i 4 timer  $\pm$  1  $\mu\text{M}$  FCCP. Cellene ble deretter vasket og  $\text{CO}_2$ -dataene ble samlet inn.

Dataene viste at oksidasjonen av [ $1-^{14}\text{C}$ ]oljesyre økte signifikant etter tilsetning av 0,1  $\mu\text{M}$  FCCP akutt til myotuber fra *Plin2*-KO-mus som ble forbehandlet med 0,1% DMSO (p = 0,002), 10 nM GW501516 (p < 0,01) og 100 nM GW7647 (p = 0,048) (Figur 22A).

Myotuber fra *Plin2*-WT mus viste også en fremtredende økning av oljesyreoksidasjon etter tilsetning av FCCP til myotuber forbehandlet med GW501516 ( $p = 0,05$ ) og GW7647 ( $p = 0,03$ ) (Figur 22B). Tilsetning av FCCP til myotuber forbehandlet med 0,1% DMSO viste ingen signifikante økninger i oljesyreoksidasjon (Figur 22B).

Den fraksjonelle oksidasjonen av oljesyre ble beregnet for å undersøke hvor stor andel av totalopptaket som ble oksidert under påvirkning av FCCP. Fraksjonell oljesyreoksidasjon av myotuber fra KO-mus viste i likhet med data fra oljesyreoksidasjon en signifikant økning av andel  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre som ble oksidert av totalopptaket hos myotuber forbehandlet med 0,1% DMSO, GW501516 og GW7647 ( $p < 0,01$ ) (Figur 22C). Data om den fraksjonelle oljesyreoksidasjonen i myotuber fra WT mus viste en signifikant økning i andel oksidert  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre av totalopptaket i myotuber forbehandlet med 0,1% DMSO ( $p < 0,01$ ), GW501516 ( $p = 0,011$ ) og GW7647 ( $p < 0,01$ ) (Figur 22D).

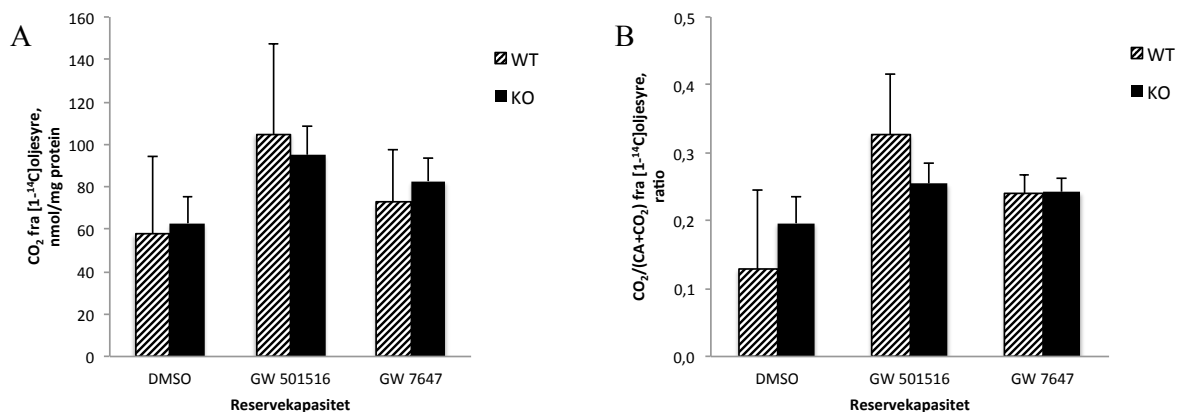


**Figur 22: Effekt av FCCP på oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre.** Differensierte myotuber ble inkubert med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ( $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ ,  $100 \mu\text{M}$ )  $\pm 1 \mu\text{M}$  FCCP i 4 timer. Frigiort  $\text{CO}_2$  ble målt ved basal (uten tilsetning av FCCP) og med FCCP (+FCCP) og relatert til nmol/mg proteiner for beregne absoluttverdien på oljesyreoksidasjon i *Plin2*-KO-myotuber (A), *Plin2*-WT-myotuber (B), fraksjonell oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *Plin2*-KO-myotuber (C) og fraksjonell oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *Plin2*-KO-myotuber (D) ble estimert ved å dividere  $\text{CO}_2$  med totalopptaket

(CO<sub>2</sub>+CA). Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM, n = 7-8. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig paret t-test, \*p ≤ 0,05 mot basal.

For å undersøke reservekapasiteten hos myotuber fra *Plin2*-WT- og KO-mus, og forskjellen i reservekapasitet mellom disse to donortypene, ble reservekapasiteten beregnet ved å subtrahere verdier fra myotuber tilsatt FCCP med verdier fra myotuber uten tilsetning av FCCP (FCCP - basal). Ved å beregne ut reservekapasiteten kan man få en anelse om hvor stor kapasitet myotubene virkelig har for å oksidere oljesyre, men som ikke blir fullt benyttet under basale tilstander.

Resultatene viste at reservekapasiteten for oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre mellom *Plin2*-KO- og WT-myotuber ikke var signifikant forskjellige fra hverandre (Figur 23A og B).

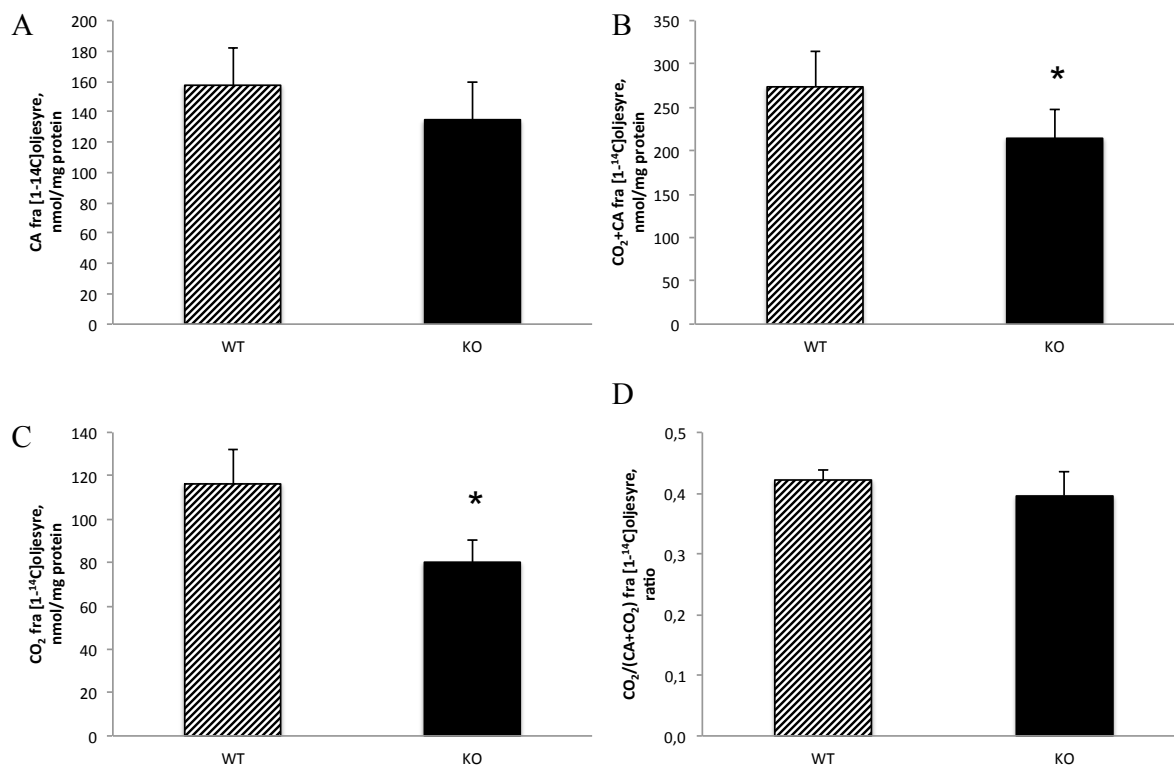


**Figur 23: Reservekapasitet av myotuber fra *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mus.** Reservekapasitet av [1-<sup>14</sup>C]oljesyreoksidasjon (A) og fraksjonell [1-<sup>14</sup>C]oljesyreoksidasjon (B) ble beregnet som differansen mellom oljesyreoksidasjon med (+FCCP) og uten FCCP (basal). Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM, n = 7-8. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test.

## 5.6 Forskjell i opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre mellom *Plin2*-villtype- og *Plin2*-knockout-myotuber

For å undersøke om det er forskjeller i akkumulering, opptak og oksidasjon av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre mellom *Plin2*-WT- og KO-myotuber ble dataene for de ulike forbehandlinger slått sammen og statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med en blandet modell analyse (Linear Mixed Model).

Statistiske analyser på akkumulering av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre viste ingen forskjell i akkumulering av oljesyre hos *Plin2*-KO- i forhold til *Plin2*-WT-myotuber (Figur 24A). Resultatet viste derimot en signifikant lavere oljesyreopptak ( $\text{CO}_2\text{+CA}$ ) ( $p = 0,010$ ) hos KO-myotuber (Figur 24B). Resultatet fra [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyreoksidasjon mellom *Plin2*-WT- og KO-myotuber viste en signifikant lavere oljesyreoksidasjon i *Plin2*-KO i forhold til *Plin2*-WT myotuber ( $p < 0,01$ ) (Figur 24C), men det ble ikke funnet noen forskjell i fraksjonell oksidasjon av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre mellom *Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-myotuber (Figur 24D).



**Figur 24:** Forskjell i lipidmetabolismen mellom myotuber fra *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mus. Figuren viser akkumulering (CA) av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (A), totalopptak (CO<sub>2</sub>+CA) av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (B), oksidasjon (CO<sub>2</sub>) av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (C) og fraksjonell oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (D) mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber etter 4 timers inkubering med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (0,5 µCi/ml, 100 µM). Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM av alle behandlinger utenom akuttbehandlinger med FCCP, n = 7-8. Statistisk analyse ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse, \*p ≤ 0,05 mot WT.

## 5.7 Effekter av ulike oljesyrekonsentrasjoner på kronisk akkumulering av oljesyre

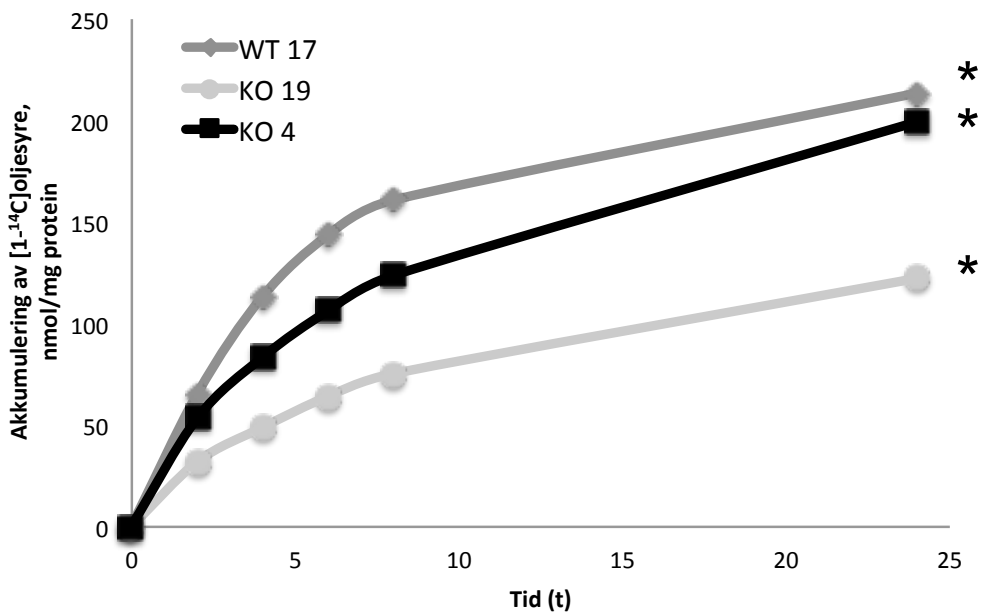
Data fra [1-<sup>14</sup>C]oljesyreakkumulering (Figur 19A) viste at donor WT17 hadde en høyere tendens til oljesyreakkumulering i forhold til donor KO4 etter 4 timers akutt behandling med radioaktiv oljesyre. For å studere kronisk akkumulering av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (0,5 µCi/ml, 100 µM oljesyre) over et tidsrom på inntil 24 timer ble SPA metoden benyttet.

Det var i tillegg ønskelig å studere påvirkning av ulike oljesyrekonsentrasjoner på [1-<sup>14</sup>C]oljesyreakkumulering over 24 timer. Differensieringsmediet ble derfor byttet ut med pulsmidiet som inneholdt [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i henholdsvis 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 600 µM og 1000 µM oljesyre (appendiks 9.4.1) etter tre dager differensiering. Deretter ble brettet umiddelbart satt til telling i MicroBeta. Etter tellingen ble brettet satt tilbake i

inkubatoren. Tellingene av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreakkumulering ble gjentatt etter 2, 4, 6, 8 og tilslutt 24 timer.

Resultatet fra akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i 24 timer er presentert nedenfor (Figur 25). Det ble observert en doseresponskurve for de ulike oljesyrekonsentrasjonene (data ikke vist). Det var i tillegg ønskelig å se på donorforskjeller. Data for akkumulering av 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  og 1000  $\mu\text{M}$  oljesyre ble derfor slått sammen og plottet mot tiden. Statistikken ble utført ved hjelp av linear blandet modell analyse (LMM) med Bonferroni korreksjon i SPSS. Det ble utført SPA forsøk på tre av donorene; donor KO19, donor WT17 og donor KO 4 med kun et forsøk fra hver donor ( $n = 1$ ).

Data i absoluttverdier (nmol/mg) på akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre viste at  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreakkumulering over 24 timer var signifikant forskjellige hos alle tre donorene, der *Plin2*-WT17-myotuber hadde høyest oljesyreakkumulering ( $p < 0,01$ ) (Figur 25).



**Figur 25:** Akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre etter kronisk eksponering av ulike oljesyre konsentrasjoner hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber i 24 timer. Figuren viser akkumuleringen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i absoluttverdi, nmol/mg (A) etter eksponering av forskjellige oljesyre konsentrasjoner; 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  og 1000  $\mu\text{M}$  oljesyre i 24 timer. Dataene for de forskjellige oljesyre konsentrasjoner ble slått sammen og presentert her som gjennomsnittsakumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i 24 timer for hver donor. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av linear blandet modell (LMM) analyse med Bonferroni korreksjon i programvaren SPSS,  $n = 1$  for hver donor. \* $p \leq 0,05$  mot alle donorer.

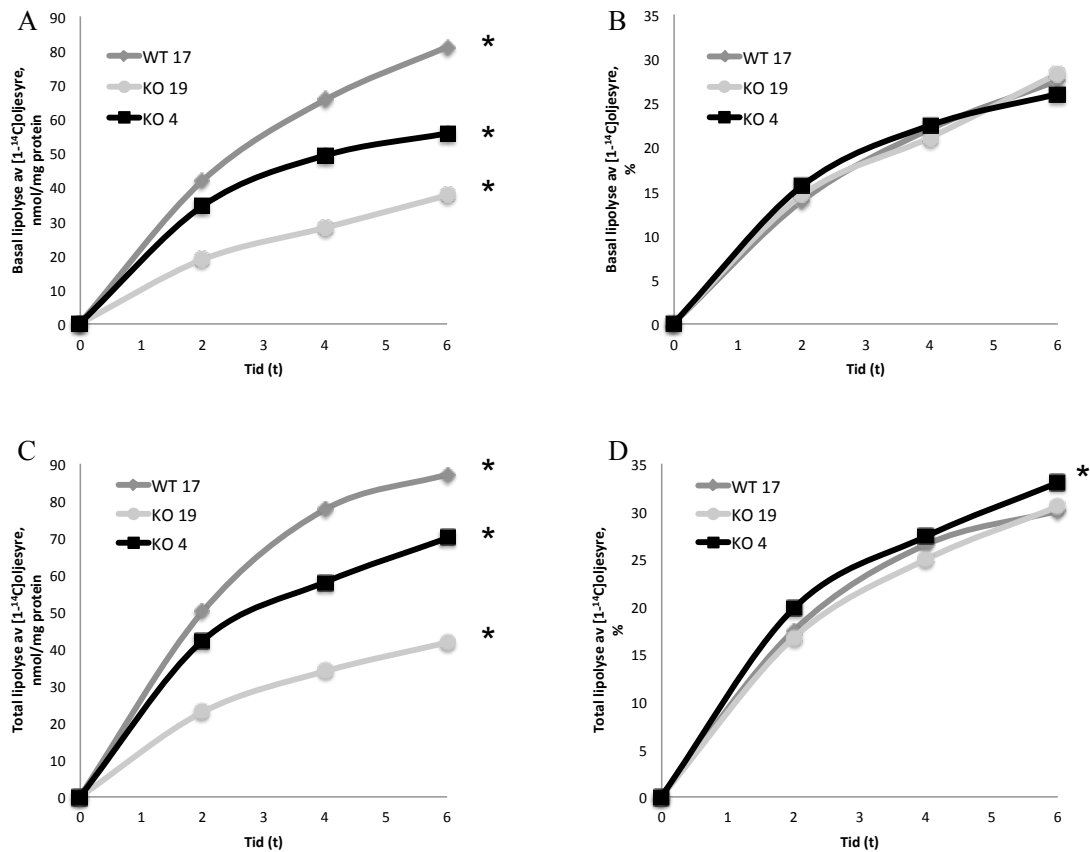


## 5.8 Effekter av ulike oljesyrekonsentrasjoner på basal- og total lipolyse av oljesyre

Det var også interessant å studere effekter av ulike oljesyrekonsentrasjoner på lipolyse etter  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreakkumulering i et døgn. Etter 24 timer med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreakkumulering ble radioaktiv oljesyre fjernet og erstattet med ”chasemedium”, et fettsyre fritt medium med 0,5% BSA  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  triacsin C (acyl-CoA syntetasehemmer). Frigjøringen av radioaktiv oljesyre i ”chasemediet” ble målt i MicroBeta ved 0, 2, 4 og 6 timer. Myotuber uten triacsin C representerer basal lipolysen, mens myotuber tilsatt triacsin C representerer total lipolysen.

Data for de ulike oljesyrekonsentrasjoner ved samme tidspunkt ble slått sammen, da det var ønskelig å undersøke donorforskjeller, i tillegg til at det var doseresponskurve for de ulike oljesyrekonsentrasjonene.

Alle tre donorer viste statistisk signifikante forskjeller i både basal lipolyse og total lipolyse ( $p < 0,01$ ) (Figur 26A og C), men når det ble beregnet basal- og total lipolyse i prosent (%) relatert til 1000  $\mu\text{M}$  oljesyre viste resultatene ingen forskjeller i basal lipolysen hos de tre donorene som ble benyttet i dette forsøket (Figur 26B). Dataene fra total lipolyse viste heller ingen signifikante forskjeller i prosentvis lipolyse mellom myotuber fra to av donorene; WT17 og KO19. Derimot var det en signifikant forskjell i total lipolysen mellom myotuber fra donor KO4 og de to andre donorene ( $p < 0,01$ ) (Figur 26D).

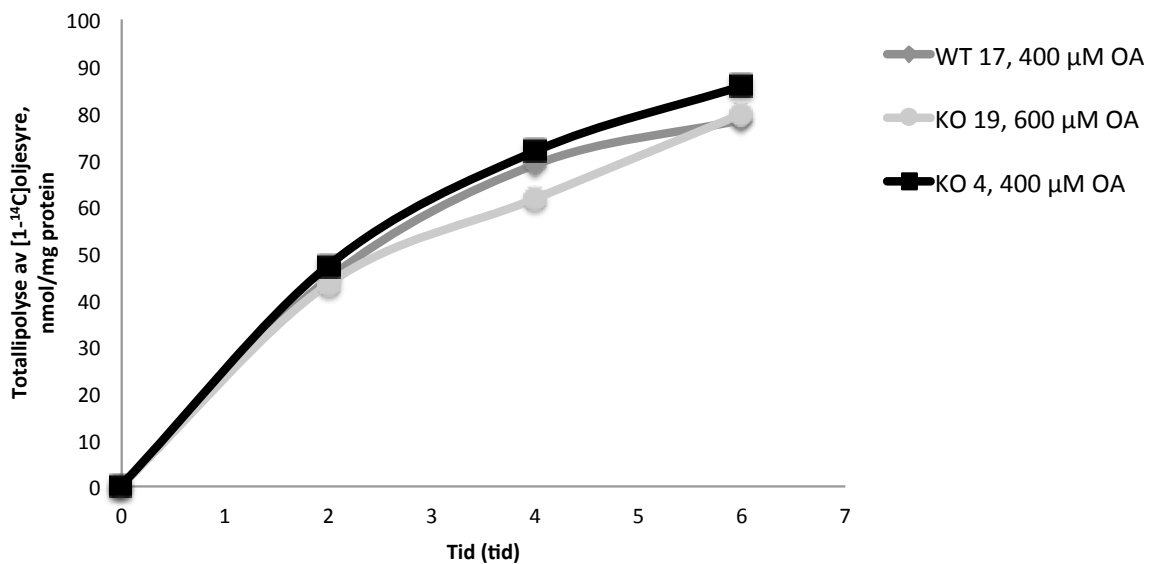


**Figur 26: Basal- og total lipolyse av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i løpet av 6 timer.** Figuren viser basal lipolyse av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i absolutt verdi, nmol/mg (A) og i prosent (%) relatert til tid 0 (B). Total lipolysen angitt i nmol/mg (C) og i prosent (%) relatert til tid 0 (D). Dataene for de forskjellige oljesyrekonentrasjoner ble slått sammen og presenteres her som gjennomsnittslipolyse av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre over 6 timer for hver donor. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av linear blandet modell (LMM) analyse med Bonferroni korreksjon i programvaren SPSS, n = 1 for hver donor. \*p ≤ 0,05 mot alle donorer.

For å undersøke ved hvilke oljesyrekonentrasjon som gir lik total lipolyse (nmol/mg) i myotuber hos de tre ulike donorene; *Plin2*-WT17, KO19 og KO4, ble det valgt ut verdier i nmol/mg med mest mulig lik mengde akkumulert oljesyre i myotubene (tid 0 for total lipolyse), og sammenlignet mot hverandre. Resultatet er fra n = 1 forsøk for hver donor.

Konstrasjoner som ble valgt ut var 400 μM oljesyre for *Plin2*-WT17, 600 μM oljesyre for *Plin2*-KO19 og 400 μM oljesyre for *Plin2*-KO4 med henholdsvis; 234 nmol/mg, 240 nmol/mg og 225 nmol/mg akkumulert oljesyre ved tid 0 av total lipolysen. Resultatene viste at det er nødvendig med opptil 600 μM oljesyre for myotuber fra *Plin2*-KO19 for at dette skal tilsvare total lipolysen for 400 μM oljesyre hos WT17-myotuber over et tidsintervall på 6 timer. Dette viser at det er nødvendig med høyere oljesyrekonstrasjoner hos *Plin2*-KO19-

myotuber for å oppnå en total lipolyse som samsvarer med total lipolyse for *Plin2*-WT17-myotuber. Inkubering av *Plin2*-KO4-myotuber i 400  $\mu$ M oljesyre i 6 timer resulterte i et tilsvarende total lipolyse-forløp som WT17-myotuber inkubert i 400  $\mu$ M oljesyre. Dette gjenspeile de inter-individuelle variasjonene mellom KO4 og KO19 (Figur 27). Foreløpig foreligger det for få data på dette området før noe kan konkluderes, men det kan være interessant med flere forsøk for å undersøke om *Plin2*-KO-myotuber generelt har et større behov for høyere oljesyrekonentrasjon enn *Plin2*-WT-myotuber for å utøve lik grad av lipolyse.

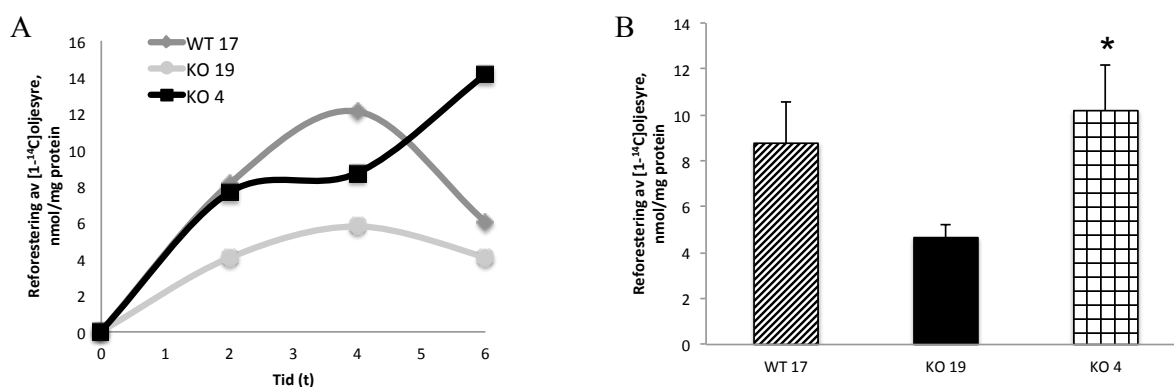


**Figur 27: Total lipolyse i nmol/mg for tre ulike donorer ved ulike oljesyrekonentrasjoner.** Total lipolyse i nmol/mg av *Plin2*-WT17-myotuber inkubert med 200  $\mu$ M oljesyre, *Plin2*-KO19-myotuber inkubert med 600  $\mu$ M oljesyre og *Plin2*-KO4 inkubert med 200  $\mu$ M oljesyre over 6 timer. Figuren representerer gjennomsnittet av 8 paralleller for hvert forsøk,  $n = 1$  for hver donor.

## 5.9 Reforestering av oljesyre

FFA som frigjøres i lipolysen kan igjen aktiveres til acyl-CoA og reforestres til nysyntese av TAG [29]. For å undersøke myotubenes evne til å reforestre FFA som ble frigjort under lipolysen ble basal lipolysen subtrahert fra total lipolysen (lipolyse med triacsin C) (total lipolyse – basal lipolyse).

Figur 28A viser grafer over reforestering av oljesyre over et tidsintervall på 6 timer, mens figur 28B viser gjennomsnittsdata for reforestering i 6 timer. Resultatene tyder på at myotuber fra donor *Plin2*-WT17 har tendens til høyere reforestering enn myotuber fra donor *Plin2*-KO19 ( $p = 0,069$ ) (Figur 28B). Myotuber fra donor *Plin2*-KO4 hadde til sammenligning større evne til reforestering av oljesyre enn myotuber fra *Plin2*-KO19 ( $p < 0,01$ ), men de utviste ikke forskjell i evnen til reforestering i forhold til myotuber fra donor *Plin2*-WT17 (Figur 28B). Resultater for donor *Plin2*-KO4 viste et spesielt forløp av reforestering av oljesyre (Figur 28A). Det er derfor vanskelig å si noe konkret om de foreløpige dataene før det foreligger flere data på reforestering av oljesyre hos *Plin2*-KO- og WT-myotuber.



**Figur 28: Reforestering av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre.** Figuren viser reforestering av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre mellom myotuber fra donor *Plin2*-WT17, *Plin2*-KO19 og *Plin2*-KO4 over 6 timer (A), og gjennomsnittet av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre reforestering i 6 timer hos *Plin2*-WT17, *Plin2*-KO19 og *Plin2*-KO4 (B). Dataene for de forskjellige oljesyrekonsentrasjoner fra lipolyse ble slått sammen, og reforestering av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre ble beregnet ved å trekke basal lipolysen fra total lipolysen (total lipolyse – basal lipolyse),  $n = 1$  for hver donor. Statistisk analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse, \* $p \leq 0,05$  mot KO19.

## 5.10 Effekt av forbehandling med ulike oljesyrekonsentrasjoner på opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose

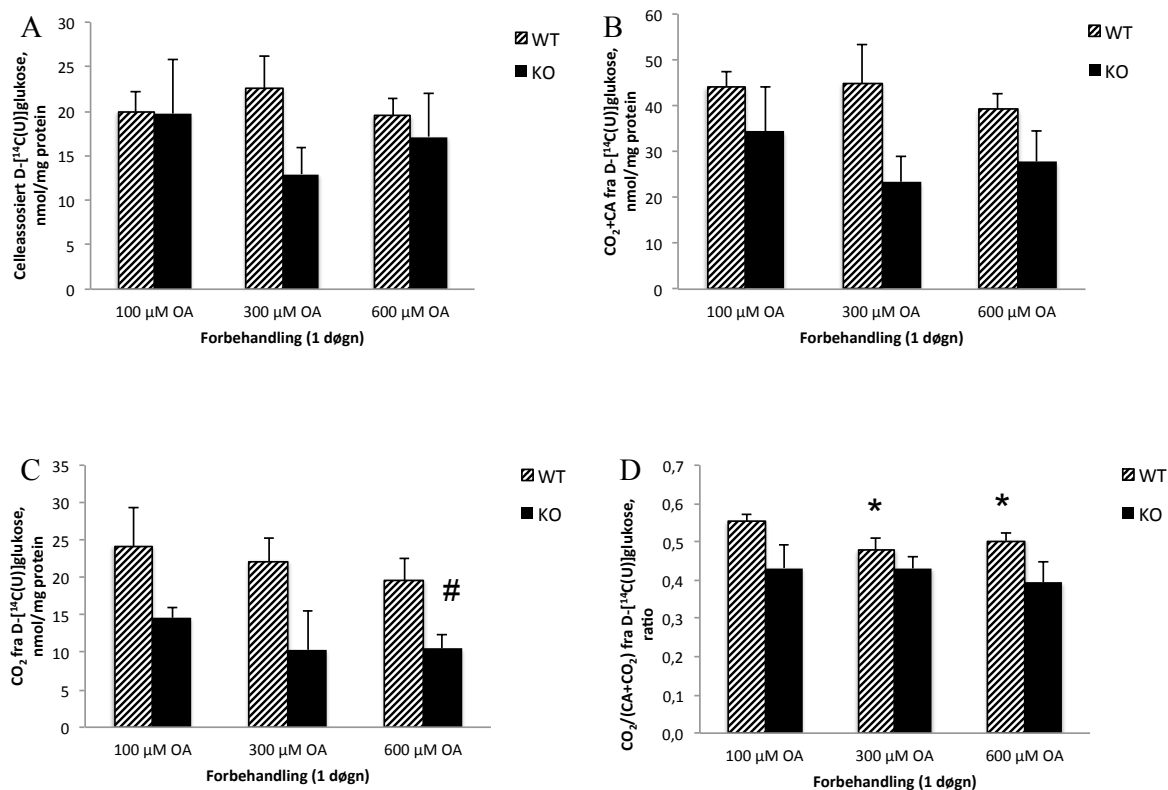
I tidligere funn av [1-<sup>14</sup>C]oljesyreopptak og [1-<sup>14</sup>C]oljesyreoksidasjon ble det vist at *Plin2*-WT-mytuber responderte på økende oljesyrekonsentrasjoner med redusert opptak og oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (avsnitt 5.3). Det var derfor ønskelig å undersøke om forbehandling med oljesyre også kunne påvirke [<sup>14</sup>C]glukoseopptak og oksidasjon hos *Plin2*-WT-mytuber og eventuell også hos *Plin2*-KO-mytuber.

Forsøket ble utført ved å forbehandle myotubene med 100 µM, 300 µM og 600 µM oljesyre i et døgn før forbehandlingsmediene ble byttet ut med et akuttmedium som inneholdt [<sup>14</sup>C]glukose (0,3 µCi/ml, 100 µM) (appendiks 9.5.2). Myotubene ble inkubert i akuttmediet i 4 timer og deretter analysert for radioaktiv CO<sub>2</sub> og CA. Glukoseforsøket ble utført på celler fra to donorer; *Plin2*-WT17 og *Plin2*-KO19 med henholdsvis n = 6 og n = 4 med 4 paralleller av hver forbehandling for hvert forsøk.

Akkumulering (CA) av [<sup>14</sup>C]glukose etter 4 timer viste ingen signifikante forskjeller etter forbehandling med 100 µM, 300 µM og 600 µM oljesyre både hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mytuber (Figur 29A). Resultater fra [<sup>14</sup>C]glukoseopptak (CO<sub>2</sub>+CA) viste heller ingen signifikante endringer av glukoseopptak ved økende oljesyrekonsentrasjoner hos *Plin2*-WT-mytuber, men kun tendenser til lavere [<sup>14</sup>C]glukoseopptak etter forbehandling med 600 µM oljesyre i forhold til 100 µM oljesyre (p = 0,09). Hos KO-mytuber var det ingen til endringer i [<sup>14</sup>C]glukoseopptak både etter forbehandling med 600 µM og 300 µM i forhold til 100 µM oljesyre (Figur 29B).

Det ble observert at forbehandling med 600 µM oljesyre gav en signifikant reduksjon av [<sup>14</sup>C]glukoseoksidasjon i forhold til 100 µM oljesyre hos *Plin2*-KO-mytuber (p = 0,01), men denne observasjonene ble ikke sett hos *Plin2*-WT-mytuber (Figur 29C).

Resultater av fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/(CA+CO<sub>2</sub>)) viste at forbehandling med 300 µM og 600 µM oljesyre gav en signifikant redusert fraksjonell oksidasjon sammenlignet med 100 µM oljesyreforbehandling i *Plin2*-WT-mytuber (p < 0,01). Denne observasjonen ble ikke sett i KO-mytuber (Figur 29D).



**Figur 29: Opptak, akkumulering, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose i *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber etter forbehandling med tre ulike oljesyrekonsentrasjoner.** Akkumulering (CA) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (A), opptak (CO<sub>2</sub>+CA) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (B), oksidasjon (CO<sub>2</sub>) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (C) og fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/(CA+CO<sub>2</sub>)) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (D) etter forbehandling med 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M og 600  $\mu$ M oljesyre i *Plin2*-WT- og KO-myotuber. Myotubene ble forbehandlet i et døgn (24 timer) med oljesyre, og deretter inkubert med D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (0,3  $\mu$ Ci/ml, 100  $\mu$ M) i 4 timer. Figurene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM, n = 4-6. Statistiske analyser ble beregnet med tosidig paret t-test, \*p  $\leq$  0,05 mot *Plin2*-WT 100  $\mu$ M oljesyres, #p  $\leq$  0,05 mot *Plin2*-KO 100  $\mu$ M oljesyre .

## 5.11 Effekt av forbehandling med GW501516 og GW7647 på opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose

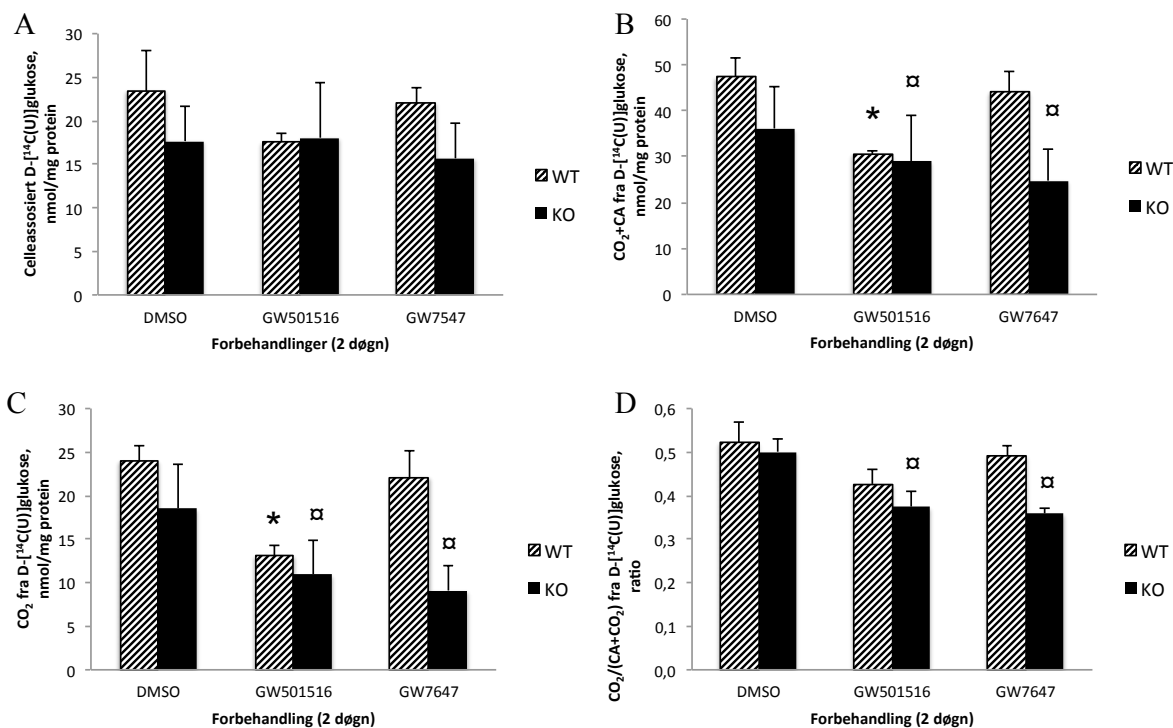
For å undersøke om PPAR $\alpha$  og PPAR $\delta$  er direkte involvert i glukosemetabolismen hos myotuber fra *Plin2*-KO- og WT-mus, ble cellene forbehandlet i to døgn med GW501516 (10 nM) og GW7647 (100 nM). 0,1% DMSO-behandlede myotuber var kontroll for myotuber behandlet med GW-substrater. Et døgn før forsøket ble cellene behandlet med 100  $\mu$ M oljesyre for å indukere *Plin2*. Deretter ble cellene inkubert i [<sup>14</sup>C]glukose i 4 timer. Forsøket ble utført på to donorer; *Plin2*-WT17 og *Plin2*-KO19 med henholdsvis n = 6 og n = 4 forsøk.

Resultatet av forbehandling med GW501516 og GW7647 viste ingen statistisk signifikant forskjell i akkumulering (CA) av [<sup>14</sup>C]glukose etter 4 timers inkubering hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber sammenlignet med 0,1% DMSO (kontroll). Forbehandling med GW7647 viste heller ingen forskjell i akkumulering av glukose (Figur 30A).

Opptaket (CO<sub>2</sub>+CA) av [<sup>14</sup>C]glukose hos *Plin2*-WT-myotuber var signifikant redusert etter forbehandling med GW501516 sammenlignet mot 0,1% DMSO (p = 0,01). GW7647 hadde derimot ingen effekt på glukoseopptaket i WT-myotuber (Figur 30B). Resultater for glukoseopptak hos *Plin2*-KO-myotuber viste signifikante reduksjoner både etter forbehandling med GW501516 og GW7647 sammenlignet mot 0,1% DMSO (p = 0,01; p = 0,04) (Figur 30B).

[<sup>14</sup>C]glukoseoksidasjonen (CO<sub>2</sub>) var signifikant redusert etter forbehandling med GW501516 sammenlignet mot 0,1% DMSO (p < 0,01) hos *Plin2*-WT-myotuber. GW7647 hadde ingen effekt på glukoseoksidasjonen i *Plin2*-WT-myotuber, men i *Plin2*-KO-myotuber derimot medførte forbehandling med GW7647 til en signifikant reduksjon av glukoseoksidasjon (p = 0,04). Forbehandling med GW501516 medførte også en tydelig reduksjon av glukoseoksidasjon (p < 0,01) (Figur 30C).

Fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/(CO<sub>2</sub>+CA)) av [<sup>14</sup>C]glukose var redusert både hos GW501516 og GW7647-forbehandlede *Plin2*-KO-myotuber sammenlignet med 0,1% DMSO-behandlede celler (p = 0,02; p = 0,02). Hos *Plin2*-WT-myotuber forbehandlet med GW501516 var det en tendens til redusert fraksjonell glukoseoksidasjon (p = 0,063) (Figur 30D).



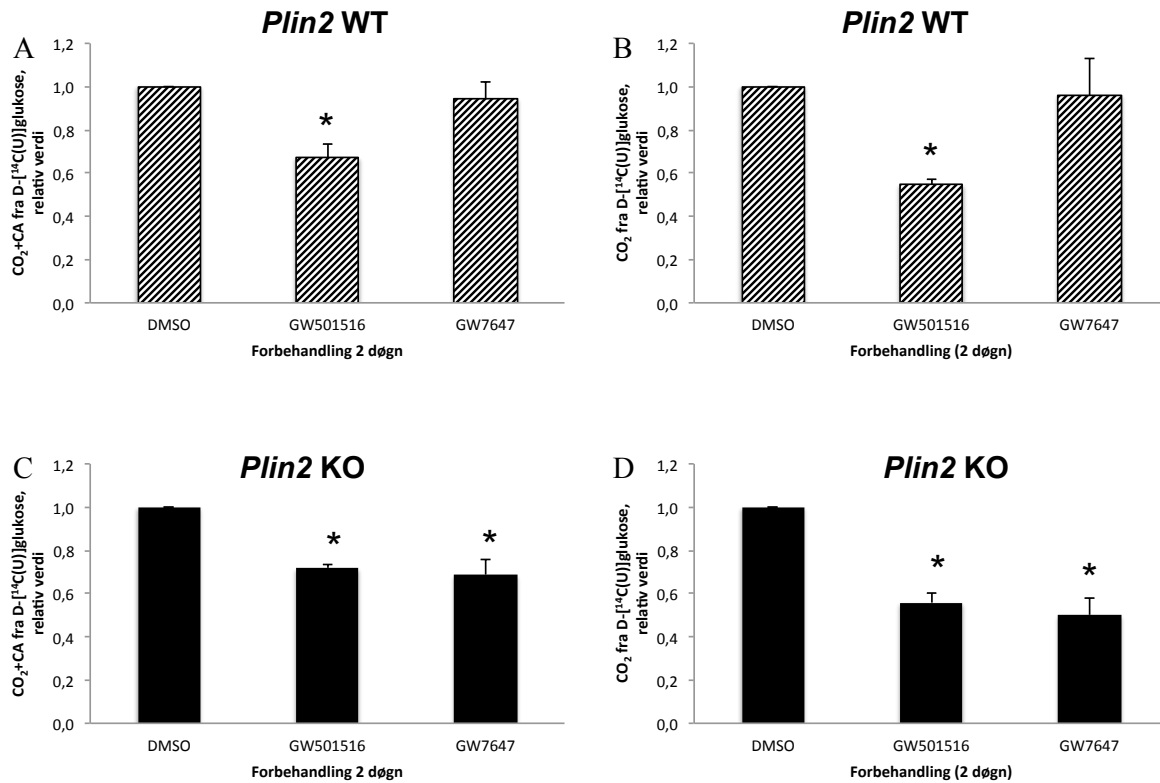
**Figur 30: Opptak, akkumulering, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose i *Plin2*-WT- og KO-myotuber etter forbehandling med GW501516, GW7647 og 0,1% DMSO.** Akkumulering (CA) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (A), opptak (CO<sub>2</sub>+CA) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (B), oksidasjon (CO<sub>2</sub>) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (C) og fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/(CA+CO<sub>2</sub>)) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (D) etter forbehandling med GW501516, GW7647 og 0,1% DMSO i *Plin2*-WT- og KO-myotuber. Myotubene ble forbehandlet i et døgn (24 timer) med oljesyre, og deretter inkubert med D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (0,3 μCi/ml, 100 μM) i 4 timer. Figurene er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 4-6. Statistiske analyser ble beregnet ved hjelp av tosidig paret t-test, \*p ≤ 0,05 mot *Plin2*-WT kontroll (0,1% DMSO), αp ≤ 0,05 mot *Plin2*-KO kontroll (0,1% DMSO).

Ved å fremstille dataene som relative verdier (relatert til 0,1% DMSO) kan man lettere observere at *Plin2*-WT-myotuber responderte mer på GW501516 fremfor GW7647 både for glukoseopptak (Figur 31A) og glukoseoksidasjon (Figur 31B). Etter forbehandling med GW501516 hos *Plin2*-WT-myotuber medførte det til ca. 32% reduksjon i glukoseopptak, mens GW7647 gav ingen effekt. Data fra glukoseoksidasjon hos *Plin2*-WT-myotuber viste hele 47% redusert glukoseoksidasjon etter forbehandling med GW501516, mens forbehandling med GW7647 gav ingen effekt (Figur 31).

Forbehandling med GW-substratene resulterte i ca. 32-36% reduksjon i glukoseopptak hos *Plin2*-KO-myotuber, der begge GW-substratene medførte signifikant lavere opptak i forhold til kontroll (Figur 31C). Det ble også observert redusert glukoseoksidasjon hos *Plin2*-KO-



myotuber, der GW501516 og GW7647 medførte til henholdsvis 44% og 50% reduksjon i glukoseoksidasjonen (Figur 31D).



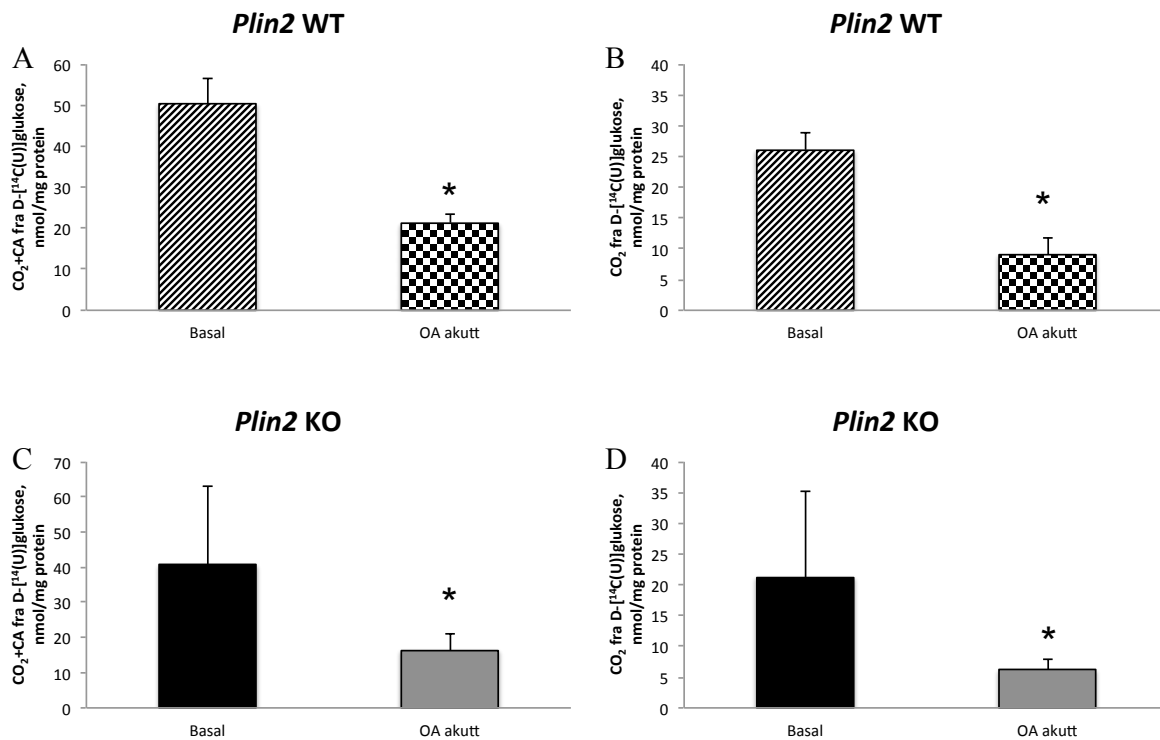
**Figur 31: Relativ opptak og oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose i *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber.** D-[<sup>14</sup>C(U)]glukoseopptak (CO<sub>2</sub>+CA) i *Plin2*-WT-myotuber (A), D-[<sup>14</sup>C(U)]glukoseoksidasjon (CO<sub>2</sub>) i *Plin2*-WT-myotuber (B), D-[<sup>14</sup>C(U)]glukoseopptak (CO<sub>2</sub>+CA) i *Plin2*-KO-myotuber (C) og D-[<sup>14</sup>C(U)]glukoseoksidasjon (CO<sub>2</sub>) i *Plin2*-KO-myotuber (D) i relative verdier. Figurene er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 4-6, \*p ≤ 0,05 mot kontroll (0,1% DMSO).

## 5.12 Effekt av akutt oljesyre på glukoseopptak og oksidasjon

Ifølge ”Randle syklus” kan FFA konkurrerer med glukose om opptak og oksidasjon i cellene (avsnitt 1.8). For å studere om den metabolske fleksibiliteten *in vitro* er forandret som følge av fjernet *Plin2* ble det tilsatt 100 μM og 600 μM oljesyre akutt til myotubene, og deretter ble cellene inkubert i [<sup>14</sup>C]glukose i 4 timer.

Data for glukoseopptak og oksidasjon med 100  $\mu\text{M}$  og 600  $\mu\text{M}$  akutt oljesyre ble slått sammen og sammenlignet mot gjennomsnittet for basalopptak og oksidasjon av [ $^{14}\text{C}$ ]glukose. Det ble utført fire forsøk for *Plin2*-WT- og tre forsøk for *Plin2*-KO-mytotuber.

Resultatet for glukoseopptak ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) etter 4 timer viste statistisk signifikant reduksjon av [ $^{14}\text{C}$ ]glukoseopptak hos *Plin2*-WT-mytotuber etter akutt tilsetning av oljesyre ( $p < 0,05$ ) (Figur 32A). En signifikant reduksjon av [ $^{14}\text{C}$ ]glukoseopptak ble også observert hos *Plin2*-KO-mytotuber ( $p < 0,05$ ) (Figur 32C). [ $^{14}\text{C}$ ]glukoseoksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) viste også en signifikant reduksjon etter akutt tilsetning av oljesyre både hos *Plin2*-WT-mytotuber ( $p < 0,05$ ) (Figur 32B) og *Plin2*-KO-mytotuber ( $p < 0,05$ ) (Figur 32D).



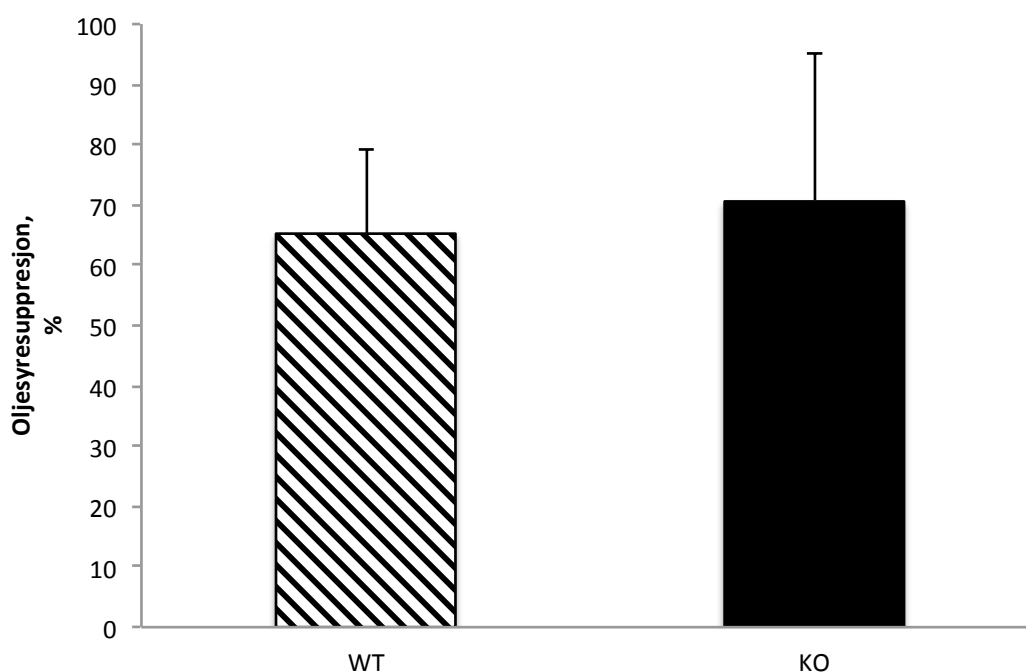
**Figur 32: Opptak og oksidasjon av D-[ $^{14}\text{C}$ ]glukose hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mytotuber  $\pm$  oljesyre akutt.** Opptak ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) av D-[ $^{14}\text{C}$ ]glukose hos *Plin2*-WT-mytotuber (A), oksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) av D-[ $^{14}\text{C}$ ]glukose hos *Plin2*-WT-mytotuber (B), opptak av D-[ $^{14}\text{C}$ ]glukose ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) hos *Plin2*-KO-mytotuber (C) og oksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) av D-[ $^{14}\text{C}$ ]glukose hos *Plin2*-KO-mytotuber (D). Myotubene ble forbehandlet i to døgn med 0,1% DMSO, 10 nM GW501516, 100 nM GW7647 og et døgn med 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  og 600  $\mu\text{M}$  oljesyre. Deretter ble det tilsatt akutt 100  $\mu\text{M}$  og 600  $\mu\text{M}$  oljesyre til halvparten av brønnene før cellene ble inkubert i D-[ $^{14}\text{C}$ ]glukose  $\pm$  1  $\mu\text{M}$  FCCP akutt i 4 timer. Figurene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 3-4$ . Data for de to oljesyrekonsentrasjonene (100  $\mu\text{M}$  og 600  $\mu\text{M}$ ) er slått sammen. Statistiske analyser ble beregnet ved hjelp av SPSS med blandet linear modell analyse (LMM), \* $p \leq 0,05$  mot basal.

## 5.13 Suppresjon av oljesyre på glukoseoksidasjon

For å undersøke om det foreligger noen forskjeller i oljesyresuppresjon på glukoseoksidasjon mellom *Plin2*-WT- og KO, ble suppresjon beregnet. Suppresjon er et mål for å bestemme *in vitro* metabolsk fleksibilitet av myotubene (avsnitt 1.8). Gjennomsnittet for glukoseoksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) i absoluttverdier (nmol/mg) ble benyttet til beregning av suppresjon. Følgende formel ble benyttet for å beregne prosent suppresjon (%):

$$\left(1 - \frac{(\text{CO}_2 \text{ med akutt oljesyre})}{(\text{CO}_2 \text{ uten akutt oljesyre})}\right) * 100$$

Resultatet av oljesyresuppresjon på  $^{14}\text{C}$ glukose hos *Plin2*-WT-myotuber viste 65% oljesyresuppresjon på glukoseoksidasjonen. Det ble også funnet en tilsvarende oljesyresuppresjon av  $^{14}\text{C}$ glukoseoksidasjon hos *Plin2*-KO-myotuber med 70% suppresjon (Figur 33).

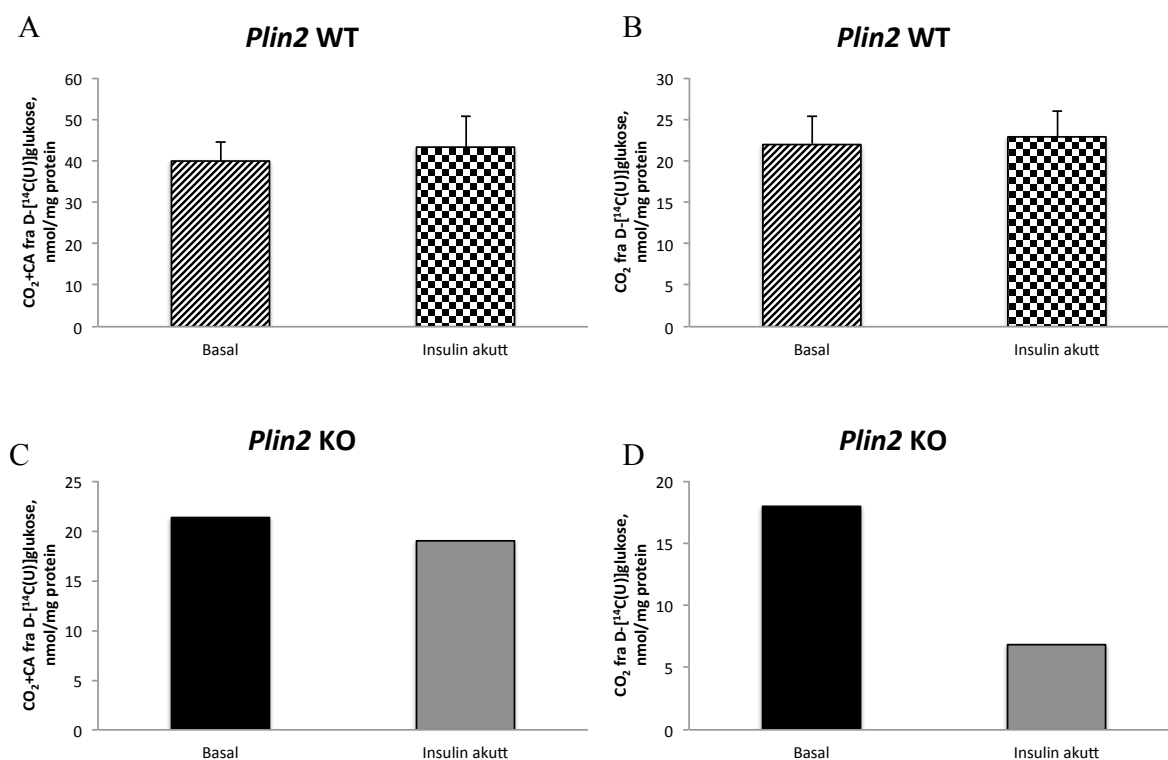


**Figur 33: Oljesyresuppresjon på D- $^{14}\text{C}$ (U)glukoseoksidasjon.** Figuren viser suppresjonsevnen av 100  $\mu\text{M}$  og 600  $\mu\text{M}$  oljesyre på D- $^{14}\text{C}$ (U)glukoseoksidasjon i prosent (%) mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber i 4 timer. Oljesyresuppresjonen ble beregnet med utgangspunkt i n = 3-4 forsøk.

## 5.14 Effekt av akutt insulin på glukoseopptak og oksidasjon

Insulin er i stand til å stimulere til økt glukoseopptak i skjelettmuskel ved å indusere til økt GLUT4 translokasjon til cellemembranen [16]. For å undersøke hvordan insulin vil påvirke opptaket og oksidasjonen av glukose hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber ble 100 nM insulin tilsatt akutt til cellene. Cellene ble deretter inkubert i [<sup>14</sup>C]glukose (0,3 µCi/ml, 100 µM) i 4 timer. Det ble utført to forsøk for basal og akutt insulindata fra *Plin2*-WT-myotuber, mens det kun ble utført et forsøk for basal og akutt insulindata fra *Plin2*-KO. Basaldata fra [<sup>14</sup>C]glukoseoksidasjon og opptak ble sammenlignet mot akutt insulindata (Figur 34).

Resultatene viste ingen forskjell i opptak (Figur 34A) og oksidasjon (Figur 34B) av [<sup>14</sup>C]glukose ved akutt tilsetning av insulin i WT-myotuber. Flere data på glukoseopptak- og oksidasjon ± insulin både for *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber er nødvendig før det kan foretas endelig konklusjon.



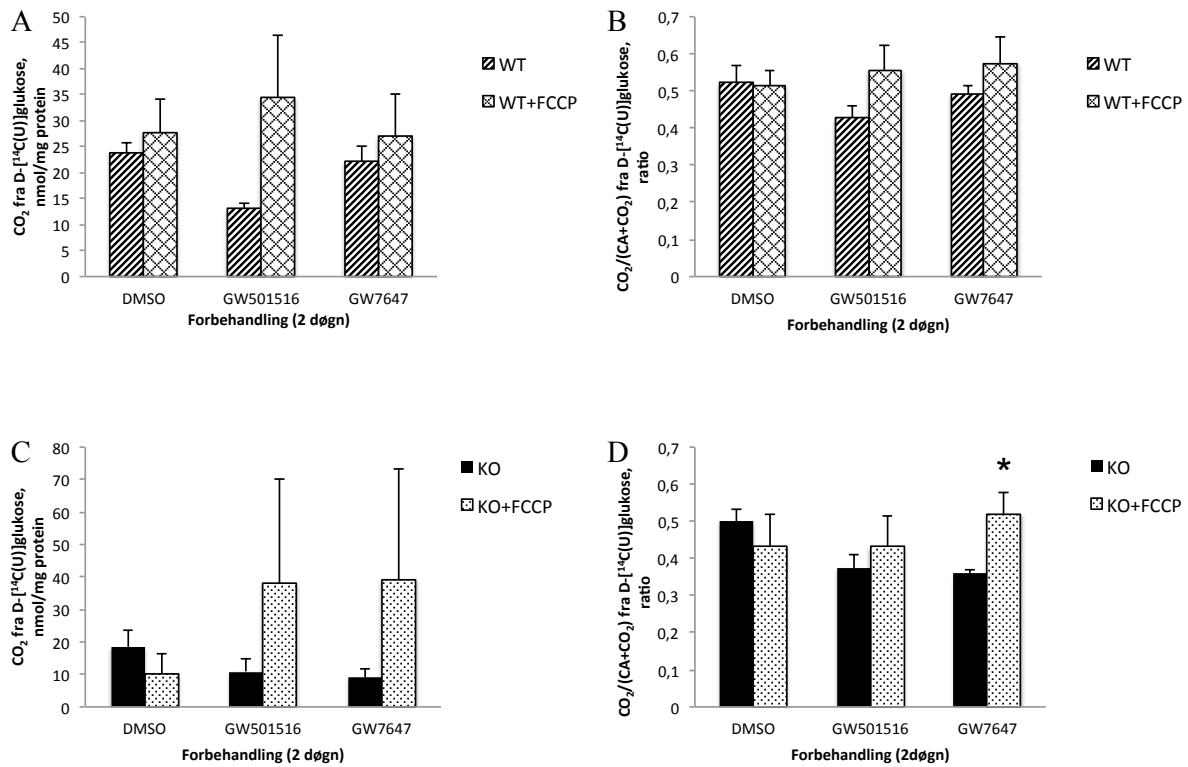
Figur 34: Opptak og oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose i *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber ± 100 nM insulin akutt. Opptak (CO<sub>2</sub>+CA) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose hos *Plin2*-WT-myotuber (A), oksidasjon (CO<sub>2</sub>) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose hos *Plin2*-

WT-myotuber (**B**), opptak av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (CO<sub>2</sub>+CA) hos *Plin2*-KO-myotuber (**C**) og oksidasjon (CO<sub>2</sub>) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose hos *Plin2*-KO-myotuber (**D**). Myotubene ble forbehandlet i to døgn med 0,1% DMSO, 10 nM GW501516, 100 nM GW7647 og et døgn med 100 μM, 300 μM og 600 μM oljesyre. Deretter ble halvparten av brønnene tilsatt 100 nM insulin før cellene ble inkubert i D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose ± 1 μM FCCP akutt i 4 timer. Figurene er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 1-2. Statistiske analyser ble beregnet ved hjelp av SPSS med blandet modell analyse (LMM).

## 5.15 Effekt av FCCP på glukoseoksidasjon

Det var ønskelig å studere den totale oksidative kapasiteten av [<sup>14</sup>C]glukose hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber, og om det forelå noen endringer som følge av utslått *Plin2*-gen. For å undersøke dette ble *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber inkubert med [<sup>14</sup>C]glukose ± 1 μM FCCP (mitokondriell avkobler) i 4 timer.

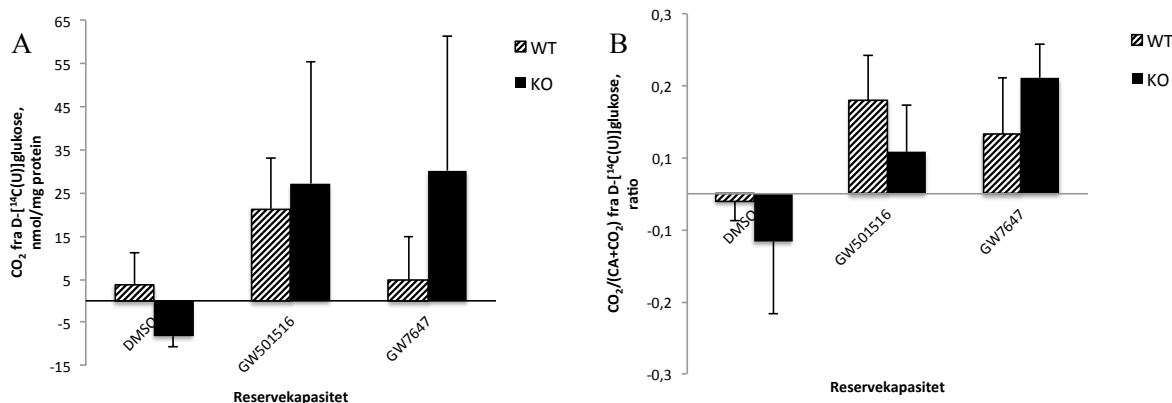
Det ble utført fire forsøk for *Plin2*-KO-myotuber og seks forsøk for *Plin2*-WT-myotuber, og statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig paret t-test. FCCP tilsatt myotuber gav store variasjoner i dataene, og statistiske beregninger tyder ikke på noen signifikante forskjeller i [<sup>14</sup>C]glukoseoksidasjon (CO<sub>2</sub>) (Figur 35A) eller fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/(CO<sub>2</sub>+CA)) hos WT-myotuber (Figur 35B). Det samme ble observert for [<sup>14</sup>C]glukoseoksidasjon hos KO-myotuber. Dataene viste heller ingen signifikant økning av oksidasjon etter tilsetning av FCCP (Figur 35C). Etter forbehandling med GW7647 ble det derimot observert en signifikant økt fraksjonell oksidasjon hos KO-myotuber (p = 0,04) (Figur 35D).



**Figur 35: Oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose ± 1 μM FCCP akutt.** Figuren viser D-[<sup>14</sup>C(U)]glukoseoksidasjon i *Plin2*-WT-mytotuber (A), fraksjonell oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose i *Plin2*-WT-mytotuber (B), oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose i *Plin2*-KO-mytotuber (C) og fraksjonell oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose i *Plin2*-KO-mytotuber (D) etter to døgns forbehandling med 0,1% DMSO, 10 nM GW7647 og 100 nM GW7647, etterfulgt av 4 timers inkubering med D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose ± 1 μM FCCP. Figurene er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 4-6. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig paret t-test, \*p ≤ 0,05 mot basal.

For å undersøke om det foreligger forskjeller i den maksimale oksidative kapasiteten av [<sup>14</sup>C]glukose mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mytotuber ble reservekapasiteten beregnet. Reservekapasiteten beskriver hvor mye cellene er i stand til å øke oksidasjonen utover den basale oksidasjonen. Reservekapasiteten ble beregnet ved å subtrahere data tilsatt FCCP fra data uten FCCP (FCCP – basal).

Resultatene viste ingen signifikante forskjeller i reservekapasiteten av oksidasjon av [<sup>14</sup>C]glukose mellom *Plin2*-KO- og WT-mytotuber etter forbehandling med 0,1% DMSO (p = 0,2), GW501516 (p = 0,8) og GW7647 (p = 0,4) (Figur 36A). Fraksjonell oksidasjon av [<sup>14</sup>C]glukose mellom *Plin2*-WT- og KO-mytotuber var heller ikke signifikant etter forbehandling med 0,1% DMSO, GW501516 og GW7647 (Figur 36B).

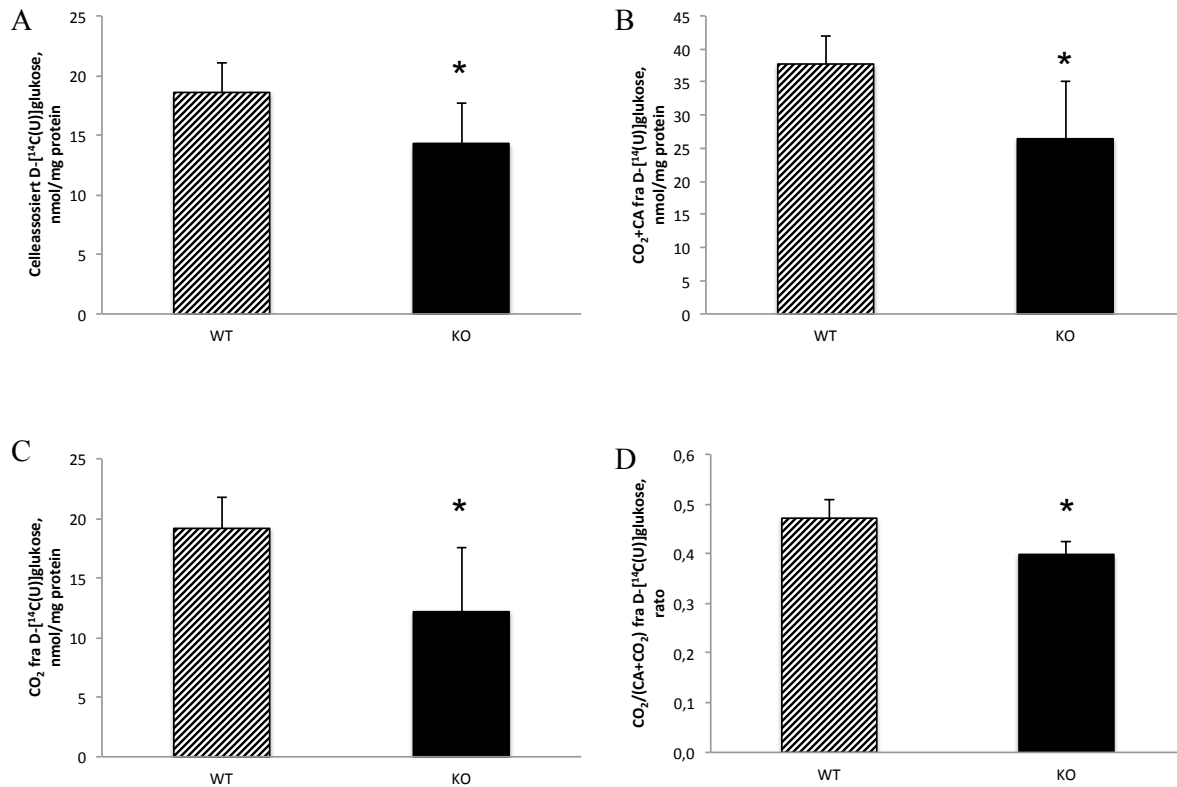


**Figur 36: Reservekapasiteten av myotuber fra *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mus.** Reservekapasiteten av D-<sup>14</sup>C(U)]glukoseoksidasjon (A) og fraksjonell D-<sup>14</sup>C(U)]glukoseoksidasjon (B) ble beregnet som differansen mellom oljesyreoksidasjon med FCCP (+FCCP) og uten FCCP (basal). Dataene er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 4-6. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test.

## 5.16 Forskjell i opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose mellom *Plin2*-villytype- og *Plin2* knockout-myotuber

Det er ønskelig å utrede i hvilken grad fjerning av *Plin2* påvirker akkumulering, opptak og oksidasjon av [<sup>14</sup>C]glukose hos myotuber fra mus. Dette ble utført ved å først forbehandle myotubene med ulike konsentrasjoner av oljesyre og GW-substrater inkludert 0,1% DMSO. Data for alle forbehandlingene av *Plin2*-WT- og KO-myotuber ble slått sammen og sammenlignet mot hverandre for å avdekke eventuelle forskjeller i glukoseopptak og oksidasjon. Det ble slått sammen tolv forsøk fra donor WT17 og åtte forsøk fra donor KO19.

Statistisk dataanalyse ved hjelp av linear blandet modell analyse (LMM) viste signifikant lavere [<sup>14</sup>C]glukoseakkumulering hos KO-myotuber sammenlignet med WT-myotuber (p = 0,02) (Figur 37A). Opptaket av [<sup>14</sup>C]glukose hos KO-myotuber var også lavere i forhold til WT-myotuber (p < 0,01) (Figur 37B). I tillegg ble det funnet en signifikant lavere oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av [<sup>14</sup>C]glukose i KO-myotuber sammenlignet med WT-myotuber (p < 0,01) (Figur 37C og D).



**Figur 37: Forskjell i glukosemetabolismen mellom myotuber fra *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-mus.** Figuren viser akkumulering (CA) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (A), totalopptak (CO<sub>2</sub>+CA) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (B), oksidasjon (CO<sub>2</sub>) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (C) og fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/(CO<sub>2</sub>+CA)) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (D) mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber etter 4 timers inkubering med D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (0,3 μCi/ml, 100 μM). Figurene presenteres som gjennomsnitt ± SEM av alle behandlinger, n = 8-12. Statistisk analyse ble utført med linear mixed model (LMM) analyse fra SPSS, \*p ≤ 0,05 mot WT.

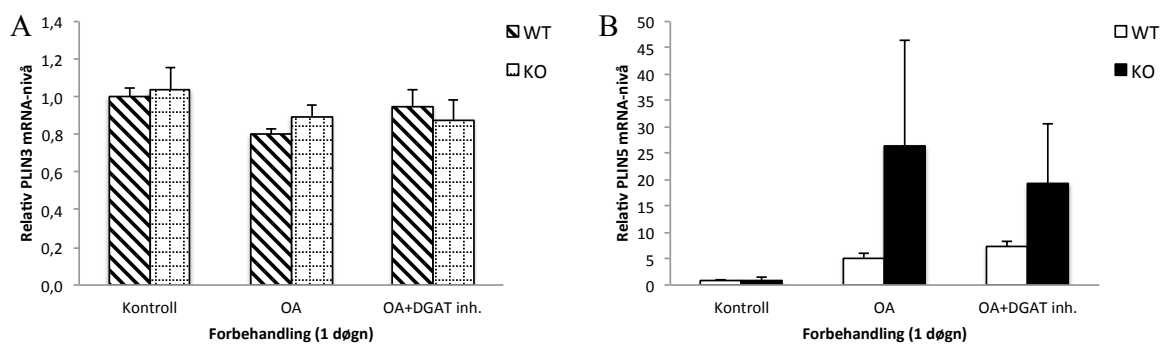
## 5.17 Genuttrykk med real-time qPCR

Det var ønskelig å studere om fravær av *Plin2* påvirker uttrykket av andre perilipiner som perilipin-3 og perilipin-5. For å gjennomføre forsøk med qPCR, ble myotubene differensiert i tre dager i et BD Matrigel™-behandlet cellebrett med 12 brønner før det ble tilsatt oljesyre (100 μM) til brønnene for å studere effekten av oljesyre på genuttrykk av *Plin3* og *Plin5*. DGAT-1-hemmer (0,5 μM) sammen med oljesyre (100 μM) ble tilsatt myotubene for å undersøke om hemming av DGAT-1 (TAG-syntese-hemming) kunne føre til endret uttrykk av *Plin3* og *Plin5*. Det ble kun utført et forsøk for *Plin3*- og to forsøk for *Plin5*-mRNA-uttrykk med fire paralleller for hver behandling.



*Plin3*-mRNA-uttrykket så ikke til å være forskjellig mellom *Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-myotuber for de ulike forbehandlingene (Figur 38A), men siden det kun ble utført et forsøk på *Plin3*-mRNA-uttrykk er statistiske beregninger ikke mulig.

Et interessant funn ble observert da *Plin5*-mRNA-uttrykk ble undersøkt hos KO- og WT-myotuber. *Plin5*-mRNA-uttrykk var oppregulert opptil 29 ganger i KO-myotuber etter 100  $\mu$ M oljesyrebehandling i forhold til kontroll. Behandling med DGAT-I-hemmer i KO-myotuber var opptil 21 ganger høyere sammenlignet med kontroll. I WT-myotuber førte behandling med oljesyre og DGAT-1-hemmer til henholdsvis 5 og 7 ganger høyere *Plin5*-mRNA-uttrykk i forhold til kontroll (Figur 38B). Dessverre var det for store spredninger og for få forsøk for å kunne si noe mer konkret om disse dataene.



**Figur 38: *Plin3*- og *Plin5*-mRNA-uttrykk.** Myotubene ble først forbehandlet med 100  $\mu$ M oljesyre og 0,5  $\mu$ M DGAT-1-hemmer i et døgn før cellene ble lysert og fraktet på is til RNA isolering, cDNA-syntese og kvantifisering av *Plin3*-mRNA i *Plin2*-WT og *Plin2*-KO-myotuber (A) og *Plin5*-mRNA hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber (B). Figurene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM, n = 1-2.

## 6 Diskusjon

Funksjonen til perilipin-2 proteiner i skjelettmuskelen er i dag fortsatt ukjent. Det har blant annet blitt foreslått at perilipin-2 i skjelettmuskel i likhet med perilipin-1 i fettvev beskytter mot TAG-hydrolyse forårsaket av lipaser [54]. I tillegg til å beskytte mot TAG-hydrolyse er perilipin-2 også foreslått å være involvert i TAG inkorporering i lipiddråper, lipiddråpestabilitet og transport av fettsyrer fra lipiddråper til mitokondrier [54, 61]. At perilipin-2 er involvert i lipiddråpemetabolismen er bredt akseptert, men det gjenstår fortsatt å avdekke konkret hvilken del av lipiddråpemetabolismen som reguleres av perilipin-2. Hvorvidt perilipin-2-uttrykk er korrelert med økt insulinsensitivitet er også et omdiskutert tema [58, 61, 62, 64]. For å besvare noen av de mange spørsmålene omkring perilipin-2s funksjon i skjelettmuskel er det derfor nødvendig med flere metabolske studier rundt dette proteinet. Det ble benyttet muskelceller fra en *Plin2*-KO-musemodell opprettet ved hjelp av *Cre/LoxP*-systemet for å studere ulike aspekter ved energimetabolismen *in vitro*.

### 6.1 Kort oppsummering av hovedfunnene

Hovedfunnene fra denne studien var observasjonene av et lavere oljesyreopptak og oksidasjon hos *Plin2*-KO-myotuber i forhold til *Plin2*-WT-myotuber (Figur 24B og C). Oljesyreakkumulering og fraksjonell oksidasjon fra substratoksidasjonsforsøk av oljesyre var derimot ikke funnet å være forskjellig mellom *Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-myotuber (Figur 24A). Resultatene fra oljesyreakkumulering med SPA viste derimot en signifikant høyere oljesyreakkumulering hos *Plin2*-WT17 sammenlignet med *Plin2*-KO19 og KO4 (Figur 25). Fra resultatene ble det også funnet at glukoseopptaket, akkumulering, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av glukose var signifikant lavere hos *Plin2*-KO-myotuber sammenlignet med *Plin2*-WT-myotuber (Figur 37). Dette tyder på at perilipin-2 også spiller en viktig rolle i reguleringen av glukosemetabolismen i skjelettmuskel.

Det ble oppdaget en signifikant lavere akkumulering av radioaktiv oljesyre etter forbehandling med 600  $\mu$ M oljesyre, og en signifikant lavere oljesyreopptak etter forbehandling med 600  $\mu$ M oljesyre i *Plin2*-WT-myotuber. Oksidasjonen av oljesyre etter forbehandling med 300  $\mu$ M og 600  $\mu$ M oljesyre var også signifikant redusert i *Plin2*-WT-myotuber. I *Plin2*-KO-myotuber ble det kun observert en tendens til redusert oljesyreakkumulering etter 300  $\mu$ M oljesyrebehandling i KO-myotuber (Figur 20A). I tillegg

ble det observert en tendens til lavere fraksjonell oksidasjon av oljesyre i WT-mytuber etter forbehandling med 600  $\mu$ M oljesyre (Figur 20A). Samtidig ble det observert signifikant lavere fraksjonell oksidasjon av glukose etter behandling med økende oljesyrekonentrasjoner, og tendens til lavere glukoseopptak ved den høyeste oljesyrekonentrasjonen (600  $\mu$ M) hos *Plin2*-WT-mytuber (Figur 29B og D). Hos KO-mytuber ble denne negative korrelasjonen ikke observert mellom oljesyrekonentrasjon og glukoseakkumulering, opptak og fraksjonell oksidasjon. Forbehandling med 600  $\mu$ M oljesyre medførte derimot til signifikant lavere glukoseoksidasjon hos KO-celler (Figur 29). Med andre ord, ulike oljesyrekonentrasjoner ser ut til å ha større påvirkning både i fettsyre- og glukosemetabolismen hos *Plin2*-WT-mytuber fremfor *Plin2*-KO-mytuber.

Akutt tilsatt oljesyre gav en signifikant suppresjon av glukoseoksidasjonen hos begge donortypene, men suppresjonsgraden var lik for begge gruppene (Figur 33). Myotuber benyttet i denne oppgaven responderte godt på den mitokondrielle avkobleren, FCCP. De cellene som fikk akutt FCCP responderte med en signifikant økning av oljesyre-, og glukoseoksidasjon (Figur 22) og (Figur 35). Reservekapasiteten for glukose- og oljeoksidasjon var like for begge gruppene (Figur 23) og (Figur 36)

Oljesyreoksidasjon hos *Plin2*-WT-mytuber var signifikant økt etter forbehandling med GW501516 (PPAR $\delta$ -agonist). GW7647 (PPAR $\alpha$ -agonist) gav derimot ingen signifikante endringer av oljesyreoksidasjon sammenlignet med kontroll. I tillegg ble det observert en tendens til høyere fraksjonell oksidasjon av oljesyre etter behandling med GW501516 hos WT-mytuber. Ingen signifikante forskjeller i oljesyremetabolismen ble registrert etter behandling med GW501516 eller GW7647 hos *Plin2*-KO-mytuber (Figur 21). Glukoseopptaket, oksidasjon og den fraksjonelle oksidasjonen hos *Plin2*-WT-mytuber var signifikant redusert etter forbehandling med GW501516. Hos *Plin2*-KO-mytuber var glukoseopptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon signifikant redusert etter forbehandling med GW501516 og GW7647 (Figur 30).

Det ble ikke observert noen signifikante forskjeller i prosentvis basal lipolyse mellom de tre donorene; *Plin2*-WT17, KO19 og KO4. Total lipolyse over 6 timer for KO4 lå høyere sammenlignet med de to andre donorene; KO19 og WT17 (Figur 26). Samtidig viste resultatene at det var nødvendig med opptil 600  $\mu$ M oljesyre i KO19 -myotuber for å tilsvare samme total lipolyse for WT17-mytuber behandlet med 400  $\mu$ M oljesyre (Figur 27).

Reforestring av oljesyre hos KO4 var signifikant høyere sammenlignet med reforestring i KO19-myotuber, mens det ble observert tendenser til høyere reforestring i myotuber fra WT17-myotuber i forhold til KO19-myotuber (Figur 28).

Et forsøk på kvantifisering av *Plin3*-mRNA så ikke ut til å vise noen forskjeller mellom *Plin2*-WT- og KO-myotuber, verken etter oljesyrebehandling eller behandling med DGAT-1-hemmer (Figur 38A). *Plin5*-mRNA-uttrykk så ut til å oppreguleres etter behandling med oljesyre og DGAT-1-hemmer, men det ble utført for få forsøk, i tillegg til at det var for stor spredning i dataene for å si noe konkret.

## 6.2 Effekt av *Plin2* på energimetabolismen

Resultatet fra *in vitro* forsøk med *Plin2*-KO-myotuber i denne oppgaven viste lavere oljesyreopptak og oksidasjon ved fravær av *Plin2*. Det kan se ut som fravær av *Plin2* medfører til lavere cellulært opptak og mindre lagring av fettsyrer. Disse observasjonene er i samsvar med funnene som er blitt gjort av Gao og Serrero [93], der perilipin-2-overuttrykk øker opptaket av langkjedede fettsyrer i COS-7 celler transfektert med *Plin2*-cDNA-vektor [93]. I studien av *Plin2*-siRNA-KD C2C12-celler ble det observert en forhindring av fettsyreindusert intramyocellulær TAG-lagring i cellene [61]. Studien utført av Bosma et al. [61] demonstrerte også at *Plin2* er viktig for TAG-lagring i lipiddråper. Dette ble bekreftet ved hjelp av imaging der det ble observert markant lavere lipidakkumulering i *Plin2*-KD C2C12-celler [61].

Resultatet av oljesyreakkumulering fra denne oppgaven viste ingen signifikante forskjeller mellom *Plin2*-KO-myotuber og *Plin2*-WT-myotuber etter 4 timers inkubering med oljesyre. Derimot viste resultatene fra SPA-forsøket en signifikant høyere oljesyreakkumulering i *Plin2*-WT17 sammenlignet med *Plin2*-KO19- og KO4-myotuber over en tidsperiode på 24 timer. Det ser derfor ut som oljesyreakkumulering i *Plin2*-WT-myotuber er høyere generelt, men denne forskjellen fremkommer signifikant kun over en lengre tidsperiode med inkubering med oljesyre. Flere SPA-forsøk er uten tvil nødvendig for å undersøke dette nærmere.

Det kan også tenkes at økt IMTG akkumulering medieres via økt fettsyreopptak i cellene. Samtidig er det ikke utenkelig at perilipin-2 i cellene fra vår studie slik som perilipin-2 i COS-7 celler er lokalisert nær cellemembranen, og kan derfor fungere som et

fettsyretransportprotein [93]. På en annen side har det blitt rapportert at perilipin-2 er ustabil og degraderes raskt ved fravær av lipiddråper. I tillegg er det blitt observert at perilipin-2 alltid foreligger bundet til lipiddråpeoverflaten [57]. Eventuell kunne den høye oljesyreopptaket hos *Plin2*-WT-celler være en konsekvens av økt oljesyreoksidasjon som driver opptaksprosessen. Ytterligere studier er nødvendig for å avklare denne mulige funksjonen hos perilipin-2.

Det ble i tillegg avdekket signifikant lavere glukoseopptak, akkumulering og oksidasjon hos *Plin2*-KO-celler i forhold til WT-celler. Siden den fraksjonelle oksidasjonen også var lavere hos KO-cellene tyder det på en redusert evne til glukoseoksidasjon utover redusert opptak hos *Plin2*-KO-celler sammenlignet med *Plin2*-WT-myotuber. Disse observasjonene tyder på at mangelen av *Plin2* bidrar til redusert evne til glukoseopptak, akkumulering og oksidasjon sammenlignet med et normalt *Plin2*-uttrykk i skjelettmuskel. Et høyere glukoseopptak hos *Plin2*-WT sammenlignet med *Plin2*-KO-celler i denne masteroppgaven var motsatt enn det som ble observert av Minnaard et al. [64], der glukoseopptaket var negativt korrelert med perilipin-2 innhold hos type 2-diabetikere og friske KMI-matchede kontroller. Gao og Serrero [93] fant heller ingen effekt av perilipin-2 på glukoseopptaket i COS-7 cellene [93]. Det er blitt foreslått av Bosma et al. [61] at fravær av *Plin2* vil kunne medføre til at mesteparten av fetttsyrene dirigeres til dannelsen av lipidintermediater som DAG, ceramider og acyl-CoA. Disse lipidintermediatene kan bidra til redusert glukoseopptak og insulinresistens (avsnitt 1.3). Dette kan muligens være forklaringen bak observasjonen av redusert glukoseopptak og oksidasjon hos *Plin2*-KO-celler.

I tillegg er det blitt utformet en hypotese fra Phillips et al. [58] som innebærer at perilipin-2 kan bidra til å beskytte skjelettmuskelen mot de skadelige effekter som fettstoffer har på insulinaktiviteten og glukosehomeostasen. Flere forsøk på insulin-stimulert glukoseopptak og oksidasjon i *Plin2*-KO-myotuber er derfor nødvendig for å avklare denne hypotesen.

En mulig forklaring av observasjonen av lavere oljesyre- og glukosemetabolismen er at cellene har mindre energibehov ved fravær av perilipin-2. Dette utdypes med at skjelettmuskelvevet har minst fire energisløsende reaksjoner via triglyserid-fettsyre syklus er viktigst i denne sammenhengen [94]. Triglyserid-fettsyre-syklus er en såkalt "futil sykling" som innebærer interkonvertering av to motsatte reaksjoner som skjer samtidig; dannelsen av TAG fra fettsyre acyl-CoA via forestering, og dannelsen av FFA fra TAG via lipolyse. Aktivisering av fettsyre til acyl-CoA krever energi i form av ATP samtidig som mye energi

frigis i form av varme (termogenese) ved dannelsen av FFA fra TAG [94, 95]. Det ble i denne oppgaven observert en lavere oljesyreoksidasjon hos *Plin2*-KO-celler sammenlignet med *Plin2*-WT-celler. Dette kan tyde på at *plin2*-KO-celler har et samlet lavere energibehov og derfor mindre behov for å oksidere substrat i forhold til *Plin2*-WT-celler. Med andre ord er *Plin2* muligens nødvendig, eller involvert i "futil sykling" via triglyserid-fettsyre syklus. Det kan derfor tenkes at *Plin2*-KO-cellene får dekket sitt energibehov via glukosemetabolismen som en kompensasjon, men resultatene fra glukosemetabolismen viste også en signifikant lavere oksidasjon hos *Plin2*-KO-myotuber i forhold til *Plin2*-WT-myotuber. I glukosemetabolismen er "futil sykling" involvert i tre irreversible trinn i interkonvertering av glukose og pyruvat; 1) mellom glukose og glukose-6-fosfat, 2) fruktose-6-fosfat og fruktose-1,6-difosfat og 3) mellom pyruvat og *p*-enolpyruvat [95]. Disse trinnene er tre energikrevende mekanismer i glukosemetabolismen og kan tenkes å være nedsatt når *plin2* er slått ut. Samlet ser det derfor ut som fravær av *Plin2* medfører til en lavere total energimetabolismen hos *Plin2*-KO-celler sammenlignet med *Plin2*-WT-celler. Dette bør undersøkes nærmere i videre forsøk.

Til tross for signifikant forskjellige grad av oljesyreakkumulering over 24 timer hos *Plin2*-WT17, KO19 og KO4 ble det ikke observert noen endringer på basal lipolyse mellom de tre donorene. Total lipolyse i myotuber fra *Plin2*-KO4 lå derimot høyere i forhold til de to andre donorene. Reforestering av oljesyresyre var lavest for *Plin2*-KO19 og høyest for *Plin2*-KO4-myotuber. For å undersøke *Plin2*s rolle i lipolyse og reforestering er det derfor nødvendig med flere antall (n) forsøk før det kan foretas videre tolkning av disse dataene.

Økning av den maksimale oksidative kapasiteten med mitokondriell avkobler (FCCP) medførte til en signifikant økning av oljesyreoksidasjon både hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber. Resultatene tyder på at disse cellene har en større mitokondriell respiratorisk kapasitet enn det som vanligvis benyttes under basaloksidasjon av oljesyre. For å finne reserven som *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber har til respiratorisk disposisjon ved økt behov for mitokondriell oksidasjon ble reservekapasiteten beregnet [78]. Resultatene viste ingen forskjeller i reservekapasiteten mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber (Figur 23). Ved nærmere sammenligning av *Plin2*-KO-myotuber med *Plin2*-WT-myotuber etter tilsetning av FCCP akutt i oljesyreoksidasjon ble det ikke funnet signifikante forskjeller i den maksimale oksidative kapasiteten mellom donortypene (data ikke vist). Dette tyder på at *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber har samme maksimal oksidativ kapasitet, og at de begge

benytter seg i lik grad av sin reservekapasitet. Selv om det er blitt funnet en signifikant lavere oljesyreoksidasjon hos *Plin2*-KO-myotuber sammenlignet med WT-myotuber er dette en samlet effekt basert på alle forbehandlingene.

FCCP så ikke ut til å gi noe effekt på glukoseoksidasjonen, men etter forbehandling med GW7647 ble det observert en signifikant økt fraksjonell glukoseoksidasjon ved akutt tilsatt FCCP i *Plin2*-KO-myotuber. Denne signifikante økningen av FCCP skyldes trolig den lave fraksjonelle oksidasjonen av glukose etter GW7647-stimulering. Det ser derfor ut som GW7647-stimulering medfører til et signifikant lavere energiforbruk (oksidering) hos *Plin2*-KO-celler noe som igjen kan bidra til at KO-cellene benytter seg mindre av reservekapasiteten. I likhet med reservekapasiteten for oljesyreoksidasjon så ble det heller ikke funnet noen forskjell i reservekapasitet for glukoseoksidasjon mellom *Plin2*-WT og *Plin2*-KO, men for disse dataene var det store spredninger. For å kunne si noe konkret bør det derfor foreligge flere data.

Resultater fra forbehandling av cellene med høye oljesyre konsentrasjoner (600  $\mu$ M) gav et signifikant lavere opptak og oksidasjon av oljesyre hos *Plin2*-WT-myotuber. I tillegg var det tendens til lavere fraksjonell oksidasjon av oljesyre ved 600  $\mu$ M oljesyre sammenlignet med 100  $\mu$ M oljesyre. Opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av oljesyre var upåvirket ved økende oljesyre konsentrasjoner hos *Plin2*-KO-myotuber. Data fra oljesyreakkumulering viste en tendens til lavere akkumulering etter 300  $\mu$ M oljesyreforbehandling i forhold til 100  $\mu$ M oljesyre i *Plin2*-KO-myotuber, men ingen forskjell i oljesyreakkumulering etter 600  $\mu$ M oljesyreforbehandling ble observert. Lavt opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre hos WT-myotuber etter forbehandling med høye oljesyre konsentrasjoner, skyldes muligens mettet TAG-lagring av umerket/kald oljesyre. Fravær av *Plin2* resulterte i ingen endringer i oljesyreakkumulering, opptak og oksidasjon, til tross for høye oljesyre konsentrasjoner. Ut ifra disse dataene kan det tyde på at *Plin2* er involvert i reguleringen av TAG-lagring. Ved fravær av *Plin2* er denne kontrollen/reguleringen borte slik at oljesyreopptak, akkumulering og oksidasjon forblir uforandret til tross for at cellene utsettes for høye konsentrasjoner av oljesyre. I studier utført av Bosma et al. [61] ble det observert et mindre antall lipiddråper hos *Plin2*-KD C2C12-celler sammenlignet med kontrollceller. Det kan derfor være interessant å undersøke dette for våre celler med imaging i senere studier.

I glukosemetabolismen ble det også observert tendenser til lavere glukoseopptak etter forbehandling med 600  $\mu\text{M}$  oljesyre sammenlignet med 100  $\mu\text{M}$  oljesyre hos *Plin2*-WT-myotuber. Den fraksjonelle glukoseoksidasjonen var signifikant redusert både etter forbehandling med 300  $\mu\text{M}$  og 600  $\mu\text{M}$  oljesyre hos *Plin2*-WT-myotuber. Hos *Plin2*-KO-myotuber derimot ble det kun observert signifikant reduksjon i glukoseoksidasjon etter forbehandling med 600  $\mu\text{M}$  oljesyre. *Plin2* er ifølge Bosma et al. [61] trolig involvert i TAG-lagring. I tillegg viste SPA forsøk med våre celler en høyere oljesyreakkumulering hos *Plin2*-WT17-celler i forhold til KO-cellene. Et høyt oljesyreakkumulering/TAG-lagring hos WT-myotuber kan derfor bidra til større tilgjengelighet av FFA til oksidasjon og dermed redusert behov for glukoseopptak. Hos *Plin2*-KO-celler var det derimot mindre TAG-akkumulering som trolig fører til mindre FFA som kan dannes via lipolyse, og dermed mindre tilgjengelig FFA som kan benyttes til oksidasjon. Dette kan muligens forklare at høye oljesyrekonentrasjoner hos *Plin2*-KO-celler i mindre grad medførte til endringer av glukosemetabolisme til tross for signifikant redusert glukoseoksidasjon etter forbehandling med 600  $\mu\text{M}$  oljesyre. Ut i fra resultatene kan det derfor se ut som cellene foretrekker oljesyre fremfor glukose til oksidasjon. Mistanken om større preferanse ovenfor oljesyre i disse cellene forsterkes i tillegg ved observasjonen av høyere oljesyreoksidasjon i forhold til glukoseoksidasjon. Forsøk for å undersøke substratpreferanse i disse cellene vil være interessant for å få understøtte resultatene funnet i denne oppgaven.

Resultatene fra denne oppgaven viste signifikante reduksjoner av opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose som følge av akutt tilsatt oljesyre. Denne observasjonen kan forklares ved hjelp av "Randle sykklus"-hypotesen som forklarer at fettsyrer kan bidra til blokkering av glukoseopptak og oksidasjon ved at fettsyremetabolitter som acyl-CoA og citrat er i stand til å hemme PDH og PFK. Hemming av disse to enzymene medfører videre til opphopninger av glukose-6-fosfat som tilslutt resulterer i hemming av heksokinase [51]. Evnen til å veksle mellom fettsyreoksidasjon under faste til glukoseoksidasjon under insulin-stimulerte forhold betegnes som metabolsk fleksibilitet [52]. Som følge av insulinrespons vil glukoseoksidasjonen øke mens fettsyreoksidasjonen dempes i en metabolsk fleksibel skjelettmuskel. Tap av evnen til å veksle mellom glukose og fettsyreoksidasjon kalles for metabolsk infleksibilitet og er blitt foreslått å medvirke til utviklingen av insulinresistens, fedme og type 2-diabetes [52, 96, 97]. Ukropcova et al.[49] beskrev metabolsk fleksibilitet *in vitro* i humane myotuber som suppresjon, evnen av akutt tilsatt glukose til å dempe



fettsyreoksidasjon. I denne oppgaven modifiserte vi denne parameteren til, suppressjon som evnen av akutt tilsatt oljesyre til å dempe glukoseoksidasjonen. For å undersøke om den metabolske fleksibiliteten mellom to energisubstrater endres som følge av fjernet *Plin2*, ble suppressjonsgraden av oljesyre på glukoseoksidasjonen undersøkt. Resultatene viste ingen signifikante forskjeller i oljesyresuppresjon på glukoseoksidasjon med henholdsvis 65% og 70% suppressjon i *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber. Disse resultatene indikerer på at fjernet *Plin2* ikke har noen påvirkning på oljesyresuppresjon på glukoseoksidasjon, og dermed er evnen til å veksle mellom to energisubstrater (metabolsk fleksibilitet) hos *Plin2*-KO-myotuber uendret.

### 6.3 *Plin2* og stimulering med PPAR-agonister

Av PPAR $\delta$ -agonistene, som ble benyttet i oppgaven, var det kun GW501516 som bidro til en signifikant økning av oljesyreoksidasjon hos *Plin2*-WT-myotuber. I tillegg ble det observert en tendens til høyere fraksjonell oljesyreoksidasjon i *Plin2*-WT-myotuber med GW501516-forbehandling. Derimot ble det ikke observert noen PPAR-effekter på oljesyremetabolismen hos *Plin2*-KO-myotuber. PPAR $\delta$ -reseptorer er involvert i reguleringen av lipidmetabolismen der det har blitt vist at PPAR $\delta$  induserer til oppregulering av flere gener involvert i lipidoksidasjon, men nøyaktig mekanisme i skjelettmuskel er fortsatt uklart [98, 99]. I og med at PPAR $\delta$ -effekten forsvinner hos *Plin2*-KO-celler kan en derfor anta at *Plin2* er involvert i fettsyreoksidasjon regulert via PPAR $\delta$ -reseptorer. De Wilde et al. [59] rapporterte blant annet at stimulering av PPAR $\delta$  med GW501516 medførte til økt perilipin-2-proteinuttrykk. Dette tyder på at *Plin2* reguleres via PPAR $\delta$ -reseptorer, og det kan derfor tenkes at økt fettsyreoksidasjon stimulert via PPAR $\delta$  skyldes en oppregulering av perilipin-2 proteiner. Hos *Plin2*-KO-cellene er perilipin-2 oppregulering ikke mulig, og i tråd med dette ble det heller ikke observert økt oljesyreoksidasjon etter PPAR $\delta$ -stimulering. Dette funnet er i samsvar med resultatene til Feng et al. [100] som viste signifikant økt oljesyreoksidasjon etter behandling med GW501516 hos humane myotuber samtidig som det ble funnet 2,3 ganger oppregulering av *PLIN2* i disse cellene [100]. *Plin2* antas derfor å være involvert i PPAR $\delta$ -indusert fettsyreoksidasjon.

Resultatene fra forbehandling av *Plin2*-KO-myotuber med GW501516 (PPAR $\delta$ -agonist) og GW7647 (PPAR $\alpha$ -agonist) tyder på at både PPAR $\delta$  og PPAR $\alpha$  er involvert i reguleringen av

glukosemetabolismen. Behandlinger med begge GW-substratene medførte signifikant redusert glukoseopptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon i *Plin2*-KO-myotuber. Hos *Plin2*-WT-myotuber var det kun signifikant reduksjon av glukoseopptaket og oksidasjon etter PPAR $\delta$ -stimulering. Det ble også observert en tendens til lavere fraksjonell glukoseoksidasjon med PPAR $\delta$ -stimulering av WT-cellene. Redusert glukoseoksidasjon som følge av PPAR $\delta$ -stimulering hos *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber kan muligens forklares med PDK4-indusering via PPAR $\delta$ . Økt PDK4-uttrykk kan medføre til hemming av pyruvatdehydrogenasekomplekset (PHD, det hastighetsbestemmende trinnet av glukoseoksidasjon i skjelettmuskel), og dermed reduseres også glukoseoksidasjonen samtidig som fettsyreoksidasjonen øker [99]. Det er nemlig blitt rapportert at behandling med GW501516 i humane myotuber aktiverer AMP-aktivert proteinkinase (AMPK). Aktivering av AMPK kan videre resultere i økt glukoseopptak [101], men denne effekten er funnet å være mediert via PPAR $\delta$ -uavhengig AMPK-aktivering, som har stimulerende effekter på glukoseopptaket [101]. Det har blant annet blitt vist at PDK4-mRNA-uttrykk induseres i humane myotuber etter GW501516-stimulering [101]. Dette funnet ble også observert hos Badin et al. [41], der en selektiv PPAR $\delta$ -agonist GW0742, induserte til PDK4-genuttrykk i humane myotuber mens effekten av PDK4-indusering nesten var borte etter behandling med en selektiv PPAR $\delta$ -antagonist, GSK0660. Ingen forskjell i glukoseopptak og oksidasjon ble observert mellom *Plin2*-WT- og *Plin2*-KO-myotuber etter PPAR $\delta$ -stimulering. Dette tyder muligens på at *Plin2* ikke er involvert i reguleringen av glukosemetabolismen via PPAR $\delta$ .

Det ble observert redusert glukoseopptak og oksidasjon etter PPAR $\alpha$ -stimulering kun hos *Plin2*-KO-myotuber. Det har blitt rapportert at GW7647 nedregulerer GLUT4-mRNA i humant, hvitt fettvev i tillegg til at det gir økt PDK4-mRNA-uttrykk [102]. Dette kan forklare det reduserte glukoseopptaket og oksidasjonen hos *Plin2*-KO-myotuber. Hvorfor GW7647-stimulering ikke bidro til en lignende reduksjon av glukoseopptak og oksidasjon hos *Plin2*-WT-myotuber er et mysterium. En mulig hypotese er at *Plin2* er i stand til å opprettholde glukoseopptak og oksidasjon ved å indirekte forhindre PDK4-oppregulering induisert av PPAR $\alpha$ . Dette kan forklares med at fravær av perilipin-2 hos *Plin2*-KO-myotuber kan medføre økning i konsentrasjonen av FFA, og dermed en opphopning av langkjedet-acyl-CoA. Økt akkumulering av langkjedet-acyl-CoA kan direkte modulere transkripsjonsaktiviteten til en rekke kjernereseptorer slik som PPAR $\alpha$ . PPAR $\alpha$  kan som

tidligere nevnt inducere til PDK4-uttrykk. Det er derfor mulig at langkjedet-acyl-CoA er i stand til å oppregulere PDK4-transkripsjon via PPAR $\alpha$ -kjernereseptor [103].

## 6.4 Uttrykk av *Plin3* og *Plin5* ved fravær av *Plin2*

Det har vært spekulasjoner om at perilipin-3 muligens kan erstatte perilipin-2s funksjon i skjelettmuskelceller ved fravær av perilipin-2 [65]. Det ble kun utført et forsøk for *Plin3*-mRNA-uttrykk både i *Plin2*-KO- og *Plin2*-WT-myotuber, men det ser ikke ut som uttrykket av *Plin3* hos KO-myotuber er forskjellig fra WT-myotuber. Flere forsøk er nødvendig for å fastslå uttrykket av *Plin3* i disse cellene.

*Plin5* uttrykkes først og fremst i oksidative vev som hjerte, type-I skjelettmuskelfibrer og lever [66]. Uttrykket av *Plin5*-mRNA i cellene våre kan muligens tyde på at myotubene fra musene som ble benyttet i denne oppgaven er oksidative og har et høyt innhold av type I-fibre. *Plin5*-mRNA-uttrykket økte etter forbehandling med oljesyre og DGAT-1-hemmer både i *Plin2*-KO- og WT-myotuber sammenlignet med kontroll. Muligens er oljesyre i stand til oppregulere *Plin5* slik som det er blitt rapportert for *Plin2* [59, 61], men flere forsøk er nødvendig for å undersøke dette nærmere.

## 7 Konklusjon

Flere aspekter av *Plin2s* funksjon er fortsatt ukjent, men ut ifra resultatene kan det tyde på at *Plin2* er involvert i både fetttsyre- og glukosemetabolismen i skjelettmuskelceller hos mus. Det ble observert at myotuber fra *Plin2*-knockout-mus hadde lavere glukose- og fetttsyreopptak, akkumulering og oksidasjon sammenlignet med myotuber fra *Plin2*-villtypemus. Metabolsk fleksibilitet målt ved oljesyresuppresjon av glukoseoksidasjon var lik hos *Plin2*-villtype- og *Plin2*-knockout-myotuber. Resultatene tyder på at *Plin2*-knockout-cellene har et samlet lavere energibehov og derfor i stand til å oksidere mindre substrat. Det er mulig at *Plin2* er involvert i energisløsende mekanismer som ”futil sykling” via fetttsyre-triglyserid-syklus, men videre studier er nødvendig for å avklare *Plin2s* rolle i ”futil sykling”.

Det ble også vist at PPAR $\delta$  stimulerer til økt fetttsyreoksidasjon kun i myotuber fra *Plin2*-villtypemus som kan skyldes oppreguleringen av *Plin2* induert av PPAR $\delta$ . *Plin2* er dermed trolig involvert i PPAR $\delta$ -indusert fetttsyreoksidasjon. PPAR $\alpha$ -stimulering reduserte glukoseoksidasjon kun i myotuber fra *Plin2*-knockout-mus, hvilket tilsier at *Plin2* er involvert i reguleringen av glukosemetabolismen via PPAR $\alpha$ .

## 8 Referanser

1. Folkehelseinstitutt. *Ny definisjon av metabolsk syndrom*. 2005 [sitert 2012 22.04]; Tilgjengelig fra: [www.fhi.no](http://www.fhi.no).
2. Berg, J.P. *Metabolsk syndrom*. [sitert 2012 06.08]; Tilgjengelig fra: [http://snl.no/sml\\_artikkel/metabolsk\\_syndrom](http://snl.no/sml_artikkel/metabolsk_syndrom).
3. Alessi, M. og I. Juhan-Vague, *Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis*. THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-, 2008. **99**(6): s. 995.
4. IDF, *The Interantional Diabetes Federation Consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome*. 2006.
5. Rosenzweig, J.L., E. Ferrannini, S.M. Grundy, S.M. Haffner, R.J. Heine, E.S. Horton, og R. Kawamori, *Primary prevention of cardiovascular disease and type 2 diabetes in patients at metabolic risk: an endocrine society clinical practice guideline*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(10): s. 3671-3689.
6. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(4): s. 295-309.
7. WHO. *Obesity and overweight*. 2011 [sitert 2012 22.04]; Tilgjengelig fra: [www.who.int](http://www.who.int).
8. Després, J.-P., *Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?* Annals of Medicine 2006. **38**: s. 52-63.
9. Kahn, S.E., R.L. Hull, og K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): s. 840-846.
10. Caro, J.F., *CLINICAL REVIEW 26 Insulin Resistance in Obese and Nonobese Man*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1991. **73**(4): s. 691-695.
11. Weiss, R., S. Dufour, S.E. Taksali, W.V. Tamborlane, K.F. Petersen, R.C. Bonadonna, L. Boselli, G. Barbetta, K. Allen, og F. Rife, *Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning*. The Lancet, 2003. **362**(9388): s. 951-957.
12. Watt, M.J., *Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance?* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2009. **36**(1): s. 5-11.
13. Vettor, R., G. Milan, M. Rossato, og G. Federspil, *Review article: adipocytokines and insulin resistance*. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2005. **22**: s. 3-10.
14. Samuel, Varman T. og Gerald I. Shulman, *Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links*. Cell, 2012. **148**(5): s. 852-871.
15. Ten Broek, R.W., S. Grefte, og J.W. Von den Hoff, *Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration*. J Cell Physiol, 2010. **224**(1): s. 7-16.
16. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, E. Haug, og K.C. Toverud, *Skjelettmuskulatur, Menneskets fysiologi*. 2007, Gyldendal Norsk Forlag AS. s. 252-257.
17. Fasting, S. *Muskelvev*. 2009 [sitert 2012 10.08]; Tilgjengelig fra: <http://snl.no/muskelvev>.
18. Morgan, J.E. og T.A. Partridge, *Muscle satellite cells*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2003. **35**(8): s. 1151-1156.
19. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, E. Haug, og K.C. Toverud, *Energiomsetning i skjelettmuskelfibrene, Menneskets fysiologi*. 2007, Gyldendal Norsk Forlag AS. s. 264-268.

20. He, J., S. Watkins, og D.E. Kelley, *Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity*. *Diabetes*, 2001. **50**(4): s. 817-823.
21. Tanner, C.J., H.A. Barakat, G.L. Dohm, W.J. Pories, K.G. MacDonald, P.R.G. Cunningham, M.S. Swanson, og J.A. Houmard, *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2002. **282**(6): s. E1191-E1196.
22. Champe, P.C., R.A. Harvey, og D.R. Ferrier, *Fatty Acid and Triacylglycerol Metabolism, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, Third edition*. 2005, Lippincott Williams & Wilkins. s. 179-198.
23. Luiken, J.J.F.P., D.J. Dyck, X.X. Han, N.N. Tandon, Y. Arumugam, J.F.C. Glatz, og A. Bonen, *Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2002. **282**(2): s. E491-E495.
24. Koonen, D.P.Y., J.F.C. Glatz, A. Bonen, og J.J.F.P. Luiken, *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005. **1736**(3): s. 163-180.
25. Gimeno, R.E., *Fatty acid transport proteins*. *Current opinion in lipidology*, 2007. **18**(3): s. 271.
26. Shi, Y. og D. Cheng, *Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2009. **297**(1): s. E10-E18.
27. Hiramine, Y., H. Emoto, S. Takasuga, og R. Hiramatsu, *Novel acyl-coenzyme A: monoacylglycerol acyltransferase plays an important role in hepatic triacylglycerol secretion*. *Journal of lipid research*, 2010. **51**(6): s. 1424-1431.
28. Cheng, D., T.C. Nelson, J. Chen, S.G. Walker, J. Wardwell-Swanson, R. Meegalla, R. Taub, J.T. Billheimer, M. Ramaker, og J.N. Feder, *Identification of acyl coenzyme A: monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(16): s. 13611.
29. Edens, N.K., R.L. Leibel, og J. Hirsch, *Mechanism of free fatty acid re-esterification in human adipocytes in vitro*. *Journal of lipid research*, 1990. **31**(8): s. 1423-1431.
30. Yen, C.L.E., S.J. Stone, S. Koliwad, C. Harris, og R.V. Farese Jr, *Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis*. *Journal of lipid research*, 2008. **49**(11): s. 2283-2301.
31. Ducharme, N.A. og P.E. Bickel, *Minireview: lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. *Endocrinology*, 2008. **149**(3): s. 942-949.
32. Wanders, R.J., J.P. Ruitter, I.J. L, H.R. Waterham, og S.M. Houten, *The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results*. *J Inherit Metab Dis*, 2010. **33**(5): s. 479-94.
33. Steiber, A., J. Kerner, og C.L. Hoppel, *Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2004. **25**(5-6): s. 455-473.
34. Bartlett, K. og S. Eaton, *Mitochondrial b-oxidation*. *European Journal of Biochemistry*, 2004. **271**: s. 462-469.
35. Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, og P. Walter, *How cells obtain energy from food, Essential cell biology*. 2004, Garland Science. s. 427-444.
36. Londos, C., D.L. Brasaemle, C.J. Schultz, D.C. Adler-Wailes, D.M. Levin, A.R. Kimmel, og C.M. Rondinone, *On the control of lipolysis in adipocytes*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999. **892**(1): s. 155-168.

37. Qvisth, V., E. Hagström-Toft, S. Enoksson, E. Moberg, P. Arner, og J. Bolinder, *Human skeletal muscle lipolysis is more responsive to epinephrine than to norepinephrine stimulation in vivo*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006. **91**(2): s. 665-670.
38. Jocken, J.W.E. og E.E. Blaak, *Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity*. *Physiology & behavior*, 2008. **94**(2): s. 219-230.
39. Gjelstad, I., F. Haugen, H. Gulseth, F. Norheim, A. Jans, S. Bakke, T. Raastad, A. Tjønnå, U. Wisløff, og E. Blaak, *Expression of perilipins in human skeletal muscle in vitro and in vivo in relation to diet, exercise and energy balance*. *Archives of physiology and biochemistry*, 2012. **118**(1): s. 22-30.
40. Watt, M.J., B.J.W. van Denderen, L.A. Castelli, C.R. Bruce, A.J. Hoy, E.W. Kraegen, L. Macaulay, og B.E. Kemp, *Adipose triglyceride lipase regulation of skeletal muscle lipid metabolism and insulin responsiveness*. *Molecular Endocrinology*, 2008. **22**(5): s. 1200-1212.
41. Badin, P.M., C. Loubiere, M. Coonen, K. Louche, G. Tavernier, V. Bourlier, A. Mairal, A.C. Rustan, S.R. Smith, og D. Langin, *Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58*. *Journal of lipid research*, 2012.
42. Tremblay, F., M.J. Dubois, og A. Marette, *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. *Front Biosci*, 2003. **8**: s. d1072-d1084.
43. Khan, A. og J. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. *Diabetologia*, 2002. **45**(11): s. 1475-1483.
44. Saltiel, A.R. og C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. 2001.
45. Kierulf, P. *Glukose-1-fosfat*. [sitert 2012 16.08]; Tilgjengelig fra: [http://snl.no/sml\\_artikkel/glukose-1-fosfat](http://snl.no/sml_artikkel/glukose-1-fosfat).
46. Champe, P.C., R.A. Harvey, og D.R. Ferrier, *Glycogen metabolism, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, Third edition*. 2005, Lippincott Williams & Wilkins. s. 125-138.
47. Galgani, J.E., C. Moro, og E. Ravussin, *Metabolic flexibility and insulin resistance*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2008. **295**(5): s. E1009-E1017.
48. Corpeleijn, E., W.H.M. Saris, og E.E. Blaak, *Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle*. *obesity reviews*, 2009. **10**(2): s. 178-193.
49. Ukropcova, B., M. McNeil, O. Sereda, L. De Jonge, H. Xie, G.A. Bray, og S.R. Smith, *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(7): s. 1934.
50. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(7): s. 1699.
51. Randle, P.J., P.B. Garland, C.N. Hales, og E.A. Newsholme, *The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. *The Lancet*, 1963. **281**(7285): s. 785-789.
52. Kelley, D.E. og L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. *Diabetes*, 2000. **49**(5): s. 677-683.
53. Martin, S. og R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006. **7**(5): s. 373-378.
54. Bickel, P.E., J.T. Tansey, og M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2009. **1791**(6): s. 419-440.

55. Londos, C., C. Sztalryd, J. Tansey, og A. Kimmel, *Role of PAT proteins in lipid metabolism*. Biochimie, 2005. **87**(1): s. 45-49.
56. Brasaemle, D.L., *Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. Journal of lipid research, 2007. **48**(12): s. 2547-2559.
57. Wang, H. og C. Sztalryd, *Oxidative tissue: perilipin 5 links storage with the furnace*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2011. **22**(6): s. 197-203.
58. Phillips, S.A., C.C. Choe, T.P. Ciaraldi, A.S. Greenberg, A.P.S. Kong, S.C. Baxi, L. Christiansen, S.R. Mudaliar, og R.R. Henry, *Adipocyte Differentiation-related Protein in Human Skeletal Muscle: Relationship to Insulin Sensitivity*. Obesity, 2005. **13**(8): s. 1321-1329.
59. de Wilde, J., E. Smit, F.J.M. Snepvangers, N.W.J. de Wit, R. Mohren, M.F.M. Hulshof, og E. Mariman, *Adipophilin protein expression in muscle—a possible protective role against insulin resistance*. FEBS Journal, 2010. **277**(3): s. 761-773.
60. Shaw, C.S., M. Sherlock, P.M. Stewart, og A.J.M. Wagenmakers, *Adipophilin distribution and colocalisation with lipid droplets in skeletal muscle*. Histochemistry and cell biology, 2009. **131**(5): s. 575-581.
61. Bosma, M., M.K.C. Hesselink, L.M. Sparks, S. Timmers, M.J. Ferraz, F. Mattijssen, D. van Beurden, G. Schaart, M.H. de Baets, og F.K. Verheyen, *Perilipin 2 Improves Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle Despite Elevated Intramuscular Lipid Levels*. Diabetes, 2012.
62. Bosma, M., S. Kersten, M.K.C. Hesselink, og P. Schrauwen, *Re-evaluating lipotoxic triggers in skeletal muscle: Relating intramyocellular lipid metabolism to insulin sensitivity*. Progress in Lipid Research, 2011.
63. Coen, P.M., J.J. Dubé, F. Amati, M. Stefanovic-Racic, R.E. Ferrell, F.G.S. Toledo, og B.H. Goodpaster, *Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content*. Diabetes, 2010. **59**(1): s. 80-88.
64. Minnaard, R., P. Schrauwen, G. Schaart, J.A. Jorgensen, E. Lenaers, M. Mensink, og M.K.C. Hesselink, *Adipocyte differentiation-related protein and OXPAT in rat and human skeletal muscle: involvement in lipid accumulation and type 2 diabetes mellitus*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(10): s. 4077-4085.
65. Sztalryd, C., M. Bell, X. Lu, P. Mertz, S. Hickenbottom, B.H.J. Chang, L. Chan, A.R. Kimmel, og C. Londos, *Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(45): s. 34341-34348.
66. Wang, H. og C. Sztalryd, *Oxidative tissue: perilipin 5 links storage with the furnace*. Trends in endocrinology and metabolism, 2011. **22**(6): s. 197-203.
67. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, E. Haug, og K.C. Toverud, *Hormoner som regulerer energilagrene, Menneskets fysiologi*. 2007, Gyldendal Norsk Forlag AS. s. 238-240.
68. Kase Tranheim, E. og K. Birkeland I., *Antidiabetika som påvirker inkretinsystemet*. Tidsskrift for Den norske legeförening, 2008. **128**(4): s. 440-442.
69. Aas, V., M. Rokling-Andersen, A.J. Wensaas, G.H. Thoresen, E.T. Kase, og A.C. Rustan, *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta Physiologica Scandinavica, 2005. **183**(1): s. 31-41.
70. Bakke, S.S., C. Moro, N. Nikolić, N.P. Hessvik, P.M. Badin, L. Lauvhaug, K. Fredriksson, M.K.C. Hesselink, M.V. Boekschoten, og S. Kersten, *Palmitic acid follows a different metabolic pathway than oleic acid in human skeletal muscle cells;*



- lower lipolysis rate despite an increased level of adipose triglyceride lipase.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2012.
71. Takahashi, S., T. Tanaka, T. Kodama, og J. Sakai, *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ), a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome.* Pharmacological research, 2006. **53**(6): s. 501-507.
  72. Seedorf, U. og J. Aberle, *Emerging roles of PPAR [delta] in metabolism.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007. **1771**(9): s. 1125-1131.
  73. Muoio, D.M., J.M. Way, C.J. Tanner, D.A. Winegar, S.A. Kliewer, J.A. Houmard, W.E. Kraus, og G.L. Dohm, *Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells.* Diabetes, 2002. **51**(4): s. 901-909.
  74. Burri, L., G.H. Thoresen, og R.K. Berge, *The role of PPAR $\alpha$  activation in liver and muscle.* PPAR research, 2010. **2010**.
  75. Terada, H., *Uncouplers of oxidative phosphorylation.* Environmental Health Perspectives, 1990. **87**: s. 213.
  76. Lou, P.H., B.S. Hansen, P.H. Olsen, S. Tullin, M.P. Murphy, og M.D. Brand, *Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range.* The Biochemical journal, 2007. **407**(Pt 1): s. 129.
  77. Park, K.S., I. Jo, Y. Pak, S.W. Bae, H. Rhim, S.H. Suh, S. Park, M. Zhu, I. So, og K. Kim, *FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na<sup>+</sup> currents in bovine aortic endothelial cells.* Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 2002. **443**(3): s. 344-352.
  78. Dranka, B.P., B.G. Hill, og V.M. Darley-Usmar, *Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species.* Free Radical Biology and Medicine, 2010. **48**(7): s. 905-914.
  79. Corpeleijn, E., N.P. Hessvik, S.S. Bakke, K. Levin, E.E. Blaak, G.H. Thoresen, M. Gaster, og A.C. Rustan, *Oxidation of intramyocellular lipids is dependent on mitochondrial function and the availability of extracellular fatty acids.* American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2010. **299**(1): s. E14-E22.
  80. Brasaemle, D.L., B. Rubin, I.A. Harten, J. Gruia-Gray, A.R. Kimmel, og C. Londos, *Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(49): s. 38486-38493.
  81. Igal, R.A., P. Wang, og R.A. Coleman, *Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA.* Biochemical Journal, 1997. **324**(Pt 2): s. 529.
  82. King, A.J., J.A. Segreti, K.J. Larson, A.J. Souers, P.R. Kym, R.M. Reilly, G. Zhao, S.W. Mittelstadt, og B.F. Cox, *Diacylglycerol acyltransferase 1 inhibition lowers serum triglycerides in the Zucker fatty rat and the hyperlipidemic hamster.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009. **330**(2): s. 526-531.
  83. Sauer, B., *Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem.* Methods, 1998. **14**(4): s. 381-392.
  84. TheJacksonLaboratory. *Introduction to Cre-lox technology.* 2012 [siteret 2012 12.04]; Tilgjengelig fra: [cre.jax.org/introduction.html](http://cre.jax.org/introduction.html).
  85. Tam, P.P. og J. Rossant, *Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development.* Development, 2003. **130**(25): s. 6155-63.
  86. Springer, M.L., T.A. Rando, og H.M. Blau, *Gene Delivery to Muscle, Current Protocols in Human Genetics.* 2001, John Wiley & Sons, Inc.

87. Wensaas, A.J., A.C. Rustan, K. Lövdstedt, B. Kull, S. Wikström, C.A. Drevon, og S. Hallen, *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. Journal of lipid research, 2007. **48**(4): s. 961-967.
88. Champe, P.C., R.A. Harvey, og D.R. Ferrier, *Introduction to Carbohydrates, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, Third edition*. 2005, Lippincott Williams & Wilkins. s. 83-106.
89. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): s. 248-254.
90. Hunt, M. *Real Time PCR*. 2010 [siteret 2012 17.08]; Tilgjengelig fra: [Http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm)
91. Arya, M., I.S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, og H.R.H. Patel, *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert review of molecular diagnostics, 2005. **5**(2): s. 209-219.
92. PrimerDesign. *Beginner's guide to Real-time PCR*. [siteret 2012 17.08]; Tilgjengelig fra: <http://www.primerdesign.co.uk/Download%20material/Beginners%20guide%20to%200real-time%20PCR.pdf>.
93. Gao, J. og G. Serrero, *Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(24): s. 16825-16830.
94. Tseng, Y.H., A.M. Cypess, og C.R. Kahn, *Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**(6): s. 465-482.
95. Katz, J. og R. Rognstad, *Futile cycling in glucose metabolism*. Trends in Biochemical Sciences, 1978. **3**(3): s. 171-174.
96. Thoresen, G.H., N.P. Hessvik, S.S. Bakke, V. Aas, og A.C. Rustan, *Metabolic switching of human skeletal muscle cells *in vitro**. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2011. **85**(5): s. 227-234.
97. Corpeleijn, E., M. Mensink, M.E. Kooi, P.M.H.J. Roekaerts, W.H.M. Saris, og E.E. Blaak, *Impaired Skeletal Muscle Substrate Oxidation in Glucose-intolerant Men Improves After Weight Loss*. Obesity, 2012. **16**(5): s. 1025-1032.
98. Kleiner, S., V. Nguyen-Tran, O. Baré, X. Huang, B. Spiegelman, og Z. Wu, *PPAR $\delta$  agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 $\alpha$  but does not increase mitochondrial gene expression and function*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(28): s. 18624-18633.
99. Ehrenborg, E. og A. Krook, *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$* . Pharmacological reviews, 2009. **61**(3): s. 373-393.
100. Y. Z. Feng, N.N., S. S. Bakke, M. V. Boekschoten, S. Kersten, E. T. Kase, A.C. Rustan, og G.H. Thoresen, *The principal effect of the PPAR- $\delta$  activation in human myotubes is to increase mitochondrial fatty acid oxidative capacity* American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. **Submittert 2012**.
101. Krämer, D.K., L. Al-Khalili, B. Guigas, Y. Leng, P.M. Garcia-Roves, og A. Krook, *Role of AMP kinase and PPAR $\delta$  in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(27): s. 19313-19320.
102. Ribet, C., E. Montastier, C. Valle, V. Bezaire, A. Mazzucotelli, A. Mairal, N. Viguerie, og D. Langin, *Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes*. Endocrinology, 2010. **151**(1): s. 123-133.

103. Tsintzas, K., K. Chokkalingam, K. Jewell, L. Norton, I.A. Macdonald, og D. Constantin-Teodosiu, *Elevated free fatty acids attenuate the insulin-induced suppression of PDK4 gene expression in human skeletal muscle: potential role of intramuscular long-chain acyl-coenzyme A*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007. **92**(10): s. 3967-3972.

# 9 Appendiks

## 9.1 Medier til celledyrking

### 9.1.1 Proliferasjonsmedium

500 ml Hams F10 Glutamax nutrient mixture

100 ml Føtal bovint serum (FBS)

2,5 ml penicillin/streptomycin (100U/ml / 100µg/ml)

2,5 ml fungizone (250 µg/ml amphotericin)

250µl (5 ng/ml) Basic fibroblast Growth Factor (BFGF)

### 9.1.2 Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium

250 ml Hams F10 Glutamax nutrient mixture

250 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM) (1 g/L glukose)

100 ml Føtal bovint serum (FBS)

2,5 ml penicillin/streptomycin (100U/ml / 100µg/ml)

2,5 ml fungizone (250 µg/ml amphotericin)

250µl (5 ng/ml) Basic fibroblast Growth Factor (BFGF)

### 9.1.3 Differensieringsmedium

500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM) (1 g/L glukose)

10 ml hesteserum

2,5 ml penicillin/streptomycin (100U/ml / 100µg/ml)

2,5 ml fungizone (250 µg/ml amphotericin)

## 9.1.4 Frysemedium

Til 1 ml frysemedium:

650 µl Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium eller proliferasjonsmedium

100 µl DMSO

250 µl FBS

## 9.2 0,01% kollagen I-behandlede celleflasker

Kollagen I kan være vanskelig å få ut av automatpipetten på grunn av den seige egenskapen, derfor bør det lages 1% Kollagen I- løsnings stamløsning først som deretter benyttes til å lage 0,01% kollagen I-løsning.

- Kollagen I-løsningen fortynnes i autoklavert vann til sluttkonsentrasjon på 0,01%
- Løsningen tilsettes til nye celleflasker fra NUNC slik at det dekker vekstoverflaten (1 ml til 25cm<sup>2</sup> celleflasker og 2 ml til 75cm<sup>2</sup> celleflasker)
- Lokket skrues godt på og plasseres i kjøleskapet over natt
- Dagen etter kan kollagen I-løsningen fra flaskene fjernes/ta vare på og kan gjenbrukes innen 2 uker
- La flaskene tørke ved romtemperatur uten kork inne i avtrekk i noen timer
- Skyll flaskene med autoklavert vann eller HBSS før bruk

## 9.3 Andre medier

### 9.3.1 1x Høstebuffer

8 g NaCl

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

0,2 g KCl

Ad 1 liter dH<sub>2</sub>O

pH justeres til 7,2-7,4 med 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 9.3.2 DPBS m/ Hepes

500 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS)

1,19 g Hepes

pH justeres til 7,2 med 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 9.4 Medier til substrate proximity assay (SPA)

### 9.4.1 Pulsmedium til substrate proximity assay

Konsentrasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre: 0,5 µCi/ml = 8,5 µM

Konsentrasjon OA	Varm OA	Kald OA
50 µM	8,5 µM	41,5 µM
100 µM	8,5 µM	91,5 µM
200 µM	8,5 µM	191,5 µM
400 µM	8,5 µM	391,5 µM
600 µM	8,5 µM	591,5 µM
1000 µM	8,5 µM	991,5 µM

\*Varm OA og kald OA tilsettes til colorless DMEM fusjonsmedium

## 9.4.2 Colorless DMEM 1g/l fusjonsmedium

Til 10 ml colorless DMEM 1g/l fusjonsmedium:

50 µl penicillin/streptomycin (100U/ml / 100µg/ml)

50 µl fungizone (250 µg/ml amphotericin)

55 µL glukose 1g/l (stock: 1M)

10 µl Hepes (stock: 1M)

0,2 ml Hesteserum (Final: 2%)

## 9.4.3 Chasemedium til substrate proximity assay

Til 15 ml chasemedium med 0,5% BSA (2 plater):

75 mg BSA veies ut

BSA løses i DPBS m/ Hepes

Tilsett 150 µl glukose (Final: 0,1 mM, stock: 10 mM)

Løsningen fordeles i to rør (7,5 ml i hvert rør)

Tilsett 7,5 µl Triacsin C i det ene røret (Final: 10 µM, stock: 10 mM)

## 9.5 Akuttmedier til substratoksidasjonsforsøk

### 9.5.1 [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (0,5 µCi/ml, 100 µM)

Til 80 brønner, 5 ml:

5 µl L-karnitin (Final: 1mM, stock: 1 M)

75 µl kald OA (Final: 91 µM, stock: 6 mM)

25 µl [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (Final: 0,5 µCi/ml, stock: 9 µM, 100 µCi/ml)

ad 5 ml med DPBS m/ Hepes

\*FCCP tilsettes til 32 av 80 brønner

### 9.5.2 D-[<sup>14</sup>C(U)]glucose (0,3 µCi/ml, 100 µM)

Til 80 brønner, 5 ml:

20 µl BSA (Final: 10 µM, stock: 2,4 mM)

15 µl D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (Final: 3 µCi/ml, stock: 166 µM, 0,5 µCi/ml)

ad 5 ml DPBS m/ Hepes

\*FCCP tilsettes til 32 av 80 brønner

## 9.6 Kvantitativt real-time RT-PCR

### 9.6.1 TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assay

Assay	Nummer	Gen navn	Assay ID
<i>TBP</i>	m-60	TATA boks bindende protein ( <i>TBP</i> )	Mm00446973_m1
<i>Plin5</i>	m-39	<i>Plin5</i>	Mm00508852_m1
<i>Plin3</i>	m-61	<i>Plin3</i>	Mm00482206_m1

### 9.6.2 Primere til kvantitativ real-time RT-PCR med SYBR Green 1

Gener	Primere
<i>Angpt14</i>	F: 5'-CTGGGTGCCACCAATGTTTC-3' R: 5'-GTCCCCACGGAGGTCATG-3'
<i>Plin2</i>	F: 5'-CAGCCAACGTCCGAGATT G-3' R: 5'-CATGGTAGTCGTCACCACATCCT-3'



