

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden Candidata Pharmaciae

Åse Svenneby Mjelva

Immunosuppressive legemidler og insulinfølsomhet

—

In vitro effekter på glukoseopptak og fosforlyring av Akt
i humane skjelettmuskelceller



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

November 2006

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden Candidata Pharmaciae

Åse Svenneby Mjelva

Immunosuppressive legemidler og insulinfølsomhet

—

***In vitro* effekter på glukoseopptak og fosforlyring av Akt
i humane skjelettmuskelceller**

**Veiledere: Professor Anders Åsberg
Professor Hege Thoresen
Professor Arild Rustan**

**Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo
November, 2006**

Førord

Først vil jeg takke Professor Anders Åsberg og Professor Hege Thoresen for god veiledning og støtte gjennom hovedfaget. Dere har gjort dette året meget meningsfylt og lærerikt. Jeg vil også takke for alle motiverende samtaler, samt støtte og hjelp i skriveprosessen

Takk til Professor Arild Rustan for gode innspill og idéer gjennom hele året.

En stor takk til Mari-Ann Baltzersen og Siri Johannesen for opplæring i celledyrking og westernblott. Jeg er utrolig glad for deres utrettelige innsats og støtte på laboratoriet.

Jeg vil også takke alle ansatte og studenter som har jobbet i 4. etasje dette året, for å ha skapt et godt miljø og gjort dette året spesielt hyggelig. Jeg kommer til å savne kaffe og kaker hver fredag ☺

Til slutt vil jeg takke kjæresten min, Bjørn, for å ha vært med på alle opp- og nedturer gjennom hele året og for å ha vært en enestående klagemur når hovedfaget ikke gikk på skinner. Tusen takk for god støtte, tålmodighet og utallige kaffepauser.

22. November 2006

Åse Svenneby Mjelva

Innholdsliste

Forord	2
Innholdsliste	3
Forkortelser	5
Sammendrag	7
1. Innledning	8
1.1 Diabetes mellitus.....	8
1.2 Insulinsignalering.....	10
1.3 GLUT-transportører	12
1.4 Muskeltyper	13
1.5 Legemidler	14
1.5.1 Glukokortikoider	14
1.5.2 Ciklosporin (CsA).....	14
1.5.3 Tacrolimus (Tac).....	16
1.5.4 Sirolimus (Sir).....	16
1.5.5 Mykofenolsyre (MPA)	17
1.5.6 Klinisk relevante plasma-/blod-konsentrasjoner av de aktuelle legemidlene	17
1.6 Mål	18
2. Materialer og metoder	19
2.1 Materialer.....	19
2.2 Glukoseopptak	20
2.2.1 Celler	20
2.2.2 Dyrking av celler.....	20
2.2.3 Insulinstimulert glukoseopptak.....	20
2.2.4 Glukosetelling (scintillasjonstelling)	21
2.2.5 Måling av totalprotein	21
2.3 Fosforylert Akt.....	22
2.3.1 Prøveopparbeidelse til westernblott	22
2.3.2 Proteinmåling til westernblott.....	22
2.3.3 Gel-elektroforese.....	22

2.3.4 Blotting	23
2.3.5 Deteksjon og kvantifisering	23
3. Resultater og diskusjon	24
3.1 Glukoseopptak	24
3.1.1 Optimalisering av glukoseopptak	24
3.1.2 Effekter på glukoseopptak	30
3.2 Fosforylert Akt	33
3.2.1 Optimalisering av fosforylert Akt	34
3.2.2 Effekter på fosforylert Akt	35
4. Konklusjon og fremtidige aspekter	39
5. Referanser	40
6. Appendiks	45

Forkortelser

2DG – 2-deoxyglukose

Akt (PKB) – protein kinase B

aPKCs - atypisk protein kinase C isoformer

BMI – body mass index

BSA – bovint serum albumin

CAP - Cbl-assosiert protein

Cbl - Casitas B lymphoma proteinfamilie

CsA – ciklosporin

Cyt B – cytochalasine B

Dex – dexametason

dH₂O – destillert vann

DMEM m/GLUTAMAX – Dulbecco's modified eagle medium with glutamax

DMSO – dimethyl sulfoksid

ECL – enhanced chemiluminescence

ECM – extracellulært matrix

FCS – føtalt kalve serum

GLUT – glukosetransporter

GSK3 - glykogen syntase kinase 3

HEPES - N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N-[etansulfonic acid]

HRP – horseradish peroxidase

IGT – nedsatt glukosetoleranse

IMPDH – inosine monofosfat dehydrogenase

IR – insulinresistens

IRS - insulinreseptorsubstrater

Isec – insulinsekresjon

MAKPs - mitogen aktivert protein kinase

MMF – mykofenolat mofetil

MPA - mykofenolsyre

NGT – normal glukosetoleranse

p70^{rsk} - p 70 ribosomal S6 kinase

PBS – phosphate buffered saline (fosfatbufferet saltvann)

PDK1 - fosfatidylinositol avhengig kinase 1

PI(3)K - fosfatidylinositol (3)-kinase

PTDM – post-transplantasjons-diabetes mellitus

PP1 - protein fosfatase 1

Sch - Src homologi og kollagen homologi

SDS – natrium dodecyl sulfat

SDS-PAGE - natrium dodecyl sulfat polyacrylamid gel elektroforese

Secr1 – første fase av insulinsekresjonen

Secr2 – andre fase av insulinsekresjonen

Sir – sirolimus

Tac – tacrolimus

TEMED – N, N, N, N'-tetra-metyl-ethylenediamin

T-TBS – Tris-(hydroxymetyl) aminometan

Sammendrag

Post-transplantasjons-diabetes mellitus (PTDM) er en kjent og vanlig bivirkning ved behandling med immunosuppressive legemidler, spesielt glukokortikoider, ciklosporin (CsA) og tacrolimus (Tac), og fører ofte til behov for eksogen tilførsel av insulin for å normalisere glukosehomeostasen i transplanterte pasienter. Både nedsatt insulinsekresjon og perifer insulinresistens er foreslått som potensielle mekanismer i patogenesen til PTDM og det har blitt argumentert at den første kan spille en viktigere rolle i utviklingen av sykdommen enn den siste. På grunn av dette er det blitt forsket mer på immunosuppressivas innvirkning på insulinsekresjonen enn insulin resistens. Det var derfor ønskelig å se på legemidlenes innvirkning på perifer insulinfølsomhet i muskelceller *in vitro* i denne oppgaven.

Satellittceller ble isolert fra biopsier donert av friske frivillige, dyrket og differensiert til myotuber som ble brukt i forsøkene. Basalt og insulinstimulert glukoseopptak ble målt. Det var vanskelig å få tydelig insulinrespons hos cellene. Forskjellige strategier for å øke responsen ble prøvd, men ingen førte frem. Måling av fosforylert Akt ved hjelp av westernblotting ble også undersøkt. Forsøkene viste en tendens til at basal fosforylering av Akt gikk ned med økende konsentrasjon av dexametason (Dex) og av CsA. Mykofenolsyre (MPA), sirolimus (Sir) og Tac viste ingen effekt på fosforylering av Akt. Både Dex og CsA og i tillegg Tac gav en økning i fosforylering av Akt ved akutt insulinstimulering, mens Sir og MPA ikke påvirket fosforyleringen.

Det er lite kunnskap om dette emnet, og forskjellene i bivirkningsprofilene til de ulike legemidlene blir viktigere ettersom organmottakerne lever lengre og de kardiovaskulære risikofaktorene blir mer fremtredende. Mer forskning på dette området er nødvendig for å kunne forutsi faren for å utvikle PTDM for de ulike immunosuppressive legemidlene og dermed få bedre individualisert terapi.

1. Innledning

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus er en kronisk metabolsk sykdom som er karakterisert av en høy blodglukosekonsentrasjon, hyperglykemi, forårsaket av nedsatt insulinproduksjon og/eller insulinresistens (IR). Hyperglykemi oppstår på grunn av ukontrollert utskillelse av hepatisk glukose og redusert opptak av glukose perifert (skjelettmuskulatur, fett og lever) og dermed redusert glykogensyntese [1].

Den gang man først begynte med organtransplantasjon var det viktigst å unngå reaksjon av organet i et kortere tidsperspektiv enn nå. Med erfaringer fra operasjoner og utviklingen av immunosuppressiva har flere pasienter oppnådd å leve lengre etter transplantasjonen. Ettersom pasientene overlevde lengre ble og de sekundære komplikasjonene som PTDM viktigere [2]. Dermed har det blitt viktigere å kontrollere komplikasjoner etter transplantasjonene og å øke livskvaliteten til pasientene [3]. Post-transplantasjons-diabetes mellitus (PTDM) dukket opp som en viktig bivirkning av de immunosuppressive legemidlene [4]. PTDM er rapportert å øke pasientens morbiditet og mortalitet ved å øke faren for mikrovaskulære komplikasjoner [3].

Nylig har eksperter blitt enige om at diabetes burde klassifiseres etter etiologi. Type 1-diabetes er forårsaket av ødeleggelse av β -cellene, som vanligvis fører til fullstendig insulinmangel, mens type 2-diabetes er karakterisert av varierende grad av IR som fører til økt utskillelse av insulin (hyperinsulinemi) i respons til den økende plasmakonsentrasjonen av glukose. Dette fører igjen til en defekt i β -cellenes evne til å skille ut tilstrekkelig insulin [5]. Andre spesifikke typer av diabetes inkluderer genfeil på β -cellefunksjonen og IR, sykdommer på den eksokrine delen av pankreas, endokrinopatier, infeksjoner og legemiddel- eller kjemikalie-indusert diabetes. PTDM kan passe i den siste kategorien, men deler og symptomer med type 2-diabetes [6].

Post-transplanterte pasienter uten tidligere påvist diabetes deles vanligvis inn i tre kategorier; pasienter med normal glukosetoleranse (NGT), pasienter med nedsatt glukosetoleranse (IGT) og pasienter med PTDM. Denne karakteriseringen bestemmes best ved å utføre en oral glukosetoleransetest. Pasienten gis en glukosedose på 75 g oralt og blodprøver tas rett før inntak samt etter 60 og 120 minutter. Serumglukose analyseres og pasientens glukosetoleranse bestemmes ut ifra gitte kriterier (tabell 1.1) [7].

Tabell 1.1: Oversikt over WHO's definisjonskriterier for oral glukosetoleransetest. NGT, normal glukosetoleranse; IGT, nedsatt glukosetoleranse; PTDM, post-transplantasjons-diabetes mellitus.

	Fastende serum glukose	Serum glukose etter 2 timer
NGT	< 7,8 mmol/L	< 7,8 mmol/L
IGT	< 7,8 mmol/L	7,8 – 11,1 mmol/L
PTDM	≥ 7,8 mmol/L	≥ 11,1 mmol/L

PTDM er en kjent og vanlig bivirkning ved behandling med immunosuppressive legemidler [8], spesielt glukokortikoider, ciklosporin (CsA) og tacrolimus (Tac) [9], og fører ofte til behov for eksogen tilførsel av insulin for å normalisere glukosehomeostasen i transplanterte pasienter [8]. De fleste av disse legemidlene har PTDM som kjent eller mistenkt bivirkning. For azathioprine og MMF er dette ikke beskrevet [10].

Både nedsatt insulinsekresjon og perifer IR er foreslått som potensielle mekanismer i patogenesen til PTDM [3]. Det har blitt argumentert for at den første kan spille en viktigere rolle i utviklingen av sykdommen enn den siste [11]. I tillegg til disse to faktorene kan en rekke andre risikofaktorer spille inn som for eksempel alder, body mass index (BMI), tidspunkt siden transplantasjon, lipidprofil, legemidler (blodtrykkssenkende og diuretika) og bruken av forskjellige immunosuppressive legemidler [12].

Frem til 1983 var azathioprine i kombinasjon med prednisolon standardterapi etter transplantasjon. Etter 1983 har CsA og prednisolon, ofte i kombinasjon med azathioprine, vært standard. I de senere år har også mykofenolat mofetil (MMF), Tac og sirolimus (Sir) blitt brukt. Ifølge Norsk Nefrologiregisters årsrapport fra 2003 brukte 77 % av nyretransplanterte i Norge CsA, 13 % Tac, 42 % azathioprine, 33 % MPA og 2 % Sir. 97 % av de transplanterte brukte prednisolon og blant de som brukte en calcineurinhemmer hadde 77 % kommet ned på

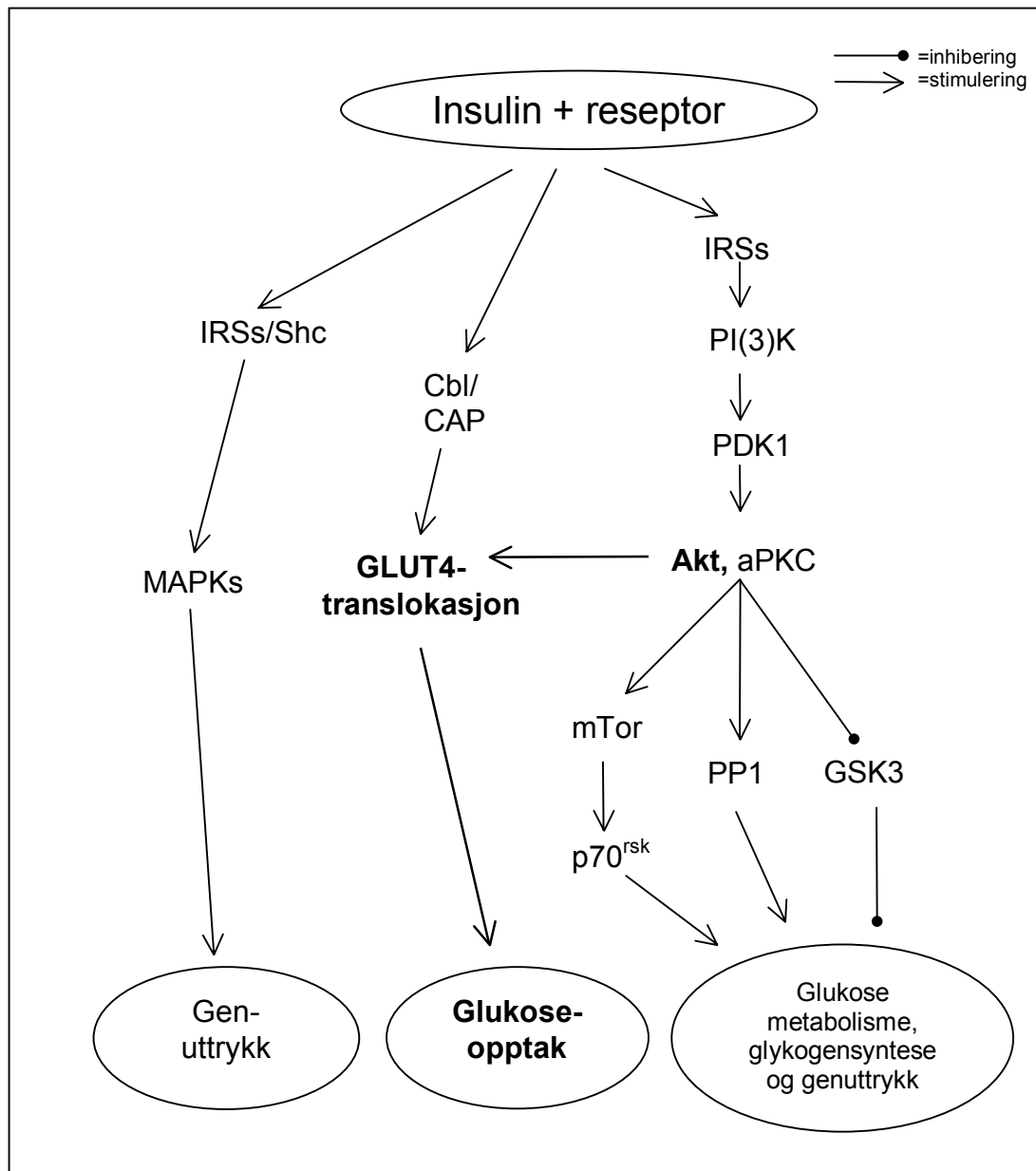
en daglig dose av prednisolon ≤ 5 mg, som er anbefalt for stabile pasienter. Hos noen få hadde prednisolon blitt seponert [13].

1.2 Insulinsignalering

Insulin syntetiseres og skilles ut fra bukspyttkjertelens β -celler i respons til en økning i plasmakonsentrasjonen av glukose, spesifikke aminosyrer, kalium og stimuli fra det parasymatiske nervesystem. Insulin binder seg til en reseptor på celleoverflaten, som består av to α - og to β -subenheter, som signaliserer via autofosforylering av reseptoren. Effektene av insulin kan deles inn i regulering av langtids-vekst og korttids-metabolisme, disse er medierte via forskjellige intracellulære signaleringsveier [14].

Et av signalmolekylene som ser ut til å være nødvendig i den insulinstimulerte glukosetransporten er Akt (PKB). Denne protein-kinasen blir fosforylert av fosfatidylinositol avhengig kinase (PDK1) via fosfatidylinositol (3)-kinase (PI(3)K) nedstrøms i insulinkaskaden. Akt fosforylerer glykogen syntase kinase 3 (GSK3), protein fosfatase 1 (PP1), p 70 ribosomal S6 kinase (p70^{rsk}), via mTOR, og bidrar til transløkasjon av glukosetransporter (GLUT)4-vesikler ut til cellemembranen [15].

På denne måten fører insulin til økt glukoseopptak, økt glykogensyntese og endringer i genuttrykket til gener som regulerer glukosemetabolismen, inkludert insulin (se figur 1.1).



Figur 1.1: Signalering som gir endringer i genuttrykket, glukoseopptaket, glukosemetabolismen og glykogensyntesen i respons til insulin i skjelettmuskelceller [15-17]. IRSs, insulin reseptor substrater; PI(3)K, fosfatidylinositol (3)-kinase; PDK1, fosfatidylinositol avhengig kinase 1; Akt (PKB), protein-kinase B; aPKCs, atypisk protein kinase C isoformer; GSK3, glykogen syntase kinase 3; PP1, protein fosfatase 1; MAPK, mitogen aktivert protein kinase; Cbl, Casitas B lymphoma proteinfamilie; CAP, Cbl-assosiert protein; GLUT4, glukose transporter 4; Shc, Src homologi og kollagen homologi; p70^{rsk}, p 70 ribosomal S6 kinase.

1.3 GLUT-transportører

Glukose blir tatt opp fra blodet via en familie med transportmolekyler, GLUT, som katalyserer transporten av glukose mot dens konsentrasjonsgradient inn i målceller, som tverrstripet muskulatur og fettvev. Det finnes 4 forskjellige isoformer av glukosetransportere (GLUT1-4). GLUT1 er konstituelt uttrykt i alle vev og GLUT3 er primært uttrykt i neuroner. GLUT2 er en lav-affinitets glukosetransporter som er uttrykt i lever, tarm, nyrer og β -celler i bukspyttkjertelen. Denne transporteren fungerer som en del av glukosesensorsystemet i β -cellene og i den basolaterale transporten i intestinale epitelceller som absorberer glukose fra dietten [18]. GLUT4-isoformen er den mest insulinsensitive transporteren og finnes for det meste i tverrstripet muskulatur og fettvev. I motsetning til de andre GLUT-isoformene, som primært er lokalisert i cellemembraner, er GLUT4-transporterproteinene lokalisert i spesielle oppbevaringsvesikler som lagres inne i cellen ved basale betingelser. Etersom det postprandiale glukosenivået øker, vil den samtidige økningen i sirkulerende insulin aktivere en intracellulær signaleringskaskade som inkluderer fosforylering av Akt, som til slutt fører til en translokasjon av GLUT4-vesikler til plasmamembranen [18]. Denne prosessen er reverserbar, slik at når det sirkulerende insulinnivået synker, blir GLUT4-transporterene fjernet fra plasmamembranen ved hjelp av endocytose og resirkulert tilbake til deres intracellulære oppbevaringsvesikler. Ved å etablere et indre membrankompartiment som det vanlige oppbevaringsstedet for GLUT4-transportere, vil insulinsensitivt vev være rede til å respondere raskt og effektivt på forandringer i sirkulerende insulinnivåer. Dessverre gir kompleksiteten av disse regulatoriske prosessene mange potensielle punkter for defekter som til slutt kan føre til perifer IR og mulig diabetes [18]. Disse punktene kan blant annet være binding av insulin til reseptor, autofosforylering av reseptorer og fosforylering av intracellulære signalmolekyler, regulering av genuttrykk og translokasjon av GLUT4-vesikler.

1.4 Muskeltyper

Skjelettmuskelfibre kan deles inn i 2 hovedklasser: type I (slow-twitch) og type II (fast-twitch) (tabell 1.2) [19]. Det har lenge vært vist at type I- og type II-muskelfibrene viser forskjellige egenskaper angående kontrahering og metabolisme [19, 20]. Muskelmorfologi er relatert til produksjon av energi og lagring av glukose. Derfor er det mulig at forandringer i morfologien kan spille en sentral rolle i utviklingen av syndromene til IR, inkludert fedme [21, 22]. Sammensetningen av fibertyper varierer fra muskel til muskel og gir grunnlaget for den strukturelle og funksjonelle variasjonen til humane skjelettmuskler.

Proteinfosfasen calcineurin induserer transformasjonen av skjelettmuskelfiber fra fenotypen fast twitch til slow twitch. CsA er en potent hemmer av calcineurinaktivitet og i rotte soleus-muskel er det vist at CsA promoterer uttrykk av fast twitch fibre [23]. Aktivisering av calcineurin fører til økt insulinaktivitet, som igjen er assosiert med økt glukoseopptak og lagring av glykogen i skjelettmuskulatur [24].

Det er vist at mengde GLUT4-protein og insulinsensitiviteten er høyere i type I- og type IIa- enn i type IIb-fibre. I tillegg er type I-muskelfibre mer insulinsensitive, rikere på mitokondrier og har høyere oksidativ kapasitet enn type II-fibre [25, 26]. Cellekulturene som brukes *in vitro* ser for det mest ut til å bestå av en type muskelfibre, fast twitch (type II-fibre) [25].

Tabell 1.2: Oversikt over fibertyper i humane muskelskjelettceller [25, 26]

Slow twitch	Type I	Høy oksidativ effekt
Fast twitch	Type IIa	Høy oksidativ effekt
Fast twitch	Type IIb	Lav oksidativ effekt

1.5 Legemidler

1.5.1 Glukokortikoider

Glukokortikoider har en doseavhengig diabetogen effekt med en forverring av IR [6, 27], og IR ser ut til å være den dominerende bivirkninger for utvikning av PTDM ved bruk av steroider [2]. To mulige mekanismer til at glukokortikoider gir IR er; ved direkte å øke IR og ved å øke kroppsvekten og redusere muskelmassen [3]. Den direkte mekanismen er assosiert med en defekt i aktivering av glykogen syntase [28] i tillegg til stor nedbrytning av glykogen syntase [29].

Glukokortikoider promoterer glukoneogenesisen i lever, hemmer glukoseopptak, senker glykogensyntese i skjelettmuskulaturen og kan også ved høye doser senke insulinsekresjonen fra bukspyttkjertelens β -celler [6, 27].

Hjelmesæth et al (1997) dokumenterte en signifikant korrelasjon mellom bruk av steroider og glukoseintoleranse hos nyretransplanterte pasienter [30].

1.5.2 Ciklosporin (CsA)

Det har blitt vist *in vivo* at CsA, en calcineurinhemmer, er toksisk for β -cellene i bukspyttkjertelen og kan nedsette insulinsekresjon. Den nøyaktige mekanismen bak dette er ukjent [2]. Korttidsbehandling av dialysepasienter med CsA ser ut til å senke andre fase av insulinsekresjonen (Secr2), men har ingen signifikant effekt på første fase av insulinsekresjonen (Secr1) hos kaukasiske pasienter [31]. Det er en hypotese på at en ”lett tilgjengelig pool” av insulinholdige granuler er ansvarlig for Secr1, mens Secr2 er avhengig av hastigheten på frigjøringen av lagrede granuler som må primes først [32].

Calcineurinhemmere kan spesifikt redusere Secr2 ved å hemme eller forstyrre den kinesinavhengige intracellulære sendingen av granuler med insulin til sekresjon fra lagre lengre inn i cellen til den ”lett tilgjengelige poolen” [33, 34]. Det er ikke kjent om denne bivirkningen er doseavhengig, men insulinsekresjonen ser ikke ut til å være doseavhengig [27, 35]. Dosereduksjon ser ikke ut til å bedre glukoseintoleransen etter nyretransplantasjon [6].

CsA er et lipofilt legemiddel som ikke bare akkumuleres i fettceller, men og i høy grad i andre vev som for eksempel bukspyttkjertelen [36], leveren og nyrene. CsA-nivåene i bukspyttkjertelen har blitt rapportert å være over 10 ganger så høye som nivåene i blodet [37]. I tillegg til å direkte hemme proteinsyntesen i β -cellene er det rapportert at CsA hemmer insulinsyntesen. Det er foreslått av CsA er en kompetitiv hemmer av P-450 systemet og forsinker nedbrytningen av steroider og øker dermed steroidenes effekt [38].

Dresner et al (1989) viste at 4 ukers behandling med CsA var assosiert med nedsatt insulinsekresjon, økt insulinclearance og uforandret insulinsensitivitet i sau [39].

Det er vist *in vitro* at CsA forandrer genuttrykket til insulin [9] og et forsøk viser at calcineurinhemmere kan senke insulins gentranskripsjon ved å hemme fosfataseaktiviteten til calcineurin som forhindrer defosforyleringen og aktiveringen av transkripsjonsfaktorer som nukleær faktor av aktiverte T-celler (NFAT) og cAMP respons element-bindende protein (CREB) [33, 40, 41]. Tilsvarende kan transkripsjon av gener som er regulert av disse faktorene bli svekket av calcineurinhemmere. Dette inkluderer transkripsjon av gener som regulerer insulin [42, 43].

In vitro er det óg vist en mulig mekanisme for at CsA senker insulinsekresjon. Ikke ved en direkte effekt på calcineurin, men mediert ved å interferere med mitokondrial funksjon (mitokondriell permeabilitets overgangspore) i bukspyttkjertellens β -celler. Den mitokondrielle permeabilitets overgangspore er en ionekanal som er involvert i β -cellenes feedback-system [44].

Ikeuhi et al (1992) fant i sin *in vivo* studie at CsA reduserte insulinsekresjonen signifikant, men gav en økning i insulinbinding til dens reseptorer. Insulinsensitiviteten ble målt ved hjelp av basal- og insulinstimulert opptak av 2-deoxyglukose (2DG). I muskler viste det seg å være lavere opptak av glukose hos dyr som ble behandlet med CsA og som hadde utviklet glukoseintoleranse. Det ble foreslått at senkningen i opptak av 2DG i musklene hos CsA-behandlede mus kunne komme av en senkning av glukosetransportere pga hypoinsulinemia og/eller den påfølgende hyperglykemien *in vivo* [45].

1.5.3 Tacrolimus (Tac)

Tac er en calcineurinhemmer som er antatt 2-4 ganger mer diabetogen enn CsA [10]. Et par studier indikerer at bruk av Tac er assosiert med en senkning i den akutte insulinresponsen i mennesket [46, 47]. I en undersøkelse senket Tac insulins Secr1 [47]. Tac har óg gitt lignende effekter som cytokiner på humane β -celler *in vitro*. Cytokiner senker basalsekresjon av insulin, og er derfor assosiert med redusert insulinrespons til glukose. Direkte β -celletoksisitet har blitt vist *in vivo* i biopsier av bukspyttkjertler fra transplantasjonsmottagere behandlet med Tac sammenlignet med CsA. Tac gav oftere og mer alvorlig celleskader enn CsA [9]. Enkelte forsøk har vist at bivirkningene Tac gir på bukspyttkjertelens β -celler er doseavhengige [47, 48].

I en farmakodynamisk studie viste Teutonico et al (2005) at Tac inhiberer den hemmende effekten Sir har på $p70^{\text{rsk}}$ i celler. Dette kan være en del av forklaringen på den lavere diabetogene effekten av lavdose Tac pluss Sir enn høydose Sir [12].

1.5.4 Sirolimus (Sir)

Sir er en mTOR-hemmer. mTOR spiller en viktig rolle i insulin-signalerings-kaskaden (se figur 1.1) og på grunn av dette har Sir et stort potensiale til å innvirke på glukosemetabolismen [49]. mTOR er et medlem av proteinfamilien PI(3)K. Stimulering av PI(3)K aktiverer mTOR og kan ved fosforylering av $p70^{\text{rsk}}$ kontrollere gentranskripsjon [15].

Kronisk behandling med Sir ser ut til å senke insulinsensitiviteten drastisk og dette kan være assosiert med en feil i den kompensatoriske β -celle responsen. mTOR- og $p70^{\text{rsk}}$ -signalerings har óg blitt vist å kontrollere størrelsen, prolifereringen og insulinfrigjøringen hos β -celler. Slik kan Sir sin hemming av $p70^{\text{rsk}}$ -aktivering være med på å starte utviklingen av ”insulinresistens” hos β -celler [50-52].

Teutonico et al (2005) sin *in vivo* studie indikerte at Sir nedsatte bukspyttkjertelens β -celle respons og økte perifer IR, og på denne måten kunne forverre glukosehomeostasen i nyretransplantasjonspasienter [12].

I tillegg har Sir blitt vist å oppheve den insulinmedierte økningen i GLUT1 proteinsyntesen. På denne måten vil Sir også være med å modulere den insulinavhengige glukosetransporten [12].

Berg et al (2002) viste *in vitro*, i fettceller, at Sir hindrer at IRS-1 nivå, insulinindusert fosforylering av Akt og insulinstimulert glukosetransport synker ved kronisk insulinstimulering. De viste også at Sir alene ikke hadde noen effekt på fosforyleringen av Akt, men tilsatt før behandling med kronisk insulinstimulering forhindret Sir senkningen av fosforyleringen av Akt. Sir hadde kun effekt på IRS-1 nivåene og ingen effekt på senkingen av GLUT-4 nivåene. Dette kan forklare at Sir bare delvis klarte å gjenvinne det insulinstimulerte glukoseopptaket [53].

1.5.5 Mykofenolsyre (MPA)

MPA hemmer selektivt inosine monofosfat dehydrogenase (IMPDH), et nøkkelenzym for lymfocyttenes purinsyntesevei [54, 55]. PTDM og IR er ikke vist å være så hyppige bivirkninger ved bruk av MPA som hos noen av de andre immunosuppressiva [9]. Det er gjort et par studier på MMF, et prodrug for MPA, på øy-celler fra rotter som viser at MPA direkte hemmer β -celle funksjon og induserer β -celle apoptose [56].

1.5.6 Klinisk relevante plasma-/blod-konsentrasjoner av de aktuelle legemidlene

Tabell 1. 3 Klinisk relevante plasma-/blod-konsentrasjoner av de aktuelle legemidlene. CsA, Ciklosporin; Tac, Tacrolimus; Sir, Sirolimus; MPA, Mykofenolsyre.

CsA	60-1700 nM
Tac	4-40 nM
Sir	5-70 nM
MPA	2-70 μ M

1.6 Mål

Nyretransplanterte pasienter har stor risiko for å utvikle nedsatt glukosetoleranse og diabetes. Hensikten med denne studien er å studere hvordan ulike immunosuppressive legemidler påvirker insulinfølsomheten i perifere skjelettmuskler. Dette ble undersøkt ved å måle glukoseopptaket og mengde fosforylert Akt etter insulinstimulering, i primære humane skjelettmuskelceller i kultur.

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

Tacrolimus var gitt som gave fra Fujisawa, Osaka, Japan. Sirolimus var gitt som gave fra Wyeth, NJ, USA. Dexametason, ciklosporin, mykofenolsyre, bovin serum albumin (BSA), cytochalin B, Tris, umerket deoxyglukose (2-deoxy-D-glukose), dimetyl sulfoksid (DMSO), ekstracellulært matriks (ECM), glykogen, N-[2-hydroxyetyl] piperazine-N-[etansulfonic acid] (HEPES), beta-mercaptoetanol, natrium dodecyl sulfat (SDS) og Ponceaus løsning ble kjøpt fra Sigma Chem. Co, St.Louis, Mo, USA. Ammoniumpersulfat, Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate, akrylamid løsning (30 %), bromfenol blått, TEMED, tween 20, goat anti-rabbit IgG-horse raddish peroxidase conjugate, SDS-PAGE Molecular Weight Standar Low Range og monomer løsning ble kjøpt fra Bio-Rad laboratorier, Hercules, CA, USA. 2-[³H(G)]deoxyglukose (10 Ci/mmol) ble kjøpt fra American Radiolabeled Chemicals Inc., MO, USA. Fungizone (250 µg/mL), Dulbecco's modified eagle medium with glutamax (DMEM m/glutamax), foetal bovint serum (FBS) og penicillin/streptomycin (10 000 IE/ 10 000 µg/mL) ble kjøpt fra Gibco, Paisly, UK. Insulin Actrapid ble kjøpt fra Novo Nordisk, Bagsværd, Danmark. Ultrosor G ble kjøpt fra Bio Septra S.A., Division of CIPHERGEN Bio Systems Inc., Cergy-Sainte-Christophe, France. ECL reagens ble kjøpt fra Amersham Biosciences / GE Healthcare, Buckinghamshire, UK. Røntgenfilm ble kjøpt fra Kodak, Rochester, NY, USA. Phospho-Akt (Ser473) ble kjøpt fra Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA. Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS, Levanger, Norge. 6-brønners Brett til celledyrkning ble kjøpt fra Costar. Pierce protein assay ble kjøpt fra Boule Nordic AS, Ski, Norge. Glycerol, NaCl, NaOH, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ ble kjøpt fra Merck, Darmstadt, Tyskland. Ecoscint A ble kjøpt fra National diagnostics, Hesse Hull, England.

2.2 Glukoseopptak

2.2.1 Celler

Satellittceller ble isolert fra m. oblicus interna (bukmuskel) biopsier donert av friske frivillige nyre-donorere. Biopsiene ble tatt på Rikshospitalet og opparbeidet på Farmasøytisk Institutt.

2.2.2 Dyrking av celler

6-brønners brett ble coated med fortynnet ekstracellulært matriks (ECM). Nedfrosne satellittceller oppbevart i nitrogen tank (-196 °C) ble tint raskt, men forsiktig på vannbad som holdt 37 °C. Korken på røret ble åpnet og lukket for å utligne trykket. Cellene ble overført til et 50 mL sentrifugerør og forsiktig tilsatt 5 mL utsåingsmedium (Appendiks 6.1). De ble deretter sentrifugert ved 550 g i 7 minutter. Supernatanten ble sugd av og kastet.

Cellepelletten ble deretter resuspendert i utsåingsmedium, først i kun 1 mL for å få cellene finfordelt og deretter til 38 eller 50 mL, henholdsvis for 6 og 8 stykker 6-brønners brett. Etter 24 timer ble det byttet til proliferasjonsmedium (Appendiks 6.2) og dyrket til cellene ble konfluente (ca 7 dager). Mediumskift ble utført hver 2. eller 3. dag. Ved konfluens, eller når cellene startet å differensiere, ble differensieringen til myotuber startet ved å tilsette differensieringsmedium (Appendiks 6.3). Forsøkene ble utført på dag 7 etter differensiering.

2.2.3 Insulinstimulert glukoseopptak

Etter preinkubering med immunosuppressiva i 1-4 døgn ble det målt basalt og insulinstimulert glukoseopptak ved hjelp av en radioaktiv glukoseisotop (2-[³H(G)]deoxy-D-glukose) over en periode på 15 min eller 4 timer. Cellene ble først vasket to ganger med forvarmet (37°C) opptaksbuffer (Appendiks 6.4) og deretter preinkubert med glukose og legemiddel løst i opptaksbuffer. Kontrollen ble preinkubert med tilsvarende mengde DMSO. Kontrollen på uspesifikt glukoseopptak, det vil si ikke-mediert av transportere (GLUT1 og 4), ble preinkubert med Cytochalasine B (Cyt B). Deretter ble cellene satt på is og vasket 3 ganger med 1 mL iskald PBS buffer (høstebuffer, Appendiks 6.5) i hver brønn. Det ble deretter tilsatt 0,5 mL 0,05 M NaOH i hver brønn slik at cellene lyserte. Etter at de hadde stått i 30 minutter ble celleskraper brukt til å samle opp celleresten i endorfrør. Cellene ble deretter sonikert i

10 sek. Glukoseopptaket ble kvantifisert som celleassosiert radioaktivitet ved hjelp av scintillasjonstelling på Packard 1900 TR liquid scintillation analyzer. Målingene for cyt B i hvert forsøk ble trukket fra de andre målingene i forsøket for at resultatet ikke skulle være påvirket av uspesifikt glukoseopptak.

2.2.4 Glukosetelling (scintillasjonstelling)

300 μL av cellelysatsen ble tatt ut og tilsatt 3 mL scintillasjonsvæske. Det ble tatt ut 3x50 μL av inkubasjonsmediene, disse ble óg tilsatt 3 mL scintillasjonsvæske og kontroll telt. Tritium er en ustabil isotop som emitterer beta-partikler. Ved hjelp av scintillasjonsvæsken fører hver beta-emisjon til en puls av lys som detekteres av scintillasjonstellersen.

2.2.5 Måling av totalprotein

2 x 10 μL prøve og standarder (se tabell 2.1.) ble tilsatt i mikrotiterplater. 200 μL fargereagens (Bio-Rad, Appendiks 6.6) ble tilsatt i hver brønn. Brettet stod i 5 minutter før det ble målt absorbans på plateleseren, Wallace Victor³ 1420 multilabel counter, ved 595 nm.

Tabell 2.1 Fortynning av proteinstandard (BSA, Bovint serum albumin) i 0,05 M NaOH til standardkurven ved måling av totalprotein

Standard	BSA i $\mu\text{g/mL}$
1	0
2	40
3	80
4	160
5	300
6	400
7	500

2.3 Fosforylert Akt

2.3.1 Prøveopparbeidelse til westernblott

Etter preinkubering med immunosuppressiva i 1-4 døgn ble cellekulturene skylt 2 ganger med PBS og tilsatt 100 µL Sample buffer (Appendiks 6.7) i hver brønn. Celleskrape ble brukt til å løsne cellene og de ble overført til rør som tåler koking. 3 og 3 brønner ble behandlet likt, disse ble overført til samme rør. Rørene ble satt på is før de ble kokt på vannbad (100 °C) i 5 minutter. 25µL ble tatt av til proteinmåling før beta-mercaptoetanol og brom-fenolblått, henholdsvis 10 % og 5 %, ble tilsatt (Lammelbuffer, Appendiks 6.12). Prøvene ble deretter kokt i nye 5 minutter før de ble fryst (-20 °C). Dette for å denaturere og for å få proteinene til å brette seg fullstendig ut. Deretter legger SDS'en, fra samplebufferen, seg rundt proteinene med negativ ladning og beta-mercaptoetanol hindrer nydannelse av disulfidbroer.

2.3.2 Proteinmåling til westernblott

10 µL prøve ble tilsatt 25 µL destillert vann og 0,7 mL reagens. Reagensen er fra Pierce BCA Protein assay reagent. 50 deler reagens A (Bicinchoninic acid) og 1 del reagens B (4 % CuSO₄) blandes og tilsettes prøvene. Prøvene settes i varmeskap (60 °C) i 30 minutter. Prøvene avkjøles og fordeles i mikrotiterplater, 300 µL med 2 paralleller på hver prøve. Standardkurven lages ved å fortynne BSA i samplebuffer som er fortynnet 1:3,5 i vann. Avlesning ved 590 nm på plateleser (Victor).

2.3.3 Gel-elektroforese

Proteinene fra prøven ble separert i forhold til molekylvekt ved bruk av gel-elektroforese. En 10 % polyakrylamidgel (Appendiks 6.8) ble støpt og tilsatt 200 µL isobutanol på toppen. Dette gjøres for å unngå luftbobler. Etter 1 time ble isobutanolen vasket av og 4 % Stack gel (Appendiks 6.9) ble støpt. Etter 45 min var gelen ferdig til bruk. Det ble tilsatt utregnede mengder prøver i brønnene, slik at det ble lik mengde protein i hver brønn basert på proteinmålingene på plateleseren (Victor). Standard (SDS-PAGE Molecular Weight Standar,

Low Range) ble tilsatt i en brønn på hver gel. Gel-elektroforese ble kjørt på 200 V i ca 1 time og proteinene ble separert i bånd etter molekylvekt.

2.3.4 Blotting

Gelene ble deretter blottet over på membraner ved 100 mA i 45 minutter for å gjøre proteinene tilgjengelig for deteksjon med antistoff. De ladede proteinene vandret fra gelen til membranen mens de beholder posisjonene de hadde i gelen. Proteinene ble eksponert i et tynt overflatelag for deteksjon ved denne blottingen. For å unngå uspesifikk binding av antistoffet til proteiner i membranene ble de vasket og blokket i en uttynnet løsning av proteiner, her kald, fettfri tørrmelk løst i T-TBS, ved romtemperatur og risting.

2.3.5 Deteksjon og kvantifisering

Primært antistoff i overskudd ble tilsatt og inkubert over natten, deretter vasket av. Det ble så tilsatt peroksydasemerket sekundært antistoff (HRP) løst i blotto (Appendiks 6.10) og inkubert i 45-60 minutter. Sekundært antistoff i overskudd ble vasket av. Membranene ble skylt og vasket med T-TBS (Appendiks 6.11). Membranene ble deretter inkubert i ECL-reagens i 1 minutt, pakket inn i plastfolie og lagt på film og eksponert i mellom 15 sekunder og 10 minutter. Prinsippet for ECL er at det emitteres lys som et resultat av en kjemisk reaksjon. HRP er festet til molekylet av interesse. Lokalt vil denne katalysere omdannelsen av ECL-reagenten til en lysømfintlig agent. Kvantefisering ble gjort ved hjelp av dataprogrammet Gene Tools from SynGene. Blottene ble scannet inn og behandlet manuelt i GeneTools. Dette programmet måler optisk tetthet i båndene på westernblottet. Se Appendiks 6.19– 6.22 for mer utfyllende metode.

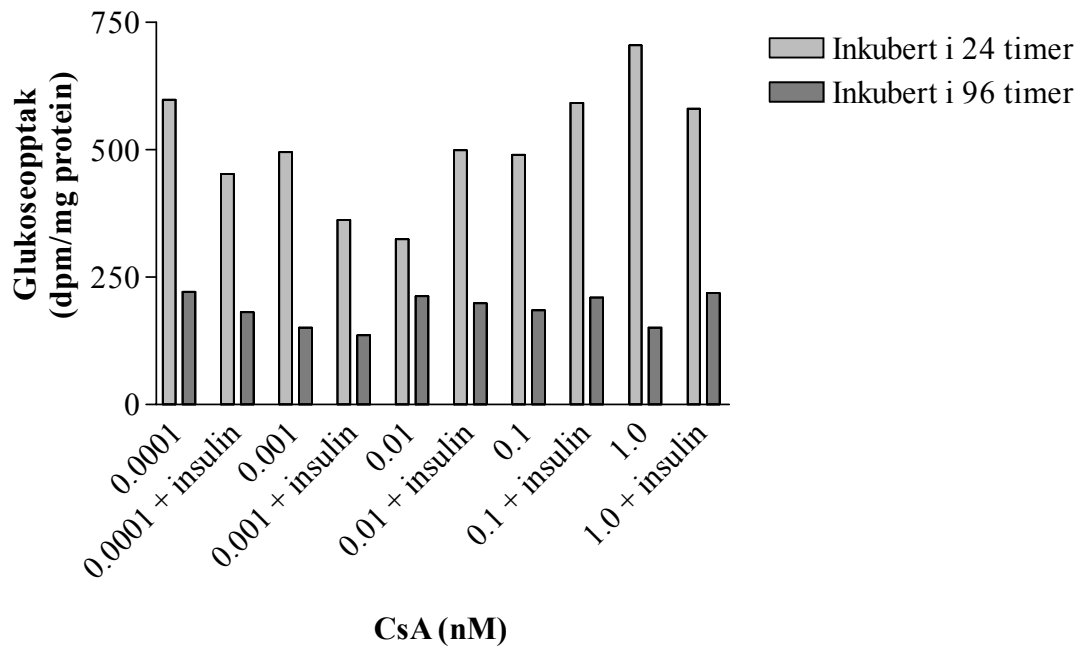
3. Resultater og diskusjon

3.1 Glukoseopptak

Glukoseopptak er en metode for å måle opptak av glukose *in vitro* i humane muskelceller ved hjelp av en radioaktiv glukose merket med en radioaktiv isotop. Cellene kan inkuberes med legemidler og stimuleres med insulin. Glukosetellingen gjøres ved hjelp av en scintillasjonsteller som registrer beta-emisjonene fra den radioaktive glukoseisotopen. Denne metoden er et direkte mål på glukoseopptaket via GLUT-reseptorene, hvor GLUT4 og GLUT1 er de viktigste.

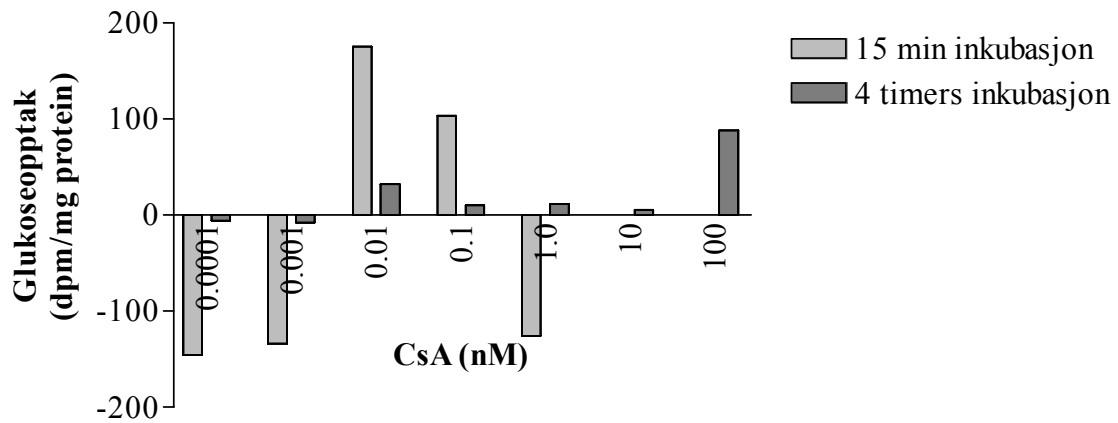
3.1.1 Optimalisering av glukoseopptak

Først ble inkubasjonstid av cellene prøvd ut for de ulike legemidlene. Cellemodellen har vært brukt tidligere til andre forsøk [57]. Det ble ikke observert store forskjeller mellom inkubasjonstid på 24 og 96 timer, men glukoseopptak per mg protein var høyere ved 24 timer enn ved 96 timers inkubasjon (figur 3.5). Både 24 og 96 timers inkubasjon ville antageligvis kunne gi resultater tilsvarende langtidseffekter av legemidlene på muskelceller, derfor ble det valgt å bruke i hovedsak 24 timers inkubasjoner videre.



Figur 3.5 Sammenligning av inkubasjonstid. Cellene ble preinkubert med ulike konsentrasjoner av CsA i henholdsvis 24 og 96 timer. dpm; desintegrasjoner per minutt.

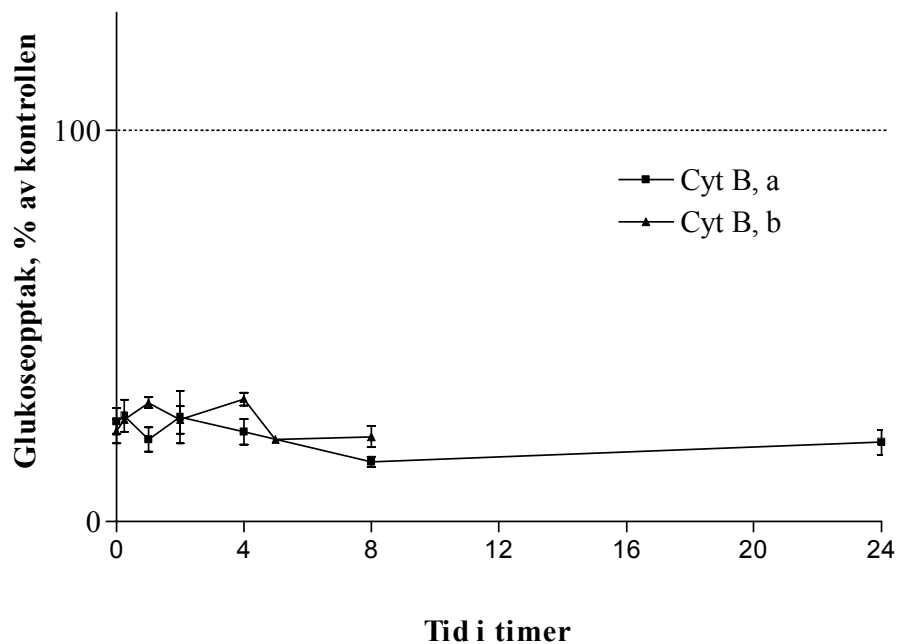
I samtlige forsøk var det vanskelig å reprodusere insulinresponsen. Insulinbatchen som ble brukt (Insulin Actrapid) var ca 1 år gammel, derfor ble ny insulin anskaffet. Ny insulin ble brukt til resten av forsøkene, men så ikke ut til å ha noe innvirkning på insulinresponsen hos cellene. Siden det ikke så ut som det var insulinen som var problemet ble det forsøkt å øke glukoseopptaket fra 15 minutter til 4 timer. Insulin og immunosuppressiva ble tilsatt samtidig med opptaksbuffer og cellene inkubert i 4 timer. Dette gav heller ikke ønsket utslag i økt insulinstimulert glukoseopptak (figur 3.6), og 15 minutters inkubering med insulin ble gjenopptatt.



Figur 3.6 Sammenligning av Δ insulin på grunnlag av forskjell i tid på glukoseopptak med insulin tilstede.

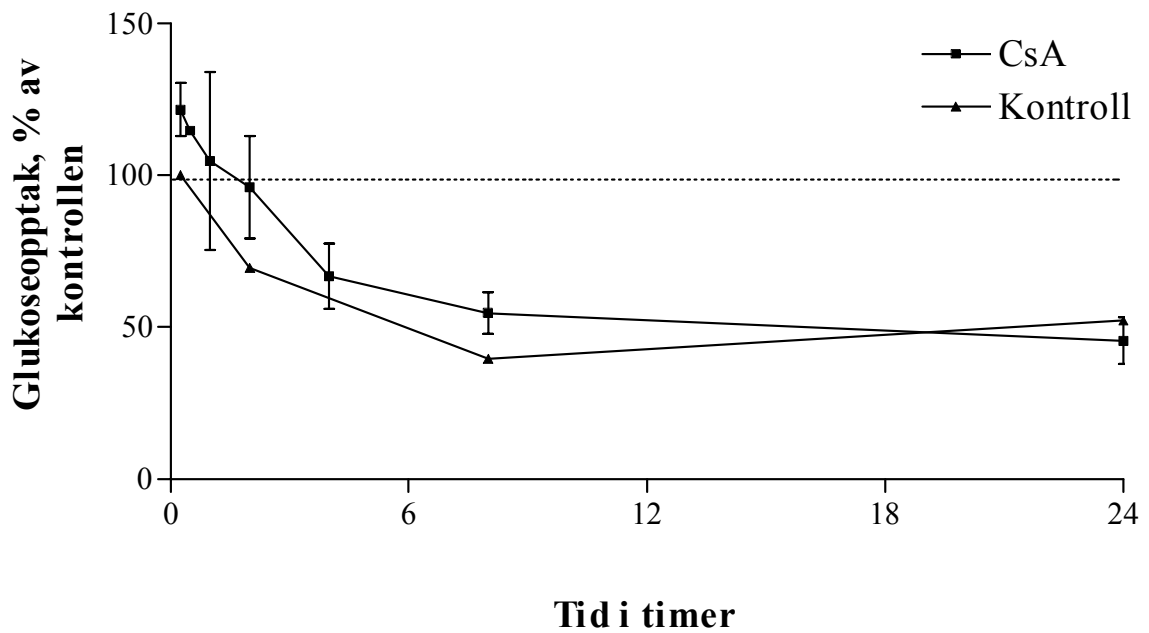
Cellene ble preinkubert med ulike konsentrasjoner av CsA, og glukoseopptak med insulinstimulering i henholdsvis 15 min og 4 timer. dpm; desintegrasjoner per minutt.

Siden det ikke ble sett noen utslag i opptak av glukose ble det sjekket at det ikke var andre uspesifikke mekanismer enn GLUT4-opptaket av glukose som var av interesse. Dette ble testet ved å tilsette cyt B til alle konsentrasjoner av CsA i stedet for insulin over tid. Cyt B hemmer glukosetransporterne og brukes for å kontrollere for uspesifikt opptak av glukose (ikke-mediert av transportere (GLUT)). Dette ble gjort for å se om CsA induerte andre effekter enn de vi hadde sett på hittil. Resultatene viste ingen slike effekter (figur 3.7).



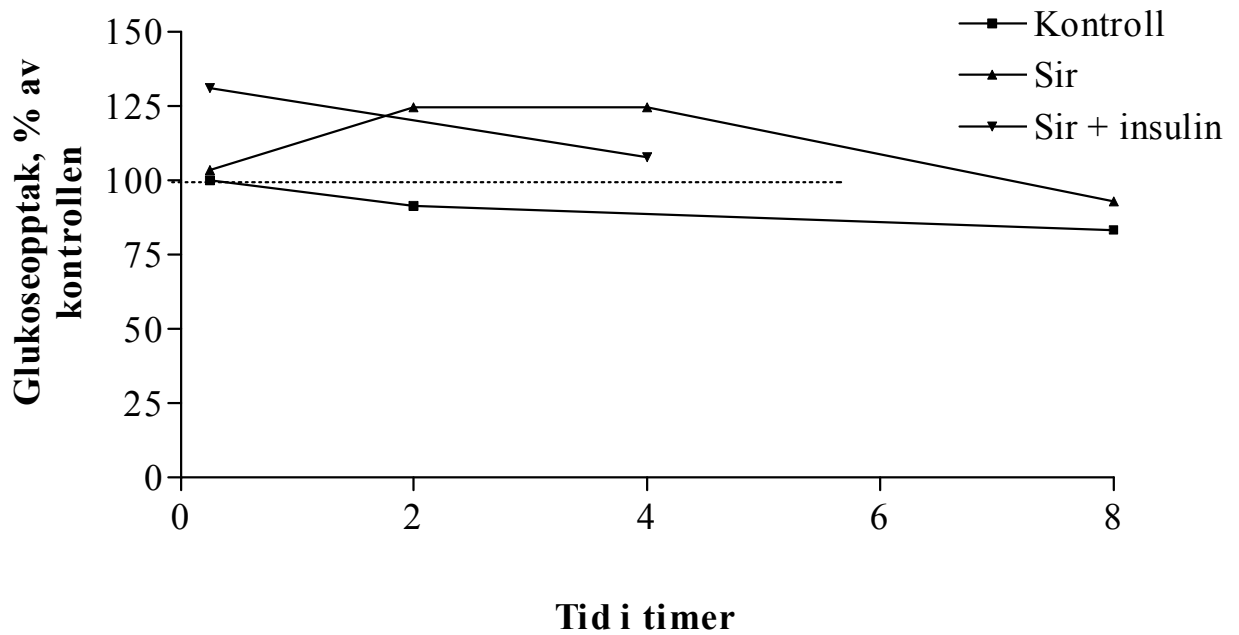
Figur 3.7 Uspesifikt glukoseopptake. Cyt B tilsatt hver uttagning av prøve over tid for å se om CsA kunne virke inn på det uspesifikke glukoseopptaket. Cellene ble inkubert med 1 nM CsA i 15 min - 24 timer i to forskjellige forsøk (a og b), og ble insulinstimulert på hvert nivå. N=3 unntatt på kontrollene der n=6.

En annen mulighet for at det var vanskelig å reproducere insulinresponsen var at den eventuelle hemmende effekten til legemidlene var målbar etter ulik tid. Ifølge Buren et al (2002) er det forskjell på basalt og insulinstimulert glukoseopptak etter inkubering med Dex (0,3 $\mu\text{mol/L}$) over tid i adipocytter. De fant at den største forskjellen mellom basal og insulinstimulert opptak var etter 2 timer, mens den største Dex-induserte forskjellen på basalopptaket kom etter 24 timer [58]. Det ble deretter prøvd å finne ut om CsA kunne virke inn på glukoseopptaket i muskelcellene over tid. Dette ble gjort ved å ta av mediet og tilsette opptaksbuffer (Appendiks 6.4) med immunosuppressive legemidler. Basalt og insulinstimulert glukoseopptak ble gjort i 15 minutter med ”varm” og ”kald” glukose samt immunosuppressiva tilstede (figur 3.8). Den effekten som ble vist kan ikke tilskrives CsA, men derimot differensieringsmediet cellene ble inkubert i. Dette mediet inneholder blandt annet glukose, insulin og serum (Appendiks 6.3). Etter ca 8 timer er ikke effekten av differensieringsmediet lengre tydelig og glukoseopptaket stabiliserer seg.



Figur 3.8 CsA inkubert over ulike tid i opptaksbuffer, CsA-konsentrasjon på 1 nM. N=3 på CsA unntatt ved 1 og 24 timer, der n=2; n=1 på kontrollene.

Effekten av Sir ble og testet over tid (se figur 3.9). På de forgående forsøkene med CsA hadde man bare vist effekten av differensieringsmediet, derfor ble cellene i dette forsøket preinkubert med differensieringsmedium frem til glukoseopptaket i stedet for opptaksbuffer.



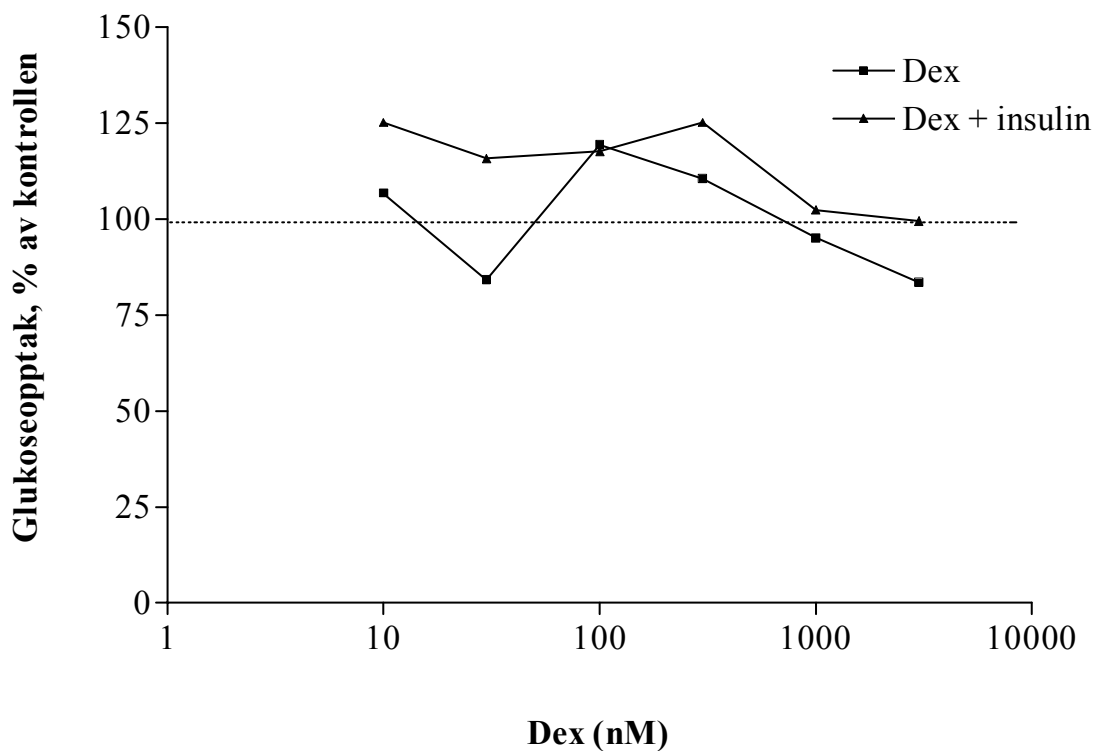
Figur 3.9 Sir inkubert over ulik tid i differensieringsmiddel. Sir-konsentrasjon på 1 nM. N=1 på alle punkter. Cellene preinkubert med differensieringsmiddel frem til glukoseopptak, da er det skiftet til opptaksbuffer (15 minutter).

Grunnen til forskjell i effekt av opptak av glukose mellom disse to oppsettene er hvilket medium cellene ble preinkubert med. I forsøkene med CsA ble differensieringsmediet tatt av før preinkubering og deretter ble opptaksbuffer med immunosuppressiva tilsatt. Siden cellene skulle preinkuberes med CsA over ulik tid, ble det også forskjell i tiden cellene stod uten differensieringsmedium. Differensieringsmedium (Appendiks 6.3) inneholder blant annet insulin, serum og glukose. Dette vil sannsynligvis føre til bedre opptak av glukose under forsøk. Som man kan se av figur 3.8 så avtar denne effekten med tid, og etter ca 8 timer har ikke differensieringsmediet lengre påviselig innvirkning. Til sammenligning ser man ikke det samme avtagende glukoseopptaket i figur 3.9, hvor alle cellene ble preinkubert med differensieringsmedium helt frem til glukoseopptaket før det ble det byttet til opptaksbuffer.

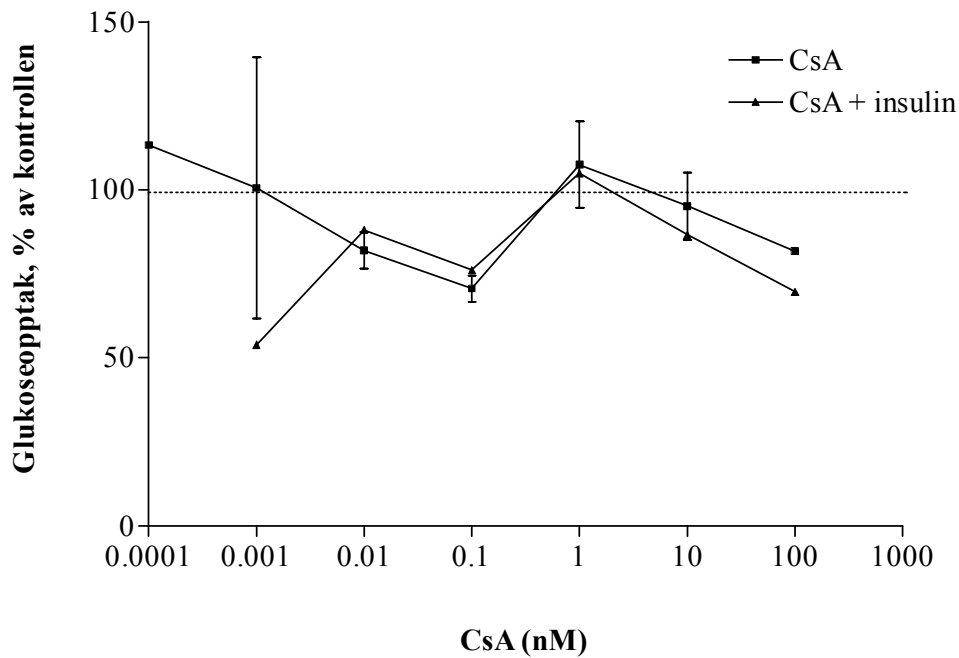
Det ble óg benyttet celler fra ulike donorer underveis. Dette for å være sikker på at ikke en donor hadde andre egenskaper for opptak av glukose, eller påvirkning av legemidler enn andre. Det ble ikke funnet forskjeller i egenskapene til cellene fra ulike donorer.

3.1.2 Effekter på glukoseopptak

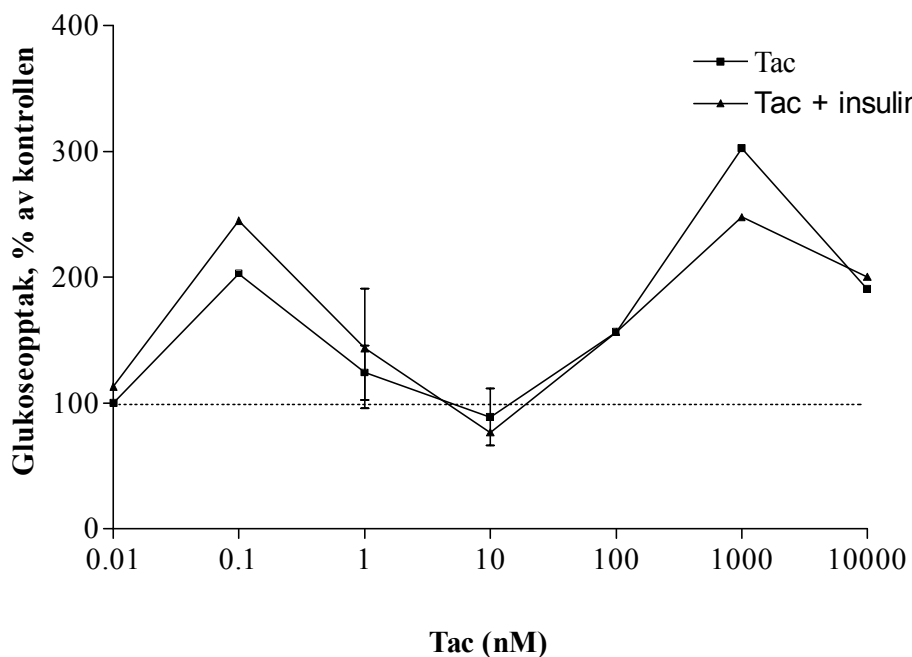
Hver prøve har blitt undersøkt i triplikater, både med og uten akutt insulinstimulering. Cellene er preinkubert i 24 timer med de ulike immunosuppressive legemidlene oppløst i DMSO. Kontrollene er preinkubert med tilsvarende mengde DMSO (maksimal konsentrasjon 0,1 %). Resultatene viser en viss nedgang i opptak av glukose ved tilsetning av Dex samt en korresponderende nedgang ved insulinstimulering (figur 3.1). Det er tidligere vist at Dex senker både basalt og insulinstimulert glukoseopptak [58]. For de andre legemidlene er resultatene noe varierende. Forsøkene med CsA (figur 3.2), Tac (figur 3.3) og MPA (figur 3.3) er ikke entydige nok og har for stor variasjon til å kunne konkludere med noen spesifikk effekt.



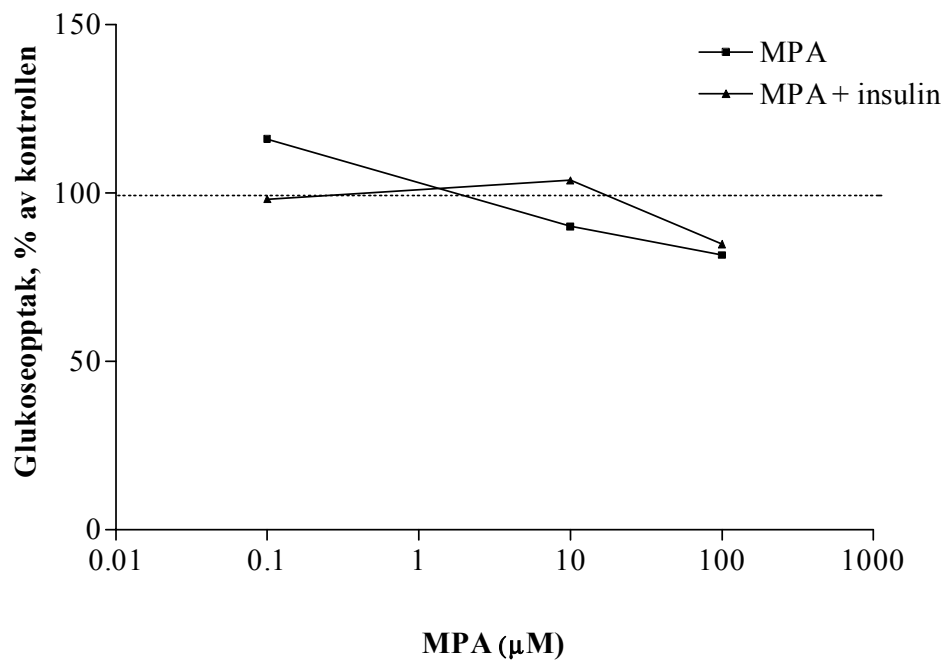
Figur 3.1 Glukoseopptak med Dex. Cellene ble inkubert med 10-3000 nM Dex i 24 timer og insulinstimulert i 15 minutter på hvert nivå. N=1 på alle punkter.



Figur 3.2 Glukoseopptak med CsA. Cellene ble inkubert med 0,001-100 nM CsA i 24 timer og insulinstimulert i 15 minutter på hvert nivå. N=2 på CsA unntatt 0,0001 og 100 nM der n=1, n=1 på alle CsA + insulin.



Figur 3.3 Glukoseopptak med Tac. Cellene ble inkubert med 0,01-10 000 nM Tac i 24 timer og insulinstimulert i 15 minutter på hvert nivå. N=1 på Tac og Tac + insulin unntatt 1 og 10 nM der n=2.



Figur 3.4 Glukoseopptak med MPA. Cellene ble inkubert med 0,1-100 µM MPA i 24 timer og insulinstimulert i 15 minutter på hvert nivå. N=1 på MPA og MPA + insulin.

Ingen effekt på glukoseopptak ble funnet slik det ble utført her. Da man heller ikke fikk tydelige og reproducerbare effekter av insulin på glukoseopptak, tyder på at dette ikke er en egnet metode. Det ble vurdert om en annen metode kunne gi bedre resultater på hvorvidt de immunosuppressive legemidlene påvirker muskelcellene direkte.

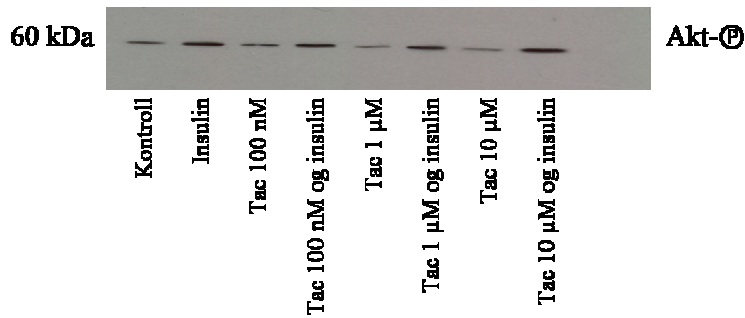
3.2 Fosforylert Akt

Westernblott av fosforylert Akt (PKB) ble valgt som alternativ metode på undersøke immunosuppressive legemidlers effekt på muskelcellers følsomhet for insulin etter at glukoseopptak ikke førte frem. Westernblott ble valgt av blant annet to grunner; samme metode for celledyrkning ble brukt til westernblott som til glukoseopptak, og at metoden allerede var godt etablert på laboratoriet. Markøren fosforylert Akt ble valgt da fosforyleringen av Akt er en sentral del av insulinsignaleringskaskaden (figur 1.1). Måling av denne markøren kunne gi indirekte informasjon om glukoseopptaket da denne er med i reguleringen av GLUT4-translokasjon som fører til økt glukoseopptak som respons til insulin.

En *in vitro* studie i rottemuskler viste at det insulinstimulerte glukoseopptaket var signifikant redusert i celler som var behandlet med CsA, mens insulinbindingen ikke var forandret. Dette kan tyde på at CsA kan virke inn på signaleringskaskaden nedstrøms for insulins binding til reseptor [45]. Analyser av fosforylert Akt vil sannsynligvis kunne fange opp en slik effekt.

Westernblott er en metode for å detektere et spesifikt protein i en prøve. Gel-elektroforese brukes for å separere denaturerte proteiner etter molekylvekt. Proteinene blir deretter overført fra gelen til en membran, hvor de blir merket ved å bruke et antistoff som er spesifikt for proteinet. Ved hjelp av dette kan man undersøke mengden av proteinet i en gitt prøve og sammenligne med andre prøver (se figur 3.10).

Det ble brukt Enhanced Chemiluminescence (ECL) westernblotting som er en lys-emitterende ikke-radioaktiv metode for deteksjon av demobiliserte spesifikke antigen, direkte eller indirekte ved hjelp av Horseradish Peroxidase (HRP) merkede antistoff.

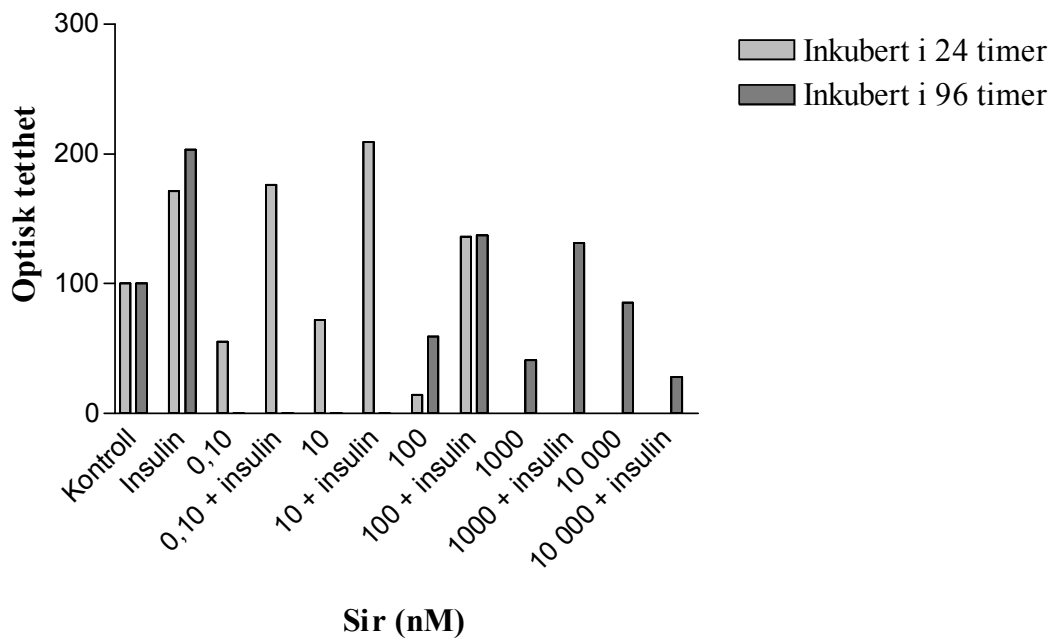


Figur 3.10 Eksempel på resultat av westernblott, målt på fosforylert Akt. Humane muskelceller i kultur stimulert med Tac i ulike konsentrasjoner i 24 timer, med både basal og akutt insulinstimulering.

3.2.1 Optimalisering av fosforylert Akt

Hvert dosenivå ble her kun undersøkt med en parallell, men både med og uten akutt insulinstimulering (15 minutters inkubering). Også her ble inkuberingstiden med legemidlene testet. 24 og 96 timers inkuberingstid ble testet på både CsA og Sir, og ingen store forskjeller i resultater ble funnet (figur 3.11). Ved 96 timers inkubasjon ble dosenivåene i tillegg økt for å se hvor mye systemet kunne stresses. En mulig uønsket konsekvens ved å øke dosene av legemidlene *in vitro* er faren for toksisitet og celledød. Ved den høyeste konsentrasjonen av CsA, 10 000 nM, døde halvparten av cellene. På grunnlag av dette ble 96 timers inkubasjon utelukket.

Det er mulig at økt toksisitet for cellene kan gi misvisende testresultater. Ved celledød er mange signalveier involvert og det er godt mulig at noen av disse kan interferere med glukoseopptak og/eller fosforyleringen av Akt.



Figur 3.11 Sammenligning av inkubasjonstid. Cellene preinkubert med ulike konsentrasjoner av Sir i henholdsvis 24 og 96 timer. Ved 24 timer er konsentrasjonene 0,1, 10 og 100 nM, og ved 96 timer er konsentrasjonene 100, 1 000 og 10 000 nM.

Akutt og kronisk effekt ble testet på både CsA og Sir. Dette ble gjort ved å inkubere ved henholdsvis 1 og 24 timer med disse stoffene. Verken CsA eller Sir ga endring i mengde fosforylert Akt på westernblott. Det er tidligere vist i en studie at fosforylering av Akt ikke endres ved inkubering med Dex over kort tid (2 og 8 timer), men over 24 timer [58]. Det ble derfor valgt å inkubere i 24 timer som med forsøkene på glukoseopptak.

Analysen av fosforylert Akt gav ikke alltid klare og tydelige bånd som ønsket. Noen av forsøkene hadde forholdsvis lav mengde protein og dette førte til at det var vanskelig å få frem tydelige resultater. Hver gang dette skjedde ble westernblottet kjørt på nytt til resultatet var tilfredsstillende.

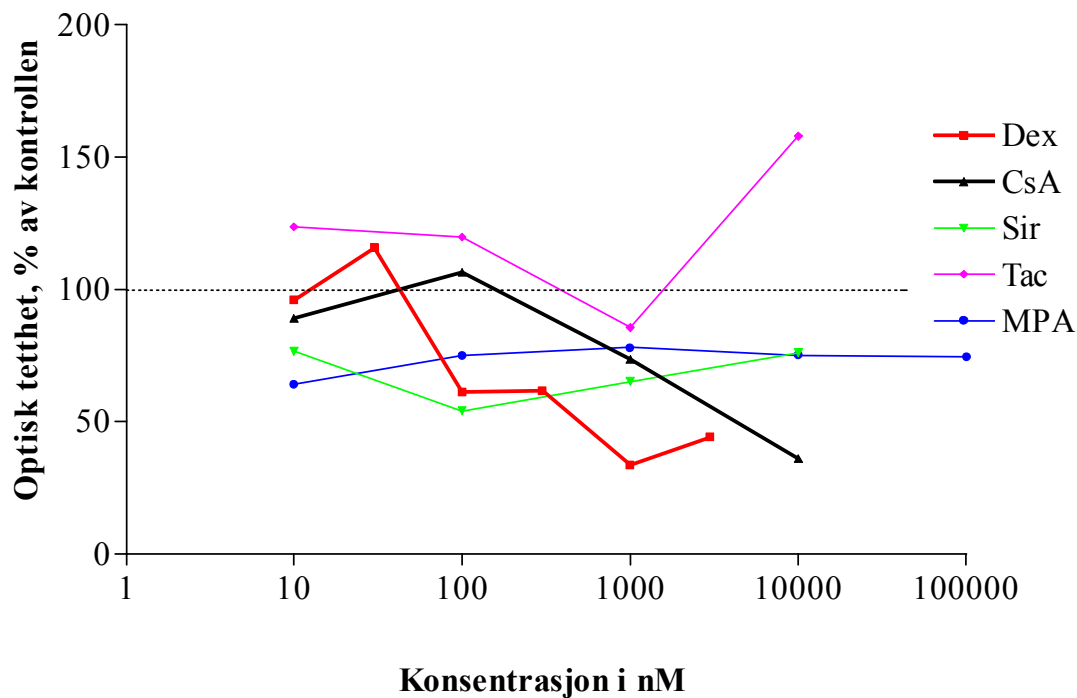
3.2.2 Effekter på fosforylert Akt

Det ble gjort westernblott med alle de legemidlene som var testet på glukoseopptak (Dex, CsA, Tac, Sir og MPA). De første forsøkene har kun en kontroll, men etter hvert ble dette økt

til to i hvert forsøk for å forsikre at disse ble mest mulig korrekt bestemt da resten av resultatene er relatert til disse kontrollmålingene.

Forsøkene ble gjort ved legemiddelkonsentrasjoner fra 0,01 nM til 100 μ M. Både basalt (figur 3.12) og insulinstimulert fosforylert Akt (figur 3.13) ble målt. Ved konsentrasjonene 0,01 nM til 1 nM var det lite utslag på regulering av fosforylert Akt (Appendiks, figur 6.9-6.10).

Derfor er det valgt å fokusere på resultatene mellom 10 nM og 100 μ M.

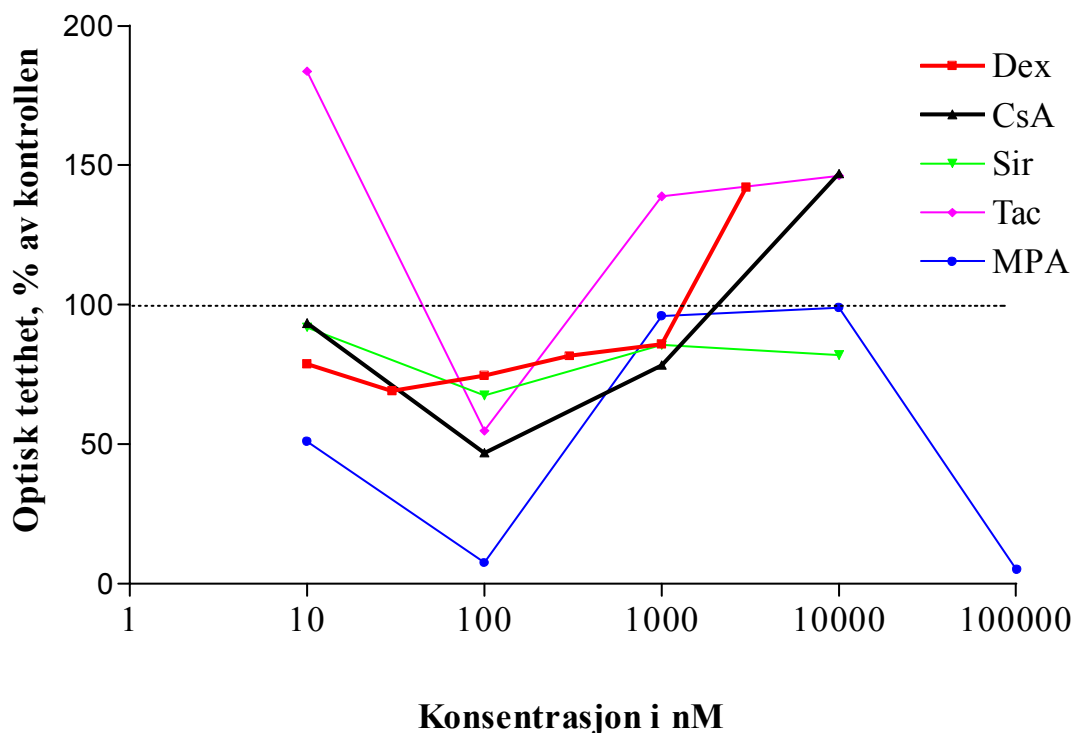


Figur 3.12 Immunosuppressive legemidlers effekt på fosforylering av Akt. Uten insulinstimulering.

Cellene ble inkubert med immunosuppressiva i 24 timer og det ble målt på basalt opptak uten insulinstimulering. Dex, dexamethason n=3; CsA, ciklosporin n=3, unntatt 1 μ M og 10 μ M der n=2; Sir, sirolimus n=3, unntatt 1 μ M og 10 μ M der n=2; Tac, tacrolimus n=3, unntatt 100 nM der n=2; MPA, mykofenolsyre n=2, unntatt 100 nM og 100 μ M der n=1. For rå-data på det enkelte legemidlet se Appendiks, figur 6.3-6.7.

Dex ser her ut til å gi en hemmende effekt på den basale fosforyleringen av Akt, og den hemmende effekten øker med dosen legemiddel. Dette har blitt vist tidligere for Dex [59]. CsA ser her ut til å gi en respons lignende Dex. MPA og Sir gir minimale utslag, mens Tac viser høy variasjon (figur 3.12).

For forsøkene med insulinstimulerte celler ble det valgt å presentere resultatene som Δ insulin for å få frem insulineffekten på cellene (figur 3.13).



Figur 3.13 Immunosuppressive legemidlers effekt på fosforylering av Akt. Insulinstimulert i 15 minutter.

Cellene ble inkubert med immunosuppressiva i 24 timer og gitt 15 minutters insulinstimulering. Dex, dexamethason n=3, unntatt 10 nM der n=2; CsA, ciklosporin n=3, unntatt 1 μ M og 10 μ M der n=2; Sir, sirolimus n=3, unntatt 1 μ M og 10 μ M der n=2; Tac, tacrolimus n=3, unntatt 100 nM der n=2; MPA, mykofenolsyre n=2, unntatt 100 nM og 100 μ M der n=1. For rå-data på det enkelte legemidlet se Appendiks, figur 6.3-6.7.

Dex, CsA og Tac ga en økende effekt på den akutte insulinresponsen, mens MPA og Sir ikke ser ut til å gi noen utslag i den akutte insulinresponsen (figur 3.13).

I figur 3.13 er det kun 2 paralleller på Dex 10 nM da det ene resultatet på insulinstimulert respons ble vurdert til å være en uteligger (Appendiks, figur 6.8).

Burén et al (2002) viste i sin studie på rotteadipocytter at korttidseksponering (10 min) med insulin ga økt fosforylering av Akt både på kontrollen og på celler behandlet med Dex i 24 timer [58]. For Sir fant Berg et al (2002) at legemidlet alene ikke hadde effekt på insulinstimulert fosforylering av Akt [53]. Begge disse undersøkelsene stemmer overens med

resultatene i figur 3.13. Langtids- versus korttidsinkubering med insulin kan gi forskjellige utslag i glukosemetabolismen. Ved diabetes 2 er hyperinsulinemi et problem som forverrer den perifere IR. Denne forskjellen i insulinstimulering kan man ikke se i disse forsøkene. Ved langtidsinkubering av insulin (12 timer) ble det vist at antall insulinreseptorer økte når cellene blir co-inkubert med Dex, mens antallet reseptorer sank ved langtids tilsetning av insulin til cellene alene [59]. Ved økt mengde insulin nedreguleres antall reseptorer på celleoverflaten [60], og dette blir fulgt av en samtidig senkning i responsen til den insulinstimulerte glukosetransporten [61].

Det er gjort lite forskning på perifer insulinresistens i muskler ved bruk av immunosuppressiva, derfor er det lite materiale å sammenligne resultatene med. Det er flere variabler som må tas med når resultatene skal vurderes og sammenlignes med funn fra *in vivo* forsøk. For eksempel er inkuberingstid henholdsvis med legemidler og insulin, samt konsentrasjonen av legemidler viktige parametre i denne sammenhengen. Legemidlenes intracellulære konsentrasjon er kun estimert og ikke målt i muskelceller. Dessuten er de fleste immunosuppressiva brukt i kombinasjon med hverandre, og det er derfor mulighet for endringer i den diabetogene effekten av det enkelte legemidlet ved ulike terapisammensetninger. Nedbrytning av legemidlene og metabolittenes effekt på systemet kommer ikke med i et enkelt *in vitro* oppsett.

For calcineurinhemmerene er det uvisst hvor mye hemmingen av calcineurin, og dens evne til å indusere transformasjon av skjelettmuskelfibre fra fast twitch til slow twitch, har å si for utviklingen av perifer IR i muskelceller. I cellekulturene som brukes *in vitro* er det for det meste fast twitch muskelfibre. Disse har lavere mengde GLUT4-protein og dårligere insulinsensitivitet enn slow twitch muskelfibrene. Dette kan gi dårligere respons enn ønsket og det kan bli vanskeligere å få gode resultater. Da relativt små utslag i glukoseopptaket vil medføre reduserte muligheter for deteksjon i endringer i opptaket. Ved en forandring i muskelcellenes fenotype som konsekvens av legemiddelbruken vil ikke denne *in vitro* modellen være egnet.

4. Konklusjon og fremtidige aspekter

Effekten av immunosuppressive legemidler på glukoseopptak gav ingen tydelige effekter, og resultatene på insulinstimulert glukoseopptak var ikke reproduserbare. Det var en tendens til at den basale fosforyleringen av Akt ble senket ved langtidstilsetning av Dex og CsA, mens ingen negative utslag ble funnet som følge av tilsetning av Sir, MPA og Tac. Fosforyleringen av Akt, ved akutt insulinstimulering, viste en tendens til økning ved langtidstilsetning av Dex, CsA og Tac, mens ingen utslag ble funnet ved tilsetning av Sir og MPA.

Det hadde vært ønskelig å fortsette med westernblott av fosforylert Akt for å få flere paralleller på hvert legemiddel og konsentrasjon. Da legemidlene er mest vanlig brukt i kombinasjon [13] ville det også vært interessant å teste ut kombinasjoner av disse på cellene, for å se om dette kunne gi større utslag på glukoseopptak eller fosforyleringen av Akt. Deretter kunne det og være interessant å inkubere cellene med legemidlenes metabolitter for å se om disse kunne være mer diabetogene enn deres modersubstanser. Det kunne også være av interesse å se på cellenes reaksjon til stimulering over lang tid med insulin (12 timers inkubasjon), for å se om dette gav andre resultater enn akutt stimulering med insulin (15 minutter) i kombinasjon med immunosuppressiva.

5. Referanser

1. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. Fifth ed. 2003: Churchill Livingstone. 385-387.
2. Jindal, R.M., et al., *Post-transplant diabetes mellitus. The role of immunosuppression*. *Drug Safety*, 1997. **16**(4): p. 242-257.
3. Nam, J.H., et al., *beta-Cell dysfunction rather than insulin resistance is the main contributing factor for the development of postrenal transplantation diabetes mellitus*. *Transplantation*, 2001. **71**(10): p. 1417-1423.
4. Weir, M. and J. Fink, *Risk for posttransplant diabetes mellitus with current immunosuppressive medications*. *American Journal of Kidney Diseases*, 1999. **34**(1): p. 1-13.
5. Vander, A., et al., *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. Vol. Eighth Edition. 2001: McGraw-Hill Higher Education. 607-610.
6. Hjelmessaeth, J., et al., *The impact of impaired insulin release and insulin resistance on glucose intolerance after renal transplantation*. *Clinical Transplantation*, 2002. **16**(6): p. 389-396.
7. Midtvedt, K., et al., *Insulin resistance is a common denominator of post-transplant diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in renal transplant recipients*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1998. **13**(2): p. 427-431.
8. Cosio, F.G., et al., *Post-transplant diabetes mellitus: Increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years*. *Kidney International*, 2001. **59**(2): p. 732-737.
9. Polastri, L., et al., *Secretory defects induced by immunosuppressive agents on human pancreatic [beta]-cells*. *Acta Diabetologica*, 2002. **39**(4): p. 229.
10. Taylor, A.L., et al., *Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2005. **56**(1): p. 23-46.
11. Hagen, M., et al., *A 6-year prospective study on new onset diabetes mellitus, insulin release and insulin sensitivity in renal transplant recipients*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003. **18**(10): p. 2154-2159.
12. Teutonico, A., et al., *Glucose Metabolism in Renal Transplant Recipients: Effect of Calcineurin Inhibitor Withdrawal and Conversion to Sirolimus*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(10): p. 3128-3135.

13. Leivestad, T., *Norsk Nefrologiregisters rapport 2003*.
14. Robert C. Andrews, B.R.W., *Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets*. *Clinical Science*, 1999. **96**(5): p. 513-523.
15. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
16. Bevan, P., *Insulin signalling*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(8): p. 1429-1430.
17. Rudberg, I., *Electrical Stimulation of Human Skeletal Muscle Cells as a Model of Exercise; Effects on Insulin Signalling and Glucose Metabolism (Hovedfag)*. 2003.
18. Watson, R.T. and J.E. Pessin, *Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation*. *Recent Progress in Hormone Research*, 2001. **56**: p. 175-193.
19. Saltin, B. and P.D. Gollnick, *Handbook of Physiology*. 1983. 555-632.
20. Hintz, C.S., et al., *Metabolite changes in individual rat muscle fibers during stimulation*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1982. **242**(3): p. C218-228.
21. Lillioja, S., et al., *Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man*. *J Clin Invest*, 1987. **80**(2): p. 415-424.
22. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(6): p. 2802-2808.
23. Chin, E.R., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type*. *Genes Dev.*, 1998. **12**(16): p. 2499-2509.
24. Ryder, J.W., et al., *Skeletal Muscle Reprogramming by Activation of Calcineurin Improves Insulin Action on Metabolic Pathways*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**(45): p. 44298-44304.
25. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. *APMIS*, 2001. **109**(11): p. 735-744.
26. Kriketos, A.D., et al., *Interrelationships between muscle morphology, insulin action, and adiposity*. *American Journal of Physiology*, 1996. **270**(6 Pt 2): p. R1332-1339.
27. Hjelmessaeth, J., et al., *Insulin resistance after renal transplantation: impact of immunosuppressive and antihypertensive therapy*. *Diabetes Care*, 2001. **24**(12): p. 2121-2126.
28. Ekstrand, A.V., et al., *Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of posttransplantation diabetes in man*. *Transplantation March*, 1992. **53**(3): p. 563-568.

29. Ekstrand, A., et al., *The effect of (steroid) immunosuppression on skeletal muscle glycogen metabolism in patients after kidney transplantation*. Transplantation March, 1996. **61**(6): p. 889-893.
30. Hjelmesaeth, J., et al., *Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age*. Transplantation, 1997. **64**(7): p. 979-983.
31. Hjelmesaeth, J., et al., *The impact of short-term cyclosporine A treatment on insulin secretion and insulin sensitivity in man*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2006: Submitted.
32. Bratanova-Tochkova, T.K., et al., *Triggering and Augmentation Mechanisms, Granule Pools, and Biphasic Insulin Secretion*. Diabetes, 2002. **51**(90001): p. S83-90.
33. Doyle, M.E. and J.M. Egan, *Pharmacological Agents That Directly Modulate Insulin Secretion*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(1): p. 105-131.
34. Donelan, M.J., et al., *Ca²⁺-dependent Dephosphorylation of Kinesin Heavy Chain on beta -Granules in Pancreatic beta -Cells. Implications for regulated beta -granule transport and insulin exocytosis*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(27): p. 24232-24242.
35. Hjelmesaeth, J., et al., *Tapering off prednisolone and cyclosporin the first year after renal transplantation: the effect on glucose tolerance*. Nephrol. Dial. Transplant., 2001. **16**(4): p. 829-835.
36. Kahan, B.D., et al., *Cyclosporin A tissue levels in a cadaveric renal allograft recipient*. Transplantation January, 1983. **35**(1): p. 96.
37. Akagi, H., et al., *Cyclosporin A and its metabolites, distribution in blood and tissues*. J Int Med Res, 1991. **19**(1): p. 1-18.
38. Ost, L., *Effects of cyclosporin on prednisolone metabolism*. The Lancet, 1984. **323**(8374): p. 451-451.
39. Dresner, L.S., et al., *Effects of cyclosporine on glucose metabolism*. Surgery, 1989. **106**(2): p. 163-169.
40. Schwaninger, M., et al., *Inhibition of cAMP-responsive element-mediated gene transcription by cyclosporin A and FK506 after membrane depolarization*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(31): p. 23111-23115.
41. Oetjen, E., et al., *The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(7): p. 982-993.

42. Lawrence, M.C., et al., *Regulation of Insulin Gene Transcription by a Ca²⁺-Responsive Pathway Involving Calcineurin and Nuclear Factor of Activated T Cells*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(10): p. 1758-1767.
43. Lawrence, M.C., et al., *NFAT Regulates Insulin Gene Promoter Activity in Response to Synergistic Pathways Induced by Glucose and Glucagon-Like Peptide-1*. Diabetes, 2002. **51**(3): p. 691-698.
44. Halestrap, A.P. and A.M. Davidson, *Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase*. Biochemical Journal, 1990. **268**(1): p. 153-160.
45. Masahito, I., et al., *In vivo and in vitro effects of cyclosporin A on glucose transport by soleus muscles of mice*. Biochemical Pharmacology, 1992. **43**(7): p. 1459-1463.
46. Montori, V.M., et al., *Posttransplantation Diabetes: A systematic review of the literature*. Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 583-592.
47. Duijnhoven, E.M.V., et al., *Influence of Tacrolimus on Glucose Metabolism before and after Renal Transplantation: A Prospective Study*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 583-588.
48. Boots, J.M.M., et al., *Glucose Metabolism in Renal Transplant Recipients on Tacrolimus: The Effect of Steroid Withdrawal and Tacrolimus Trough Level Reduction*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 221-227.
49. Harrington, L.S., et al., *Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(1): p. 35-42.
50. Rhodes, C.J. and M.F. White, *Molecular insights into insulin action and secretion*. European Journal of Clinical Investigation, 2002. **32**(s3): p. 3-13.
51. Paty, B.W., et al., *Inhibitory effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion from HIT-T15 cells and Wistar rat islets*. Transplantation, 2002. **73**(3): p. 353-357.
52. Briaud, I., et al., *Differential Activation Mechanisms of Erk-1/2 and p70S6K by Glucose in Pancreatic {beta}-Cells*. Diabetes, 2003. **52**(4): p. 974-983.
53. Berg, C.E., et al., *Rapamycin partially prevents insulin resistance induced by chronic insulin treatment*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **293**(3): p. 1021-1027.

54. Sintchak, M.D., et al., *Structure and Mechanism of Inosine Monophosphate Dehydrogenase in Complex with the Immunosuppressant Mycophenolic Acid*. Cell, 1996. **85**(6): p. 921-930.
55. Natsumeda, Y. and S.F. Carr, *Human type I and II IMP dehydrogenases as drug targets*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1993. **696**: p. 88-93.
56. Kutkuhn, B., et al., *Development of insulin resistance and elevated blood pressure during therapy with cyclosporine A*. Blood Pressure, 1997. **6**(1): p. 13-17.
57. Kase, E.T., et al., *Skeletal Muscle Lipid Accumulation in Type 2 Diabetes May Involve the Liver X Receptor Pathway*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1108-1115.
58. Buren, J., et al., *Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes*. Eur J Endocrinol, 2002. **146**(3): p. 419-429.
59. Knutson, V.P., *The acute and chronic effects of glucocorticoids on insulin receptor and insulin responsiveness. Transient fluctuations in intracellular receptor level parallel transient fluctuations in responsiveness*. J. Biol. Chem., 1986. **261**(22): p. 10306-10312.
60. Knutson, V.P., et al., *Control of insulin receptor level in 3T3 cells: effect of insulin-induced down-regulation and dexamethasone-induced up-regulation on rate of receptor inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(9): p. 2822-2826.
61. Ronnett, G.V., et al., *Insulin-induced down-regulation of insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered rate of receptor inactivation*. J Biol Chem, 1982. **257**(8): p. 4285-4291.

6. Appendiks

6.1

Utsåingsmedium

500 mL DMEM m/GLUTAMAX I
50 mL FCS (Foetal Calf Serum)
2,5 mL Pen/Strep 10 000 units/mL
2,5 mL Fungizone

6.2

Proliferasjonsmedium

500 mL DMEM m/GLUTAMAX I
10 mL FCS (Foetal Calf Serum)
10 mL Ultroser G
2,5 mL Pen/Strep 10 000 units/mL
2,5 mL Fungizone

6.3

Differensieringsmedium

500 mL DMEM m/GLUTAMAX I
10 mL FCS (Foetal Calf Serum)
2,5 mL Pen/Strep 10 000 units/mL
2,5 mL Fungizone
25 pmol insulin (21 μ L av 1000 ganger fortykning av Insulin Actrapid Penfill 0,6 nM)

6.4**Opptaksbuffer – (pH 7,4 ved 37 °C)**

140 mM NaCl
20 mM HEPES
5 mM KCl
2,5 mM MgSO₄ 7H₂O
1 mM CaCl₂ 2H₂O

6.5**PBS – Høstebuffer (pH 7,2 – 7,4)**

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

6.6**Fargereagens (Bio-Rad)**

Bio-Rad Protein Assay Dye Concentrate fortynnes 1 til 4 med destillert vann og filtreres gjennom Millipore membranfilter 0,22 µm.

6.7**Sample buffer**

12,5 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
10 mL Glycerol
20 mL 10 % SDS

6.8**10 % Polyakrylamid gel (2 stk)**

5,23 mL	dH ₂ O
3,25 mL	1,5 M Tris-Cl pH 8,8 (Appendiks 3.7)
4,33 mL	Monomer løsning
130 µL	SDS løsning (10 %) (Appendiks 3.9)
65 µL	amm.persulf. (10 %) (Appendiks 3.10)
6,5 µL	TEMED

6.9**4 % Stack gel**

6,10 mL	dH ₂ O
2,50 mL	0,5 M Tris-Cl pH 6,8 (Appendiks 3.8)
1,30 mL	Monomer løsning
100 µL	SDS løsning (10 %) (Appendiks 3.9)
50 µL	amm.persulf. (10 %) (Appendiks 3.10)
10 µL	TEMED

6.10**Blotto**

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

Varmes opp og filtreres gjennom Whatman 4 filterpapir

6.11**T-TBS (Tween – Trisbuffered salin)**

10 mM	Tris pH 7,5
100 mM	NaCl
0,05 %	Tween

6.12**Laemmelbuffer x 2**

Sample Buffer

10 % beta-mercaptoetanol

5 % (volum) bromfenolblått

6.13**Gel buffer, 1,5 M Tris-Cl pH 8,8**

36,30 g Tris (base)

Til 200 mL dH₂O*Sterilfiltreres, avgasses. Justeres til pH 8,8 med HCl.***6.14****Stack gel buffer, 0,5 M Tris-Cl pH 6,8**

3,0 g Tris (base)

Til 200 mL dH₂O*Sterilfiltreres, avgasses. Justeres til pH 6,8 med HCl.***6.15****SDS 10 %**

5,0 g SDS

Til 100 mL dH₂O*Oppbevares ved romtemperatur.***6.16****Ammonium persulfat 10 %**

5,0 g Amm. persulfat

Til 50 mL dH₂O*Fryses i småposjoner (500 µL). Kastes en dag etter tining.*

6.17**Elektroforesebuffer (2,5 L) – pH 8,3**

0,025 M Tris
0,192 M Glycin
0,1 % SDS

6.18**Blotter buffer (Western transphor buffer) - pH 8,3**

0,02 % SDS
0,025 M Tris
0,192 M Glycin
20 % Metanol

6.19**Støping av gel**

- Lag 10 % gel, og bland løsningen med pipette og støp i formen som er satt sammen på forhånd (se figur 6.1)
- Tilsett 200 µL isobutanol på hver gel (fjerner bobler)
- La stå i 1 time
- Vask isobutanolen av
- Lag 4 % Stack gel og etterfyll formen med gel
- Sett i former for brønner (kammer) og la stå i 45 minutter
- Ta platene fra hverandre og vask hver del med destillert vann. Disse kan lagres eller brukes direkte i forsøk

6.20

Gel-elektroforese

- Fyll ut skjema for westernblott (Appendiks 6.23)
- Sett gelene på plass i gelbadet
- Hell elektroforesebuffer (Appendiks 6.3.11) bak gelene og i gelbadet
- Sett på brønnmarkører, ta deretter av kammene
- Tilsett standard og prøver i brønnene
- Ta av brønnmarkørene
- Sett på støphode og sett på program med 200V i ca 1 time
- Koble til kjøleslangene
- Stopp gelene når fargebåndet har kommet helt ned

6.21

Blotting

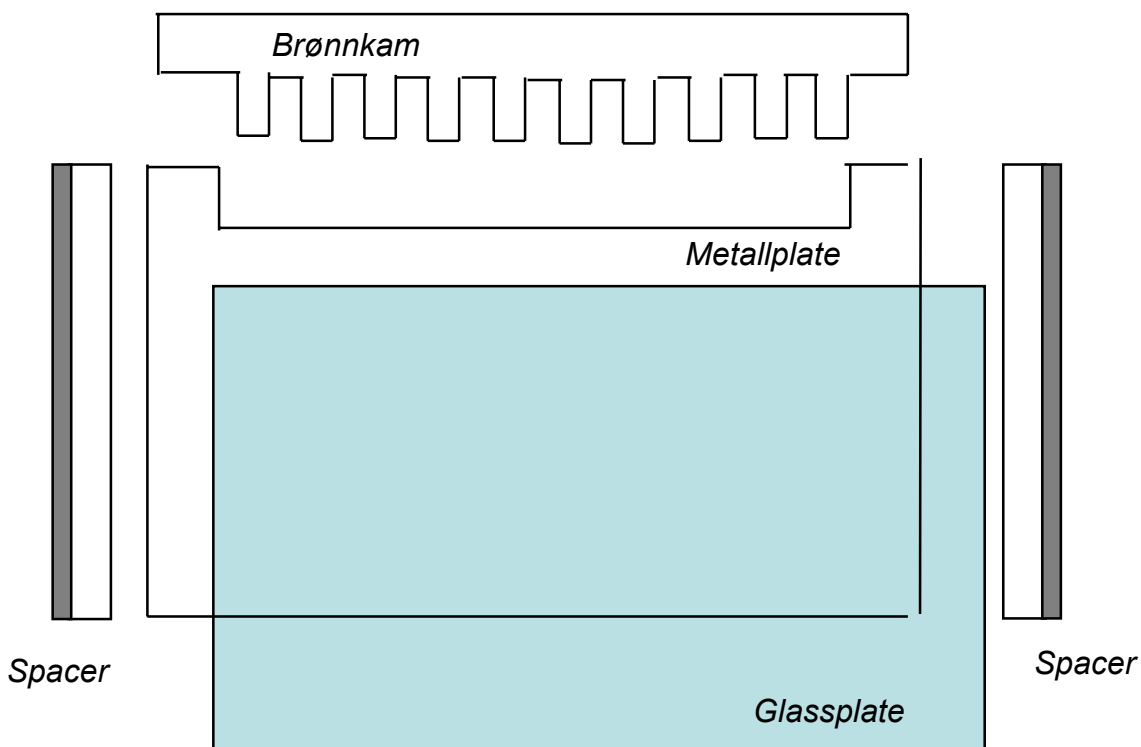
- Fukt filterpapir, membraner og celofan i blotterbuffer (6.3.12). Nummerer membranene med blyant
- Lag sandwich (Mylarmaske - 3 filterpapir – membran – gel – celofan – filterpapir - membran – gel – 2 filterpapir) (se figur 6.2)
- Kjør på blottingmaskinen ved 100 mA i 45 minutter
- Ferdige blott farges med Ponceau S løsning i 1 minutt og skylles i destillert vann. Kopieres for å ha et bilde av mengden protein i hver prøve

6.22

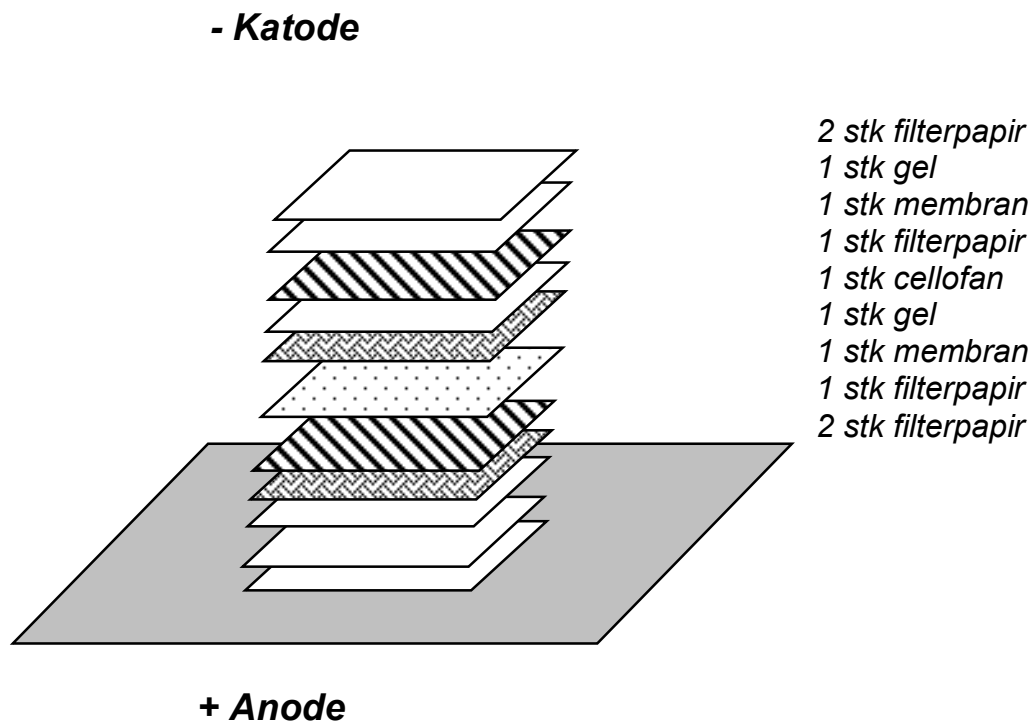
Deteksjon av immunoblott

- Legg membranene i destillert vann noen minutter, deretter ca 10 min i T-TBS
- Blokk membranen i Blotto i 60 minutter ved romtemperatur og risting
- Hell av blokker-løsningen. Primært antistoff, løst i Blotto (1:1000 Phospho-Akt), tilsettes (10 mL/membran). Inkuber over natt på kjølerom med risting
- Vask 3 x 10-15 minutter i Blotto ved romtemperatur og risting
- Peroksydasermerkerket sekundært antistoff (1:3000 geit-anti-kanin) løses i Blotto, inkuberes i 45-60 minutter ved romtemperatur og risting
- Vask 3 x 10-15 minutter i Blotto ved romtemperatur og risting

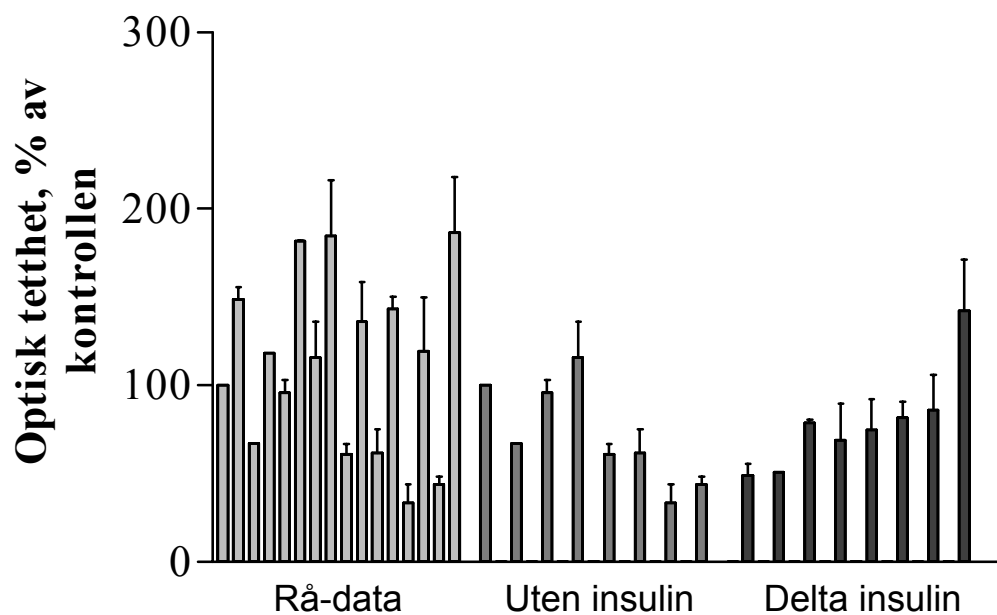
- Skyll membranene med T-TBS, deretter vaskes 2 x 5-10 minutter ved romtemperatur og risting
- Behandling med ECL-reagens: 3 mL fra hver flaske blandes i et kar og inkuber membranene 1 minutt i romtemperatur og bevegelse. Pakk membranene i plastfolie, legg på film. Eksponer 15 sekunder – 10 minutter.
- Mørkerom: På forhånd lage til:
 - Fremkaller: 120 mL fremkaller til 400 mL med vann
 - Fix: 120 mL fix til 400 mL med vann
- Legg filmen over i fremkaller (ca ½ minutt – 1 minutt) mens du følger med. Skylls med vann før man legger den over fix i 5 minutter. Og til slutt legges den i vann i ca 1 minutt
- Filmen henges opp til tørk
- Westernblottet scannes inn på datamaskinen og behandles av dataprogrammet GeneTools from SynGene
- Blottene behandles manuelt i dataprogrammet. Resultater på optisk tetthet brukes som rå-data til forsøkene



Figur 6.1 Oversikt over form til å støpe geler i.

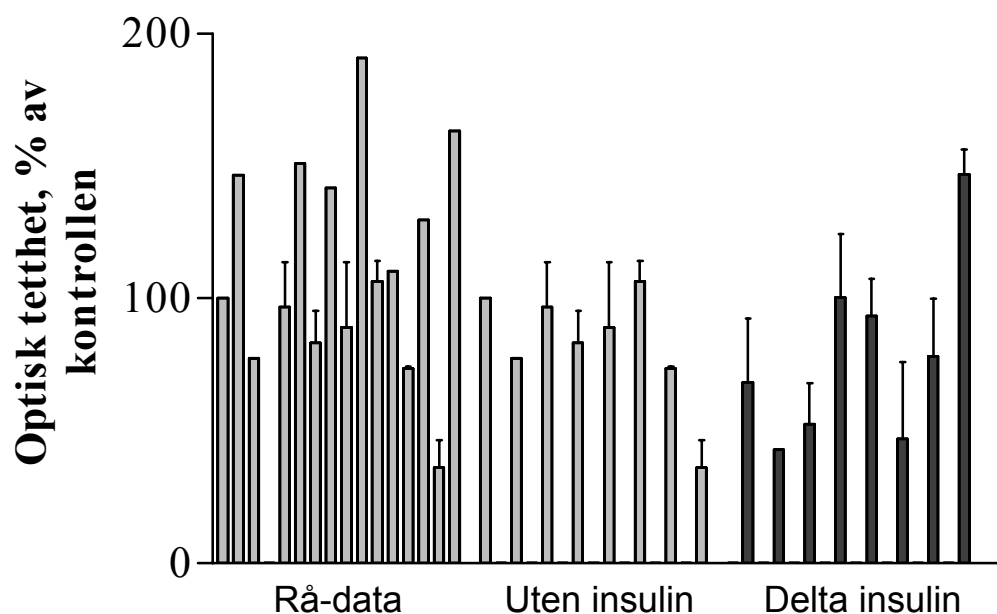


Figur 6.2 "Sandwich" for å få de ladede proteinene til å vandre fra gelen til membranen mens de beholder posisjonene de hadde i gelen.



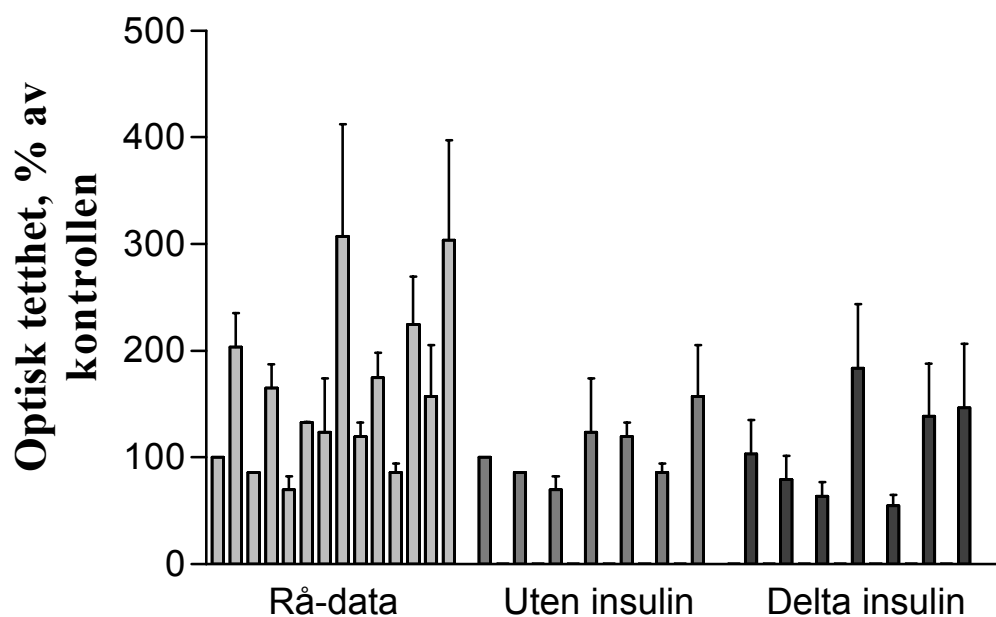
Figur 6.3 Westernblott med Dex. Cellene ble inkubert med 1, 10, 30,100, 300, 1 000 og 3 000 nM i 24 timer, insulinstimulert på hvert nivå. N=3, unntatt 10 nM (insulinstimulert) der er n=2 og 1 nM der n=1.

Rekkefølge av data på grafen, rå-data: Kontroll, kontroll og insulin, 1 nM Dex, 1 nM Dex og insulin, 10 nM Dex, 10 nM Dex og insulin, 30 nM Dex, 30 nM Dex og insulin, 100 nM Dex, 100 nM Dex og insulin, 300 nM Dex, 300 nM Dex og insulin, 1 000 nM Dex, 1 000 nM Dex og insulin, 3 000 nM Dex, 3 000 nM Dex og insulin.



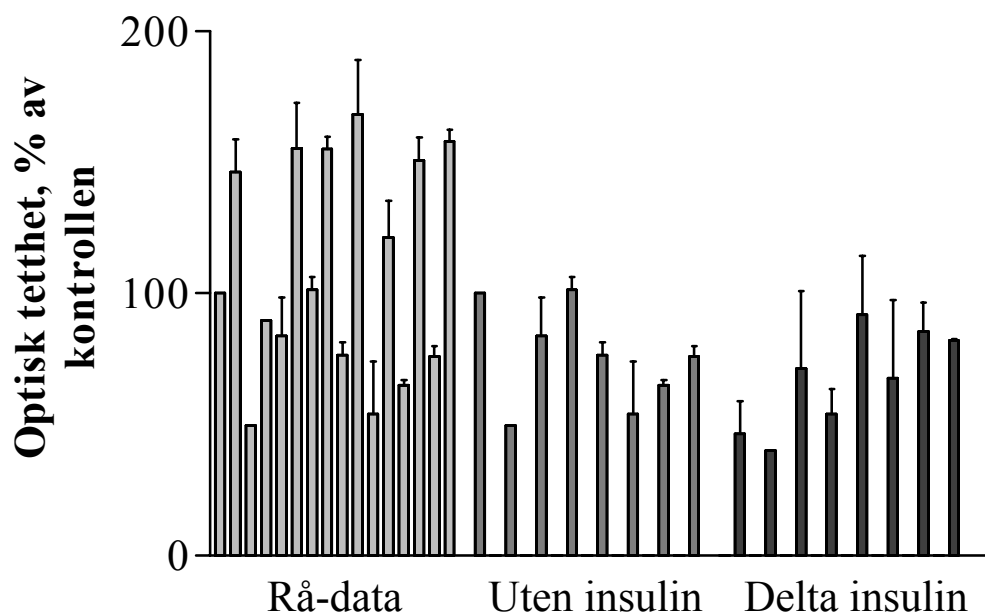
Figur 6.4 Westernblott med CsA. Cellene ble inkubert med 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 og 10 000 nM i 24 timer, insulinstimulert på hvert nivå. N=3, unntatt 1, 1 000 og 10 000 nM der er n=2 og 0,01 nM der n=1.

For graf-oppsett se figur 6.3.



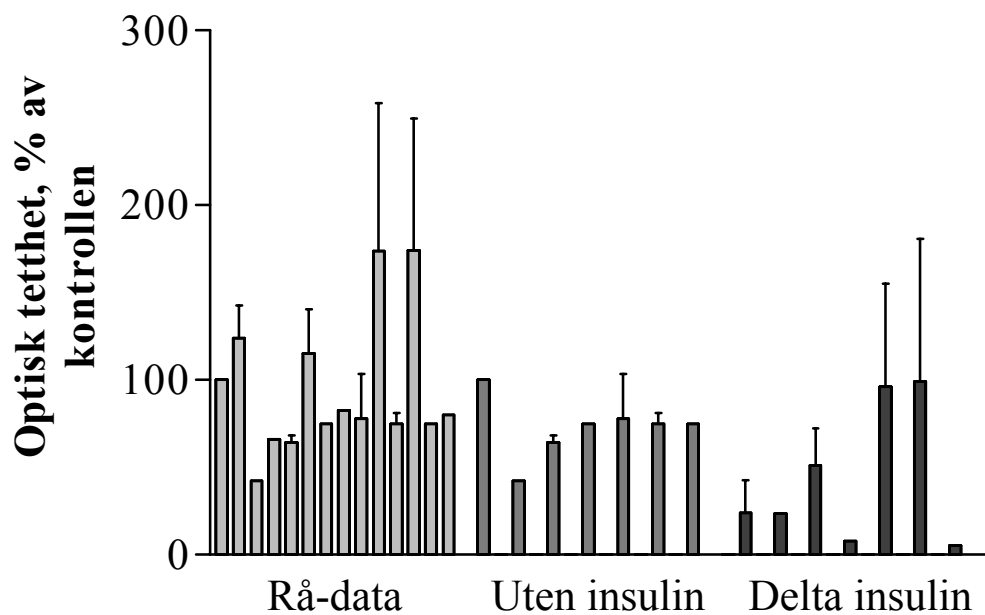
Figur 6.5 Westernblott med Tac. Cellene ble inkubert med 0,1, 1, 10,100, 1 000 og 10 000 nM i 24 timer, insulinstimulert på hvert nivå. N=3, unntatt 0,1, 1 og 100 nM der n=2.

For graf-oppsett se figur 6.3.



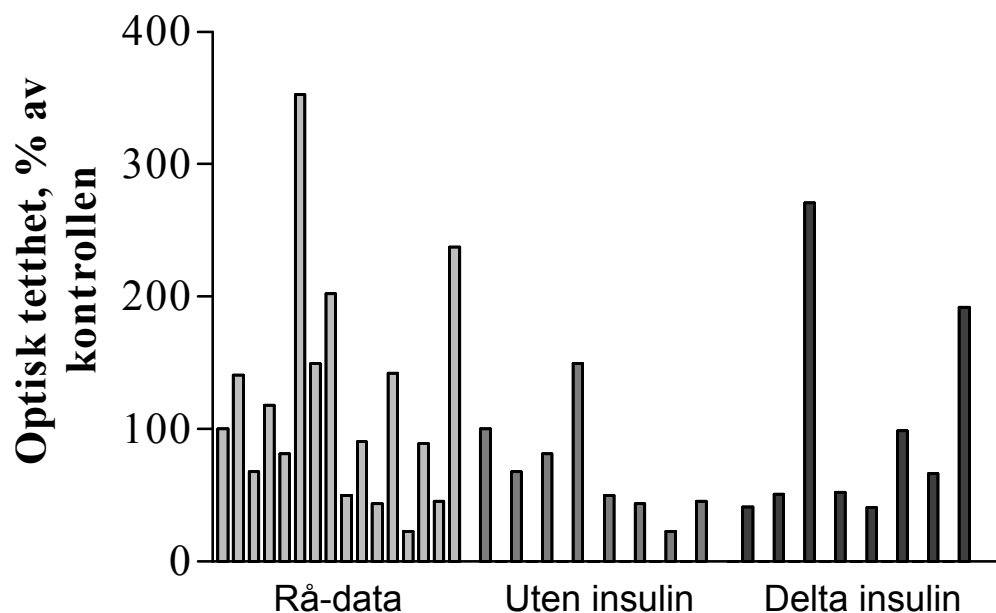
Figur 6.6 Westernanalyse med Sir. Cellene ble inkubert med 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 og 10 000 nM i 24 timer, insulinstimulert på hvert nivå. N=3, unntatt 1, 1 000 og 10 000 nM der er n=2 og 0,01 nM der n=1.

For graf-oppsett se figur 6.3.



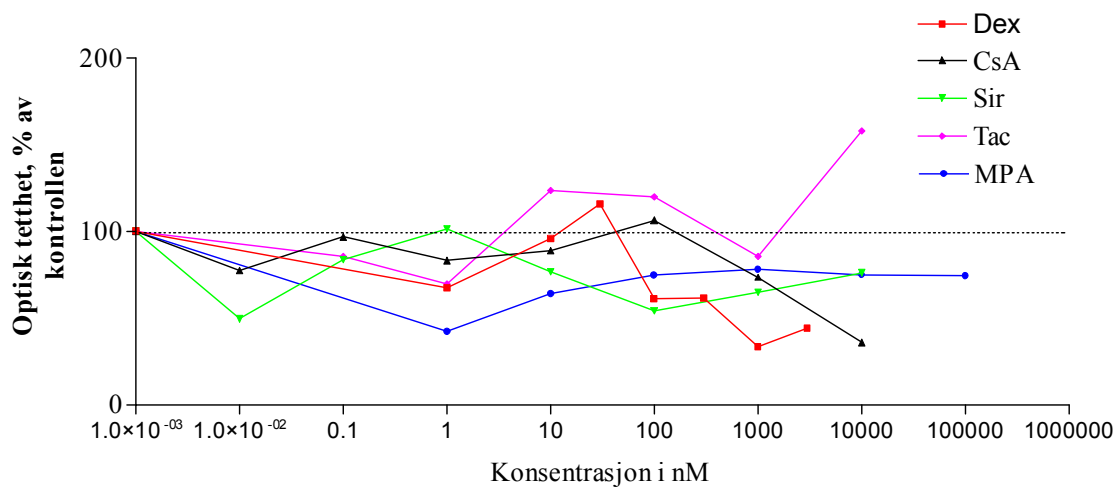
Figur 6.7 Westernblott med MPA. Cellene ble inkubert med 1, 10, 100, 1 000, 10 000 og 100 000 nM i 24 timer, insulinstimulert på hvert nivå. N=2, unntatt 1, 100 og 100 000 nM der n=1.

For graf-oppsett se figur 6.3.

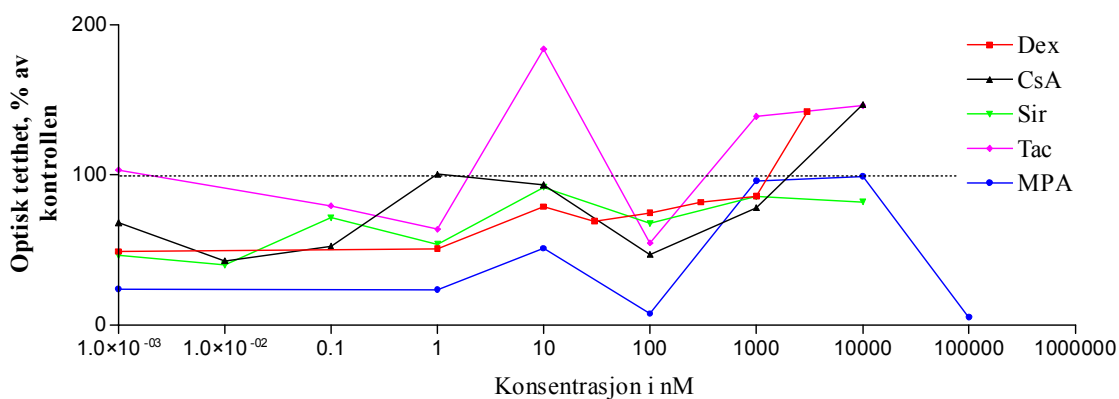


Figur 6.8 Westernblott med Dex, tydelig uteligger på insulinstimulert 10 nM. Cellene ble inkubert med 1, 10, 30, 100, 300, 1 000 og 3 000 nM i 24 timer og ble insulinstimulert på hvert nivå. N=1 på alle punkter.

For graf-oppsett se figur 6.3



Figur 6.9 Immunosuppressive legemidlers effekt på fosforylering av Akt. Uten insulinstimulering. Cellene ble inkubert med immunosuppressiva i 24 timer o basalt opptak ble gjort uten insulinstimulering. Dex, dexamethason n=3 unntatt 1 nM der n=1; CsA, ciklosporin n=3 unntatt 1, 1 000 og 10 000 nM der n=2 og 0,01 nM der n=1; Sir, sirolimus n=3 unntatt 1, 1 000 og 10 000 nM der n=2 og 0,01 nM der n=1; Tac, tacrolimus n=3 unntatt 0,1, 1 og 100 nM der n=2; MPA, mykofenolsyre n=2 unntatt 1, 100 og 100 000 nM der n=1. For rådata av det enkelte legemidlet se Appendiks, figur 6.3-6.7.



Figur 6.10 Immunosuppressive legemidlers effekt på fosforylering av Akt. Insulinstimulert i 15 minutter. Cellene ble inkubert med immunosuppressiva i 24 timer og insulinstimulert (15 minutter) opptak ble gjort. Dex, dexamethason n=3 unntatt 10 nm der n=2 og 1 nM der n=1; CsA, ciklosporin n=3 unntatt 1, 1 000 og 10 000 nM der n=2 og 0,01 nM der n=1; Sir, sirolimus n=3 unntatt 1, 1 000 og 10 000 nM der n=2 og 0,01 nM der n=1; Tac, tacrolimus n=3 unntatt 0,1, 1 og 100 nM der n=2; MPA, mykofenolsyre n=2 unntatt 1, 100 og 100 000 nM der n=1. For rådata av det enkelte legemidlet se Appendiks, figur 6.3-6.7

6.23

Skjema for westernblott

WESTERN

Elektroforese:

Dato: _____

Prøver: _____

Homogen gel: _____ %

PLATE 1	PLATE 2
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10

Betingelser:

Tid: _____

Spenning: _____ V

Strøm: _____ mA

Deteksjon av immunoblott

Dato: _____

PLATE 1	PLATE 2
Primært antistoff: _____	Primært antistoff: _____
Konsentrasjon: _____	Konsentrasjon: _____
Primært antistoff: _____	Primært antistoff: _____
Konsentrasjon: _____	Konsentrasjon: _____
Fremkallingstid: _____	Fremkallingstid: _____