

Lever X reseptorer (LXR) i skjelettmuskelceller

*Betydning av isoformene LXR α og LXR β for lipidmetabolisme
og insulinfølsomhet*

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Noor Al-Swafi



**Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet**

UNIVERSITET I OSLO

Mai 2009

Lever X reseptorer (LXR) i skjelettmuskelceller

*Betydning av isoformene LXR α og LXR β for lipidmetabolisme
og insulinfølsomhet*

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Noor Al-Swafi



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITET I OSLO

Mai 2009

Veiledere

Professor Hege Thoresen

Professor Arild Chr. Rustan

Stipendiat Nina P. Hessvik

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden mai 2008 til mai 2009.

Jeg ønsker å takke mine veiledere professor Hege Thoresen for god oppfølging gjennom hele masteroppgaven og for uvurderlig hjelp i skriveprosessen og professor Arild Chr. Rustan for god hjelp gjennom hele studieåret. En takk rettes også til stipendiat Nina P. Hessvik for god hjelp og besvarelse på alle spørsmål.

Jeg vil også takke Mari-Ann Baltzersen for opplæring i laboratoriearbeid og dyrking av celler, og Hilde Nilsen for opplæring i Western.

Til slutt vil jeg takke min familie, spesielt mamma for uvurderlig støtte gjennom hele farmasistudiet.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	3
Innholdsfortegnelse.....	4
Sammendrag.....	7
Forkortelser.....	9
1. Innledning	13
1.1 Diabetses, metabolsk syndrom og fedme.....	13
1.2 Insulinreseptor og insulinsignalering.....	14
1.2.1 Insulinreseptoren.....	15
1.2.2 Intracellulære signaleringsveier.....	16
1.3 Kjernereseptorer.....	18
1.4 Lever X reseptorer.....	19
1.4.1 Strukturen av de to LXR-isoformene.....	22
1.4.2 LXR-agonister.....	23
1.4.2.1 Oksysteroler.....	23
1.4.2.2 Syntetiske og naturlige eksogene LXR-ligander.....	23
1.4.2.3 Glukose.....	25
1.4.3 LXR-antagonister.....	25
1.4.4 Regulering av LXR-uttrykk og-aktivitet.....	25
1.4.4.1 Posttranslasjonal regulering av LXR-aktivitet.....	26
1.4.5 Biologisk rolle av lever X-reseptorer.....	27
1.4.5.1 Effekter av LXR på kolesterolmetabolisme.....	27
1.4.5.2 Effekter av LXR på lipidmetabolisme (lipogenese).....	30
1.4.5.3 Effekter på glukosemetabolisme/antidiabetiske effekter.....	30
1.5 LXR og oksidasjon/lipogenese i skjelettmuskel.....	32

1.6 Humane skjelettmuskelceller.....	33
1.7 Mål.....	34
2. Materialer og metoder.....	35
2.1 Materialer.....	35
2.2 Metoder.....	36
2.2.1 Cellemodell.....	36
2.2.2 Humane skjelettmuskelceller.....	36
2.2.2.1 Donorkarakteristika.....	36
2.2.2.2 Dyrkning av humane skjelettmuskelceller.....	37
2.2.2.2.1 Utsåing av satelittceller.....	37
2.2.2.2.2 Vekst av satelittceller og differensiering til flerkjernede muskelfibre.....	38
2.2.2.2.3 Substrat-oksidasjonsforsøk i 96-brønners brett ("trapping").....	41
2.2.2.2.4 CO ₂ måling (måling av fettsyreoksidasjon).....	42
2.2.2.2.5 Lysatmålin (måling av celleassosiert).....	42
2.2.2.2.6 Proteinmåling.....	43
2.2.3 Skjelettmuskelceller fra mus.....	44
2.2.3.1 LXR-knockout- og villtypeceller.....	44
2.2.3.2 Dyrkning av skjelettmuskelceller fra mus.....	44
2.2.3.2.1 Utsåing av celler.....	44
2.2.3.2.2 Utsåing i flasker.....	44
2.2.3.2.3 Splitting og utsåing på brett, vekst og differensiering.....	45
2.2.3.3 Western blotting.....	46
2.2.3.3.1 Prinsipp.....	46
2.2.3.3.2 Forbehandling og høsting av museceller til Western.....	46
2.2.3.3.3 Gelelektroforese.....	47

2.2.3.3.4 Overføring/blotting.....	49
2.2.3.3.5 Deteksjon av immunoblott.....	49
2.2.3.3.6 Kvantifisering.....	50
2.2.3.3.7 Stripping.....	50
2.2.3.3.8 Proteinmåling.....	51
2.2.3.4 Lipogenesemåling.....	52
2.2.3.4.1 Forbehandling, høsting og prøveopparbeidelse og ekstraksjon av lipider..	52
2.2.3.4.2 Separering av lipider (tynnsjikt).....	53
2.2.3.4.3 Proteinmåling.....	53
2.2.4 Statistisk analyse.....	54
3. Resultater	55
3.1 Lipogenese i LXR α -KO- og LXR β -KO-skjelettmuskelceller.....	55
3.2 LXR-isoform-spesifikke effekter av lever-X-reseptor agonisten.....	57
3.3 Effekter av cRA og T0901317 i humane skjelettmuskelceller.....	61
3.4 Effekter av LG100268 i humane skjelettmuskelceller.....	64
3.5 Effekter av LG100268 og T0901317 på lipogenese.....	66
3.6 Effekter av insulin på fosforylering av Akt og ERK.....	68
4. Diskusjon	74
4.1 Lipogenese i LXR α -KO- og LXR β -KO skjelettmuskelceller.....	74
4.2 Effekter av RXR-agonister.....	76
4.3 Effekter av insulin på fosforylering av Akt og ERK.....	78
5. Oppsummering og konklusjon	80
Referanseliste.....	82
Appendiks.....	85

Sammendrag

Type 2-diabetes er en kronisk stoffskiftesykdom med høyt blodsukker (hyperglykemi) og andre metabolske forstyrrelser. Type 2-diabetes er et økende helseproblem i den vestlige verden og er assosiert med fedme, insulinresistens og høye plasmanivåer av glukose, triglyserider og kolesterol. Lever X-reseptorer er ligandaktiverte transkripsjonsfaktorer som tilhører kjernereseptor- superfamilien og er i fokus på grunn av deres rolle i kolesterol, lipid og karbohydratmetabolisme. Det er identifisert to LXR isoformer, LXR α og LXR β . Ved ligandindusert aktivering danner LXR heterodimere med retinoid-X-reseptor (RXR) og regulerer genuttrykk. LXR/RXR er en permissiv heterodimer som kan bli aktivert med enten LXR-agonist eller med en spesifikk RXR-ligand. LXR regulerer viktige gener involvert i kolesterol, lipid og karbohydratmetabolisme. LXR har gunstige effekter på revers kolesteroltransport, kolesterolefflux fra makrofager og kolesterolekskresjon i gallen, og er et mulig target for legemidler mot aterosklerose. LXR agonister har også antidiabetiske egenskaper, i modeller av type-2 diabetes og insulinresistens vil LXR aktivering normalisere glykemi og forbedre insulinsensivitet. Men LXR har også ugunstige effekter på lipidmetabolisme gjennom økt lipogenese.

Fordi skjelettmuskel står for ca 40 % av den totale kroppsvekten, er det største organet for glukose- og fettsyreoksidasjon og er det største insulinfølsomme vevet, ønsket vi å studere LXRs effekter i skjelettmuskelceller. Vi benyttet skjelettmuskelceller isolert fra mennesker og fra mus, både villtypemus og mus hvor LXR α - og LXR β var fjernet ("knocket ut" (KO)), og undersøkte lipogenese og oljesyreoksidasjon, samt fosforylering av kinasene Akt og ERK.

Vi fant at det var redusert lipogenese i celler fra LXR β -KO-mus, men ikke i celler fra LXR α -KO- eller villtypemus, etter forbehandling med LXR-agonisten T0901317. For å forsøke å optimalisere effekten av LXR-aktivering, undersøkte vi effekten av T0901317 i nærvær av RXR-aktivatorer. Resultatene viste en mulig tilleggeffekt ved forbehandling av muskelceller med T0901317 i tillegg til RXR-agonist enn ved bare

forbehandling med RXR-agonist, med hensyn på oljesyreoksidasjon og lipogenese. Fordi RXR også heterodimeriserer med andre kjernereseptorer som PPAR δ , ble RXR-agonist kombinert med PPAR- δ agonisten GW501516 (GW). GW501516 ga en egeneffekt og også en tilleggseffekt til RXR-agonist på oksidasjonen. Videre undersøkte vi om LXR og eventuelt hvilken subtype, har effekt på insulineffekten (i form av fosforylert Akt eller fosforylert ERK). Resultatene viste ingen forskjell i insulinrespons i de ulike celletyper, og heller ingen effekt av forbehandling med T0901317 er observert.

Resultatene indikerer at LXR β er den viktigste isoformen i skjelettmuskel. Dette setter et spørsmålstegn ved ideen om å lage LXR β -selektive agonister for unngå de lipogene effektene som er observert å være knyttet til LXR α -isoformen i lever, men betydningen av økt lipogenese i muskel er uklar. Selv om tidligere funn indikerer redusert insulinrespons i LXR β -KO-celler, ser vi ikke dette på niva av Akt- og ERK-fosforylering. Aktivering av LXR har ikke effekt på insulinresponsen på p-Akt eller p-ERK nivå.

Forkortelser

ABCA1	ATP-bindende kassett-transportør A1
ABCG1	ATP-bindende kassett transportør-G1
ABCG5	ATP-bindende kassett transportør-G5
ABCG8	ATP-bindende kassett transportør-G8
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
AS160	Akt substrat 160
ATP	Adenosintrifosfat
bFGF	“Basic Fibroblast Growth Factor”
BSA	Bovint serum albumin
CA	Celleassosiert
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
CETP	“Cholesteryl ester transfer protein”
ChREBP	Karbohydrat responselement-bindende protein
Ci	Curie
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Coenzym A
cRA	Cis-retinsyre
DBD	DNA-bindingsdomene

dH ₂ O	Destillert vann
DMEM	”Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
DPBS	“Dulbecco's Phosphate Buffered Saline”
DAG	Diacylglycerol
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ECL	“Enhanced Chemiluminescence”
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ERK	Ekstracellulær signalregulert kinase
FAS	Fettsyresyntase
FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
FXR	Farnesoid X-reseptor
G-6-P	Glukose-6-fosfat
GLUT	Glukosetransportør
Grb-2	Vekstfaktorreseptor-bindende protein-2
GS	Glykogensyntase
GSK-3	Glykogensyntasekinase-3
GTP	Guanosintrifosfat
GW	GW501516

HBSS	“Hanks Balanced Salt Solution”
HDL	High Density Lipoprotein
IGF	Insulin-liknende vekstfaktor
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
KO	Knock-out
LBD	Ligandbindingsdomene
LXR	Lever X-reseptor
LXRE	Lever X-reseptor responselement
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MAPKK	MAPK kinase
MEK	MAP-ERK-kinase
mRNA	Messenger-ribonukleinsyre
NPC1	Niemann-Pick C1
NPC1L1	Niemann-Pick C1 like 1
NPC2	Niemann-Pick C2
O.D	Optical density
OA	Oljesyre
PBS	Phosphate buffered saline
PDK	PI-avhengig kinase

PI3K	Fosfotidylinositol 3-kinase
PIP ₃	Fosfatidylinositol-3-fosfat
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroksisom-proliferator-aktivert-reseptor
PXR	Pregnan X-reseptor
RCT	Revers kolesteroltransport
RSK	Ribosomal-S6-kinase
RXR	Retinoid X-reseptor
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SDS	Natrium dodekylsulfat
SEM	Standardfeil
SH2	Src homologi-2
SOS	Son-of-sevenless
SREBP-2	Sterol regulatory element bindende protein-2
SDS-PAGE	SDS polyakrylamid geleelektroforese
TAG	Triacylglycerol
TMED	Tetrametyletylendiamin
TRE	Tyroideahormon-responselement
T-TBS	Tween trisbufret saltløsning
VT	Villtype

1. Innledning

1.1 Diabetes, metabolsk syndrom og fedme

Diabetes mellitus er en kronisk stoffskiftesykdom med høyt blodsukker (hyperglykemi) og andre metabolske forstyrrelser som skyldes absolutt eller relativ insulinmangel, ofte sammen med nedsatt insulinvirksomhet (insulinresistens) [1].

Prevalensen til diabetes er økende på verdensbasis, og ca 5-15 % av verdens befolkning er rammet [2]. En ekspertgruppe nedsatt av WHO (1998) har foreslått inndeling i 4 grupper:

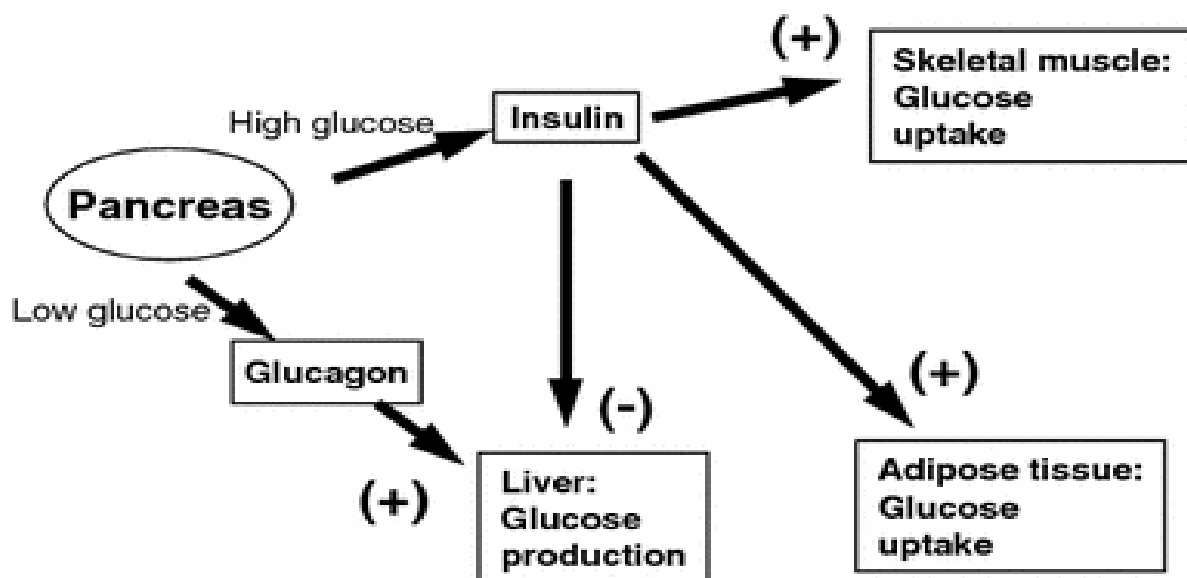
- Type 1 diabetes mellitus
- Type 2 diabetes mellitus
- Andre typer diabetes mellitus som genetiske defekter i β -cellefunksjonen og insulinvirksomheten, sykdommer i pankreas, endokrinopatier og andre
- Svangerskapsdiabetes

Type 1-diabetes mellitus skyldes insulinmangel, vanligvis pga. en autoimmun destruksjon av β -cellene i de langerhanske øyer [1]. Type 2-diabetes er en metabolsk sykdom karakterisert av insulinresistens [3] og utilstrekkelig insulinproduksjon [1]. Det fører til økning i glukosenivåer i sirkulasjonen og hyperglykemi utvikles. Kronisk hyperglykemi er assosiert med mange alvorlige patologiske komplikasjoner og fører til en rekke makrovaskulære og mikrovaskulære komplikasjoner som aterosklerose, nefropati, neuropati og retinopati [3]. Type 2-diabetes er ofte et ledd i insulinresistenssyndrom (metabolsk syndrom) med abdominal fedme, høyt blodtrykk, høye triglyserider, lavt HDL-kolesterol og økt tendens til aterosklerose [1]. Selv om det er mange faktorer som karakteriserer metabolsk syndrom, er reduserte vevsresponser til insulin og metabolsk infleksibilitet (reduisert kapasitet til overgang mellom fett- og karbohydrat-energikilder) nøkkelkomponenter [4].

Fedme, diabetes og kardiovaskulær sykdom regnes som en del av en økende global epidemi [5]. Fedme er assosiert med økt risiko for utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes. Utvikling av type 2-diabetes kan bli forsinket eller noen ganger hindret i å manifestere seg hos personer med fedme som er i stand til å gå ned i vekt [6]. Den anatomiske lokaliseringen av fettakkumulering er fundamental for den metabolske risikoprofilen som predikerer for utvikling av kardiovaskulær sykdom og type 2-diabetes. Abdominal fedme er generelt assosiert med høye nivåer av sirkulerende triglyserider, lav HDL-kolesterol og høye plasma konsentrasjoner av apoB-holdige lipoproteiner [5].

1.2 Insulinreseptor og insulinsignalering

Insulin frigjøres endogent fra pankreatiske β -celler [3,7], inhiberer hepatisk glukoseproduksjon [2, 3, 7, 8] og stimulerer perifert glukoseforbruk (figur 1.1) [7]. Insulin øker glukosetransport til muskel og fettvev [8]. På det cellulære nivået skjer glukoseopptak på grunn av insulinstimulert translokasjon av glukosetransportøren 4 (GLUT 4) fra intracellulære lagre til plasmamembranen [8, 9, 10].



Figur 1.1 Høye glukosenivåer i sirkulasjonen fører til insulinfrigjøring fra pankreas. Insulinfrigjøring fører til økt (+) glukoseopptak i skjelettmuskel og fettvev, og fører til redusert (-) glukoseproduksjon fra lever. Figuren er tatt fra referanse [3].

Insulin utløser sine signaleringskaskader ved å binde til og aktivere sin celleoverflate-reseptor [8].

1.2.1 Insulinreseptoren

Insulinreseptorer er uttrykt i praktisk talt alle celler, og antallet per celle varierer fra noen få hundre i røde blodceller til noen hundre tusen i lever og fettvev [2].

Insulinreseptoren tilhører tyrosinkinasereseptorsuperfamilien, som inkluderer blant annet insulin-liknende vekstfaktor (IGF)-I-reseptor [11]. Reseptoren er en homodimer [2] som består av to α - og to β - subenheter [2,3, 11, 12]. α -subenheten er ekstracellulær og inneholder ligandbindings-domenet. β -subenheten krysser plasmamembranen, og er bundet til α -subenheten med disulfidbroer og nonkovalente interaksjoner. Den intracellulære delen av β -subenheten inneholder tyrosinkinasedomenet [2]. Insulinbinding til α -subenheten fører til konformasjonsendring i det intracellulære domenet slik at tyrosinkinasen blir aktivert og reseptoren autofosforyleres [2]. Fosforylerte tyrosinrester i den aktiverte insulinreseptoren virker som ”docking sites” for binding av noen nedstrøms signaleringsmolekyler som insulinreseptorsubstrat (IRS)-proteiner [3]. Blant disse IRSene, har IRS1 og IRS2 nøkkelroller i insulin-stimulert glukoseopptak i fett og muskel [8]. Den insulin-avhengige tyrosinfosforyleringen av IRS-proteiner skaper ”docking sites” for mange Src homolog 2 (SH2)- domeneholdige nedstrøms aktører [8]. SH2-motivene er 50-100 aminosyre lange, og de virker som høyaffinitetsfosfotyrosin-bindingssteder og er funnet i mange intracellulære

signaleringsmolekyler [2]. Mange av disse SH2- proteinene er ”adaptor” molekyler som den p85 regulatoriske subenheten av PI(3)K eller Grb2 [11].

1.2.2 Intracellulære signaleringsveier

Det er to hovedveier som overfører signalet som genereres gjennom insulinreseptoren (figur 1.2) [2]:

1. Insulinreseptor substrater/fosfotidylinositol 3-kinase (IRS/PI3-K)-veien:

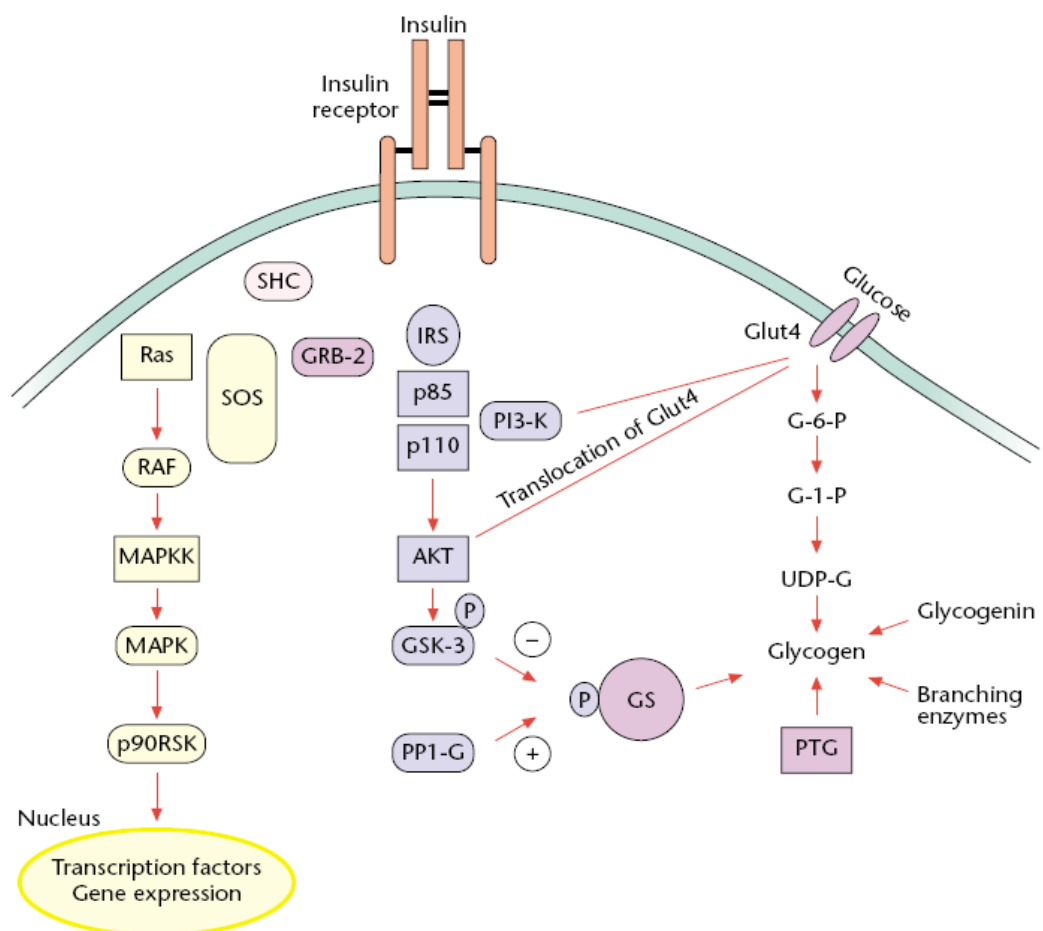
Denne veien fører til dannelse av fosfatidylinositol 3-fosfat (PIP₃), med etterfølgende aktivering av PI-avhengige kinaser, som PI-avhengig kinase-1 og -2 (PDK-1, PDK-2) og proteinkinase-C (PKC). Noen av disse kinasene er nødvendige for aktivering av nedstrøms kinaser som serin/treonin kinasen AKT (også kalt protein kinase-B [3]), produktet av *AKT*-proto-onkogenet). Man tror at AKT kan direkte fosforylere [2,3] og inaktivere glykogensyntase-kinase-3 (GSK-3), og dermed føre til defosforylering og aktivering av glykogensyntase og økt glykogensyntese [2,12,13]. Det er også noen funn som knytter AKT til translokalisering av glukosetransportører [2]. Fosforylering av Akt-substrat 160 (AS160), som har et GTPase-aktiverende domene, tillater translokasjon av GLUT4 til sarcolemma og fasilierer glukoseinngang til cellen [4].

Et nøkkelsignaleringskompleks i insulineffekten er dannet mellom IRSene og den regulatoriske subenheten (p85) av enzymet PI3-K. Det er to SH2-domener i strukturen til p85. Binding av IRSene til de to domenene fører til aktivering av p110 (katalytisk)- subenheten av PI3-K. Den katalytiske aktiviteten av p110 stimulerer fosforylering av fosfatidylinositol og fører til dannelse av PIP₃ [2,12].

2. Ras/mitogenaktivert-proteinkinase (MAPK)-veien:

Insulin aktiverer denne veien gjennom dannelse av komplekser mellom utvekslingsfaktoren SOS (son-of-sevenless) og vekstfaktorbindende protein-2 (GRB-2) [2]. Ras aktiveres, og den stimulerer en kinasekaskade gjennom trinnvis aktivering av Raf, MEK og ERK. Aktivert ERK kan translokeres til kjernen hvor den katalyserer fosforyleringen av transkripsjonsfaktorer [11].

Det ser ut som om de akutte metabolske effektene av insulin trenger aktivering av IRS/PI3-K veien, mens Ras/MAPK-veien kan spille en rolle i langtidseffektene av insulin på vekst og proliferasjon [2].



Figur 1. 2 Intracellulære insulinsignaleringsveier: Insulinbindingen til dets reseptor aktiverer forskjellige signaleringsveier. De to hovedveiene er IRS/PI3-K veien og Ras/MAPK veien. IRS/PI3-K veien medierer glykogensyntese og translokasjonen av

glukosetransportører (Glut) til celleoverflaten. Ras/MAPK-veien medierer effektene av insulin på cellevekst og proliferasjon. GS (K), glykogensyntase (kinase); G-6-P, glukose-6-fosfat; MAPKK, MAPK kinase; Ras, en GTPase protoonkogen produkt; Raf, en serin/treonin kinase protoonkogen produkt; RSK, ribosomal S6 kinase; PP1-G, glykogenassosiert proteinfosfatase-1; DP-G, uridin difosfat-glukose. Figuren er tatt fra referanse [2].

1.3 Kjernereseptorer

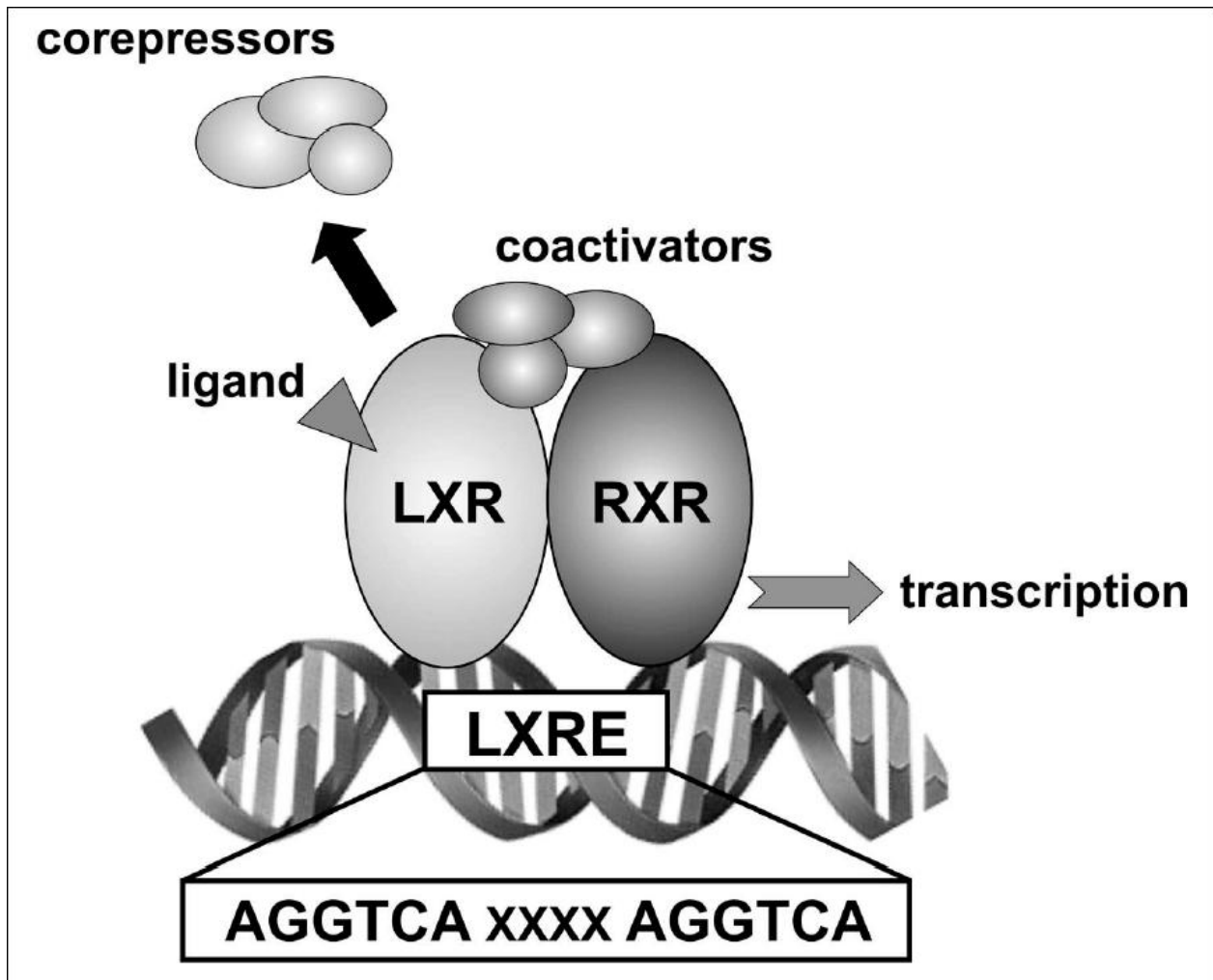
Kjernereseptorer danner en superfamilie av ligandaktiverte transkripsjonsfaktorer som regulerer uttrykk av en rekke gener [14, 15]. Kjernereseptorsuperfamilien består av 49 medlemmer, og hver av dem er involvert i forskjellige (og/eller overlappende) aspekter av sykdomsforhold som kreft, fedme, diabetes og kardiovaskular sykdom [17]. De fleste reseptorene har lignende struktur, inkludert et aminoterminalt aktiveringsdomene (AF-1), et DNA-bindingsdomene, et ligandbindingsdomene og et annet karboksy terminal aktiveringsdomene (AF-2) [18, 19]. Proteiner av denne superfamilien er karakterisert av tilstedeværelse av en sentral ≈ 70 aminosyresekvens som koder for et DNA-bindingsdomene som binder til spesifikke DNA-sekvenser (responselementer) i promoterne til de regulerte genene [14], mens ligandbindingsdomenet er større [14] og med forskjellige og spesialiserte ligandbindingssteder for hver reseptor [19]. Dette domenet er ansvarlig for ligandbinding, dimerisering og ligandavhengig aktivering [14].

Ligandene for disse reseptorene, enten de er naturlige ligander eller syntetiske agonister eller antagonister, har en upolar karakter som gjør dem i stand til fritt å passere gjennom lipidbilaget av cellemembranen [19]. Ved ligandbinding skjer en konformasjonsendring i reseptoren fulgt av frigjøring av korepressorer og aktiv rekruttering av koaktivatorer [14,18]. Dette gjør at reseptoren kommuniserer med det generelle transkripsjonsmaskineriet slik at uttrykk av målgener reguleres [14]. Reseptorene binder responselementene som homo- eller heterodimere [15].

1.4 Lever-X-reseptorer

Lever-X-reseptorer er ligandaktiverte transkripsjonsfaktorer som tilhører kjernereseptor- superfamilien [20, 21]. Lever-X-reseptorer α og β ble klonet i 1994 basert på en sekvenshomologi med andre kjernereseptorer fra et leverderivert cDNA-bibliotek, og fikk navnet på grunn av det høye uttrykket i lever [19]. LXR ble først klassifisert som ”foreldreløse” kjernereseptorer, fordi de hadde ingen kjente naturlige ligander [20, 22]. Senere ble oksiderte kolesterolderivater; oxysteroler, identifisert som spesifikke ligander til LXR. Oxysteroler blir dannet i proporsjonalt mengde til kolesterolinnhold i cellen, og LXR virker derfor som kolesterolsensor [23].

Ved ligandindusert aktivering danner LXR heterodimere med retinoid-X-reseptor (RXR) og regulerer genuttrykk ved at heterodimeren binder til LXR-resonselementer (LXREs) i promoterregioner til målgenene. LXR-resonselementer består av to idealiserte heksanukleotidsekvenser (AGGTCA) separert med 4 baser (DR-4 element) (figur 1.3) [20].

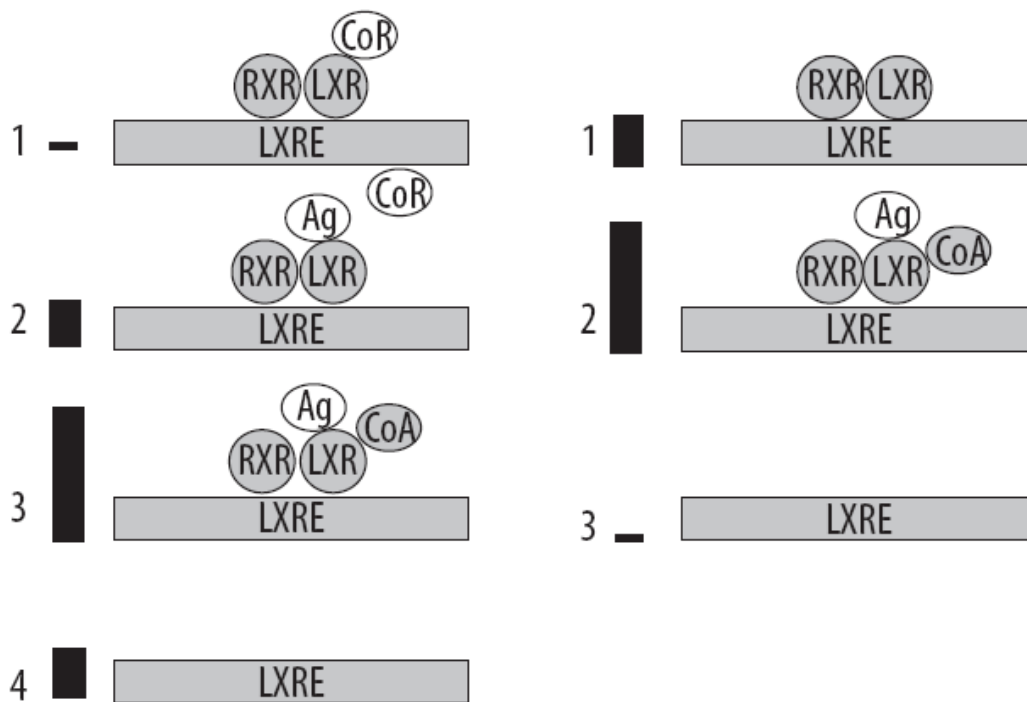


Figur 1.3 Mekanisme av transkripsjonell regulering mediert av LXR. RXR, retinoid X reseptor; LXRE, LXR-responselement. Figuren er hentet fra [20.]

LXR/RXR er en permissiv heterodimer som kan bli aktivert med enten LXR-agonist eller 9-cis-retinsyre (9-cRA), en spesifikk RXR-ligand. Vanligvis er det synergisk effekt når LXR-agonist og RXR-agonist bindes samtidig [20,23]. Når LXR-ligander ikke er tilstede, rekrutterer LXR komplekser av korepressorer. Disse blir byttet ut med koaktivatorer ved reseptoraktivering [20].

På samme måte som PPAR og FXR, kan LXR stimulere transkripsjonen til en viss grad selv ved fravær av ligand. LXR kan også aktivt undertrykke uttrykk av noen

gener når ingen ligand er bundet. Derfor ble en tre trinns-modell foreslått for å beskrive aktivering av LXR. I følge denne modellen inhiberer LXR/RXR-heterodimeren aktivt transkripsjonen ved å rekruttere nukleære korepressorer når liganden ikke er tilstede. Ved ligandbinding induseres dissosiasjon av korepressorene, og det fører til moderat stimulering av transkripsjonen. Etter det rekrutteres koaktivatorer og det fører til maksimal stimulering av transkripsjonen. Denne modellen forklarer hvorfor uttrykk av noen målgener er høyere i LXR-manglende mus enn i villtype [23] (figur 1.4).



FIGUR 1.4: To modeller for regulering av genuttrykk med LXR/RXR heterodimer
Venstre: Ubundet LXR/RXR undertrykker aktivt transkripsjonen (1) ved å rekruttere korepressorer. Dissosiasjon av korepressorer induseres ved ligandbinding, og det fører til moderat stimulering av transkripsjonen (2), senere rekrutteres koaktivatorer og det fører til maksimal stimulering av transkripsjonen (3). Fjerning av aktiv suppresjon med LXR "knockout" (4) fører til moderat høyere uttrykk av et målgen sammenlignet med villtype.

Høyre: Ubundet LXR/RXR gir moderat stimulering av transkripsjonen fordi korepressorer ikke er bundet (1). Agonistbinding gir maksimal transkripsjon ved at koaktivatorer rekrutteres (2). Ved fravær av LXR er transkripsjonen minimal (3), fordi basal stimulatorisk effekt av ubundet LXR er fjernet. De vertikalesorte søylene representerer kvantitativt nivået av genuttrykk. Ulike gener kan bli regulert i følge den første eller den andre modellen. LXRE; LXR responselementer, CoR; korepressorer, Ag; agonist . Figuren er tatt fra referanse [23].

1.4.1 Strukturen av de to LXR-isoformene

Det er blitt identifisert to LXR isoformer, LXR α og LXR β [24] som er kodet av genene NR1H3 og NR1H2 [25]. LXR α er hovedsakelig uttrykt i lever, tynntarm, nyrer, milt og fettvev [14, 22, 26,], mens LXR β er uttrykt i nesten alle undersøkte vev, men i mindre grad [14,20,23]. De to isoformene er cirka 80 % identiske med hensyn på aminosyresekvens [23] både i DNA- og ligandbindingsdomenene [20].

LXR molekylet består av 4 domener [23]:

1. Et N-terminal ligand-uavhengig aktivering funksjonsdomene (AF-1) som kan stimulere transkripsjonen når en ligand ikke er tilstede.
2. Et DNA-bindingsdomene (DBD) som inneholder to zink-fingre.
3. Et hydrofobt ligandbindingsdomene (LBD) som trengs for ligandbinding og reseptor dimerisering.
4. En C-terminal ligandavhengig transaktiveringsekvens, også referert til som aktivering funksjon-2 (AF-2), som stimulerer transkripsjonen som respons på ligandbinding.

LXR α eksisterer i 3 varianter, nemlig LXR α 1, LXR α 2 og LXR α 3. LXR α 1 er den vanligste varianten i de fleste vev unntatt testiklene, hvor LXR α 2 dominerer, mens LXR α 3 er uttrykt i mindre grad i lunger, skjoldbruskkjertelen og milt. Alle disse variantene binder DNA, men LXR α 2 er mindre aktiv i å stimulere transkripsjonen enn

LXR α 1. LXR α 3 er ikke i stand til å binde ligander og kan ikke stimulere transkripsjonen; den kan egentlig motvirke funksjonen til de andre LXR α isoformene [23].

1.4.2 LXR-agonister

1.4.2.1 Oksysteroler

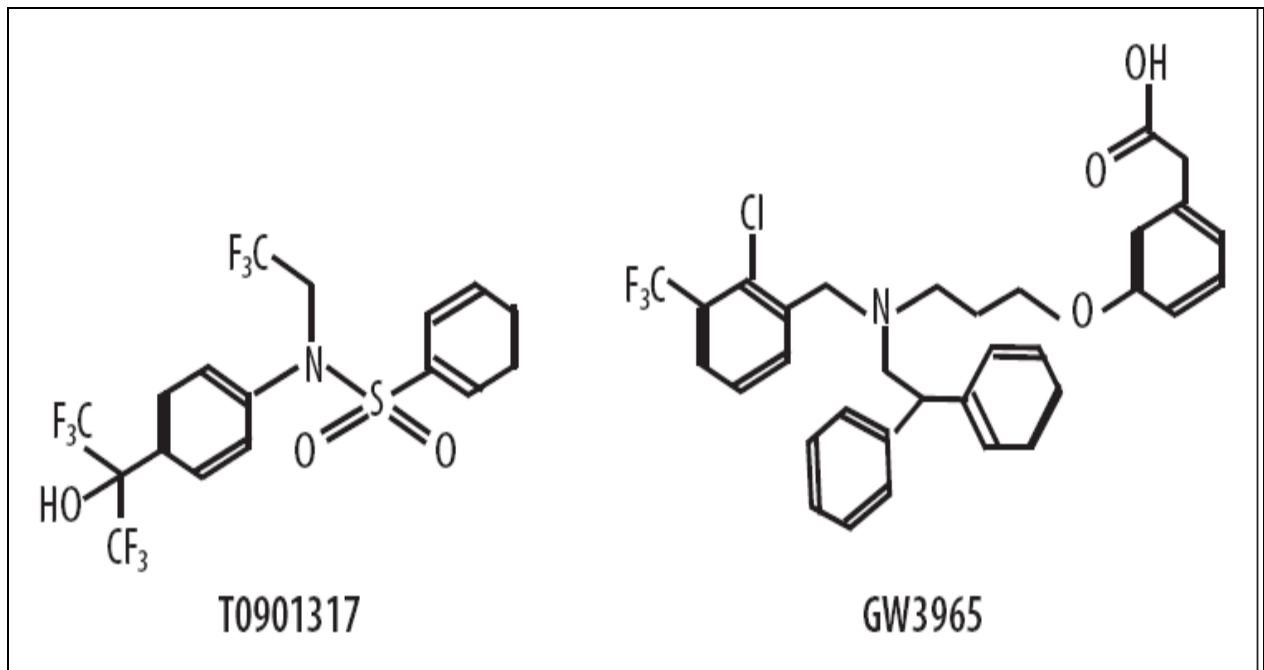
Som nevnt er det stor enighet om at de fysiologiske LXR-ligandene er monooksiderte derivater av kolesterol kalt oksysteroler [23,27]. Kolesterol har ikke målbar affinitet til LXR, men har en regulatorisk rolle på LXR gjennom sine metabolitter. De er alltid til stede sammen, men med 10^5 - 10^6 gangers overskudd av kolesterol. Den totale konsentrasjonen av oksysteroler i plasma til en frisk person er cirka 1 μ M, og det er cirka 0,02 % av mengden kolesterol, hvor enzymatisk genererte oksysteroler sirkulerer i høyere mengder enn ikke-enzymatisk genererte oksysteroler. Det er 3 kilder til oksysteroler og disse er endogen produksjon i enzymatiske reaksjoner, endogen produksjon gjennom ikke-enzymatiske ROS (reaktive oksygen spesier) – avhengig oksidasjon av kolesterol og gjennom kosten [23]. Generelt blir de mest potente av oksysterolene dannet i enzymatiske reaksjoner, mens oksysteroler dannet fra ikke-enzymatiske reaksjoner har en svak eller ingen agonisteffekt. Videre kan oksysterolene dannet fra enzymatiske reaksjoner deles i 3 grupper [23]:

- Intermediater av kolesterolbiosynteseveien, hvor 24(S), 25-epoksykolesterol er de eneste representanter av den gruppen hittil
- Intermediære forbindelser fra syntesen av steroidhormoner fra kolesterol, for eksempel 22(R)-hydroksykolesterol, og til en mindre grad 20(S)-hydroksykolesterol
- Noen hydroksysterol forbindelser dannet fra kolesterol via sterol hydroksylaser.

1.4.2.2 Syntetiske og naturlige eksogene LXR-ligander

To syntetiske, ikke steroide LXR-agonister som er mye brukt i eksperimentelle studier

er T0901317 [23,28] og GW3965 (figur 1.5). T0901317 aktiverer både LXR α og LXR β , men den er ikke en fullstendig selektiv LXR-agonist siden den aktiverer også pregnan X-reseptor (PXR) og farnesoid X-reseptor (FXR), men likevel med mye lavere affinitet enn til LXR [23]. GW3965 har høyere affinitet til LXR β enn til LXR α , men forskjellen er for liten til å brukes til å differensiere mellom de to isoformene.



Figur 1.5 De mest brukte syntetiske LXR-agonister. Figuren er tatt fra kilde [23]

Det fins også naturlige eksogene LXR ligander, for eksempel paksillin, en indol alkaloid som produseres av soppen *Penicillium paxilli*, som er den første naturlige ikke-oksyterol LXR- agonisten. Dets affinitet til LXR er lik 22(R)-HC. *Penicillium paxilli* egner seg ikke for *in vivo* studier på grunn av toksisitet [23].

I de fleste eksperimentelle systemer har man sett at de naturlige LXR-ligandene er mindre potente enn de syntetiske. Det er nylig vist at 22(R)-HC er en partiell agonist, det vil si at den øker LXR affiniteten til både transkripsjon koaktivatorer og korepressorer, mens T0901317 er en full agonist, det vil si at den induserer dissosiasjon av korepressorer og binding av koaktivatorer [23].

Den endelige effekten av en gitt agonist avhenger av den relative tilgjengeligheten av visse koaktivatorer og korepressorer i en gitt celle [23].

1.4.2.3 Glukose

Det er nylig vist at glukose og glukose-6-fosfat binder til og aktiverer de to LXR-isoformene [20, 23], nemlig LXR α og LXR β , mens andre enkle karbohydrater ikke har effekt. I tillegg ga glukosediett til mus oppregulering av LXR-målgener i lever og tynntarm, noe som kan indikere at glukose er en fysiologisk LXR-ligand. LXR fungerer i så fall som en glukosesensor, i tillegg til å være en kolesterolsensor [23]

1.4.3 LXR-antagonister

I motsetning til oksysteroler, hemmer geranylgeranylpyrofosfat (en intermediat av kolesterol biosyntese veien) begge LXR-isoformene ved å motvirke LXRs interaksjon med koaktivatorer. Den transkripsjonelle aktiviteten av LXR er også vist å bli inhibert av forskjellige oksiderte kolesterol-3 sulfater normalt funnet i human plasma. I tillegg er flerumettede fettsyrer funnet å være kompetitive LXR-antagonister i ulike cellelinjer [20]. Den endogene LXR-liganden; 22-S-hydroksykolesterol er vist å virke som en LXR-antagonist [29].

1.4.4 Regulering av LXR-uttrykk og-aktivitet

Ikke bare agonister og antagonister påvirker LXR-signalering. Signaleringen kan også bli modulert av reseptoruttrykk. Noen studier har vist at stimulering av peroksisom-proliferator-aktiverende-reseptorer- α og γ (PPAR α og PPAR γ) øker LXR-uttrykk [23]. Både PPAR γ og PPAR α er kjent for å indusere uttrykk av LXR α i makrofager, mens PPAR γ selv er et målgen til LXR [17].

PPAR α heterodimeriserer med både LXR α og β like bra som med RXR, selv om PPAR α /LXR α (β)-heterodimeren ikke kan binde til LXRE-områder. Det kan

interferere med dannelse og rekruttering av LXR α /RXR til LXRE-holdige promotere av LXR α /RXR, som SREBP1c [17].

Man har også sett at insulin øker uttrykk av LXR α i leveren både *in vitro* og *in vivo* og det er blitt foreslått at den stimulatoriske effekten av insulin på hepatisk lipogenese er delvis mediert via LXR [23]. Man har sett at insulin økte reseptor-mRNA i rotte-hepatocytter på en dose- avhengig måte [20].

Noen studier har vist at uttrykk av LXR α (men ikke LXR β) er kontrollert med en autoregulatorisk mekanisme [20,23]. En funksjonell LXRE som aktiveres av begge LXR-isoformene ble identifisert i den humane LXR α -genpromoterens [20]. Både syntetiske og naturlige LXR-ligander er vist å øke LXR α -uttrykk i humane makrofager, adipocytter, hepatocytter [20,23], hud- fibroblaster og myotuber [20].

1.4.4.1 Posttranslasjonal regulering av LXR aktivitet

Transkripsjonell aktivitet av LXR α er også regulert posttranslasjonalt av proteinkinase A som fosforylerer LXR på to seter og dermed hemmer dimerisering og DNA-binding [20].

Det er nylig demonstrert at LXR α er fosforylert ved Ser198 av mitogen-aktiverede proteinkinaser (MAPK). Den funksjonelle effekten av denne fosforyleringen er uklar siden de fosforylerte og de ikke fosforylerte reseptorene har de samme transkripsjonelle aktivitetene [23].

Andre kjernereseptorer som danner heterodimere med RXR kan inhibere LXR signalering ved å konkurrere med LXR om RXR, for eksempel, vitamin D-reseptor motvirker den transkripsjonelle aktiviteten av LXR α når den blir stimulert med sin ligand 1,25-dihydroksykolekaliferol [23].

1.4.5 Biologisk rolle av lever X-reseptorer

1.4.5.1 Effekter av LXR på kolesterolmetabolisme:

LXR er sensor for kolesteroloverskudd og utløser ulike mekanismer for å beskytte cellene mot kolesteroloverbelastning. Aktivering av LXR fører til stimulering av revers kolesteroltransport (RCT), inhibering av intestinal kolesterolabsorpsjon og inhibering av kolesterolsyntese og kolesterolopptak [20]

a) Stimulering av revers kolesteroltransport (RCT)

RCT involverer fjerning av kolesterol fra cellen (til high-density-lipoproteins (HDLs) eller til lipid-frie apolipoproteiner som apoA-I eller apoE), transport til leveren og biliær ekskresjon [23]. Data fra studier har klart indikert at en LXR-agonist har stimulert kolesteroltransport til lever for etterfølgende ekskresjon og/eller metabolisme *in vivo*. De fleste, hvis ikke alle, trinnene i RCT er stimulert av LXR [23]. For det første oppregulerer LXR uttrykk av transportører involvert i kolesterolfjerning fra plasmamembran til ekstracellulære akseptorer. Disse transportørene er de ATP-bindende kassettransportørene A1 (ABCA1) [23, 30] og G1 (ABCG1). Disse er det rikelig av i makrofager hvor de hindrer skumcelledannelse ved å fjerne kolesterol-overskudd. De er også uttrykket i de fleste andre celletyper inkludert hepatocytter, enterocytter, adipocytter og skjelettmuskelceller [23].

LXR er også involvert i regulering av intracellulær kolesteroltrafikk. Før kolesterolefflux, må kolesterol først bli transportert fra det endosomale kompartiment til plasma membranen. Denne prosessen medieres av to bærere, Niemann-Pick C1 (NPC1) og C2(NPC2) proteiner. LXR-agonister øker uttrykk av de to proteinene, og dermed stimuleres distribusjonen av kolesterol fra det endosomale kompartiment til plasmamembranen hvor det blir tilgjengelig for efflux til ekstracellulære akseptorer [23].

Når det gjelder kolesterolmetabolisme til gallesyrer, så er 7 α -hydroksylase (CYP7A1) det hastighetsbestemmende enzymet i hepatisk gallesyresyntese [23]. Mus som manglet LXR α eller LXR β ble foret med høy kolesteroldiett, og resultatet var at mus som manglet LXR α utviklet massiv hepatisk akkumulering av kolesterolestere, hepatomegali og hyperkolesterolemi [20, 23, 24]. Det var på grunn av manglende evne til å oppregulere Cyp7a1-uttrykk, og dermed gallesyresyntese og ekskresjon [M]. Mus som manglet LXR β har normal hepatisk kolesterol metabolisme, og klarte å adaptere seg til kolesterolrik diett. Det understreker nøkkelrollen LXR α har i denne prosessen [M]. Men i motsetning til gnagere, blir human Cyp7a1 ikke induisert av LXR α [M]. Human *CYP7a1* genet inneholder ikke LXRE og dets transkripsjon blir ikke oppregulert av LXR agonister [23]. Denne forskjellen mellom mennesker og mus kan være ansvarlig for den høye mottageligheten mennesker har for diettindusert hyperkolesterolemi [20,24].

I tillegg til regulering av gallesyresyntese inducerer LXR transkripsjonen av ATP-bindende kassettransportører ABCG5 og ABCG8 i lever [20,24], og det fører til henholdsvis økt kolesterolekskresjon til gallen, og redusert kolesterolabsorpsjon [24].

b) Inhibering av kolesterolabsorpsjon i tarm:

ABCG5 og ABCG8 spiller en nøkkel rolle i absorpsjon av kolesterol fra tynntarm. Disse er lokalisert på den apikale membranen av enterocytene, og deres primære funksjon er å transportere absorbert kolesterol tilbake til lumen av tynntarm. Ekspresjon av disse to ble økt i muse- tynntarm og i human enterocyt (CaCo-2)-cellelinje ved LXR-aktivering [M]. Konsekvensen var merkbar reduksjon i netto kolesterolabsorpsjon i mus ved administrering av LXR-agonister [20]. T0901317 reduserer absorpsjon av kolesterol fra tynntarm [23]. ABCG5 og ABCG8 er involvert i LXR-indusert inhibering av kolesterolabsorpsjon fra tynntarm [20]. Fecal kolesterolinhold er økt, mens netto kolesterolabsorpsjon fra tarm er redusert i mus som overuttrykker ABCG5 og ABCG8, mens det motsatte er observert hos ABCG5/ABCG8 dobbelt-knockout mus [23]. I tillegg er det nylig blitt rapportert at uttrykk av Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1), et protein som er kritisk for

kolesterolabsorpsjon fra tarm, er økt av syntetiske LXR-agonister i musetarm og i CaCo-2 celler [20].

c) Inhibering av kolesterolsyntese og kolesterolopptak:

Noen nøkkel-enzymmer i kolesterolbiosynteseveien, inkludert 3-hydrokso-3-metylglutarylkoenzym A (HMG-CoA)-reduktase blir stimulert av sterol-regulatorisk-elementbindende protein-2 (SREBP-2) [23]. SREBPene er transkripsjonsfaktorer syntetisert som inaktive foreløpere som er bundet til det endoplasmatiske retikulum [20,23]. Disse blir aktivert ved proteolyse, og da migrerer de til kjernen og stimulerer uttrykk av målgener [20,23]. Det finnes tre SREBP isoformer; SREBP-1a som regulerer uttrykk av gener involvert i både fettsyre- og kolesterolbiosyntese[20,23], SREBP-1c som stimulerer lipogene gener (og dermed lipogenese) [20, 23,31] og SREBP-2 som stimulerer kolesterol-syntetiserende enzymmer [20,23] og LDL reseptor [23]. Mus som manglet LXR α har vist høyere hepatisk uttrykk av SREBP-2 og noen av dets målgener, men nedregulering av hepatiske kolesterogene gener som respons til kolesterolrik diett er ikke forstyrret i verken LXR α - eller LXR β -manglende mus, noe som indikerer at sterol-indusert inhibering av SREBP-2 spalting heller enn LXR aktivering som spiller den største rollen i det fenomenet. Selv om det er data som foreslår at LXR inhiberer kolesterol biosyntese, er LXR's rolle på regulering av denne veien uklar og trenger mer undersøkelse [20].

De viktigste effektene av LXR er i kolesterolmetabolismen er på revers kolesteroltransport og på kolesterolabsorpsjon fra tarmen, mens effektene av LXR på kolesterolopptak og syntese er svake og spiller en mindre rolle [23].

1.4.5.2 Effekter av LXR på lipidmetabolisme (lipogenese)

Selv om effektene av LXR på kolesterolmetabolisme ser ut til å være nyttige, er LXRs rolle som farmakologisk mål for behandling av aterosklerose begrenset fordi aktivering av LXR induserer fettsyre- og triglyseridsyntese [24]. Denne prosessen er kontrollert av SREBP-1c som regulerer alle gener involvert i denne veien, nemlig acetyl-CoA karboksylase (ACC), fettsyresyntase (FAS) og stearyl-CoA-desaturase (SCD) [20,24, 31]. SREBP-1c binder til sterolresponselement (SRE) innen promoterområdet av gener som koder for ulike lipogene enzymer [Grazyna]. I tillegg til at LXR regulerer de lipogene enzymene via SREBP-1c, regulerer LXR de lipogene enzymene direkte, inkludert ACC, FAS og SCD-1, ved å binde til de LXREs i de regulatoriske områdene av henholdsvis *ACC*, *FAS* og *SCD-1* [23]. Behandling av mus med LXR-agonister resulterte i induksjon av hypertriglysemi og hepatisk lipogenese [24]. T0901317-indusert aktivering av lipogenese førte til massiv hepatisk akkumulering av triglyserider og hypertriglyseridemi i mus, rotter og hamstere [20]. Man har sett at hepatisk uttrykk av SREBP-1c, ACC, FAS og SCD-1 ble økt ved administrering av T0901317 i villtype mus, men ikke mus som manglet LXR α /LXR β eller som manglet LXR α . Nøkkelrollen LXR α har i kontroll av hepatisk lipogenese var bekreftet av Lund *et al* i eksperimenter utført med en spesifikk LXR α -aktivator [20].

Karbohydrat-responselement-bindende protein (ChREBP) er en glukose sensitiv transkripsjonsfaktor som stimulerer uttrykk av lipogene gener, og dermed hjelper med hepatisk forvandling av karbohydratoverskudd til lipider. Det ble rapportert at administrering av T0901317 økte mRNA-nivå og aktivitet av ChREBP og uttrykk av ChREBP-regulerte gener i lever i villtype, men ikke i LXR α /LXR β -manglende mus. LXR regulerer hepatisk uttrykk av lipogene gener med ulike mekanismer, både direkte (via LXREene) og indirekte (via SREBP-1c og ChREBP) [20].

1.4.5.3 Effekter på glukose metabolisme/antidiabetiske effekter

Det ser ut at LXR-ligander er involvert i glukosehomeostase. Det er foreslått at hepatisk LXR α -uttrykk er indusert som respons for insulin, og nylig er det funnet at

D-glukose og D-glukose-6-fosfat er direkte agonister av LXR [24]. Det er også blitt vist at LXR-agonisme inhiberer uttrykk av glukoneogene enzymer, inkludert PEPCK (som er det hastighetsbestemmende enzymet i glukoneogenesen), fruktose-bifosfatase-1 og glukose-6-fosfatase [24].

Mekanismen for hvordan LXR-ligander kan forbedre insulinresistens ser ut å involvere en kombinasjon av effekter på insulinsignalering og sekresjon [24].

Funksjonelle LXRE var identifisert i promoterområdet til GLUT4-genet i både mus og mennesker, og syntetiske LXR-ligander er vist å øke GLUT4 uttrykk i hvit fett vev hos mus og rotter og i kulturer av adipocytter fra mus og mennesker. Denne effekten ser ut til å bli mediert av begge LXR-isoformene siden T091317 oppregulerer uttrykk av GLUT4 i både LXR α -og LXR β -manglende mus (men ikke i LXR α /LXR β -dobbel knockoutmus) [20].

I motsetning til i fettvev, blir GLUT4-uttrykk i skjelettmuskel ikke oppregulert ved LXR aktivering i gnagere [20]. Det er blitt imidlertid vist at GLUT4-uttrykk var høyt oppregulert ved T091317-behandling i humane myotuber fra både kontroll og type 2 diabetiske personer [20].

Det er også gjort studier som viser andre effekter av LXR, for eksempel at LXR-agonisme undertrykker inflammatorisk genuttrykk i makrofager og inhiberer proliferasjon av glatte muskelceller (som spiller viktig rolle i patogenesen til aterosklerose) [24].

Den unike evnen LXR har til å øke kolesterolefflux fra lipid-ladete makrofager, revers kolesteroltransport til lever, kolesterol-ekskresjon i gallen, sammen med effekten av LXR-agonisme på å undertrykke inflammatorisk og proliferativ genaktivering, gjør det mulig å se på LXR som et lovende farmakologisk mål for behandling av dyslipidemi og aterosklerose [24]. Likevel vil utfordringen for videre utvikling av denne strategien være å lage LXR-agonister som ikke fører til lipogenese og triglyserid-akkumulering. Dette kan for eksempel gjøres ved å lage LXR β -

selektive agonister, fordi LXR α ser ut til å være den predominante reseptor subtypen som er ansvarlig for triglyserid syntese [24].

Selv om det er vist at LXR-agonister har potente antiaterosklerotiske egenskaper i mus, kan ikke resultatene av disse studiene ekstrapoleres til mennesker på grunn av artsforskjeller i lipoproteinmetabolisme og LXR-målgener. For det første er det humane CYP7a1 ikke under LXR-kontroll, i motsetning til hos gnagere. En annen viktig forskjell mellom mus og mennesker er at mus mangler LXR-målgenet cholesteryester-transportprotein (CETP). CETP er involvert i utveksling av triglyserider i apo-B holdige lipoproteiner for HDL-kolesterol, og dermed reduserer økt CETP HDL-kolesterolkonsentrasjonen og forsterker en mer aterogen plasmalipoproteinprofil [20].

1.5 LXR og oksidasjon/lipogenese i skjelettmuskel

Skjelettmuskel står for ca 40 % av den totale kroppsvekten til en voksen, er det største organet for glukose- og fettsyreoksidasjon [32,33] og er det største insulinfølsomme vevet [4]. Muskel er derfor et viktig organ for insulinresistens ved type 2-diabetes [34]. I skjelettmuskel blir intracellulær glukose raskt fosforylert av heksokinase og dirigeres til oksidativ eller non-oksidativ metabolisme [4]. Glukose oksideres av glykolytiske prosesser og det dannes pyruvat som så transformeres til acetyl-CoA som videre metaboliseres i sitronsyresyklusen, for til slutt å danne kjemisk bundet energi i form av ATP. Hvis glukose ikke forbrukes umiddelbart for energi, undergår den non-oksidativ metabolisme og lagres som glykogen i skjelettmuskel [3] og lever, og som triglyserider i fettvev [2].

Selv om LXRene først ble identifisert som lever-berikede transkripsjons faktorer, er disse også uttrykt i skjelettmuskel [32]. LXR α og LXR β er funnet i human skjelettmuskel [25,32] og fettvev [25].

Selv om LXRene er blitt vist å være viktige regulatorer av hepatisk fetttsyremetabolisme [32], er det ikke gjort mange studier på deres rolle i human skjelettmuskel. Noen nyere rapporter har indikert at ligander til LXR (T0901317 eller GW3965) induserer ekspresjon av nøkkelgener til lipogenese og lipidmetabolisme, både *in vivo* i skjelettmuskel i gnagere og *in vitro* i kulturer av muskelceller [25]. Det samme ble bekreftet i differensierte humane myotuber [25]. Studier har vist at aktivering av LXR med T0901317 i skjelettmuskel førte til oppregulering av kjente LXR målgener, og det er tidligere i vårt laboratorium vist at LXR også har en funksjonell rolle i både lipid- og glukosemetabolisme i humane myotuber, hvor de fører til økt lipiddannelse [29]. Muscat *et al.* har også vist at LXR aktivering med en syntetisk LXR-agonist økte opptak, fordeling til komplekse cellulære lipider og oksidasjon av palmitat. Stimulering med T0901317 førte også til økt opptak og oksidasjon av glukose i kulturer av humane skjelettmuskelceller [33]. Aktivering av LXR førte til markant induksjon av lipogenese og akkumulering av triglyserider uten å påvirke insulineffekten i differensierte humane skjelettmuskelceller [33].

1.6 Humane skjelettmuskelceller

Postnatal skjelettmuskel inneholder satelittceller, en gruppe av stamceller. Primære satelittcellekulturer er blitt et viktig verktøy som et modellsystem for skjelettmuskel [35]. Skjelettmuskel er det prinsipielle stedet for insulin-mediert glukoseopptak og forbruk hos mennesker [36]. Det er blitt etablert vevskulturer fra satelittceller fra forskjellige arter [35]. Gaster *et al.* har optimalisert en metode for dyrking av satelittceller hvor noen metoder for estimering av fraksjon av satelittceller i kultur ble kombinert. For detaljer, refereres det til Gaster *et al.* [35].

1.7 Mål

Målet for oppgaven er å studere betydningen av de to isoformene LXR α og LXR β i skjelettmuskelceller. Jeg ønsker å belyse følgende spørsmål:

1. Hvilken betydning har isoformene LXR α og LXR β for LXR-indusert lipogenese i skjelettmuskelceller?
2. Hvilken effekt har stimulering av RXR på LXR-indusert oljesyreoksidasjon og lipogenese i muskelceller?
3. Det er tidligere i laboratoriet funnet at skjelettmuskelceller uten LXR β har redusert insulinindusert glukoseopptak. Hvilken betydning har isoformene LXR α og LXR β for insulinindusert Akt- og ERK-aktivering?

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

Ham's F10 Glutamax medium, Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM/Glutamax), føtalt kalveserum (FCS), fungizone 250 mg/ml, hestenserum, penicillin-streptomycin (10,000 IE/10 mg/ml), trypsin-EDTA, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS m/ Ca^{2+} og Mg^{2+}) var fra Gibco, Life Technologies (Paisley, Scotland, UK). HBSS var fra PAA Laboratories GmbH (Pasching, Østerrike). Matrigel ble skaffet fra BD Biosciences (Bedford, MA, USA). Bovint serumalbumin (BSA), L-carnitine, dimetylsulfoksid (DMSO), oljesyre (OA), beta-merkaptoetanol, ponceau S- løsningsmiddel, HEPES, lipidstandarder (diacylglycerol, triacylglycerol, frie fettsyrer og kolesteolestere), og tris var fra Sigma (St.Louis, MO, USA). Basic Fibroblast-vekstfaktor (bFGF) var fra Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). [^{14}C]acetat (54 mCi/mmol) var fra ARC (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA), T0901317 var fra Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Insulin Actrapid® Penfill® ble kjøpt fra NovoNordisk, Bagsvaerd, Danmark. GW501516 ble syntetisert av Calin C. Ciocoiu, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS, Levanger, Norge. Enhanced Chemiluminescence-reagens (ECL) ble kjøpt fra GE Healthcare, Buckinghamshire, UK. Phospho-Akt (Ser473), Phospho-pp44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) ble kjøpt fra Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA. Goat anti-rabbit IgG-horse raddish peroxidase conjugate, goat anti-mouse IgG horse raddish peroxidase conjugate, 30 % Acrylamid/Bis løsningsmiddel, Tetramethylethylenediamine (TMED) og Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards var fra BioRad Laboratories, Hercules, Ca, USA. Pierce Protein Assay ble kjøpt fra Boule Nordic AS, Ski, Norge. Kodak X-Ray-fikseringsløsning og Kodak X-Ray-fremkaller var fra Carestream Health, Inc, Rochester, NY, USA. Proteinmålingsreagens var fra Bio-Rad, København, Danmark. Cell-Bind© celledyrkningsplater fra Corning Inc., Costar, NY,

USA. 96-brønners filterplater Whatman UniFilter®-96 GF/B, TopSeal®- A klebende film, [^{14}C]oljesyre (54,6 mCi/mmol), OptiPhase Supermix®, UltimaGold™ scintillasjonsvæsker fra Perkin Elmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA. Ultrosor G var fra BioSeptra, Process Division of CIPHERGEN Biosystems Inc., Paris, Frankrike.

Alle andre kjemikalier og reagenser som ble brukt var av analytisk kvalitet.

2.2 Metoder

2.2.1 Cellemodell

I forsøkene som ble gjort i denne masteroppgaven, ble det benyttet både humane skjelettmuskelceller i kultur og muskelceller fra mus, både fra villtype og LXR α - og LXR β -knockout mus.

2.2.2 Humane skjelettmuskelceller

De humane skjelettmuskelcellene som ble brukt, ble først proliferert og differensiert fra humane satelittceller, som er udifferensierte celler som befinner seg i nærheten av muskelfibre, og differensierer på samme måte som embryonale myoblaster.

2.2.2.1 Donorkarakteristika

Humane skjelettmuskelceller som ble brukt til forsøkene ble isolert fra muskelbiopsier fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrå, indre bukmuskel). Alle donorer var friske frivillige forsøkspersoner.

Tabell 2.1 Donorkarakteristika

ID	Kjønn (M/K)	Alder (år)	Høyde (cm)	Vekt (kg)
LD14	M	63	175	78
LD15	K	55	171	85
LD17	K	56	170	67
LD18	K	52	175	68
LD22	M	40	172	85
LD23	K	61	170	63
LD24	K	70	170	70
LD36	K	41	160	52
LD37	K	35	163	55
Gj.snitt ± SD		52,6 ± 11,7	169,6 ± 5	69,2 ± 11,8

Forkortelser: LD = levende donor, M = mann, K = kvinne, SD = standardavvik

2.2.2.2 Dyrkning av humane skjelettmuskelceller

Satelittcellene som ble brukt her, ble dyrket etter metoden beskrevet av Michael Gaster *et al* [35].

2.2.2.2.1 Utsåing av satelittceller

Nedfrosne satelittceller i fryserør (ampuller, Nunc rør) fra de ulike donorene ble tatt opp fra nitrogentanken (-196 °C). Korken ble åpnet og lukket for å utligne trykket. Satelittcellene ble tint raskt og forsiktig på 37 °C- vannbad. Etter at cellene ble tint, ble de overført til 50 ml sentrifugerør, hvor det ble tilsatt 5 ml utsåingsmedium (Appendiks) dråpevis. Sentifugerøret med cellesuspensjonen ble nå sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatanten som inneholdt det toksiske, kuldebeskyttende dimetylsulfoksid (DMSO) ble sugd av og kastet. Cellene ble så resuspendert i 1 eller 1/2 ml utsåingsmedium, og blandet godt med pasteurpipette.

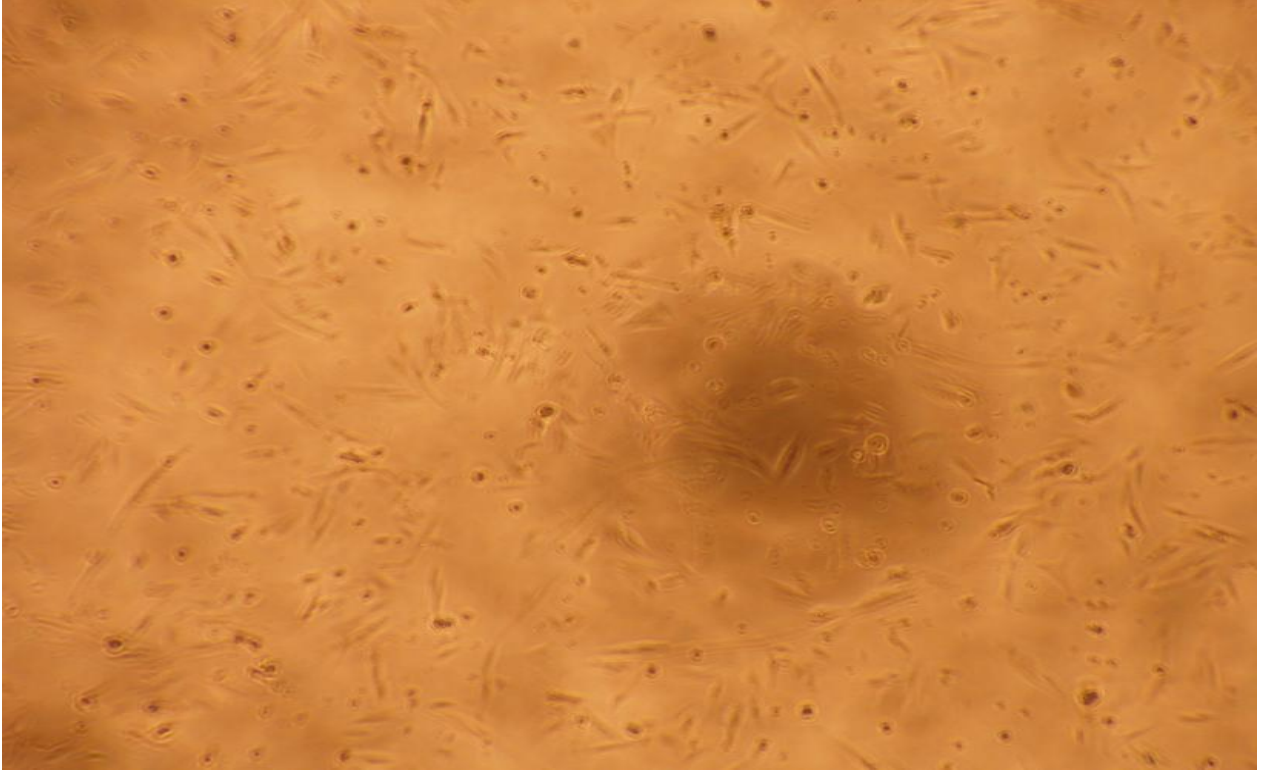
For å beregne antall viable celler, ble det blandet en jevn cellesuspensjon og 0,4 % tryptanblått (som penetrerer uintakte cellemembraner og farger cellene blå) i forholdet 1:1 (f.eks. 50 µl av hver), og blandingen ble telt i et tellekammer. Resten av cellesuspensjonen ble deretter tilsatt passe volum utsåingsmedium etter hva man ønsket av celletetthet.

Cellesuspensjonen med det ønskede antall celler ble blandet godt og sådd ut på coatede 96-brønnersbrett. Det ble sådd ut 100 ul per brønn, hvor celletettheten var cirka 6000 celler per brønn

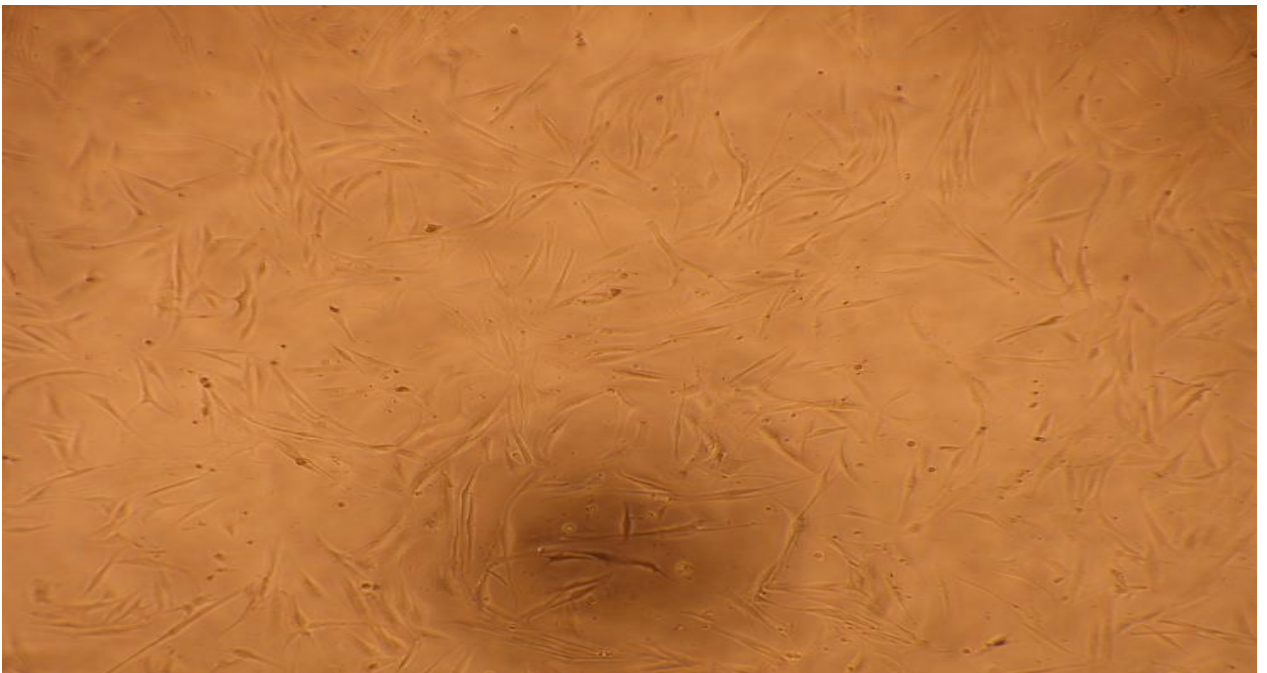
2.2.2.2.2 Vekst av satelittceller og differensiering til flerkjernede muskelfibre

Etter utsåing av cellene, ble de inkubert i cirka 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂ før utsåingsmediet (Appendiks) ble skiftet med proliferasjonsmedium (Appendiks). Proliferasjonsmediet ble skiftet hver 2.- 3. dag, og cellene ble dyrket til de var konfluente eller begynte å spontandifferensiere. Da ble proliferasjonsmediet skiftet med differensieringsmedium. Ved differensiering begynner de udifferensierte, mononukleære satelittcellene å fusjonere til flerkjernetete muskelfibre (figur 2.1).

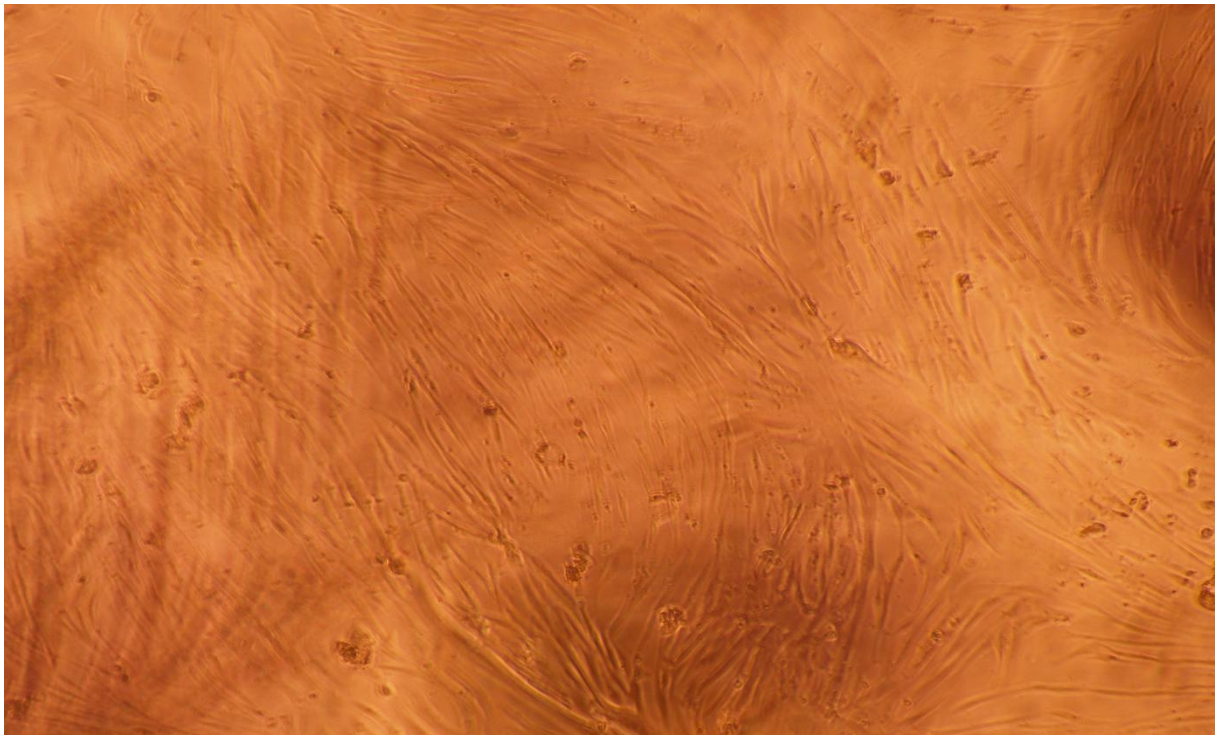
A



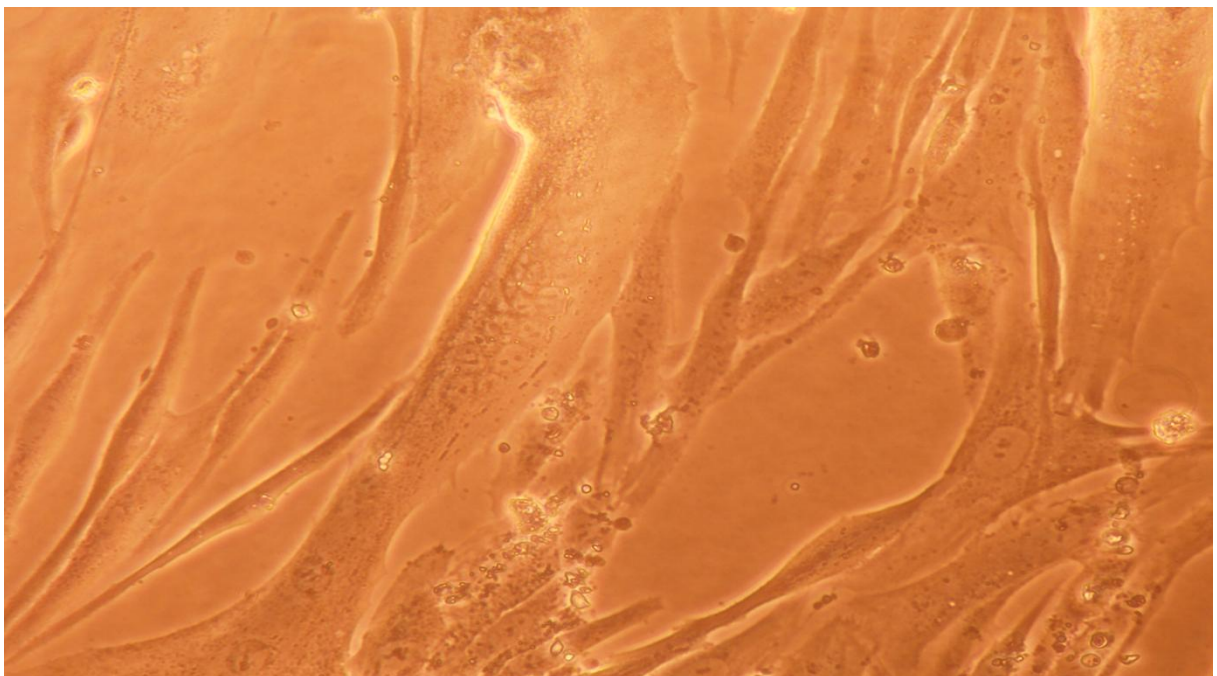
B



C



D



Figur 1.6 Satelittceller ved utsåingsdagen ved forstørrelse 4 x (A), 2. dag etter utsåing (B) ved forstørrelse 4 x, 3. dag etter differensiering til myotuber ved forstørrelse 4 x (C) og ved forstørrelse 20 x (D).

De ulike ligandene som ble brukt til disse forsøkene, ble satt til cellene sammen med differensieringsmediet dag 3 etter start av differensieringen, og tilsatt på nytt ved mediumskift på dag 5 etter start av differensieringen. Forsøk ble utført den 7. dagen etter start av differensieringen.

Vekst og differensiering av cellene ble visuelt undersøkt i mikroskopet, og bilder ble tatt noen ganger. I alle forsøkene ble det brukt 8 brønner per behandling. Som kontroll, ble det brukt 0,1 % DMSO i ligandfritt differensieringsmedium. Her ble det brukt 16 brønner i hvert forsøk.

2.2.2.2.3 Substrat-oksidasjonsforsøk i 96-brønners Brett ("trapping")

Etter at cellene ble preinkubert med de ønskede substansene, ble forsøk utført den 7. dagen etter start av differensieringen som nevnt tidligere. På forsøksdagen ble differensieringsmediet med de ulike ligandene byttet med 50 μ l forsøksmedium per brønn. Forsøksmediet besto av

- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (med Mg^{2+} og Ca^{2+})
- 1 mM karnitin,
- BSA (bovint serum albumin) (7,2 μ M)
- Ikke-radioaktiv oljesyre (82 μ M) og radioaktiv [^{14}C]oljesyre (18 μ M).

Den endelige konsentrasjonen oljesyre var 100 μ M, 1 μ Ci/ml

Cellebrettet ble plassert i en platepresse/"trapper" (som var på forhånd lagt i en inkubator for å bli temperert), deretter ble en 96-hulls silikonpakning lagt oppå cellebrettet for å sikre et lufttett system. Silikonpakningen ble stabilisert med knotter til hver av hjørne-brønnene. En 96-brønners filterplate som på forhånd var fuktet med 20 μ l 1 M NaOH per brønn, ble lagt oppå silikonpakningen. En metallplate ble lagt til slutt for å ha jevnt trykk over platene, og for å sikre at systemet var tett. Cellebrettet ble så inkubert i 4 timer ved 37 °C. Etter inkubering i 4 timer, ble forsøksmediet sugd av, og hver brønn med celler ble vasket forsiktig 2 ganger med 150 μ l høstebuffer

(PBS-buffer, pH 7,4) (Appendiks) for å fjerne overskudd av radioaktivitet. Cellene ble så tilsatt 200 µl 0,1 M NaOH per brønn. Brettet kunne nå fryses ned for senere måling av protein og celleassosiert.

2.2.2.2.4 CO₂ måling (måling av fettsyreoksidasjon)

Etter trappingen ble filterplaten fjernet fra trapperen og ble tilsatt 40 µl Optiphase Supermix tellevæske per brønn. Platen ble dekket med transparent, adhesiv plastfolie. Brettet sto i to dager før den ble målt med en Wallac MicroBeta teller (telleprotokoll karbondioksid). Under inkuberingen ble den radioaktive oljesyren som ble tatt opp i cellene omdannet i mitokondriene til CO₂. [¹⁴C]CO₂- som ble dannet, reagerer med NaOH i filterplaten og gjør det mulig å få et mål på oksidasjon av den radioaktive syren, fordi mengden [¹⁴C]CO₂ produsert, er proporsjonal/relatert til mengden av [¹⁴C]oljesyre som ble oksidert.

2.2.2.2.5 Lysatmåling (måling av celleassosiert)

Som et mål på cellenes fettsyreopptak, ble celleassosiert [¹⁴C]oljesyre målt. Celleassosiert radioaktivitet som måles er egentlig lavere enn det faktiske opptaket, fordi en del av [¹⁴C]oljesyre har blant annet blitt omdannet til [¹⁴C]CO₂ i sitronsyresyklusen, og en del blir delvis omdannet og skilt ut som β-oksidasjonsprodukter i mediet.

50 µl homogenisert cellelysat fra hver brønn av cellebrettet som ble tilsatt 0,1 M NaOH, ble overført til et 96-brønnersplate (Isostar), og ble tilsatt 100 µl Optiphase Supermix tellevæske per brønn. Det ble også målt 4 paralleller av det radioaktive forsøksmediet. Platen ble dekket med transparent, adhesiv plastfolie, og sto i to timer før det ble telt med en Wallac MicroBeta teller (telleprotokoll CA, lysat).

2.2.2.2.6 Proteinmåling

Reagenset Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ble brukt for proteinmålingen, og er basert på metoden til Bradford. Metoden innebærer tilsetting av en sur fargeløsning til en proteinløsning, med etterfølgende måling ved 595 nm med en spektrofotometer eller en mikroplateleser. Fargen endrer seg da relatert til proteinkonsentrasjonen. Det skjer ved at fargestoffet Coomassie^(R) Brilliant Blue G-250 binder seg primært til basiske og aromatiske aminosyre rester, spesielt arginin, og absorpsjonsmaksimum for en sur løsning av fargestoffet endres fra 465 nm til 595 nm når proteinbindingen skjer. For å kvantifisere proteinkonsentrasjonen, sammenlignes absorbansen med en standardkurve laget av kjente proteinkonsentrasjoner, og proteinmålingen som da gjøres, er relativt til standardkurven.

For å gjøre det, ble 50 µl homogenisert cellelysat fra hver brønn av cellebrettet som ble tilsatt 0,1 M NaOH, ble overført til et 96-brønners mikrotiterplate, og ble tilsatt 200 µl Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate som først ble fortynnet med destillert vann i forholdet 1:4, og filtrert gjennom Millipore membranfilter 0,45.

For å kunne bestemme proteinkonsentrasjonen i prøvene, ble det laget en standardkurve fra proteinstandarder. Proteinstandardene ble laget av BSA fortynnet i 0,1 M NaOH til kjente konsentrasjoner (0-80 µg/ml). Det ble målt 2 paralleller á 50 µl av hver proteinstandard. Brettet med prøvene og standardene tilsatt fargningsreagenset sto i 5 minutter i romtempertaur før absorbansen/O.D (optical density) ble målt ved bølgelengde 595 nm med Wallac VictorTM mikroplateleser fra Perkin Elmer.

2.2.3 Skjelettmuskelceller fra mus

2.2.3.1 LXR-knockout- og villtypeceller

For å studere betydningen av hver av LXR-isoformene (LXR α og LXR β), ble det benyttet i oppgaven kulturer av skjelettmuskelceller fra villtype (VT), LXR α og LXR β -knockout (KO) mus. Celler fra LXR α -KO-mus er celler hvor LXR α isoformen er fjernet, mens celler fra LXR β -KO-mus er celler hvor LXR β -isoformen er fjernet. Hensikten er å kunne studere rollen til hver av de to LXR-isoformene når det benyttes ligander som antas å aktivere begge subtypene. Etter aktivering med ligander kan man studere effekten av LXR α isoformen i celler fra β -KO-mus og omvendt.

2.2.3.2 Dyrkning av skjelettmuskelceller fra mus

2.2.3.2.1 Utsåing av celler

Cellene (både KO og VT ble først sådd ut i 75 cm² flasker til de ble tette, før de ble splittet og deretter sådd ut på brett.

2.2.3.2.2 Utsåing i flasker

Ampuller med nedfrosne celler ble tatt ut fra nitrogenbanken (-196 °C) og ble tint raskt i vannbad (37 °C). Korken til ampullen ble åpnet og lukket for å utligne trykket. Cellesuspensjonen ble deretter overført til 50 ml rør og 5 ml vekstmedium (Appendiks) ble tilsatt. Det ble nå sentrifugert i 5 minutter ved 2500 rpm. Supernatanten inneholdende den toksiske DMSO ble sugd av, før cellene ble resuspendert i 12 ml vekstmedium (Appendiks) og sådd ut i 75 cm² flasker.

2.2.3.2.3 Splitting og utsåing på brett, vekst og differensiering

Etter dyrkning på flasker ble cellene splittet. Dette ble gjort ved at vekstmediet ble sugd forsiktig av før cellene ble skylt (veldig forsiktig) 3 ganger med 4 ml HBSS. Skyllingen med HBSS ble gjort for å vaske vekk serumet (fra vekstmediet) som kunne hemme neste trinn, nemlig trypsinering. Deretter ble 4 ml trypsin EDTA tilsatt, og flasken ble inkubert i cirka ett minutt ved 37 °C og 5 % CO₂. Flasken ble så tatt ut og dunket i siden for å løsne cellene. Cellene ble visuelt undersøkt i mikroskopet for å se om de fleste cellene har løsnet.

5 ml vekstmedium ble deretter tilsatt, og det ble pipettert opp og ned for å få med flest mulig celler og deretter ble celledensiteten overført til et 50 ml rør før ytterligere 5 ml medium ble satt til flasken og overført til 50 ml røret. Celledensiteten ble sentrifugert i 5 minutter ved 2500 rpm. Etter sentrifugeringen ble supernatanten med DMSO fjernet, og cellepelletten ble resuspendert nøyaktig i 2 ml vekstmedium.

50 µl celledensitet og 50 µl trypanblått ble blandet godt, og brukt til telling. Cellene ble telt i et Burker tellekammer, og så ble de fortynnet med vekstmedium til ønsket tetthet, og sådd ut på 6-brønners brett (til Westernprøver) eller 12-brønners brett (til lipogenesemåling). Brettene var coatet på forhånd med Matrigel fortynnet med DMEM i forholdet 1:50. Hver brønn var coatet med 0,8 og 0,4 ml fortynnet Matrigel for henholdsvis 6 og 12-brønners brett. Brettene sto med coatingsmediet i en time før hver brønn ble skylt med 1 og 1/2 ml DMEM for henholdsvis 6 og 12-brønners brett. Brettene var nå klare til utsåing av celler. Det ble sådd ut 1 ml celledensitet per brønn hvor celledensiteten var henholdsvis cirka 250 000 og 125000 celler per brønn for 6 og 12-brønners brett. Cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ og vekstmediet ble byttet hver 2.-3.dag til cellene var konfluente. Da ble vekstmediet byttet med differensieringsmedium (Appendiks) og ble inkubert under samme forhold. Differensieringsmediet ble byttet hver 2.-3. dag.

2.2.3.3 Western blotting

2.2.3.3.1 Prinsipp

Westernblotting er en analytisk teknikk som brukes til å detektere spesifikke proteiner i en prøve. Det benyttes gelelektroforese for å separere native eller denaturerte proteiner. Native eller ikke-denaturerte proteiner separeres på grunnlag av den tredimensjonale strukturen til proteinet, mens denaturerte proteiner separeres på grunnlag av molekylstørrelsen eller lengden av polypeptidkjeden til proteinet (i forsøkene som ble utført her, ble proteinene denaturert). Proteinene blir så overført til en nitocellulosemembran, hvor de detekteres ved hjelp av antistoffer som er spesifikke for målproteinet. Først tilsettes det primære antistoffet, som binder seg til målproteinet, så tilsettes det sekundære antistoffet som bindes til det primære antistoffet. Det sekundære antistoffet er bundet til et reporterenzym som alkalisk fosfatase eller pepperrotperoksidase. Det mest vanlige er pepperrotperoksidase (brukt i de forsøkene som ble utført her), som sammen med en kjemiluminiserende agent danner luminisens som er relatert til proteinmengden. Luminisensen eller lyset detekteres av en fotografisk film som plasseres mot membranen, og det lages et bilde av antistoffene som er bundet til blottet.

2.2.3.3.2 Forbehandling og høsting av museceller til Western

Etter 48 timers differensiering, ble cellene preinkubert med 1 μM T0901317 (med 0,1 % DMSO) eller med kontroll (bare 0,1 % DMSO i differensieringsmedium) i 48 timer. Etter preinkuberingen, ble cellene tilsatt 100 μM insulin eller destillert vann som kontroll. Hver brønn ble ristet forsiktig og inkubert i 15 minutter, før det ble skylt to ganger med 1 ml PBS (Appendiks). Så ble cellene lysert i 200 μl 2x sample buffer (Appendiks) per brønn, og cellene ble skrapet over til Nunc rør (små rør som tåler koking). Nuncrørene ble så kokt i vannbad (100 °C) i fem minutter. 25 μl ble tatt ut til

protein før resten ble tilsatt 10 % beta-merkaptoetanol og 5 % bromfenolblått (Appendiks). Rørene ble kokt i enda fem minutter til før de ble frosset ned (-20 °C) for senere analyse.

Beta-merkaptoetanol reduserer de intra- og inter-molekulære disulfidbindingene til proteinene, og dermed tillater separasjon av proteinene på grunnlag av molekylstørrelsen. SDS fra samplebufferen binder til proteinene slik at de blir dekket med en negativ ladning, i tillegg til at den denaturerer proteinene også, og dermed hjelper med at proteinene separeres etter molekylstørrelse under elektroforesen. Bromfenolblått virker som fargeindikator, og gjør det lettere å sette prøvene i gelbrønnene og hjelper med å se prøvefronten under vandringen under elektroforesen. Noen ganger ble det tilsatt fosfatasehemmere til samplebuffer for å hindre defosforylering av prøvene av sine egne enzymer. Glyserol i samplebufferen øker tettheten av prøven slik at prøven faller lettere til bunnen av brønnen under prøvepåsetting, og dermed minimeres tap av prøve.

2.2.3.3 Gelelektroforese

I den vanligste typen gelelektroforese (som ble brukt her) benyttes polyakrylamidgel og buffer med natriumdodekylsulfat (SDS). SDS-PAGE (SDS polyakrylamid-gelelektroforese) holder polypeptidene i en denaturert tilstand, etter at de først har blitt behandlet med sterke reduserende agenter for å ødelegge den sekundære og den tertiære strukturen (f.eks disulfid-bindinger [S-S] til sulfydryl-grupper [SH og SH]). Når den sekundære og den tertiære strukturen til proteinene er ødelagt, separeres proteinene etter molekylvekt. Detergenten SDS dekker proteinene med en negativ ladning og beveger dem mot en positivt ladet elektrode gjennom gelen. Mengden SDS som bindes til proteinene er relatert til proteinstørrelsen, slik at proteiner med lav molekylvekt beveger seg raskere gjennom gelen, og proteinene separeres etter størrelse. Konsentrasjonen av akrylamid bestemmer separasjonen av proteinene i gelen. For proteiner med høy molekylvekt vil lav akrylamidkonsentrasjon gi bedre

seperasjon, mens for lavmolekylære proteiner vil høy akrylamidkonsentrasjon gi bedre oppløsning.

Etter at 12 % eller 10 % gel ble laget etter oppskrift (Appendiks), ble den tilsatt i støpeformen, og så ble det tilsatt 200 μ l isobutanol til hver geloverflate, for å fjerne bobler (som kan stoppe polymeriseringen) og ha jevn øvre kant. Gelen polymeriserte i cirka 45 minutter, eller til den har stivnet i røret den først ble laget i. Gelen ble skylt med destillert vann for å fjerne rester av isobutanol, og tørket av med papir. Deretter ble 4 % stackgel (Appendiks) laget etter oppskrift, og støpeformen ble fylt helt opp med den. En brønnekam ble plassert i hver gel, og det ble etterfylt med stackgel. Stackgelen polymeriserte i 45 minutter eller til den har stivnet, før platene ble tatt fra hverandre med kniv og hver gel vasket slik at gelrester ble fjernet, og gelen ble nå klar til gelelektroforese. Noen ganger ble gelen pakket inn med fuktig papir, og lagret i kjøleskapet til en annen dag (maks 3-4 dager).

For å kjøre elektroforese, ble gelen plassert i elektroforesekaret, og elektroforesebuffer ble helt bak gelene og i elektroforesekaret, slik at det ble nok buffer til strømvandring. Etter det ble brønnekammene tatt forsiktig ut, og brønnene ble skylt med en pipette. Hver brønn ble tilsatt en mengde prøve som var utregnet på forhånd, slik at mengde protein i hver brønn var lik i alle brønnene. Mengde prøve som ble tilsatt i hver brønn var opptil 20 μ l. I hver gel ble det tilsatt 4 μ l standard (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards) i en brønn. Denne standarden inneholder forskjellige proteiner med kjent molekylvekt. Disse proteinene er også farget slik at de danner synlige, fargete bånd på gelen. Med disse standardproteinene kan man sammenligne prøveproteinene.

Etter at prøvene og standarden ble tilsatt, ble strømløkket satt på og elektroforesen ble startet på 200 V i 100 minutter.

2.2.3.3.4 Overføring/blotting

Filterpapir og membran ble fuktet i blottebuffer i ca 5-10 minutter før det ble laget sandwich etter Hoefers metode (semidry blotting): 3 filterpapir-membran-gel-3 filterpapir, og det ble tilført blottebuffer mellom hvert lag. Filterpapiret og membranen var kuttet i riktig størrelse etter strømstanseren i plast som ligger på bunn i blottemaskinen (ca. 6 x 8 cm). Etter det ble strøm koblet til lokket og blottemaskinen koblet til strømuttak. Blottemaskinen ble kjørt ved 32 mA per gel (dvs. 64 mA ved to geler) i 60 minutter. Når proteinene er blitt blottet over til membranen, er de nå eksponert på en tynn overflate, og er tilgjengelige for antistoff binding. Proteinene er blitt overført fra gelen til membranen ved elektroblotting, dvs. at den elektriske strømmen overfører proteinene fra gelen til membranen.

Ferdig blott ble farget i Ponceu S i ett minutt, og skylt i destillert vann. Dette gjøres for å se hvor effektivt overføringen av proteinene var fra gelen til membranen. Det ble tatt en fotokopi av membranen mellom to overheadark.

2.2.3.3.5 Deteksjon av immunoblott

Membranen ble lagt 10 minutter i T-TBS (Appendiks) før den ble blokkert i Blotto (Appendiks) i 60 minutter ved romtemperatur og vipping. Proteiner fra tørrmelken i Blotto binder seg alle steder på membranen der målproteinene ikke er bundet, slik at når antistoff blir tilsatt, må den binde seg til målproteinene, og ikke til andre steder på membranen. På den måten hindres uspesifikk binding, og falskt positive resultater elimineres. Etter blokkingen, ble blokkerløsningen helt av, og 10 ml primært antistoff løst i Blotto ble tilsatt (10 ml per membran), og ble inkubert over natt på kjølerom med vipping.

Neste dag ble membranen vasket med Blotto 3-4 ganger i 5-15 minutter ved romtemperatur og vipping, før det sekundære antistoffet ble tilsatt (10 ml per

membran) og membranen ble inkubert med den i 45-60 minutter ved romtemperatur og vipping. Etter inkuberingen ble membranen vasket 5-15 minutter i Blotto ved romtemperatur og vipping, så ble membranen skylt to ganger med T-TBS, og deretter vasket 4 ganger i 5-15 minutter med T-TBS ved romtemperatur og vipping.

De primære og de sekundære antistoffene som ble brukt var:

P-AKT fortynnet i Blotto 1:1000 - Geit-anti-kanin fortynnet i Blotto 1:3000

P-ERK fortynnet i Blotto 1:2000 - Geit-anti-mus fortynnet i Blotto 1:1500

AKT (total AKT) fortynnet i Blotto 1:1000 - Geit-anti-kanin fortynnet i Blotto 1:3000

ECL reagens ("enhanced chemiluminescence" reagens) fra Amershamn ble blandet som beskrevet på pakningen (like deler av flaske A og flaske B i en liten skål) og membranen ble inkubert i ECL reagnset i ett minutt, før membranen ble pakket i en plastfolie. Så ble membranen med en film over det lagt i en bok for eksponering fra ett minutt til en time avhengig av det primære antistoffet som ble brukt.

Etter det ble filmen lagt over i fremkaller (120 ml fremkaller+ 280 ml springvann) som var laget på forhånd i ca et halvt minutt til den ble svart, så ble den skylt med vann før den ble lagt over i fix (120 ml fix+ 280 ml springvann) som var laget på forhånd i ca fem minutter, så ble den lagt over i vann i ca ett minutt, så ble den hengt til tork, og man kunne se bånd med forskjellige styrker.

2.2.3.3.6 Kvantifisering

Kvantifisering ble utført ved hjelp av GeneTools fra SynGene. Relativ lysintensitet til de forskjellige båndene på filmen ble målt, ved at filmene ble skannet inn først.

2.2.3.3.7 Stripping

Noen ganger ble membranene "strippet". Det ble gjort når man ønsket å prøve andre

antistoffer på den samme membranen. Da slapp man å utføre gelelektorforese og blotting over til membran. Det er både tidsparende og man slipper å tilsette prøve (spesielt nyttig hvis man ikke har mer prøve). Dette ble gjort ved at membranen ble lagt i en skål med strippebuffer (Appendiks) i vannbad (50 °C) i 30 minutter, og det ble vippet av og til. Etter det ble membranen vasket 2x 10 minutter med T-TBS (Appendiks) før membranen ble blokkert i Blotto (Appendiks) i 60 minutter. Etter det ble primært antistoff tilsatt, og resten ble gjort på samme måte som tidligere beskrevet.

2.2.3.3.8 Proteinmåling

Det ønskes lik mengde protein i hver brønn, og siden det er ukjent proteinkonsentrasjonen i hver prøve, måles proteinkonsentrasjonen i hver prøve, slik at det settes utregnet prøvemengde i hver brønn på basis av det.

For denne proteinmålingen, ble det brukt et kit fra Pierce (Pierce BCA protein assay reagent). Reagenset ble laget ved å blande 50 deler av A som inneholder "Bicinchoninic acid" og 1 del B som inneholder 4 % CuSO₄.

Dette ble gjort ved å ta 5 µl prøve, og så tilsette 30 µl destilert vann og 700 µl reagens. Deretter ble det satt på varmeblokk (60 °C) i 30 minutter før det ble avkjølt. To paralleller med 300 µl av hver prøve ble fordelt i mikrotiterplate. Standardkurve ble laget av 0,5 mg/ml BSA i samplebuffer som var fortynnet med destillert vann i forholdet 1:7. Proteinkonsentrasjonene til proteinstandardene var fra 0-0,5 mg/ml, og disse ble tilsatt 700 µl reagens på samme måte som prøvene. Absorbansen ble deretter målt ved 590 nm på Wallac Victor™ mikroplateleser fra Perkin Elmer.

2.2.3.4 Lipogenesemåling

2.2.3.4.1 Forbehandling, høsting og prøveopparbeidelse og ekstraksjon av lipider

Det ble sådd ut 12-brønners brett (se utsåing, vekst og differensiering av museceller). På dag 3 etter differensiering, ble cellene preinkubert med de ønskede ligandene som var; 1 μ M T0901317, 10^{-7} M LG100268, 1 μ M T0901317 + 10^{-7} LG100268 og kontroll (0,1 % DMSO) i mus differensieringsmedium i 48 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Det ble laget 3 paralleller av hver behandling.

På dag 5 etter differensieringen ble cellene inkubert med 500 μ l 100 μ M, 1 μ Ci/ml acetat (Appendiks) per brønn i 4 timer, etter at differensieringsmediet med de ligandene ble sugd av. Etter inkuberingen ble hver brønn med celler vasket 2 ganger med 1 ml PBS (Appendiks), før cellene ble lysert med 250 μ l destillert vann.

Til proteinmåling ble det tatt 10 μ l med to paralleller fra hver brønn til en 96-brønners mikrotiterplate (se proteinmåling). Platen ble dekket med en plastfolie og frosset ned for senere proteinmåling. Resten av det som var i brønnen ble overført til glassrør. Brønnen ble så skylt med 100 μ l metanol og overført til glassrøret. 50 μ l FCS (føtalt kalveserum) ble tilsatt til hvert glassrør. Deretter ble 5 ml kloroform:metanol (2:1) tilsatt. Det ble nå vortexet og sto i 30 minutter før 0,9 % NaCl- buffer pH 2 med 10 mM Na-acetat (Appendiks) ble tilsatt. Alt ble blandet og sto over natt på benk.

Neste dag ble den øvre metanol-vann fasen og proteinsjiktet sugd av, mens kloroformfasen med lipider ble dampet inn under nitrogen på vannbad (45° C). Etter inndampingen ble det reløst i 110 μ l avkjølt heksan, vortexet og satt på is. 20 μ l ble tatt fra hvert glassrør til scintillasjonsrør for telling av totallipid. Det ble telt ved at hvert rør ble tilsatt 3 ml Ultima Gold® scintillasjonsvæske og ble telt i beta-scintillasjonstelleren. Resten ble frosset ned for senere å bli brukt til tynnsjikt.

2.2.3.4.2 Separering av lipider (tynnsjikt)

Det reløste lipidekstraktet fra hvert rør ble applisert (ca. 90 µl) på en tynnsjiktplate med silikagel i bestemte steder. En tynnsjiktplate var nok for 6 prøver (rør). Tynnsjiktplatene ble først festet til en varmeplate før prøvene ble applisert. Dette for at heksanen skulle fordampe raskere. Lipidstandarder ble dessuten applisert på platen (ble satt på prøvene) i rekkefølgen; DAG (diacyglyserol), TAG (triacylglyserol (triolein)), FFA (frie fettsyrer) og CE (kolesterolester). Lipidekstraktene på tynnsjiktplatene ble separert til de ulike lipidklassene ved at platene ble plassert i et kammer med 101 ml upolart løpemiddel bestående av heksan:dietyleter:iseddik i forholdet 65:35:1 i ca 60 minutter (til løpemidlet ha vandret til toppen). Det var kapillærkrefter som fikk løpemidlet til å vandre oppover platen. Lipidene ble separert avhengig av de ulike lipidenes affinitet til silikaplatene og til løpemidlet. Deretter ble tynnsjiktplatene tatt ut og tørket i ca 10 minutter før platene ble plassert i et jodkammer (kammer med jod på bunnen). Lipidene på kromatogrammet ble fremkalt ved at jod reagerte med de umettede bindingene i lipidene og de ble farget gule. De ulike lipidene hadde migrert forskjellig på platene, avhengig av affiniteten som nevnt. De mest lipofile migrerte lengst (CE øverst, så TAG, FFA, DAG og PL (fosfolipider)). De gule flekkene ble markert, for deretter å bli klippet (etter at gulfargen har forsvunnet) ved hjelp av trakt i scintillasjonsrør. Hvert rør ble tilsatt 3 ml Ultima Gold® scintillasjonsvæske, og telt ved hjelp av beta-scintillasjonstelleren.

2.2.3.4.3 Proteinmåling

Som nevnt tidligere ble 10 µl med to paralleller homogenisert cellelysat fra hver prøve overført til 96- brønners mikrotiterplate. Standardkurve ble laget fra BSA i 0,1 M NaOH til kjente proteinkonsentrasjoner (0-300 µg/ml). Deretter ble prøvene og proteinstandardene tilsatt 200 µl av proteinfargningsreagenset "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate" som først ble fortynnet med 4 deler destillert vann og filtrert gjennom Millipore membranfilter 0,45. På samme måte som tidligere proteinmåling med den metoden, sto brettet i 5 minutter før absorbansen ble målt ved 595 nm ved hjelp av Wallac Victor™ mikroplateleser fra Perkin Elmer.

2.2.4 Statistisk analyse

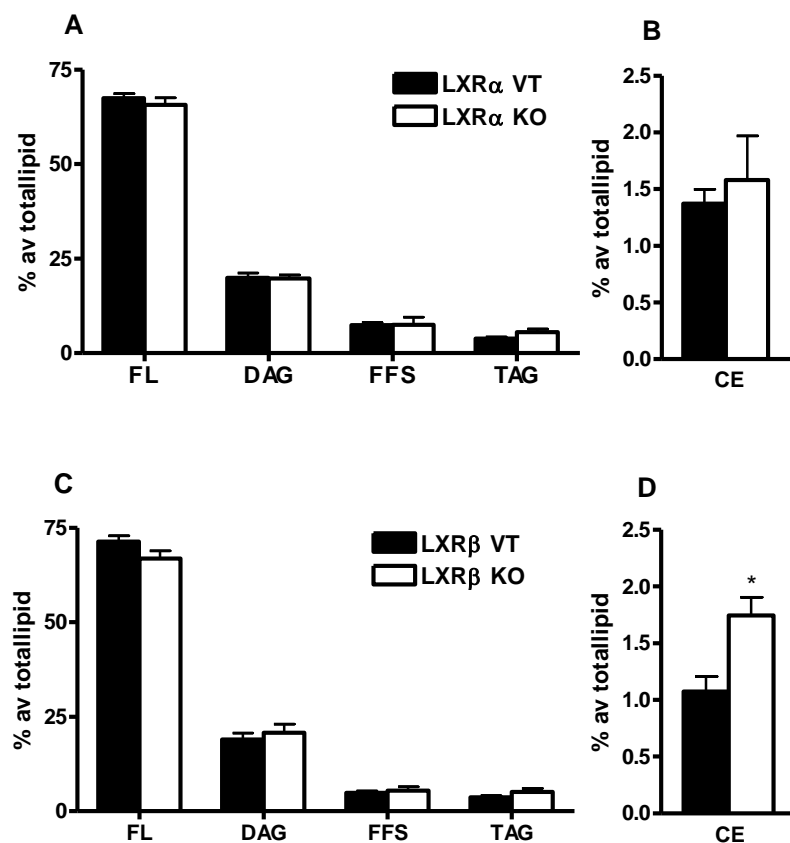
Alle verdier fra forsøkene er vist som middelerdier (gjennomsnitt) \pm SEM. n representerer antall forsøk som er gjort. For hvert forsøk ble middelerdier regnet ut fra 3 eller 8 paralleller avhengig av type forsøk.

Noen ganger ble det utført paret t-test for å se på statistisk signifikans, hvor $p < 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

3. Resultater

3.1 Lipogenese i LXR α -KO- og LXR β -KO-skjelettmuskelceller

For å studere effekter av de to ulike LXR-isoformene, LXR α og LXR β , i skjelettmuskel ble lipogenese undersøkt i LXR α -KO- og LXR β -KO-celler, og sammenlignet med kontroll (VT)-celler. Cellene ble inkubert med ^{14}C -acetat. Acetyl-CoA omdannes til fettsyrer som videre omdannes til ulike lipider ved lipogenese.



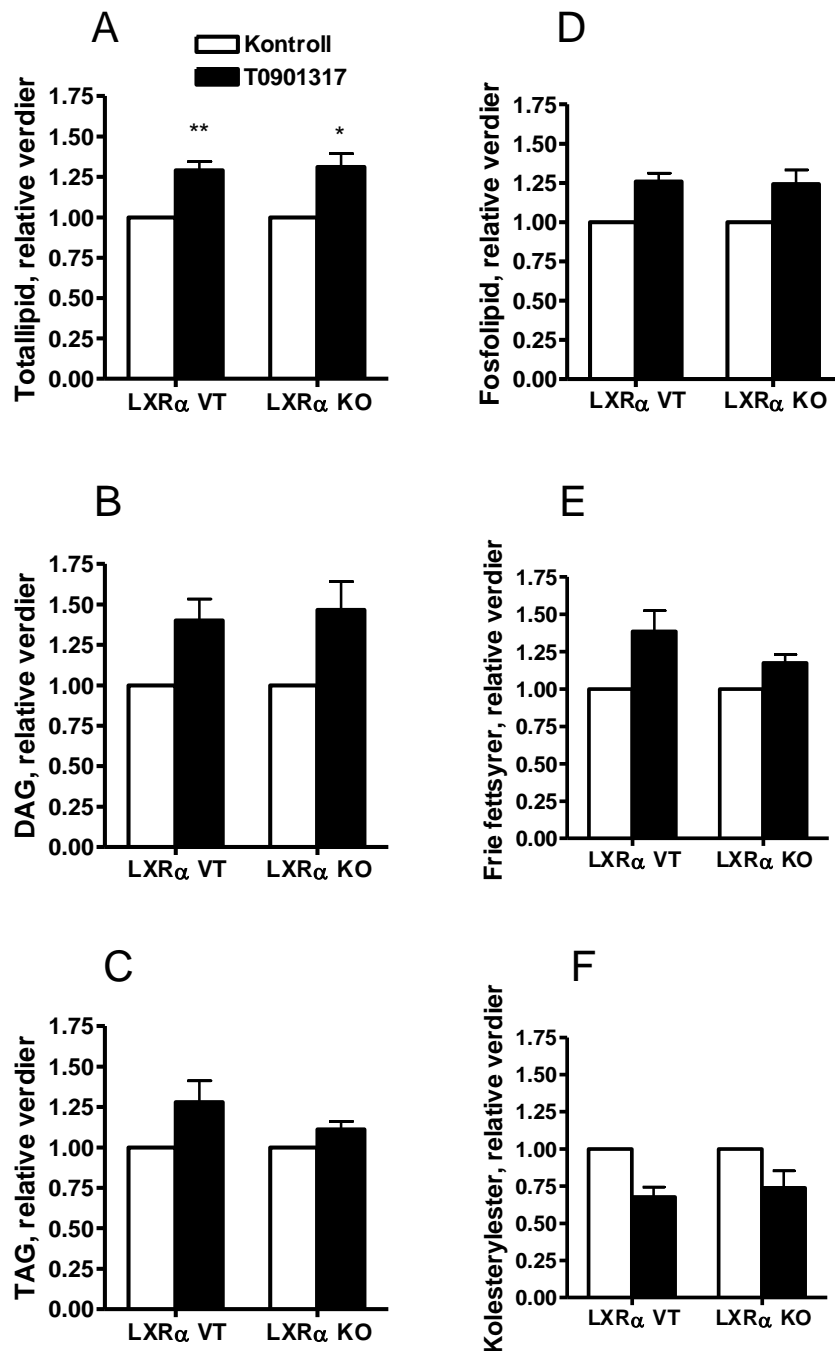
Figur 3.1 Inkorporering av acetat til de ulike lipidklassene fosfolipid (FL/PL), diacylglycerol (DAG), frie fettsyrer (FFS/FFA), triacylglycerol (TAG) (Figur A og C) og kolesterylester (CE) (Figur B og D) etter 48 timers forbehandling med $1\mu\text{M}$ T0901317. Resultatene er vist som % av totallipid. Det var LXR α -KO og LXR α -VT skjelettmuskelceller fra mus (Figur A og B) eller LXR β -KO og LXR β -

*VT (Figur C og D) som ble forbehandlet. Forbehandlingen ble startet på 3. dag etter differensiering. På dag 5 etter differensieringen ble forsøket utført ved å inkubere muskelcellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene er representert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=6$). * = $p < 0,05$.*

I figur 3.1 ser vi at den lipidklassen som dannes med høyest andel i forhold til andre lipider er fosfolipider med en andel på omtrent 67 % i LXR α -VT skjelettmuskelceller, etterfulgt av DAG med en andel på cirka 20 % etterfulgt av nesten 7 % for frie fettsyrer, mens TAG utgjør bare tilnærmet 3 % av totallipid (Figur 3.1.A). CE har lavest andel og er på 1,4 % (Figur 3.1.B). Fordelingen av de ulike lipidklassene er nesten det samme i LXR α -KO som det er i LXR α -VT. For fosfolipider er den litt lavere enn i LXR α -VT og er på 65 %. TAG har litt høyere andel i LXR β -KO med en andel på 6 % (Figur 3.1 A). CE utgjør litt høyere andel i LXR α -KO enn LXR α -VT, og er på 1,6 % (Figur 6 B). For DAG og frie fettsyrer er fordelingen i LXR α -KO lik den i LXR α -VT (Figur 6 A). På samme måte som i LXR α -VT og LXR α -KO, er andel av dannelse av de ulike lipidkompleksene i forhold til totallipid nesten lik for LXR β -KO og LXR β -VT skjelettmuskelceller. Fosfolipider er den lipidklassen med høyest andel av totallipid i celler fra både LXR β -KO og LXR β -VT. Andelen er 70 % i LXR β -VT og 65 % i LXR β -KO. Nest høyeste lipidandel er for DAG med 22 % i LXR β -VT celler og 24 % i LXR β -KO celler. Andelen frie fettsyrer og TAG er nesten lik og er omtrent på 5 % i begge celletyper, men litt høyere (med cirka 1-2 %) i LXR β -KO. CE har også her lavest prosent og er nesten 1,1 % i celler fra LXR β -VT og 1,9 % i celler fra LXR β -KO (signifikant med $p < 0,05$).

3.2 LXR-isoform-spesifikke effekter av lever-X-reseptor-agonisten T0901317 på lipogenese i skjelettmuskelceller

Videre ble effekter av lever-X-reseptor-agonisten T0901317 på lipogenese ble undersøkt i LXR α -KO- og LXR β -KO-celler, og sammenlignet med kontroll (VT)-celler. Resultatene vises i figur 3.2 og figur 3.3.

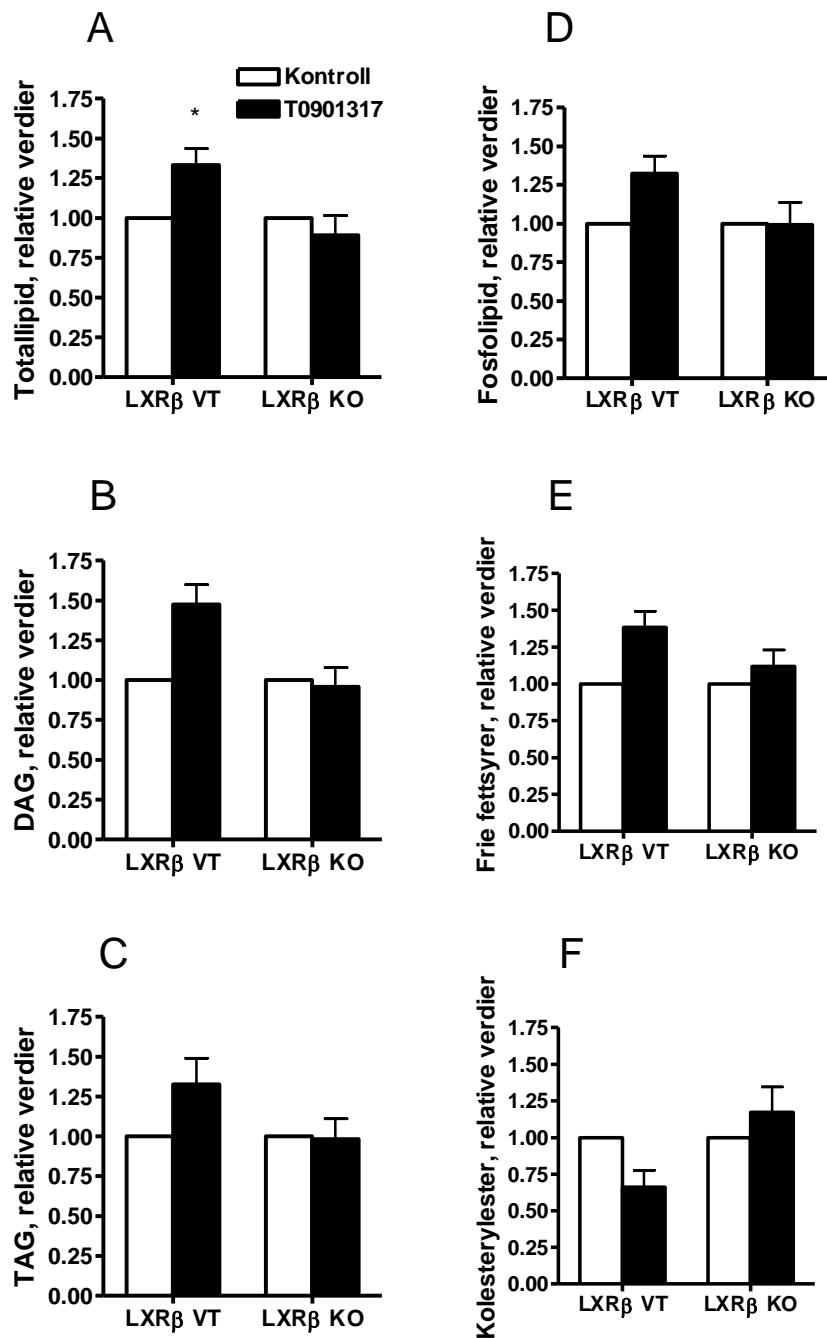


Figur 3.2 Inkorporering av acetat til toltallipid (A) og til de ulike lipidklassene diacylglyserol (DAG) (B), triacylglyserol (TAG) (C), fosfolipid (PL) (D), frie fettsyrer (FFA) (E) og kolesterylester (CE) (F) etter 48 timers forbehandling med 1 μ M T0901317 i LXR α -KO og LXR α -VT-skjelettmuskelceller fra mus. Forbehandlingen ble startet på 3. dag etter differensiering. På dag 5 etter differensieringen ble forsøket utført ved å inkubere muskelcellene i 4 timer i serumfri

DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM).

*Resultatene er vist relativt til kontroll (0,1 % DMSO i musedifferensierings-medium) og er representert som gjennomsnitt \pm SEM (n= 6). * = $p < 0,05$ og ** = $p < 0,01$.*

I figur 3.2 er lipogenese studert i LXR α -KO- og LXR α -VT-museceller etter 48 timers forbehandling med 1 μM T091317 sammenlignet med LXR α -KO og LXR α -VT museceller behandlet med kontroll (0,1 % DMSO i mus differensieringsmedium). Vi ser at forbehandling med T091317 øker dannelsen av alle lipidklassene sammenlignet med kontroll unntatt kolesterylester (CE) hvor T091317 ser ut til å hemme dannelsen av det. Denne effekten av T091317 sees for både LXR α -KO og LXR α -VT, men i ulik grad for de to celletypene og de ulike lipidene. Vi ser at det er en signifikant økning ($p < 0,01$) på cirka 25 % sammenlignet med kontroll i dannelsen av totallipid i LXR α -VT celler. Det er også en signifikant T091317-indusert økning ($p < 0,05$) på dannelsen av totallipid på litt over 25 % i LXR α -KO celler. Vi ser at det er økt dannelsen av DAG i både LXR α -VT og -KO, med henholdsvis cirka 37 og 40 % sammenlignet med kontroll. Dannelsen av TAG er også økt etter forbehandling med T091317 i begge celletyper, men denne gangen er økningen høyere i LXR α -VT enn i LXR α -KO, økningen er på cirka 25 % for LXR α -VT, mens den er på cirka 10 % for LXR α -KO. Inkorporering av acetat til frie fettsyrer følger nesten det samme mønsteret som for TAG, med en økning på omtrent 35 % for LXR α -VT og 20 % for LXR α -KO. For fosfolipider er det også økt dannelsen i begge celletyper, men denne økningen er omtrent lik for de to celletypene og er på nesten 25 %. Når det gjelder dannelsen av kolesterylester (CE), er bildet annerledes. T091317 ser ut til å hemme dannelsen av CE sammenlignet med kontroll. Denne hemmingen er litt sterkere i LXR α -VT, men er omtrent det samme i de to celletypene. Hemmingen er nesten 35 % i LXR α -VT 30 % i LXR α -KO.



Figur 3.3 Inkorporering av acetat til totallipid (A) og til de ulike lipidklassene diacylglycerol (DAG) (B), triacylglycerol (TAG) (C), fosfolipid (PL) (D), frie fettsyrer (FFA) (E) og kolesterylester (CE) (F) etter 48 timers forbehandling med 1 μ M T0901317. Det var LXR β -KO ("knock-out") og LXR β -VT (villtype) skjelettmuskelceller fra mus som ble forbehandlet. Forbehandlingen ble startet på 3. dag etter differensiering. På dag 5 etter differensieringen ble forsøket utført ved

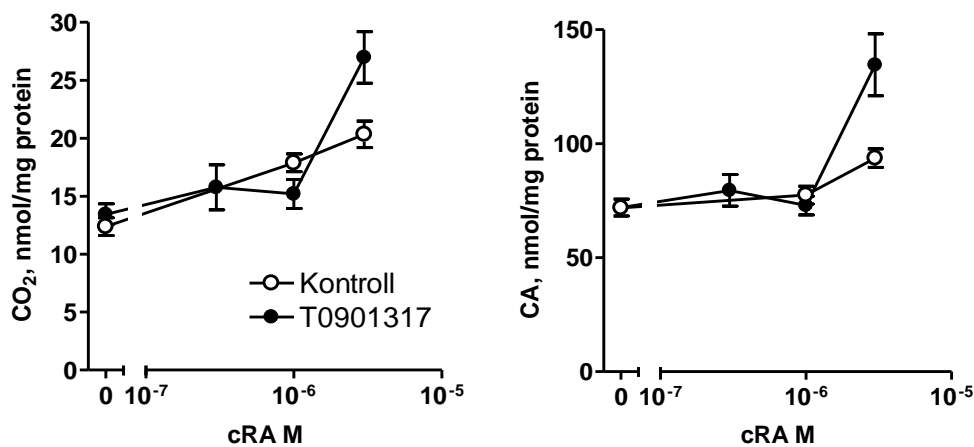
*å inkubere muskelcellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene er vist relativt til kontroll (0,1 % DMSO i mus differensieringsmedium) og er representert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=6$). * = $p < 0,05$.*

I figur 3.3 ser vi at T0901317 ikke induserer dannelse av de ulike lipidklassene i LXR β -KO-celler, i motsetning til i LXR β -VT-celler. I LXR β -VT celler gir forbehandling med T0901317 (figur 3.3 A) en signifikant økning ($p < 0,05$) på omtrent 25 % av inkorporering av acetat til totallipid sammenlignet med kontroll, mens T0901317-indusert inkorporering til totallipid i LXR β -KO celler er omtrent 10 % lavere enn kontroll. T0901317-indusert dannelse av DAG, TAG og fosfolipider (Figur 3.3 B, C og D) er omtrent det samme som kontroll (dvs. ingen økning) i LXR β -KO celler, mens den er henholdsvis nesten 48, 35 og 35 % høyere enn kontroll i LXR β -VT celler. For dannelse av frie fettsyrer (Figur 3.3 E) er det omtrent 10 % økning etter T0901317-behandling sammenlignet med kontroll i LXR β -KO celler, men likevel er dannelsen høyere i LXR β -VT-celler og er på nesten 35 % sammenlignet med kontroll. T0901317-indusert dannelse av CE skiller seg ut fra resten av lipidklassene. Den er høyere i LXR β -KO- enn i LXR β -VT-celler. Økningen er på nesten 10 % i celler fra LXR β -KO-mus, mens dannelsen er cirka 35 % lavere enn kontroll i celler fra LXR β -VT-mus.

3.3 Effekter av cRA og T0901317 i humane skjelettmuskelceller

På grunn av en relativt liten effekt av T0901317 i musecellene, ønsket vi å se om effekten av T0901317 ble tydeligere i nærvær av RXR-aktivatorer. Effekt av RXR-aktivatorene ble først undersøkt i humane skjelettmuskelceller. Først ønsket vi å se hvordan forbehandling av muskelcellene med T0901317 sammen med ulike konsentrasjoner av retinoid-X-reseptor-agonisten cis-retinsyre (cRA) påvirker

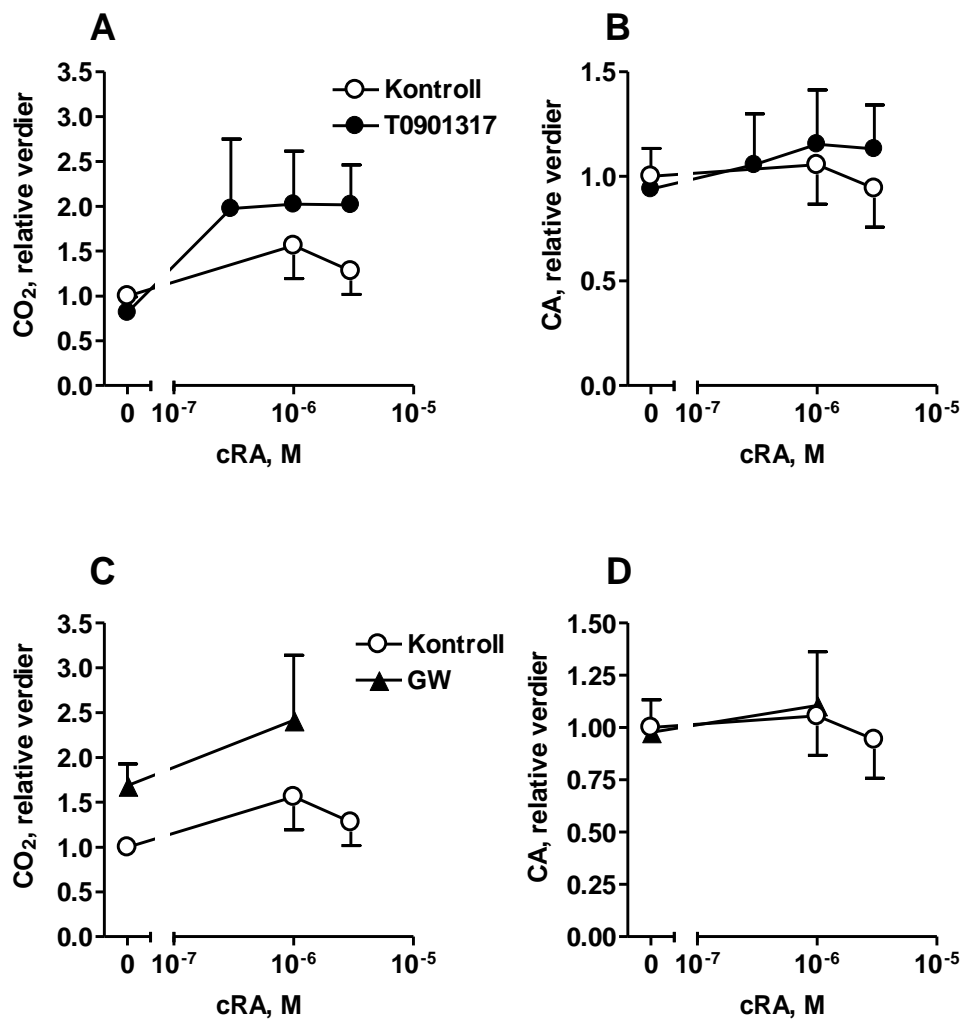
oksidasjon av og celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre i forhold til når cellene forbehandles med bare cRA. Resultater vises i figur 3.4 og figur 3.5.



Figur 3. 4 Oksidasjon av oljesyre til CO₂ (vist som nmol/ mg protein) og celleassosiert (CA) (vist som nmol/mg protein) etter forbehandling med ulike konsentrasjoner av retinoid X reseptor-agonisten cRA (cis- retinsyre) de siste fire dagene av differensieringsperioden, med eller uten (vist som kontroll på figuren) 1 μM av lever X reseptor-agonisten T0901317. Forsøkene ble utført ved å inkubere muskelcellene i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre (1 μCi/ml, 100 μmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n= 8) fra ett forsøk.

Oksidasjon av oljesyre ser ut til å bli økt dose-avhengig ved bruk av cRA alene i figur 3.4 A. Forbehandling av muskelcellene med 1 μM T0901317 i tillegg til cRA ser ut til å gi en tilleggseffekt og oksidasjonen ble høyere enn når bare cRA ble brukt.

Tilleggseffekten er spesielt høy ved den høyeste konsentrasjonen av cRA (3 × 10⁻⁶ M). Effekten på opptak av oljesyre (celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre, figur 3.4 B) ser ut til å følge nesten det samme mønsteret som på oksidasjonen, hvor en tilleggseffekt av T0901317 er høyest ved en cRA-konsentrasjon på 3 × 10⁻⁶ M.



Figur 3.5 Oksidasjon av oljesyre til CO₂ (vist som relative verdier, i forhold til kontroll som er 0,1 % DMSO i differensieringsmedium) og celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre (CA) (også relative verdier) etter forbehandling med ulike konsentrasjoner av retinoid X reseptor-agonisten cRA (cis- retinsyre) de siste fire dagene av differensieringsperioden med eller uten (vist som kontroll i figuren) 1 μM av lever X reseptor-agonisten T0901317 (figur A og B), eller med eller uten (vist som kontroll i figuren) 10 nM av PPARδ -agonisten GW501516 (figur C og D). Forsøkene ble utført ved å inkubere muskelcellene i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre (1 μCi/ml, 100 μmol/l). Resultatene er uttrykt i relative verdier, som gjennomsnitt ± SEM fra 8 forsøk, hvert forsøk hadde 8 paralleller.

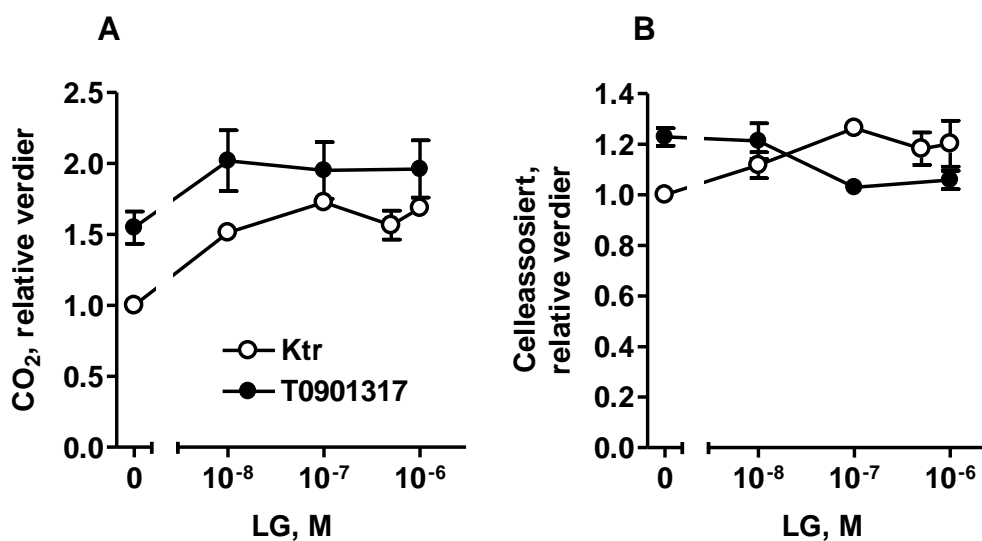
I figur 3.5 A og B er det på samme måte som i figur 3.1 studert oksidasjon av oljesyre til CO₂ og celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre etter forbehandling av muskelcellene med 1 µM av LXR-agonisten T0901317 i tillegg til samtidig forbehandling med forskjellige konsentrasjoner av cRA. Her er gjennomsnitt av 8 forsøk presentert, og resultatene er vist som relative verdier, i forhold til kontroll som var 0,1 % DMSO (dimetylsulfoksid) i differensieringsmedium. Også her er det en tilleggseffekt av T0901317 på oksidasjonen i forhold til når cRA ble benyttet alene. Denne tilleggseffekten ser imidlertid ikke til å øke med økende konsentrasjon av cRA, dvs. doserespons kurven nådde et platå, i motsetning til figur 3.4 hvor tilleggseffekten er høyest ved den høyeste cRA konsentrasjonen. Denne tilleggseffekten er på cirka 50-70 %. T0901317 hadde også en tilleggseffekt på celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre, men i liten grad.

Fordi RXR også heterodimeriserer med andre kjernereseptorer som PPAR δ , ble cRA kombinert med GW501516 (GW), en selektiv PPAR- δ agonist som er vist å stimulere fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskelceller [38,39,40] Figurene 3.5 C og D viser henholdsvis relative verdier av oljesyre-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre etter forbehandling av muskelcellene med 10 nM GW. I figur 3.5 C ser vi at det er en egeneffekt av GW på oksidasjonen på cirka 60 % sammenlignet med kontroll (0,1 % DMSO i differensieringsmedium). En tilleggseffekt av GW på effekten av cRA sees når cellene ble forbehandlet med GW samtidig med cRA. På celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre ser det ikke ut som om det er effekt av GW, verken alene eller sammen med cRA (figur 3.2 D).

3.4 Effekter av LG100268 og T0901317 i humane skjelettmuskelceller

Vi ønsket også å teste effekten av en ny og spesifikk RXR-agonist, LG100268 [40,41]. Denne ble først testet på oksidasjon av oljesyre og celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre i humane skjelettmuskelceller. Videre ønsket vi å se om det

var en tilleggseffekt av å forbehandle muskelcellene med 1 μM T0901317 i tillegg til ulike konsentrasjoner av den nye RXR-agonisten. Resultatene er vist i figur 3.6.

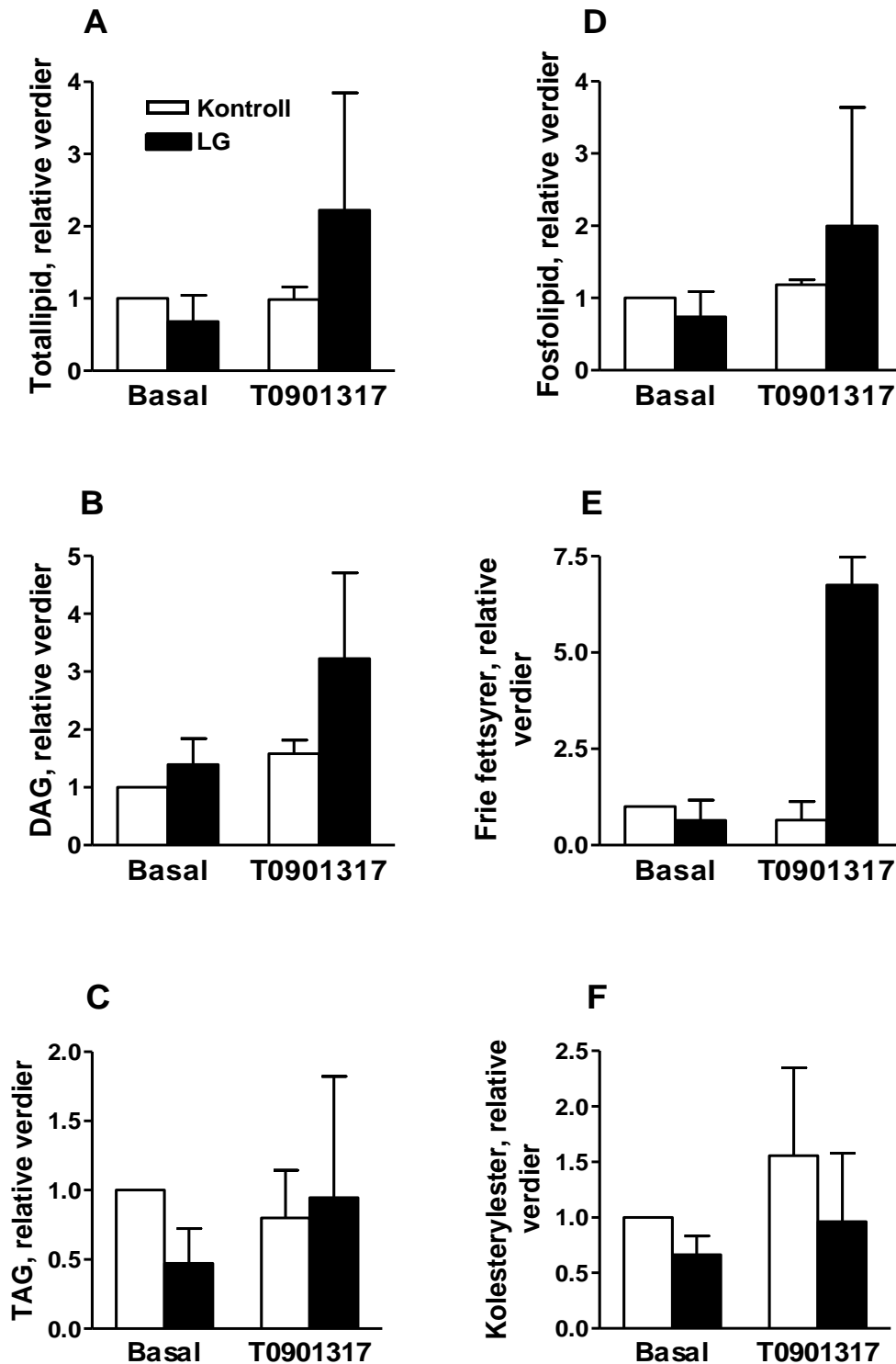


Figur 3.6 Oksidasjon av oljesyre til CO₂ (vist som relative verdier, i forhold til kontroll som er 0,1 % DMSO i differensieringsmedium) og celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre (CA) (også relative verdier) etter forbehandling med ulike konsentrasjoner av retinoid X reseptor-agonisten LG100268 de siste fire dagene av differensieringsperioden med eller uten (vist som kontroll i figuren) 1 μM av lever X reseptor-agonisten T0901317. Forsøkene ble utført ved å inkubere muskelcellene i 4 timer med [¹⁴C]oljesyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{mol/l}$). Resultatene er illustrert som gjennomsnitt \pm SEM (n=4)

I figur 3.6 A ser vi oksidasjon av oljesyre til CO₂ øker med økende konsentrasjon av LG 100268, men dose-respons kurven ser ut til å oppnå et platå og høyest oksidasjon fås ved en konsentrasjon på 10⁻⁷- 10⁻⁶ M LG100268. Vi ser at det er en klar egeneffekt av T0901317, og vi ser en klar tilleggseffekt av T0901317 på 20-50 %. Denne tilleggseffekten ser ikke ut til å fortsette å øke med økende konsentrasjon av LG100268, den oppnår et platå på nesten samme måte ved LG 100268 alene. Effekten av T0901317 og/eller LG100268 på celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre ser ikke ut til å ha et klart mønster (figur 3.6 B).

3.5 Effekter av LG100268 og T0901317 på lipogenese

Fordi det så ut som det var en effekt av LG100268 på oljesyreoksidasjon i humane skjelettmuskelceller, og da denne effekten var additiv med effekten av T0901317, ønsket vi å studere effekten av LG100268 på lipogenese i museceller. Vi undersøkte effekten av LG100268 og om det var en tilleggseffekt av å forbehandle cellene med LXR-agonisten T0901317 samtidig med LG100268, i kontroll-celler (villtype). Resultatene vises i figur 3.7.



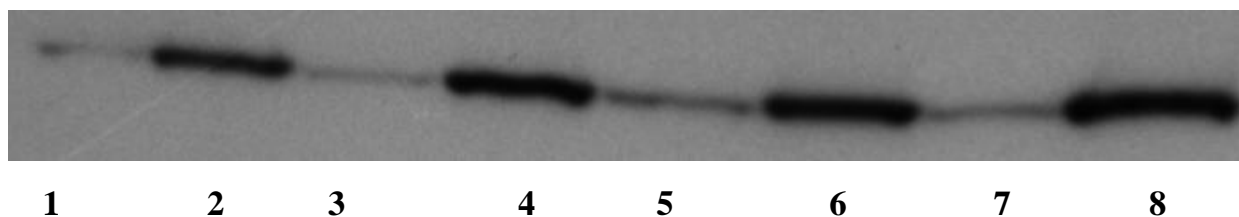
Figur 3.7 Inkorporering av acetat til toltallipid (A) og til de ulike lipidklassene diacylglyserol (DAG) (B), triacylglyserol (TAG) (C), fosfolipid (PL) (D), frie fettsyrer (FFA) (E) og kolesterylester (CE) (F) etter 48 timers forbehandling med 10^{-7} M LG100268 med eller uten $1 \mu\text{M}$ T0901317, i villtype skjelettmuskelceller fra mus. Forbehandlingen ble startet på 3. dag etter differensiering. På dag 5 etter

differensieringen ble forsøket utført ved å inkubere muskelcellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene er vist relativt til kontroll (0,1 % DMSO i mus differensieringsmedium) og er representert som gjennomsnitt \pm SEM ($n= 2$), hvert forsøk med 3 paralleller.

Vi ser fra figur 3.7 at inkorporering av acetat til de ulike lipidene tenderer til å øke når museceller ble inkubert med T0901317 i tillegg til LG100268 sammenlignet med når cellene ble inkubert med bare T0901317. Denne effekten ser vi imidlertid ikke for kolesterylester. Dannelse av kolesterylester i museceller er blitt redusert ved samtidig behandling med både T0901317 og LG100268 sammenlignet med forbehandling med bare LG100268. I figur 3.7 A ser det ut som det er mindre totallipiddannelse ved forbehandling med LG100268 sammenlignet med kontroll, mens effekten av T0901317 er samme som kontroll, og det ser ut som om det er en synergisk effekt ved forbehandling med både T0901317 og LG100268. Generelt viser figuren mindre effekt av T0901317 enn i figur 3.2 og figur 3.3, og en tendens til additivitet eller synergisme for LG1002268 og T091317 for flere lipidklasser. Materialet består imidlertid bare av to forsøk, det er stor spredning mellom forsøkene og vanskelig å konkludere.

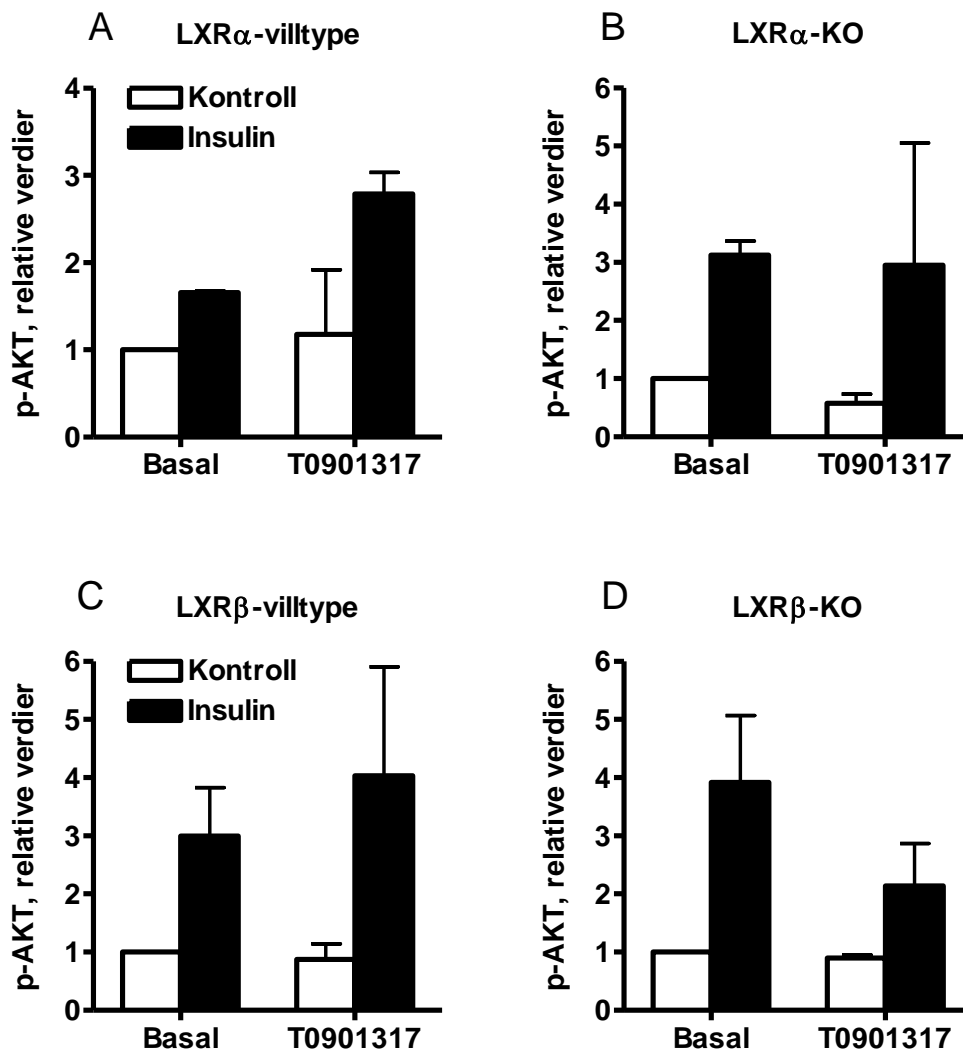
3.6 Effekter av insulin på fosforylering av Akt og ERK

Tidligere forsøk i laboratoriet har vist at LXR β -KO-cellene er insulinresistente med hensyn på glukoseopptak, det vil si at insulinstimulert glukoseopptak er redusert (Nina P. Hessvik, upubliserte data). Akt og ERK er to signalmolekyler nedstrøms for insulinreseptoren. Westernblotting-forsøk ble derfor utført for å undersøke om insulinresponsen (i form av fosforylert Akt eller ERK) er endret i LXR α - og LXR β -KO myotuber i forhold til deres respektive villtype. Resultatene for Akt vises i figur 3.8 og figur 3.9, for ERK i figur 3.10 og figur 3.11.



Figur 3.8 Effekter av forbehandling av museceller fra LXR β -villtype (brønn 1-4) og LXR β -knock-out (brønn 5-8) med T0901317 på fosforylering av Akt. Etter 48 timers differensiering, ble cellene preinkubert med 1 μ M T0901317 (brønn 3, 4, 7 og 8) eller med kontroll (0,1 % DMSO) i 48 timer. På 5. dag etter differensiering, ble cellene ytterligere preinkubert med enten 100 μ M insulin (brønn 2, 4, 6 og 8) eller dH₂O i 15 minutter. Westernblotting ble gjort med antistoff rettet mot fosforylert Akt.

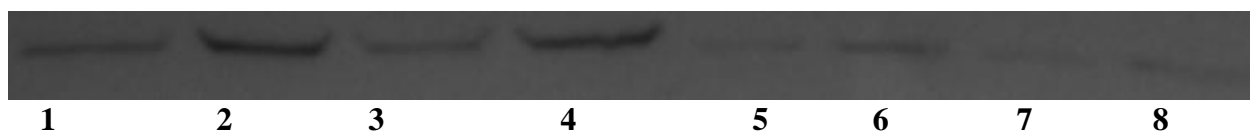
Figur 3.8 viser ett bilde av et Westernforsøk med antistoff rettet mot fosforylert Akt. Bildet viser en klar insulineffekt (brønn 2, 4, 6 og 8) i både LXR β -villtype og LXR β -knock-out skjelettmuskelceller fra mus.



Figur 3.9 Effekter av forbehandling av musceller fra LXR α -villtype, LXR β -villtype og deres respektive knock-out med T0901317 på fosforylering av Akt. Etter 48 timers differensiering, ble cellene preinkubert med 1 μ M T0901317 eller med kontroll (0,1 % DMSO i musedifferensieringsmedium) i 48 timer. På 5. dag etter differensiering, ble cellene ytterligere preinkubert med enten 100 μ M insulin eller dH₂O i 15 minutter. Westernblotting ble gjort med antistoff rettet mot fosforylert Akt. Resultatene er vist som relative verdier og representerer middelveier (gjennomsnitt) \pm SEM (n =2-9).

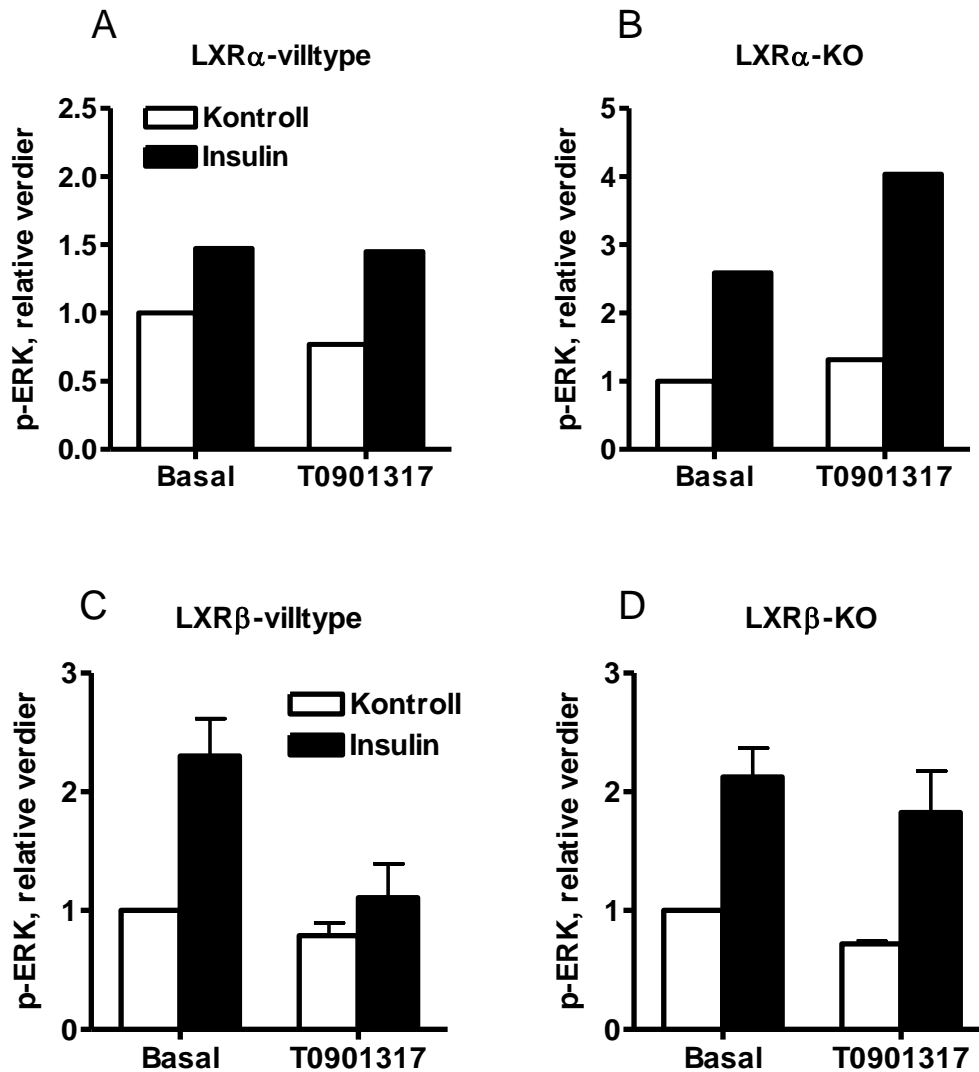
Figur 3.9 viser flere Westernforsøk som er kvantifisert og slått sammen. Vi ser at det er en insulineffekt på fosforylering av Akt i alle typer myotuber. Det ser ikke ut til at

det er noen forskjell i respons mellom celler fra ulike dyr (KO og villtype), men spredningen er stor. Det er heller ingen tydelig effekt av T0901317.



Figur 3.10 Effekter av forbehandling av museceller fra *LXRβ*-knock-out (brønn 1-4) og *LXRβ*-villtype (brønn 5-8) med T0901317 på fosforylering av ERK. Etter 48 timers differensiering, ble cellene preinkubert med 1 μ M T0901317 (brønn 3, 4, 7 og 8) eller med kontroll (0,1 % DMSO i musedifferensieringsmedium) i 48 timer. På 5. dag etter differensiering, ble cellene ytterligere preinkubert med enten 100 μ M insulin (brønn 2, 4, 6 og 8) eller dH_2O i 15 minutter. Westernblotting ble gjort med antistoff rettet mot fosforylert ERK.

Figur 3.10 viser ett bilde av et Westernforsøk med antistoff rettet mot fosforylert ERK. Bildet viser en klar insulineffekt (brønn 2, 4, 6 og 8) i både *LXRβ*-villtype og *LXRβ*-knock-out skjelettmeskelceller fra mus.



Figur 3.11 Effekter av forbehandling av museceller fra LXR α -villtype, LXR β -villtype og deres respektive knock-out med T0901317 på fosforylering av ERK (ekstracellulær signalregulert kinase). Etter 48 timers differensiering, ble cellene preinkubert med 1 μ M T0901317 eller med kontroll (0,1 % DMSO i musedifferensieringsmedium) i 48 timer. På 5. dag etter differensiering, ble cellene ytterligere preinkubert med enten 100 μ M insulin eller dH₂O i 15 minutter. Westernblotting ble gjort med antistoff rettet mot fosforylert ERK. Resultatene er vist som relative verdier og representerer middelverdier (gjennomsnitt) \pm SEM ($n = 1-5$)

Figur 3.11 viser at det er insulineffekt på fosforylering av ERK i både LXR α -villtype og KO, og LXR β -villtype og KO-mus skjelettmuskelceller. Heller ikke her er det noen klar forskjell i respons mellom celler fra ulike dyr (KO og villtype), det er få forsøk og spredningen er stor. Det er heller ingen tydelig effekt av T0901317.

4. Diskusjon

4.1 Lipogenese i LXR α -KO- og LXR β -KO-skjelettmuskelceller

Det er vist at LXR spiller en viktig rolle i regulering av hepatisk fettisyrebiosyntese [M.]. Denne effekten er delvis mediert gjennom den transkripsjonelle reguleringen av sterol regulatorisk-element-bindende protein-1c (SREBP-1c) [20,33,42] som regulerer alle genene involvert i denne veien; acetyl-CoA-karboksyklase (ACC), fettisyresyntase (FAS) og stearyl-CoA desaturase (SCD) [M.]. I tillegg regulerer LXR karbohydrat-responselement-bindende protein (ChREBP) som er en glukosesensitiv transkripsjonsfaktor som øker hepatisk omdannelse av karbohydratoverskudd til lipid [20,42]. Studier har vist at forbehandling av skjelettmuskel med LXR-reseptor agonisten T0901317 oppregulerte kjente LXR gener som SREBP-1c og FAS [33]. Kase *et al* [33] har vist at basal inkorporering av radioaktivt merket palmitat til de ulike lipidklassene; frie fettisyre (FA), diacylglyserol (DAG), triacylglyserol (TAG), fosfolipider (PL) og kolesterolester (CE) økte etter forbehandling med LXR agonisten T0901317 i kulturer av humane skjelettmuskelceller. Studier gjort av Kase *et al.* har vist at behandling med T0901317 økte lipogenese (de novo lipid syntese) og lipidakkumulering i humane skjelettmuskelceller. T0901317 økte totallipogenese to eller tre ganger i humane skjelettmuskelceller etter preinkubering med radioaktivt acetat. Denne økningen var høyere i skjelettmuskelceller fra type 2-diabetikere enn i skjelettmuskelceller fra normalvektige forsøkspersoner [42].

Det var ønskelig å undersøke hvilken LXR-isoform (LXR α eller LXR β) som påvirket lipogenese mest i skjelettmuskelceller. For å undersøke det, ble det benyttet skjelettmuskelceller fra LXR α -KO-, LXR β -KO- og LXR-villtype-mus. Cellene ble forbehandlet med LXR-agonisten T0901317 og inkubert med ^{14}C -acetat.

Vi fant at det er redusert dannelse av totallipid i LXR β -KO celler som ble forbehandlet med LXR-agonisten T0901317 sammenlignet med tilsvarende villtype. T0901317-indusert inkorporering av acetat til de ulike lipidklassene DAG, TAG, fosfolipider og frie fettsyrer ble redusert i myotuber fra LXR β -KO mus sammenlignet med villtype. Denne effekten ser vi imidlertid ikke for kolesterylester (CE). Men dannelse av CE er veldig liten i forhold til dannelse av de andre lipidklassene, og utgjør bare en liten del av totallipid. Reduksjon i T0901317-indusert inkorporering av acetat til de forskjellige lipidklassene i myotuber fra LXR β -KO mus sammenlignet med villtype, sees ikke i LXR α -KO celler sammenlignet med sin respektive villtype. Totallipiddannelse er litt høyere i LXR α -KO celler enn i tilsvarende villtype, i motsetning til effekten i LXR β -KO hvor totallipiddannelse ble redusert i skjelettmuskelceller fra LXR β -KO mus sammenlignet med villtype. Inkorporering av acetat til de ulike lipidklassene i LXR α -KO celler forbehandlet med T0901317 var enten lik eller i liten grad endret sammenlignet med tilsvarende villtype. Det indikerer at LXR β -isoformen er den som er viktigst i skjelettmuskelceller fra mus med hensyn på effekter på lipogense. Disse resultatene er i samsvar med det som ble funnet av Hessvik *et al.* (upubliserte data). Hessvik har funnet ut at forbehandling med den uselektive LXR-agonisten T0901317 økte mRNA-nivåer av LXR-målgenner involvert i lipogense som sterol-regulatorisk elementbindende-transkripsjonsfaktor-1 (SREBF1), fettsyresyntase (FAS) og stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) i myotuber fra villtype og LXR α -KO mus. I LXR β -KO mus forbehandlet med T0901317, er det imidlertid sett bare små forandringer i uttryksnivåer til de ulike målgenene. Resultatene indikerer at LXR β er den sentrale LXR-subtypen som regulerer de lipogene effektene i skjelettmuskel til mus.

Studier gjort tidligere har indikert at LXR α -subtypen er den LXR-subtypen som er ansvarlig for kontroll av hepatisk lipogense [20] og økt triglyseridsyntese [24]. Mus som manglet LXR α viste reduksjon i plasma-triglyserid nivåer og redusert hepatisk mRNA nivåer for ulike gener involvert i fettsyresyntese. Denne effekten er ikke blitt observert i LXR β -manglende mus. Det indikerer at det er LXR α -subenheten som er

ansvarlig for de uønskede lipogene effektene i lever [24]. På bakgrunn av slike studier, er LXR β -selektive agonister diskutert som antiaterogene legemidler som kan gi gunstige effekter av LXR-aktivering og samtidig unngå uønskede effekter på lipogenese av LXR-aktivering [24]. Men tilgjengelige studier indikerer markante forskjeller i LXR-signalering mellom lever og skjelettmuskel [20]. Skjelettmuskel utgjør det største insulin-sensitive organet i kroppen, er primær sete for insulin-stimulert glukoseforbruk og utgjør cirka 40-50 % av kroppsmassen [4]. Insulinresistens i skjelettmuskel er en viktig egenskap ved type 2-diabetes og metabolsk syndrom og har vært knyttet til økt lipidakkumulering [29]. Lipidakkumulering i ikke-fettvev, for eksempel i skjelettmuskel, lever eller nyre, er indikert å være en viktig bidragsyter til utvikling av metabolsk syndrom. I skjelettmuskel inkluderer det både fett mellom muskelfibrene og økt intramyocellulært lipid. Triglyseridakkumulering i skjelettmuskel kan være assosiert med insulinresistens og tap av metabolsk fleksibilitet [4]. Resultatene fra denne oppgaven viser at lipogenese er redusert i LXR β -KO-celler men ikke i LXR α -KO- eller villtype-skjelettmuskelceller fra mus, og indikerer at LXR β -isoformen er den viktigste i regulering av de lipogene effektene i skjelettmuskel til mus. Derfor må langtids-effekter av triglyseridakkumulering i skjelettmuskel studeres før LXR β -selektive agonister ansees som lovende til terapeutiske formål. I tillegg ser det ut som lipogenese er mindre aktivert i myotuber fra mus sammenlignet med lipogenese i humane skjelettmuskelceller (Hessvik, upubliserte data).

4.2 Effekter av RXR-agonister

LXR/RXR er en permissiv heterodimer som kan bli aktivert ved enten å binde LXR-agonist eller en spesifikk RXR-ligand [23]. Samtidig forbehandling med agonister av begge partnere kan gi en sterkere respons enn ved en agonist alene [23]. Vi ønsket vi å se effekten av T0901317 i nærvær av RXR-ligandene 9-cis reinnyre (9 cRA) og LG100268 på oksidasjon av og celleassosiert radioaktivitet fra oljesyre i forhold til når cellene forbehandles med bare RXR-ligand. Vi fant at det er en tilleggseffekt av forbehandling av humane skjelettmuskel celler med T0901317 sammen med (9 cRA)

eller LG100268 sammenlignet med ved forbehandling av cellene med bare RXR-ligander. Det var ingen tydelig effekt på fettsyreopptak i form av celleassosiert radioaktivitet, verken for RXR-ligander alene eller i kombinasjon med T0901317.

RXR heterodimeriserer også med andre kjernereseptorer som PPAR δ . Som kontroll på fettsyre oksidasjon, ble cRA kombinert med GW501516 (GW), en selektiv PPAR- δ agonist som er vist å stimulere fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskelceller [39, 40, 41]. Vi fant at det er en tilleggseffekt på oksidasjon av OA til CO₂ ved forbehandling av skjelettmuskelcellene med GW501516 i tillegg til cRA sammenlignet med forbehandling med bare cRA, og det var som forventet. Samtidig var det en egeneffekt av GW501516 med en økning på cirka 60 % sammenlignet med kontroll.

Dette betyr at effekten vi ser av LG100268 på fettsyreoksidasjon, både egeneffekten og effekten ved samtidig forbehandling av skjelettmuskelcellene med T0901317 kan skyldes effekt på RXR-PPAR δ -dimeren (ellert andre dimerer med RXR), ikke bare på RXR-LXR-dimeren. Altså mister vi spesifisitet når vi stimulerer RXR samtidig med LXR, og den effekten vi observerer er nødvendigvis ikke en effekt av LXR/RXR. Inkorporering av acetat til de ulike lipidklassene ble tydelig økt etter forbehandling av skjelettmuskelcellene fra mus med T0901317 i tillegg til samtidig forbehandling med LG100268 sammenlignet med effekt på lipogenese ved forbehandling med bare LG100268.

4.3 Effekter av insulin på fosforylering av Akt og ERK

Da tidligere forsøk i laboratoriet har vist at LXR β -KO-cellene er insulinresistente med hensyn på glukoseopptak, var det ønsket å undersøke om insulinresponsen (i form av fosforylert Akt eller ERK) er endret i LXR α - og LXR β -KO myotuber i forhold til deres respektive villtype. Akt er en sentral del av insulinreseptor-fosfatidylinositol 3-kinase (IRS/PI3-K)-signalveien, og ERK er en sentral del av Ras/mitogenaktivert proteinkinase (Ras/MAPK) signalveien. Disse enzymene er aktive bare i fosforylert form.

Vi fant en klar insulinrespons på fosforylering av Akt og ERK i alle typer skjelettmuskelceller fra mus. Det ser ikke ut til at det er noen forskjell i respons mellom celler fra KO- og villtype-dyr, og heller ikke mellom LXR α og LXR β . Dette viser at ikke alle effekter av insulin er redusert i LXR β -KO- celler. Det indikerer at tidligere forsøk i laboratoriet som har vist at LXR β -KO-cellene er insulinresistente med hensyn på glukoseopptak, har denne effekten på et nivå nedstrøms for Akt og ERK i insulinsignaleringsveien. Kapasiteten insulin har til å øke skjelettmuskel-glukosetransport er avhengig av cellulært uttrykk av insulin-sensitive glukose transportører hvor GLUT4-isoformen er den best karakteriserte og av flux gjennom insulin-signaleringsveien. Noen studier indikerer at det hastighetsbestemmende trinnet som forårsaker insulinresistens er rekruttering av glukosetransportører til sarcolemma [4]. Vi fant heller ingen klar effekt av T0901317 på Akt- eller ERK-fosforylering i noen av de ulike skjelettmuskelcelletypene i forsøkene utført her.

Eksperimenter har vist at adenovirusmediert overuttrykk av SREBP-1c forbedret glykemisk kontroll i insulinmanglende mus og etterlignet insulineffekten i myotuber fra rotter [25]. Siden LXR øker uttrykk av SREBP-1c, kan LXR indirekte via SREBP-1c forbedre den glykemiske kontrollen. Men samtidig er det velkjent at aktivering av LXR fører til økt lipogenese og triglyserid-akkumulering, og intracellulær akkumulering av lipider er assosiert med redusert insulineffekt i cellemodeller [25].

Disse er to motsatte effekter av LXR. For å avklare dette, har Cozzone *et al.* utført studier som indikerte at LXR-agonister ikke påvirker insulineffekten i humane skjelettmuskelceller [25]. Disse resultatene kan stemme med resultatene vi har fått og som indikerte at aktivering av de ulike skjelettmuskelcellene fra mus (LXR α og - β -KO og villtype) med T0901317 ikke førte til endret insulinrespons i form av fosforylert Akt eller ERK i de ulike celletypene. LXR kan ha effekt på insulinresponsen, men denne effekten ser ikke ut til å være på Akt- eller ERK-nivå.

Vi fant insulineffekt på fosforylering av ERK i både LXR α -villtype og KO, og LXR β -villtype og KO-mus skjelettmuskelceller. Heller ikke her er det noen tydelig forskjell i respons mellom de ulike celletypene. Det er heller ingen klar effekt av T0901317. Effekten på av insulin på fosforylering av ERK er generelt svakere enn fosforylering av Akt i skjelettmuskelceller fra ulike dyr, noe som kan indikere at ERK-signalveien er mindre viktig i skjelettmuskel. Det er få forsøk og spredningen er stor, og det må gjøres flere studier med signifikante resultater før man kan konkludere.

5. Oppsummering og konklusjon

Resultatene fra denne oppgaven viser at lipogenese (inkorporering av acetat til lipid) økte etter forbehandling med LXR-agonisten T0901317 i skjelettmuskelceller fra LXR α -KO- og villtypemus, men ikke i skjelettmuskelceller fra LXR β -KO-dyr. Den observerte effekten støttes av gendata tidligere gjort på vårt laboratorium, som viste at mRNA nivåer for gener involvert i lipogenese øker etter behandling med T0901317 i skjelettmuskelceller fra LXR α -KO- eller villtypemus, men ikke i skjelettmuskelceller fra LXR β -KO-dyr. Dette indikerer at LXR β -isoformen er den viktigste subtypen for lipogenese i skjelettmuskel. Effekten av LXR på økt lipogenese og økt triglyseridakkumulering har vært knyttet til LXR α -isoformen i lever, og LXR β -selektive agonister er derfor blitt foreslått til terapeutiske formål. Effekten av LXR β -isoformen i skjelettmuskel funnet i denne oppgaven gjør LXR β -selektive agonister kanskje mindre attraktive som terapeutiske formål, da økt lipogenese i muskel er vist å kunne påvirke insulinfølsomheten i negativ retning.

Effekt av forbehandling av humane skjelettmuskelceller med LXR-agonisten T0901317 sammen med RXR-aktivatorer (cRA eller LG100268) på oksidasjon av oljesyre så ut til å bli økt sammenlignet med forbehandling av cellene med bare RXR-aktivator. RXR dimeriserer også med andre kjernereseptorer enn LXR som PPAR δ . Det ble sett at oksidasjonen økte etter forbehandling av cellene med cRA kombinert med PPAR- δ agonisten GW501516 (GW). Tilleggseffekten av RXR-agonister på oksidasjonen av oljesyre etter forbehandling av cellene med T0901317 kan derfor skyldes effekt på andre heterodimere med RXR, og er ikke sikkert en effekt på RXR/LXR heterodimeren.

Tidligere forsøk i laboratoriet har vist at LXR β -KO-cellene er insulinresistente med hensyn på glukoseopptak. Derfor var det ønsket å undersøke om insulinresponsen i form av fosforylert Akt eller ERK er endret i LXR α - og LXR β -KO myotuber i forhold til deres respektive villtype. Resultatene fra denne oppgaven viste ingen forskjell i insulin-indusert fosforylering av Akt eller ERK mellom LXR α -KO, LXR β -

KO eller villtype. LXR β -effekten på insulinresistens reguleres antageligvis ikke på Akt eller ERK nivå, men muligens nedstrøms for Akt og ERK.

Referanseliste

1. Legemiddelhåndboka: Norsk legemiddelhåndbok for hesepersonell 2006
2. Najjar, S., *Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes*. Nature Publishing Group, 2001.
3. Karlsson, H.K. and J.R. Zierath, *Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle*. Cell Biochem Biophys, 2007. **48**(2-3): p. 103-13.
4. Stump, C.S., et al., *The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism*. Ann Med, 2006. **38**(6): p. 389-402.
5. Hill, M.J., D. Metcalfe, and P.G. McTernan, *Obesity and diabetes: lipids, 'nowhere to run to'*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(2): p. 113-23.
6. 1. Cummings, S., C.M. Apovian, and L. Khaodhiar, *Obesity surgery: evidence for diabetes prevention/management*. J Am Diet Assoc, 2008. **108**(4 Suppl 1): p. S40-4.
7. Goalstone, M.L. and B. Draznin, *Insulin signaling*. West J Med, 1997. **167**(3): p. 166-73.
8. Watson, R.T. and J.E. Pessin, *Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(4): p. 215-22.
9. Laffitte, B.A., et al., *Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5419-24.
10. Dalen, K.T., et al., *Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48283-91.
11. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
12. Khan, A.H. and J.E. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-83.
13. 1. Zierath, J.R. and Y. Kawano, *The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2003. **17**(3): p. 385-98.
14. Repa, J.J. and D.J. Mangelsdorf, *The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 459-81.
15. Fitzgerald, M.L., K.J. Moore, and M.W. Freeman, *Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home*. J Mol Med, 2002. **80**(5): p. 271-81.
16. Peet, D.J., et al., *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Cell, 1998. **93**(5): p. 693-704
17. Villacorta, L., M.T. Garcia-Barrio, and Y.E. Chen, *Transcriptional regulation of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors*. Curr Atheroscler Rep, 2007. **9**(3): p. 230-7.

18. Hong, C. and P. Tontonoz, *Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors*. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(5): p. 461-7.
19. Torocsik, D., A. Szanto, and L. Nagy, *Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages*. *Mol Aspects Med*, 2009.
20. Baranowski, M., *Biological role of liver X receptors*. *J Physiol Pharmacol*, 2008. **59 Suppl 7**: p. 31-55.
21. Kumar, N., et al., *Liver X receptor is a regulator of orphan nuclear receptor NOR-1 gene transcription in adipocytes*. *Int J Obes (Lond)*, 2009. **33**(5): p. 519-24.
22. Willy, P.J., et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. *Genes Dev*, 1995. **9**(9): p. 1033-45.
23. Wojcicka, G., et al., *Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007. **61**: p. 736-59.
24. Nomiya, T. and D. Bruemmer, *Liver X receptors as therapeutic targets in metabolism and atherosclerosis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2008. **10**(1): p. 88-95.
25. Cozzone, D., et al., *Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells*. *Diabetologia*, 2006. **49**(5): p. 990-9.
26. Song, C., et al., *Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(23): p. 10809-13.
27. Lehmann, J.M., et al., *Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(6): p. 3137-40.
28. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
29. Kase, E.T., et al., *22-Hydroxycholesterols regulate lipid metabolism differently than T0901317 in human myotubes*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(12): p. 1515-22
30. Steffensen, K.R. and J.A. Gustafsson, *Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR)*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S36-42.
31. Repa, J.J., et al., *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2819-30.
32. Muscat, G.E., et al., *Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(43): p. 40722-8.
33. 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. 1108-15.
34. Frojdo, S., H. Vidal, and L. Pirola, *Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1792**(2): p. 83-92.
35. Gaster, M., H. Beck-Nielsen, and H.D. Schroder, *Proliferation conditions for human satellite cells. The fractional content of satellite cells*. *APMIS*, 2001. **109**(11): p. 726-34.

36. Henry, R.R., et al., *Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures.* Diabetes, 1995. **44**(8): p. 936-46.
37. Kramer, D.K., et al., *Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta.* Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1157-63.
38. Evans, R.M., G.D. Barish, and Y.X. Wang, *PPARs and the complex journey to obesity.* Nat Med, 2004. **10**(4): p. 355-61.
39. Liby, K., et al., *The rexinoid LG100268 and the synthetic triterpenoid CDDO-methyl amide are more potent than erlotinib for prevention of mouse lung carcinogenesis.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(5): p. 1251-7.
40. Burrage, P.S., et al., *Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists cooperate to inhibit matrix metalloproteinase gene expression.* Arthritis Res Ther, 2008. **10**(6): p. R139.
41. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation.* J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.
42. Kase, E.T., et al., *Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals.* Diabetologia, 2007. **50**(10): p. 2171-80.

Appendiks

Dyrkning av humane skjelettmuskelceller

Utsåingsmedium

500 ml DMED m/GLUTAMAX-1
50 ml FCS (føtalt kalveserum)
2,5 ml Penicillin-Streptomycin (10 000 enheter/ ml)
2,5 ml Fungizone® (250 ug/ml amfotericin B)

Proliferasjonsmedium

500 ml DMED m/GLUTAMAX-1
10 ml ml FCS (føtalt kalveserum)
10 ml Ultroser G
2,5 ml Penicillin-Streptomycin (10 000 enheter/ ml)
2,5 ml Fungizone (250 ug/ml amfotericin B)

Differensieringsmedium

500 ml DMED m/GLUTAMAX-1
10 ml ml FCS (føtalt kalveserum)
2,5 ml Penicillin-Streptomycin (10 000 enheter/ ml)
2,5 ml Fungizone (250 ug/ml amfotericin B)
25 pmol insulin (21 ul av 1000 x fortytning av Insulin Actarapid Penfill® 0,6 mM)

Dyrkning av skjelettmuskelceller fra mus

Vekstmedium

400 ml Ham` s F10 med L-glutamin
100 ml Føtalt kalveserum
2, 5 ml Penicillin-Streptomycin

5 ng/ml Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF)

Differensieringsmedium

500 ml DMEM Glutamax (5,5 mM glukose)

10 ml Hesteserum, 2 %

2,5 ml Penicillin/Streptomycin

Substrat-oksidasjonsforsøk

Høstebuffer (PBS)

8 g NaCl

0,2 g KH₂PO₄

2,9 g Na₂HPO₄

0,2 g KCl

1 liter destillert vann tilsettes, og pH justeres til 7,2-7,4 med HCl

Lipogenesemåling

Acetat 100 μ M, 1 μ Ci/ml

500 μ l serumfri DMEM/Glutamax per brønn

1 mM L-carnitine

1 μ Ci/ml [¹⁴C]acetat, tilsvarer 18,2 μ M

100 mM Na-acetat

Westernblotting

2x samplebuffer

6,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

7,5 ml 100 % Glyserol

5 ml 10 % SDS

Justeres med dH₂O opptil 50 ml

12 % Polyakrylamidgel (2 stk)

4,36 ml dH₂O

3,25 ml gelbuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)

5,20 ml Monomerløsning (akrylamid)

130 l SDS-løsning (10 %)

65 µl Ammonium persulfat (10 %)

6,5 µl TEMED

Gelbuffer, 1,5 M Tris-HCl

45,3 g TRIS

Til 250 ml dH₂O

pH justeres til 8,8 med HCl og sterilfiltreres

SDS 10 %

10 g SDS

Til 100 ml dH₂O

Ammonium persulfat 10 %

5 g Ammonium persulfat

Til 50 ml dH₂O

Bromofenolblått 0,5 %

Bromofenolblått 0,5 %

10 % etanol

4 % Stackgel

6,10 ml dH₂O

2,50 ml stackgelbuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)

1,30 ml Monomerløsning (Akrylamid)

100 µl SDS-løsning (10 %)

50 µl Ammonium persulfat (10 %)

10 µl TEMED

Stackgel-buffer, 0,5 Tris-HCl

15,1 g TRIS

Til 250 ml dH₂O

pH justeres til 6,8 med HCl og sterilfiltreres

Elektroforesebuffer

0,025 M TRIS (7,6 g)

0,192 M Glycine (36 g)

0,1 % SDS (2,5 g)

Til 2,5 L dH₂O

Blottebuffer

12 g Trisbase (25 med mer) ???

57,6 g Glycine (192 mM)

0,8 g SDS (0,02 %)

3200 ml dH₂O

800 ml metanol (20 %)

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

10 med mer Trisbase (2,42 g)

100 med mer NaCl (11,68 g)

Løses i cirka 1,8 L dH₂O

pH justeres til 7,5 med HCl

Justeres med d H₂O opptil 2 L

0,05 % Tween 20 tilsettes (1 ml)

Blotto

50 g tørrmelk (fettfri) tilsettes per 1 L T-TBS

Varmes opp under omrøring, for så å bli filtrert gjennom whatman 4 filterpapir