

Effekter av FKBP51-hemmeren SAFit2
på glukoseopptak
i skjelettmuskelceller og fettceller

Stefan Maricic



Masteroppgave for graden Master i farmasi

45 studiepoeng

Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

April/2021

Effekter av FKBP51-hemmeren SAFit2 på glukoseopptak i skjelettmuskelceller og fettceller

Stefan Maricic



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

April/2021

Veiledere:

Professor G. Hege Thoresen

Stipendiat Christine Skagen

© Stefan Maricic

2021

Effekter av FKBP51-hemmeren SAFit2 på glukoseopptak i skjelettmuskelceller og fettceller

Stefan Maricic

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Seksjon for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden fra august 2020 til april 2021.

Jeg vil uttrykke stor takknemlighet til veilederne mine, professor G. Hege Thoresen og Stipendiat Christine Skagen. Spesielt vil jeg takke professor G. Hege Thoresen for all oppfølging, rådgivning, korrekturlesing, oppmuntring og hjelp med figurene og resultatene. Jeg vil også takke Hege Gilbø Bakke og Camilla Stensrud for hjelpen med opplæring i laboratoriet og for innhenting og opparbeidelse av resultatene. En stor takk til Hege Gilbø Bakke for hjelpen med humane adipocytter, Westernblotting og qPCR. Tusen takk til resten av «Muskelbunt»-gruppen for deres bidrag med faglige innspill og hjelpen på laboratoriet.

Til slutt, en spesiell takk til foreldrene mine Miljko og Milena, og til søsteren min Petra for all støtte og motivasjon i løpet av disse fem årene.

Oslo, april 2021

Maricic Stefan

Stefan Maricic

Abstract

Background: Type 2 diabetes is a disease with an increasing prevalence worldwide. The disease affects many organs in the body such as the pancreas, liver, skeletal muscles, kidneys, brain, small intestine and adipose tissue. Insulin deficiency and insulin resistance are the main causes of type 2 diabetes. Insulin plays an important role in glucose metabolism in skeletal muscle and adipose tissue. It stimulates glucose uptake into both fat and skeletal muscle cells. This process depends on the GLUT-4 transporter. In insulin resistance, insulin-stimulated glucose uptake into adipocytes and skeletal muscle cells is reduced.

A previous study from mice has shown that SAFit2, an inhibitor of the FKBP51 protein, improved glucose uptake into skeletal muscle cells by increasing the phosphorylation of AS160 and the amount of GLUT-4 in the plasma membrane. In this study, effects of SAFit2 on glucose uptake in different cell models (human skeletal muscle cells, skeletal muscle cells from mice and human fat cells) were investigated, as well as effects on gene expression of GLUT-1 and GLUT-4, and basal and insulin-stimulated phosphorylation of AS160 and AKT2.

Method: In our study, three different cell models were used, human skeletal muscle cells, skeletal muscle cells from mice and human adipocytes. Human skeletal muscle cells were isolated from biopsies from *musculus vastus lateralis*, while mouse skeletal muscle cells were isolated from muscle mass from the hindlimbs. Human and mouse skeletal muscle cells were cultured and differentiated into myotubes. Human adipocytes, originally isolated from a person with Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS cells), were cultured and differentiated into mature adipocytes.

Glucose uptake into human and mouse skeletal muscle cells, as well as into SGBS cells, was measured after 24 hours of treatment with SAFit2 in the absence and presence of insulin. Glucose uptake into human skeletal muscle cells was also measured after 4 days of pretreatment with the LXR agonist T0901317 including treatment with SAFit2 for the last 24 hours. Glucose uptake was measured using radiolabeled deoxyglucose (2- [1-¹⁴C] -Deoxy-D-glucose). The gene expression of GLUT-1 and GLUT-4 in human skeletal muscle cells after treatment with the LXR agonist T0901317 and SAFit2 was analyzed by quantitative polymerase chain reaction

(qPCR). Phosphorylation of AS160 and AKT2 in human skeletal muscle cells after treatment with the LXR agonist T0901317 and SAFit2 was analyzed by Western blotting.

Results: 24 hours of treatment with SAFit2 did not increase glucose uptake in the different cell models, neither in the absence nor in the presence of insulin. Treatment with the LXR agonist T0901317 for four days including 24 hours of SAFit2 treatment for the last 24 hours did not increase glucose uptake into skeletal muscle cells, neither in the absence nor presence of insulin. GLUT-1 and GLUT-4 expression in skeletal muscle cells increased significantly after treatment with the LXR agonist T0901317, but there was no significant change in GLUT-1 and GLUT-4 expression after treatment with SAFit2. Treatments with SAFit2 and the LXR agonist T0901317 did not increase phosphorylation of AS160 and AKT2 in skeletal muscle cells, neither in the presence nor absence of insulin.

Conclusion: This study shows that basal and insulin-stimulated glucose uptake in different cell models was not affected by 24-hour treatment with the FKBP51 inhibitor SAFit2, neither in human skeletal muscle cells, in mouse skeletal muscle cells nor in human adipocytes. Treatment with the LXR agonist T0901317, which affects GLUT-4 expression, had no influence on the effect of SAFit2 on glucose uptake into human skeletal muscle cells. In the gene expression assay of skeletal muscle cells after treatment with SAFit2, no significant change in expression of GLUT-1 and GLUT-4 was observed, while treatment with the LXR agonist T0901317 led to an increase in expression of both GLUT-1 and GLUT-4, both in the presence and absence of SAFit2. Our study showed no significant change in phosphorylation of AS160 and AKT2 in skeletal muscle cells, neither after treatment with SAFit2 nor after treatment with the LXR agonist T0901317. Several studies are required to support the findings of this study and conclude with certainty whether there is an effect of SAFit2 on glucose uptake into skeletal muscle and adipose tissue.

Sammendrag

Bakgrunn: Diabetes type 2 er en sykdom med en økende prevalens i verden. Sykdommen rammer mange organer i kroppen som bukspyttkjertel, lever, skjelettmuskulatur, nyrer, hjerne, tynntarm og fettvev. Insulinmangel og insulinresistens er de viktigste årsakene til diabetes type 2. Insulin spiller en viktig rolle i glukoseomsetning i skjelettmuskulaturen og fettvevet og stimulerer glukoseopptaket i både fett- og skjelettmuskelceller. Denne prosessen er avhengig av glukosetransportøren GLUT-4. Ved insulinresistens er insulinstimulert glukoseopptak i adipocytter og skjelettmuskelceller redusert.

En tidligere studie fra mus har vist at SAFit2, en hemmer av FKBP51-proteinet, forbedret glukoseopptaket i skjelettmuskelceller ved å øke fosforylering av AS160 og GLUT-4-mengden i plasmamembranen. I denne studien ble det undersøkt behandlingseffekter av SAFit2 på glukoseopptak i ulike cellemodeller (humane skjelettmuskelceller, skjelettmuskelceller fra mus og humane fettceller), samt påvirkning på genekspresjon av GLUT-1 og GLUT-4, og basal og insulinstimulert fosforylering av AS160 og AKT2 i skjelettmuskelceller.

Metode: Det ble benyttet tre ulike cellemodeller, humane skjelettmuskelceller, skjelettmuskelceller fra mus og humane adipocytter. Humane skjelettmuskelceller ble isolert fra biopsier fra *musculus vastus lateralis*, mens skjelettmuskelceller fra mus ble isolert fra muskelmasse fra bakbenet. Skjelettmuskelcellene fra mennesker og mus ble dyrket og differensiert til myotuber. Humane adipocytter, opprinnelig isolert fra en person med Simpson-Golabi-Behmel syndrom (SGBS-celler), ble dyrket og differensiert til modne adipocytter.

Glukoseopptaket i skjelettmuskelceller fra mennesker og mus, samt i SGBS-celler, ble målt etter 24 timers behandling med SAFit2 i fravær og nærvær av insulin. Glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller ble også målt etter 4 dagers forbehandling med LXR-agonisten T0901317 etterfulgt med 24 timers behandling med SAFit2 det siste døgnet. Glukoseopptaket ble målt ved hjelp av radioaktivmerket deoksyglukose (2-[1-¹⁴C]-Deoksy-D-glukose). Genuttrykket av GLUT-1 og GLUT-4 i humane skjelettmuskelceller etter behandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 ble analysert ved hjelp av kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR). Fosforylering av AS160 og AKT2 i humane skjelettmuskelceller etter

behandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 ble analysert ved hjelp av Westernblotting.

Resultater: 24 timers behandling med SAFit2 økte ikke glukoseopptaket i de ulike cellemodellene, verken i fravær eller nærvær av insulin. Behandling med LXR-agonisten T0901317 i fire dager med SAFit2-behandling det siste døgnet økte heller ikke glukoseopptaket i skjelettmuskelceller, verken i fravær eller nærvær av insulin. GLUT-1- og GLUT-4-uttrykket i skjelettmuskelceller økte signifikant etter behandling med LXR-agonisten T0901317, men det var ingen signifikant endring av GLUT-1- og GLUT-4-uttrykket etter behandling med SAFit2. Behandlingene med SAFit2 og LXR-agonisten T0901317 økte ikke fosforylering av AS160 og AKT2 i skjelettmuskelceller, verken i nærvær eller fravær av insulin.

Konklusjon: Denne studien viser at basalt og insulinstimulert glukoseopptak i ulike cellemodeller ikke ble påvirket av ett døgns behandling med FKBP51-hemmeren SAFit2, verken i humane skjelettmuskelceller, i skjelettmuskelceller fra mus eller i humane adipocytter. Behandlingen med LXR-agonisten T0901317, som påvirker GLUT-4-ekspresjon, hadde ingen påvirkning på effekt av SAFit2 på glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller. I genekspresjonsanalysen av skjelettmuskelceller etter behandlingen med SAFit2 ble det ikke observert signifikant endring i ekspresjon av GLUT-1 og GLUT-4, mens behandlingen med LXR-agonisten T0901317 førte til økning i ekspresjon av både GLUT-1 og GLUT-4, både i nærvær og fravær av SAFit2. Studien vår viste ingen signifikant endring i fosforylering av AS160 og AKT2 i skjelettmuskelceller, verken etter behandling med SAFit2 eller etter behandling med LXR-agonisten T0901317. Flere studier kreves for å kunne støtte funnene i denne studien og konkludere med sikkerhet om det er effekt av SAFit2 på glukoseopptak i skjelettmuskulaturen og fettvevet.

Forkortelser

AC	Adenylylcyklase
ACC 1	Acetyl-CoA-karboksylase 1
Acetyl-CoA	Acetyl-koenzym A
Acyl-CoA	Acyl-koenzym A
AKT1	Proteinkinase B-alfa
AKT2	Proteinkinase B-beta
AKT3	Proteinkinase B-gamma
AMPK	5' AMP-aktivert proteinkinase
AS160	Akt-substrat på 160 kDa
ATGL	Adipocyttriglyseridlipase
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
C	Karbon
CA	Celleassosiert radioaktivitet
cAMP	Syklisk AMP
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
CD 36	Differensieringsklynge 36
DAG	Diacylglycerol
DGAT	Diglyseridacyltransferase
DMEM	Serumfritt differensieringsmedium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre

DPBS	Dulbecco Fosfatbufret saltvann
FATP 1	Fettsyretransportprotein 1
FAO	Fettsyreoksidasjon
FAS	Fettsyresyntetase
FFA	Frie fettsyrer
FKBP51	FK506-bindende protein 51
GLUT	Glukosetransportør
GO	Glukoseoksidasjon
GSV	GLUT-4 lagringsvesikler
G3P	Glyserol-3-fosfat
H	Hydrogen
HSL	Hormonsensitiv lipase
INSR (IR)	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
LPL	Lipoproteinlipase
LXR	Lever X-reseptor
MAG	Monoacylglyserol
MGL	Monoacylglyserollipase
NA	Noradrenalin
NAD ⁺	Nikotinamiddinukleotid i oksydert form
NADH	Nikotinamiddinukleotid i redusert form
NaOH	Natriumhydroksid
O	Oksygen
PBS	Fosfatbufret saltvann

PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
PHLPP	PH-domene leucinrik repeterende proteinfosfatase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
qPCR	Kvantitativ sanntids polymerase-kjedereaksjon
REK	Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RNA	Ribonukleinsyre
RPLP0	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein 0
RT	Revers transkriptase
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel syndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfeilen til gjennomsnittet
SGLT	Natriumkoblede glukosetransportør
TAG	Triacylglyserol
TGN	Trans-Golgi nettverk
TTBS	Tween-Tris-bufret saltvann
0F	Serumfritt basalmedium
β -AR	β -adrenergreseptor

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Diabetes type 2.....	1
1.2	Insulin og insulinsignalering.....	2
1.3	Insulinresistens.....	3
1.4	Glukosemetabolisme.....	5
1.5	GLUT-4-mekanisme	7
1.6	Skjelettmuskulaturens rolle i energimetabolismen	10
1.7	Fettvevets rolle i metabolismen	12
1.8	SAFit2.....	14
1.9	LXR-agonisten T0901317	16
1.10	Oppgavens formål.....	17
2	Materialer og metode	18
2.1	Materialer.....	18
2.1.1	Utstyr.....	18
2.1.2	Kjemikalier og reagenser	21
2.2	Donorkarakteristika.....	25
2.3	Dyrking av humane skjelettmuskelceller	25
2.3.1	Opprettelse av cellebank	25
2.3.2	Utsåing av celler	26
2.3.3	Splitting av celler	26
2.3.4	Proliferasjon og differensiering	27
2.4	Dyrking av skjelettmuskelceller fra mus	28
2.5	Dyrking av humane fettceller.....	29
2.6	Deoksyglukoseopptak.....	30
2.6.1	Forbehandling med SAFit2.....	30
2.6.2	Forbehandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2.....	32
2.6.3	Bradfords metode for kvantitativ proteinanalyse.....	33
2.6.4	Måling av celleassosiert radioaktivitet (CA)	34
2.7	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR)	34
2.7.1	Utsåing, dyrking og høsting av celler til qPCR	34

2.7.2	Isolering av RNA	35
2.7.3	Kvantifisering av RNA	36
2.7.4	cDNA-syntese	36
2.7.5	qPCR.....	36
2.8	Westernblotting.....	38
2.8.1	Utsåing, dyrking og høsting av celler	38
2.8.2	Gelelektroforese	39
2.8.3	Blotting	40
2.8.4	Blokking med primær- og sekundærantistoff	40
2.8.5	Fremkalling.....	41
2.8.6	Stripping og reblotting av membran	41
2.9	Statistikk	42
3	Resultater	43
3.1	Effekter av forbehandling med SAFit2 på deoksyglukoseopptak	43
3.1.1	Behandlingseffekter i humane skjelettmuskelceller	43
3.1.2	Behandlingseffekter i skjelettmuskelceller fra mus.....	44
3.1.3	Behandlingseffekter i SGBS-celler.....	45
3.2	Effekter av forbehandling med både LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 på deoksyglukoseopptak.....	47
3.3	Genekspresjon av GLUT-4 og GLUT-1 i skjelettmuskelceller.....	49
3.4	Fosforylering av AS160 og AKT2 i skjelettmuskelceller.....	50
4	Diskusjon	52
4.1	Metodologiske betraktninger	52
4.1.1	Cellemodellene	52
4.1.2	Metodene.....	53
4.2	Diskusjon av resultatene	54
4.2.1	Insulineffekter i de undersøkte cellemodellene	54
4.2.2	Effekter av SAFit2 alene.....	55
4.2.3	Effekter av SAFit2 i kombinasjon med T0901317	56
4.3	Veien videre	57
5	Konklusjon.....	58
	Litteraturliste.....	59

Vedlegg..... 65

1 Introduksjon

1.1 Diabetes type 2

Diabetes type 2 er en sykdom som rammer stadig flere mennesker verden rundt. I 2015 ble det estimert at rundt 415 millioner mennesker lever med diabetes, hvorav mer enn 90 % med diabetes type 2 (1). Mange studier har vist en sammenheng mellom vår moderne livsstil og risikoen for diabetes type 2. Utvikling av samfunnet fra et agrarisk samfunn til et moderne samfunn har fremmet forekomsten av diabetes type 2 (2). Det økende antallet mennesker med diabetes type 2 har blant annet kommet som en konsekvens av fedme, fysisk inaktivitet, diett med høyt kaloriinnhold, mindre fysisk krevende jobber (f.eks. kontorjobb), biltilgjengelighet osv. (1, 2).

Diabetes type 2 skyldes insulinmangel på grunn av β -cellesvikt og insulinresistens i målorganer. Sykdommen rammer mange organer i kroppen som bukspyttkjertel, lever, skjelettmuskulatur, nyrer, hjerne, tynntarm og fettvev (1). En utilstrekkelig insulinproduksjon og nedsatt insulinvirkning fører til en reduksjon i glukosetransporten til leveren og et redusert glukoseopptak i muskel- og fettceller som resulterer i hyperglykemi (høyt blodsukker) (3).

Glukose er en viktig energikilde for mange organer i kroppen, spesielt hjernen. Dermed er det nødvendig å opprettholde tilstrekkelige glukosenivåer i blodet for å overleve, men på den andre siden kan høye glukosenivåer i blodet være skadelig. Normale glukoseverdier i blodet opprettholdes ved hjelp av to motregulerende hormoner, glukagon og insulin (4).

Vanligvis, etter et måltid, øker insulinsekresjon og glukagonproduksjon nedsettes som en respons på hyperglykemi. Dette fører til nedsatt glukoseproduksjon i leveren og økt glukoseopptak i musklene. Ved diabetes type 2 er denne prosessen forstyrret, slik at insulinsekresjon og glukoseopptak i musklene er svekket, mens glukagonproduksjon og glukoseproduksjon i leveren ikke nedsettes (5).

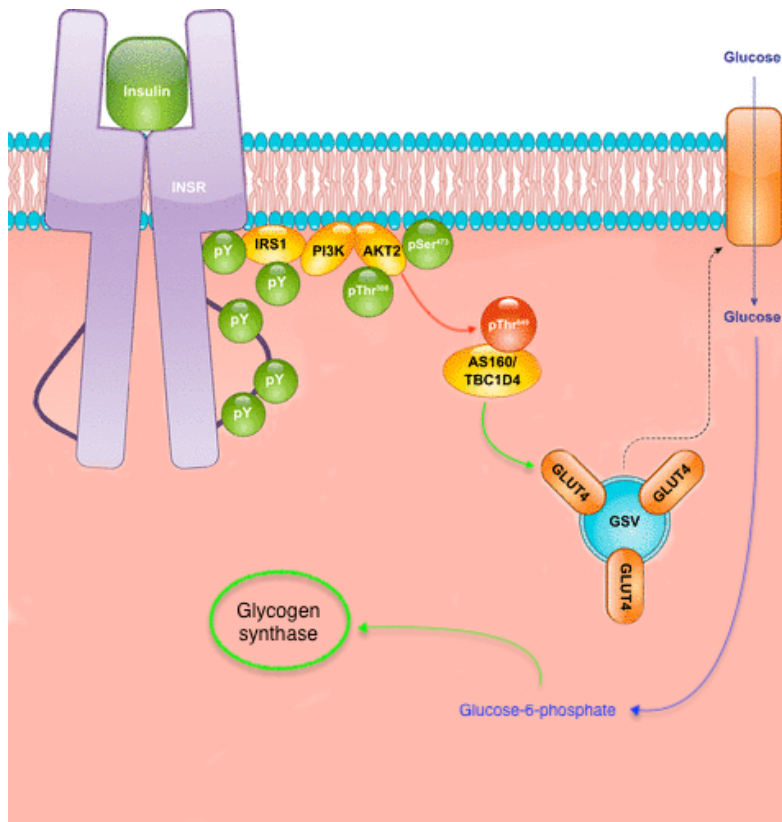
1.2 Insulin og insulinsignalering

Insulin er et peptidhormon som produseres i β -celler i bukspyttkjertelen og regulerer glukosenivået i blodet. Det er et dipeptid bestående av to polypeptidkjeder, A- og B-kjede som inneholder henholdsvis 21 og 30 aminosyrer. Hormonet produseres først i inaktiv form (proinsulin) som senere omdannes til den aktive formen (insulin). Insulin regulerer karbohydrat-, lipid- og proteinmetabolisme og letter glukosetransporten i insulinavhengige vev som muskler og fettvev (6).

Insulin binder seg til sin reseptor på cellenes plasmamembran i målvev og utøver på den måten sin effekt. Det er to bindingssteder på insulinreseptor, men insulin binder seg til ett av dem. Det vil si at ett insulinmolekyl binder seg til én insulinreseptor og aktiverer den. Insulinreseptor (INSR) består av fire subenheter, hvorav to alfa- og to beta- subenheter. Hver subenhet inneholder ett tyrosinkinasedomene (7). Insulinreseptor foreligger i to isoformer, A og B. Isoform B er en den vanligste isoformen i lever, muskel og fettvev og er mye mer insulinspesifikk enn isoform A (8, 9).

Insulin spiller en viktig rolle i glukoseomsetning i skjelettmuskulatur og fettvev. I skjelettmuskulatur stimulerer insulin glukoseopptak inn i celler og syntese av glykogen. I fettvev stimulerer insulin glukoseopptak inn i celler og lipogenese (7).

Når insulin binder seg til sin reseptor, aktiveres tyrosinkinase som fosforylerer insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1). Det finnes seks isoformer (IRS1-6) av insulinreseptorsubstrat (IRS). Det antas at de fleste metabolske effektene ved insulinreseptoraktivering medieres via IRS1 og IRS2. IRS1 er den vanligste isoformen av IRS i skjelettmuskulatur, mens IRS2 er den vanligste isoformen i lever (6, 7). Fosforylert IRS1 binder seg til og aktiverer PI3K. Aktivert PI3K fører til fosforylering av AKT2 (Proteinkinase B-beta, PKB- β) i Thr308- og Ser473-residuer og dets aktivering. AKT2 fosforylerer AKT-substrat på 160 kDa (AS160), også kjent som TBC1D4. Fosforylering av AS160 fremmer translokasjon av GLUT-4 lagringsvesikler (GSV) (7). Figur 1.1 viser insulinsignalering i skjelettmuskelceller.



Figur 1.1: Forenklet oversikt over insulinsignalering i skjelettmuskelceller. Aktivering av insulinreceptor (INSR) fører til glukoseopptak inn i skjelettmuskelceller. Insulinstimulert glukoseopptak skjer gjennom translokasjon av GLUT4-lagringsvesikler (GSV) til plasmamembranen. INSR, insulinreceptor; IRS1, insulinreceptorsubstrat 1; PI3K, fosfoinositid-3-kinase; AKT2, Proteinkinase B-beta (PKB- β); AS160, AKT-substrat på 160 kDa; GLUT-4, glukosetransportprotein 4. Figuren er modifisert fra (7).

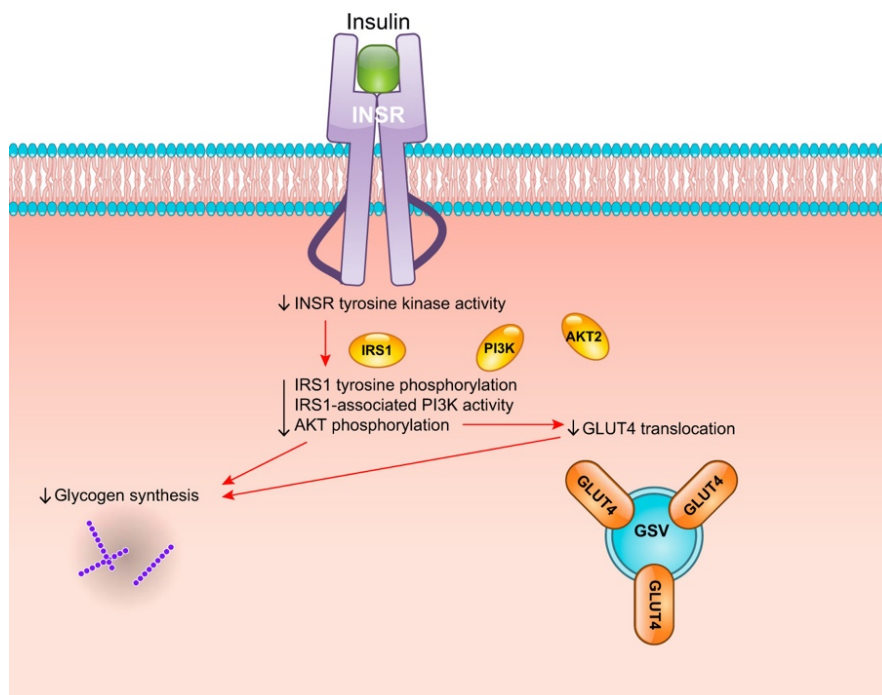
1.3 Insulinresistens

Insulinresistens defineres som en manglende glukosesenkende respons av en gitt insulinkonsentrasjon i insulinavhengige vev (10, 11). Normal glukosesenkende respons er en koordinert prosess som involverer nedsettelse av glukoseproduksjon i leveren, nedsettelse av lipolyse i fettvev, cellulært opptak av tilgjengelig plasmaglukose og glykogensyntese. Kroppen prøver å kompensere den manglende responsen ved å øke insulinproduksjon som til slutt fører til hyperinsulinemi (7).

Ved insulinresistens er insulinstimulert glukoseopptak i adipocytter og skjelettmuskelceller redusert, mens glukoseproduksjon i leveren ikke er nedsatt (12). Insulinresistens i skjelettmuskulatur er hovedkomponenten av insulinresistens ved diabetes type 2 (7). Den

påvirker glukoseomsetning i hele kroppen siden skjelettmuskulatur er et viktig lagringssted for glukose og cirka 70 % av helkroppsglukoseopptaket skjer i skjelettmuskulatur (6, 7). Det antas at omtrent 10 % av helkroppsglukoseopptaket skjer i fettvev (6).

En viktig funksjon til insulin, som nevnt tidligere, er å fremme glukosetransport i skjelettmuskelceller. Denne prosessen er avhengig av GLUT-4-translokasjon og kontrolleres av insulin. Den viktigste faktoren som er ansvarlig for redusert insulinstimulert glukoseopptak i musklene er glukosetransport (7). Ved insulinresistens er det et normalt uttrykk av GLUT-4 i skjelettmuskelceller, og det reduserte glukoseopptaket skyldes en nedsatt translokasjon av GLUT-4 til plasmamembran (12). Svekket insulinisering er en annen defekt funnet ved insulinresistens i skjelettmuskulatur i tillegg til nedsatt GLUT-4-translokasjon. Defekten ved insulinisering er forbundet med INSR-, IRS1-, PI3K- og AKT2-aktivitet. Det er en redusert aktivitet av INSR-tyrosinkinase, en reduksjon i IRS1-tyrosinfosforylering, en redusert PI3K-aktivitet og en reduksjon i AKT2-fosforylering (7). Figur 1.2 viser defekter ved insulinresistens.



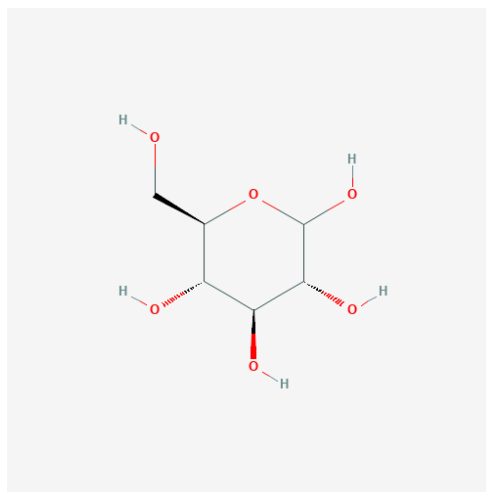
Figur 1.2: Insulinsignaling i skjelettmuskelceller ved insulinresistens. Insulinresistens fører til defekt i insulinsignaling og nedsatt GLUT-4-translokasjon. En redusert aktivitet av INSR-tyrosinkinase fører til en reduksjon i IRS1-tyrosinfosforylering etterfulgt av redusert PI3K-aktivitet. Dette fører til redusert AKT2-fosforylering og til slutt nedsatt translokasjon av GSV. INSR, insulinreseptor; IRS1, insulinreseptorsubstrat 1; PI3K, fosfoinositid-3-kinase; AKT2, Proteinkinase B-beta (PKB- β); GSV, GLUT4-lagringsvesikler; GLUT-4, glukosetransportprotein 4. Figuren er modifisert fra (7).

Den viktigste faktoren som bidrar til redusert glukoseopptak i adipocytter er nedsatt ekspresjon av GLUT-4, i tillegg til defekten i insulinisering (12).

I likhet med i skjelettmuskelceller er det ved insulinresistens redusert tyrosinkinaseaktivitet og IRS-fosforylering i adipocytter. I adipocytter kan det være redusert IRS-1-uttrykk, noe som resulterer i redusert IRS-1-assosiert PI3K-aktivitet. I motsetning til dette er det i skjelettmuskulatur et normalt uttrykk av IRS-1, men PI3K-aktivitet er svekket (12).

1.4 Glukosemetabolisme

Enhver organisme i verden bruker glukose som energikilde (13). Glukose er den viktigste energikilden for kroppen (14). Det er et karbohydrat med seks karbonatomer. Den kjemiske formelen til glukose er $C_6H_{12}O_6$ (13). Strukturformel for glukose er vist i figur 1.3.



Figur 1.3: Strukturformelen for glukose. Bildet er hentet fra (15).

Glukosemetabolisme involverer fire følgende prosesser (16):

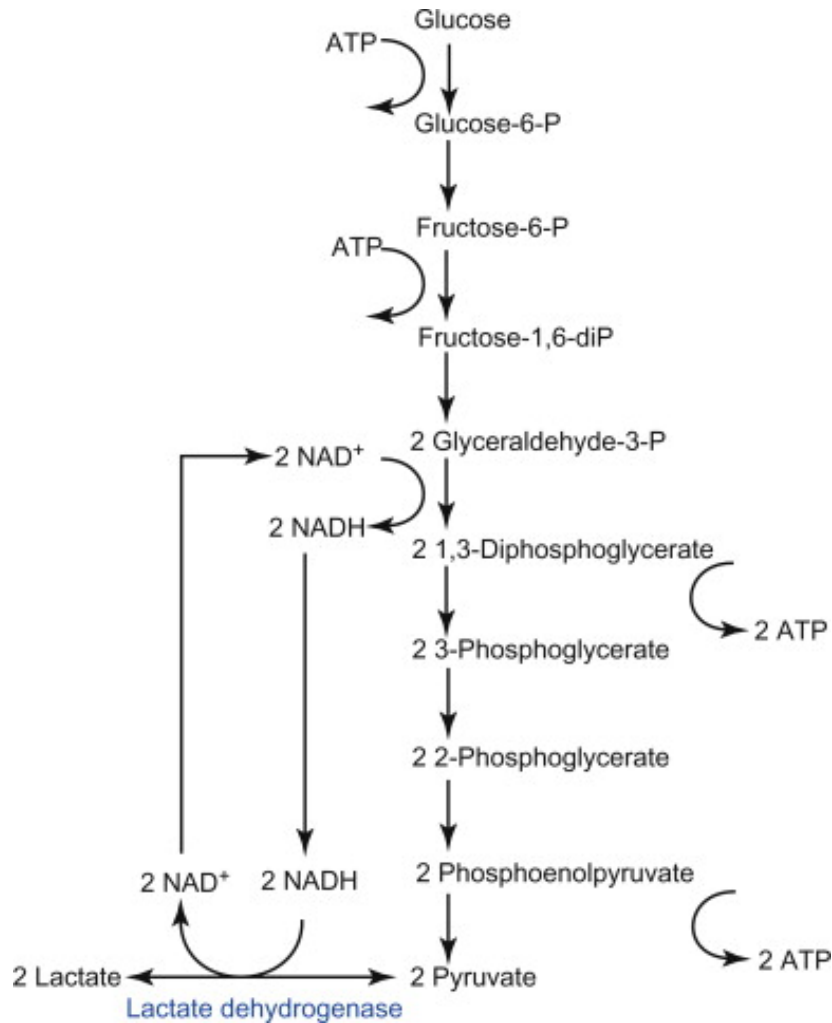
- Glykolyse
- Glukoneogenese
- Glykogenolyse
- Glykogenese

Glukose kommer inn i kroppen via flere kilder og transporteres gjennom blodet til energikrevende vev (13). I energikrevende vev skjer det glukosenedbrytning gjennom mange biokjemiske reaksjoner der mange forskjellige enzymer er involvert (13, 16). I denne nedbrytningsprosessen (glykolyse) dannes det fri energi i form av ATP som videre brukes i alle energikrevende prosesser (13).

Som nevnt i avsnitt 1.1 reguleres plasmaglukosenivåene, samt glykogensyntese av insulin og glukagon, hormoner som syntetiseres i endokrine celler i bukspyttkjertelen (4, 13). I kroppen er det en balanse mellom disse to motregulerende hormonene. Ved faste er det en høy glukagonkonsentrasjon, mens det er en høy insulinkonsentrasjon etter måltid. Ved høye glukagonverdier skjer det glykogenedbrytning og frigjøring av glukose (glykogenolyse). Ved høye insulinverdier tas glukoseoverskudd opp inn i celler og glykogen syntetiseres (glykogenese). Glukoseoverskudd lagres i kroppen som glykogen, mest i leveren og musklene (13).

Glykolyse er den viktigste metabolske prosessen for glukosenedbrytning i vevene (17). Etter at glukose har blitt tatt opp inn i celler, blir glukose fosforylert til glukose-6-fosfat som videre blir omdannet til fruktose-6-fosfat ved hjelp av fosfoglukoisomerase. Fruktose-6-fosfat blir fosforylert til fruktose-1,6-difosfat som videre spaltes til to glyseraldehyd-3-fosfat-molekyler. Deretter skjer det en oksidasjon og defosforylering der glyseraldehyd-3-fosfat blir omdannet til 3-fosfoglyserat. 3-fosfoglyserat omdannes videre til 2-fosfoglyserat og videre til fosfoenolpyruvat. Ved hjelp av enolase og pyruvatkinase dannes det pyruvatmolekyl fra fosfoenolpyruvat (17). Til slutt fra et glukosemolekyl dannes det to pyruvatmolekyler og to ATP-molekyler (16, 18).

Sluttprodukt dannelse i glykolyseprosessen avhenger av oksygentilgangen (19). Pyrodruesyre (pyruvat) er glykolysesluttprodukt under aerobe forhold (i nærvær av oksygen), mens melkesyre (laktat) er glykolysesluttprodukt under anaerobe forhold (i fravær av oksygen) (17, 19). Pyruvat omdannes til laktat ved hjelp av laktatdehydrogenase. Til slutt dannes det to laktatmolekyler og to ATP-molekyler fra et glukosemolekyl (17, 18). Glykolyseprosessen er presentert i figur 1.4.



Figur 1.4. Glykolyseprosessen. ATP, Adenosintrifosfat; NAD^+ , Nikotinamidadenindinukleotid i oksydert form; NADH, Nikotinamidadenindinukleotid i redusert form. Figuren hentet fra (20).

1.5 GLUT-4-mekanisme

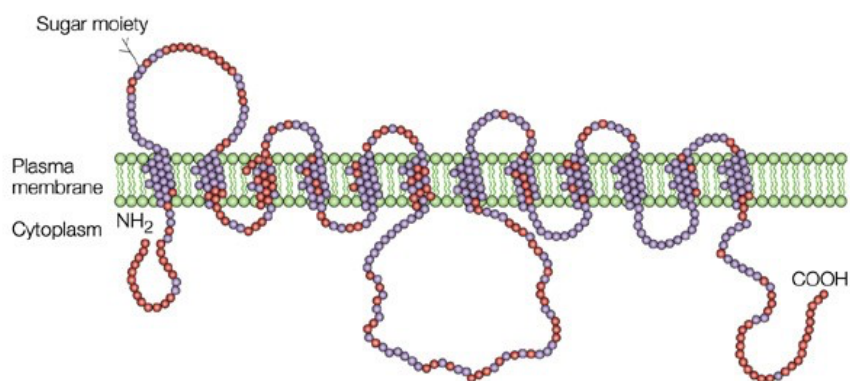
Glukose er en polar forbindelse med stor molekylvekt. Glukosemolekylene kan ikke krysse gjennom cellemembran ved diffusjon, dermed skjer glukosetransport inn i celler ved hjelp av transportproteiner som kalles glukosetransportører. Det finnes to typer glukosetransportører, natriumkoblede glukosetransportører (SGLT) og glukosetransportører (GLUT) (21, 22).

Glukosetransport gjennom SGLT-transportører er avhengig av natriumioner. Glukose transporteres mot en natriumkonsentrasjonsgradient. SGLT-transportører finnes i tynntarm og nyrer (21).

GLUT-transportører finnes i ulik grad i nesten alle celler (22). Glukosetransport gjennom GLUT-transportører er en ATP-uavhengig fasilitativ diffusjonsprosess (21, 23). Transporten skjer med konsentrasjonsgradient via diffusjon ved hjelp av spesielle membranproteiner (22).

Det finnes 13 kjente isoformer av GLUT-transportører. De er delt i 3 ulike klasser. I Klasse I er fire glukosetransportører, GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3 og GLUT-4 (21, 24). De er ansvarlige for glukosetransport (24). Det er også fire glukosetransportører i klasse II, GLUT-5, GLUT-7, GLUT-9 og GLUT-11 (21, 24). De er hovedsakelig ansvarlige for fruktosetransport (24). I klasse III er fem glukosetransportører, GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10, GLUT-12 og GLUT-13(HMIT1) (21, 24). Disse transportørene har en utypisk struktur for GLUT-transportører (24).

GLUT-4 er den viktigste GLUT i celler hvor glukoseopptak er insulinstimulert (22). Den inneholder 12 transmembran-domener (figur 1.5) (23). GLUT-4 er glukosetransportøren som reagerer på insulinstimuli og finnes i hjerte, skjelettmuskulatur, fettvev og hjerne (21). Den er involvert i normalisering av plasmaglukosenivåene og er en viktig faktor som bidrar til glukosefjerning fra blodet (25). Strukturen til GLUT-4 er vist i figur 1.5.

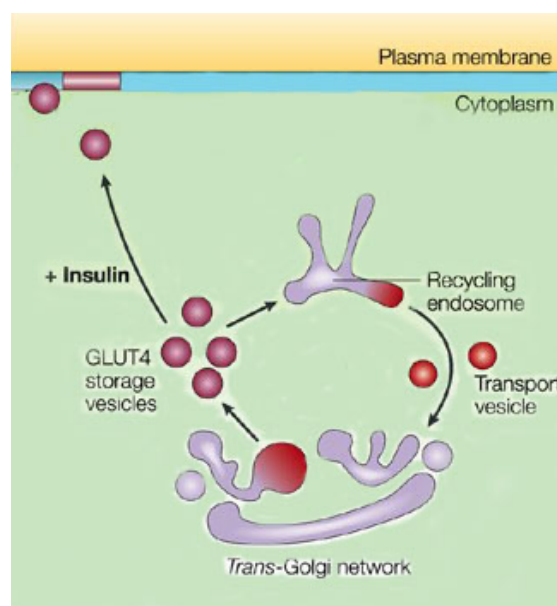


Figur 1.5: Strukturen til den insulinstimulerte GLUT-4 glukosetransportøren. Figuren er hentet fra (24).

GLUT-4 uttrykkes hovedsakelig i fett- og muskelceller (24). I fettceller og muskelceller lagres GLUT-4 i intracellulære vesikler (GLUT-4-lagringsvesikler, GSV) og ligger i veggen deres (se figur 1.1) (22, 24). Disse lagringsvesiklene har sannsynligvis opphav fra trans-Golgi og/eller endosomer (26).

GLUT-4 kan translokteres til cellemembranen som en respons på stimuli (insulin eller trening) (23). I basal tilstand (fravær av insulin eller trening) er det veldig lite GLUT-4 i cellemembranen og 90% av GLUT-4 forblir inne i cellen (22, 23). GLUT-4 lagres i GSV og sirkulerer mellom endosomer og trans-Golgi. GSV smelter sammen med endosomer og transporteres fra endosomer til trans-Golgi (26). Som en respons på insulin eller trening translokteres GLUT-4 fra disse vesiklene til cellens plasmamembran ved hjelp av eksocytose (21, 23, 24).

Etter opphør av stimuli transporteres GLUT-4 tilbake i intracellulære vesikler ved hjelp av endocytose (23). Figur 1.6 viser sirkulering av GLUT-4 i cellen, i nærvær og fravær av insulin.



Figur 1.6: Intracellulær sirkulering av GLUT-4 i nærvær og fravær av insulin. GLUT-4 sirkulerer i GLUT-4-lagringsvesikler mellom endosomer og trans-Golgi-nettverk (TGN), og er en del av TGN – endosomsyklus. I fravær av insulinstimuli smelter disse lagringsvesikler med endosomer og GLUT-4 transporteres fra endosomer til TGN. Ved insulinstimuli slutter GLUT-4 å sirkulere mellom endosomer og TGN og transporteres til cellens plasmamembran (24, 26). Figuren er modifisert fra (24).

GLUT-4-translokasjon i skjelettmuskelceller kan være insulinstimulert og ikke-insulinstimulert (kontraksjonsstimulert) (23, 27). Mekanisme til insulinstimulert GLUT-4-translokasjon er beskrevet i avsnitt 1.2 (figur 1.1). Kontraksjonsstimulert GLUT-4 translokasjon skjer ved fysisk aktivitet (trening). Det antas at mekanismen til kontraksjonsstimulert GLUT-4-translokasjon er uavhengig av PI3K, i motsetning til insulinstimulert GLUT-4-translokasjon (23). Kontraksjonsstimulert GLUT-4-translokasjon er avhengig av 5'AMP-aktivert proteinkinase (AMPK) som aktiveres ved muskelsammentrekning (23, 27). Muskelsammentrekning fører til

økt AS160-fosforylering som en konsekvens av AMPK-aktivering. Som en respons på økt AS160-fosforylering skjer det en GLUT-4-translokasjon (25). Men mekanismen til kontraksjonsstimulert GLUT-4-translokasjon er fremdeles ikke fullstendig forstått (27).

1.6 Skjelettmuskulaturens rolle i energimetabolismen

Det finnes tre muskeltyper i menneskekroppen: skjelettmuskulatur, glattmuskulatur og hjertemuskulatur (28). Skjelettmuskulaturen er den største muskulaturen av disse tre muskeltypene og ett av de største organsystemene i kroppen. Den gir kroppen stabilitet og forårsaker bevegelse sammen med skjelettet (28, 29). Omtrent 40 prosent av kroppsvekten finnes i skjelettmuskulaturen (30).

Skjelettmuskulaturen har en viktig funksjon i regulering av karbohydrat- og lipidmetabolisme (31, 32). Som nevnt tidligere er glukose den viktigste energikilden for kroppen og mesteparten av det insulinstimulerte glukoseopptaket skjer i skjelettmuskulaturen (6, 7, 14). Men glukose er ikke den eneste energikilden for skjelettmuskulaturen. Skjelettmuskulaturen kan også bruke frie fettsyrer (FFA) som energikilden (33). Avhengig av energibehovene og tilgjengelighet av energisubstrat kan skjelettmuskulaturen skifte mellom disse to energisubstratene (33, 34). Denne skifteprosessen er insulinkontrollert og avhengig av plasmaglukosekonsentrasjon (35). I nærvær av insulin favoriseres glukose som energisubstrat fremfor FFA, mens i fravær av insulin favoriseres FFA som energisubstrat (35, 36).

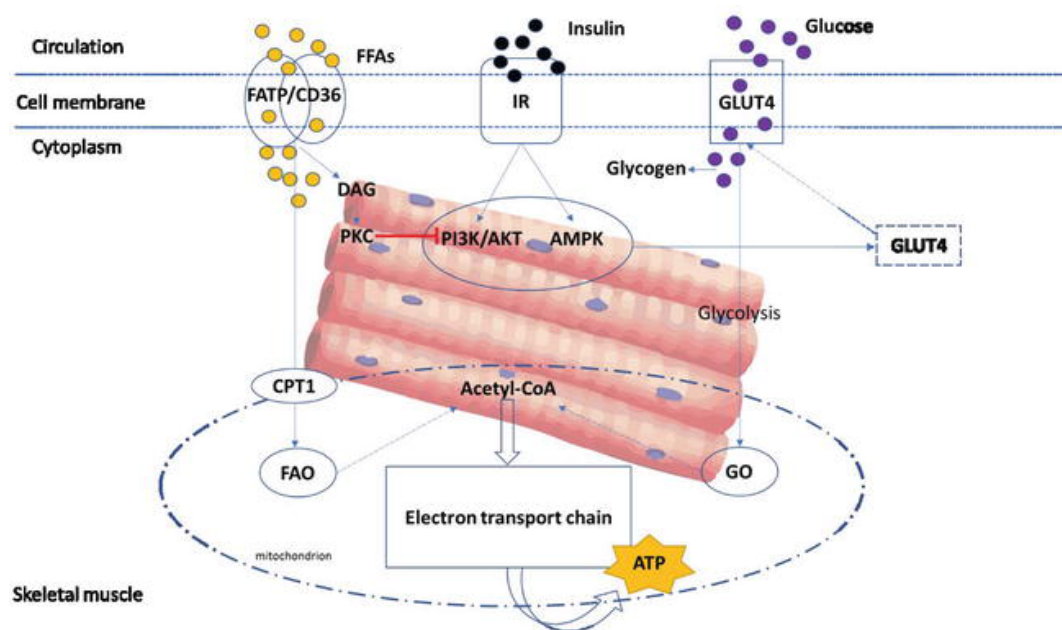
Ved faste (ved lave glukosekonsentrasjoner) nedsettes insulinproduksjon og glukoseopptaket i skjelettmuskulaturen reduseres vesentlig, samtidig øker plasmakonsentrasjon av FFA på grunn av nedbrytning av fett i fettvevet (lipolyse) (33, 35). Etter lipolyse i fettvevet kommer fettsyrer inn i sirkulasjonen bundet til albumin (37). En sirkulasjonsøkning av FFA vil deretter føre til økt fettmetabolisme og inhibering av karbohydratmetabolismen (38). Skjelettmuskulaturen blir dermed nødt til å bruke FFA som energisubstrat (kilde til ATP-produksjon) (33, 35).

I skjelettmuskulaturen skjer fettnedbrytning (betaoksidasjon) som til slutt fører til ATP-produksjon (fri energi). Frie fettsyrer (FFA) transporteres inn i cellen ved hjelp av fettsyretransportprotein 1/differensieringsklynge 36 (FATP 1/CD 36) (33). Deretter skjer en fettsyreakivering der fettsyrer omdannes til acyl-CoA. Ved hjelp av enzymkomplekset karnitinpalmitoyltransferase I (CPT I) transporteres de videre til mitokondrier der skjer

fettsyreoksidasjon og videre omdanning til acetyl-CoA og ATP-produksjon til slutt (39). Figur 1.7 viser fettysremetabolisme i skjelettmuskulaturen.

Ved høye glukosekonsentrasjoner stimuleres insulinproduksjon som fører til økt glukoseopptak i skjelettmuskulaturen og glukose brukes som energisubstrat (kilde til ATP-produksjon). Samtidig reduseres plasmakonsentrasjon av FFA siden fettnekbrytning i fettvevet er nedsatt (33, 35). Glukosemetabolismen i skjelettmuskulaturen er beskrevet i avsnitt 1.4.

Ved insulinresistens klarer skjelettmuskulaturen i mindre grad å skifte mellom disse to energisubstratene. Dette kan føre til nedsatt glukose- og fettmetabolisme som en konsekvens (33). Nedsatt fettmetabolisme kan føre til økt konsentrasjon av FFA som ytterligere kan nedsette insulinstimulert glukoseopptak og dermed nedsette glukosemetabolismen (34, 39, 40). Redusert glukoseopptak i skjelettmuskulaturen kan skje på grunn av aktivering av proteinkinase C (PKC) som fosforylerer insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1) og endrer hele insulinssignaleringsveien, og til slutt fører til nedsatt GLUT4-translokasjon (33, 39). Figur 1.7 viser mekanisme til fettysreindusert insulinresistens.



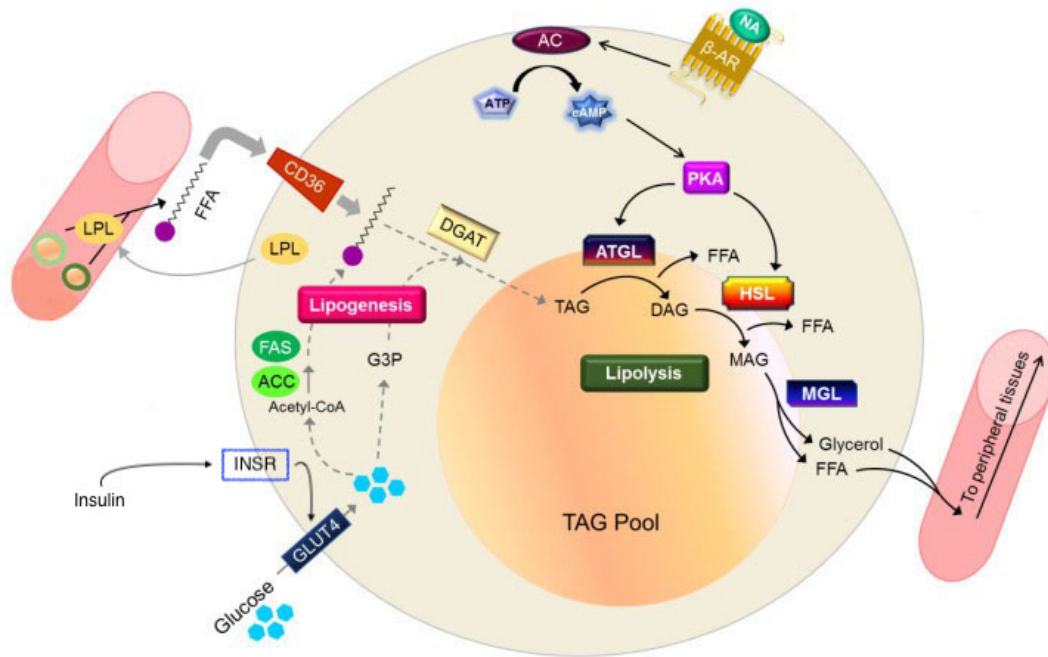
Figur 1.7: Fettysremetabolismen i skjelettmuskulatur og mekanismen til fettysreindusert insulinresistens. CD36: differensieringsklynge 36, CPT1: karnitinpalmitoyltransferase 1, DAG: diacylglycerol, FFAs: frie fettysrer, FAO: fettysreoksidasjon, FATP: fettysretransportprotein 1, GLUT4: glukosetransportør 4, GO: glukoseoksidasjon, IR: insulinreseptor, and PKC: proteinkinase C. Figuren er hentet fra (33).

1.7 Fettvevets rolle i metabolismen

Fettvevet spiller også en viktig rolle i kroppens karbohydrat- og lipidmetabolisme (31, 41). Fett er hovedsakelig lokalisert under huden, men finnes også mellom musklene, i tarmen, rundt hjertet, nyrer og andre indre organer. Menneskekroppen har to typer fettvev, hvitt og brunt fettvev (42, 43). Disse to vevene har ulike funksjoner. Hvitt fett fungerer som kroppens energilager og produserer forskjellige hormoner som er involvert i energimetabolisme eller har endogen funksjon (41, 42). Ved energioverskudd lagres kroppsfett i fettceller som triacylglyserol TAG (lipogenese) (44). Brunt fett er involvert i termogenese, en energikrevende prosess av varmeproduksjon (41, 42). Hos voksne mennesker er brunt fett nesten fraværende (45).

Ved stort energibehov (i perioder med sult) skjer det fettnedbrytning i fettvevet. Denne nedbrytningsprosessen kalles lipolyse. I denne nedbrytningsprosessen skjer det nedbrytning av triacylglyserol (TAG) som fører til dannelse av frie fettsyrer (FFA) og glyserol (42, 44). Frie fettsyrer (FFA), som er frigjort ved lipolyse, benyttes som et energisubstrat for energiproduksjon i andre vev (f.eks. musklene) (33, 35, 42). TAG brytes ned til diacylglyserol (DAG) ved hjelp av adipocyttriglyseridlipase (ATGL). DAG brytes ned til monoacylglyserol (MAG) ved hjelp av hormonsensitiv lipase (HSL). Ved hjelp av monoacylglyserollipase (MGL) brytes MAG ned til FFA og glyserol (44, 46, 47). Lipolyseprosessen er vist i figur 1.8.

Som nevnt tidligere antas det at omtrent 10 % av helkroppsglukoseopptaket skjer i fettvev, i en prosess stimulert av insulin (6, 7). Dermed er fettvevet også involvert i kroppens regulering av plasmaglukosenivåene. Insulin stimulerer glukoseopptak og -akkumulering i fettceller, men samtidig nedsettes nedbrytning av TAG (44). Akkumulert glukose fungerer videre som et substrat for de novo syntese av fettsyrer og dannelse av TAG (lipogenese) (45, 46). De novo syntese av fettsyrer skjer fra acetyl-CoA som er en metabolitt i glukosenedbrytningsprosessen (46). Denne omdanningen skjer etter karbohydratrike måltider og er mediert av enzymene acetyl-CoA-karboksylase 1 (ACC 1) og fettsyresyntase (FAS) (44, 47). Glukose omdannes også til glyserol som er involvert i esterifisering av fettsyrer og dannelse av TAG (44). Denne prosessen er mediert av diglyseridacyltransferase (DGAT) (44, 48). Lipogeneseprosessen er vist i figur 1.8.

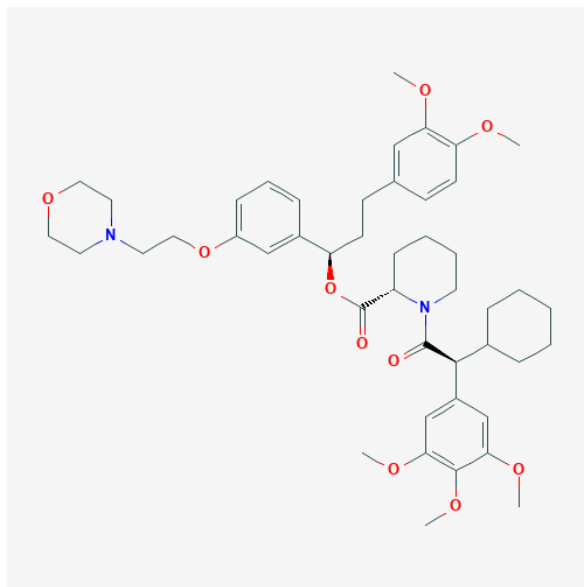


Figur 1.8: Lipogenese og lipolyse i fettcellen. Insulin stimulerer glukoseopptak ved å øke uttrykket av GLUT-4. Inne i fettcellen nedbrytes glukose til Acetyl-CoA som videre omdannes til frie fettsyrer (FFA) ved hjelp av enzymene acetyl-CoA-karboksyklase 1 (ACC1) og fettsyresyntase (FAS). Glukose omdannes også til glyserol. Ved hjelp av diglyseridacyltransferase (DGAT) dannes TAG fra FFA og glyserol (lipogenese). Noradrenalin (NA) stimulerer adenylylsylase (AC) som stimulerer produksjon av syklisk AMP (cAMP). cAMP stimulerer proteinkinase A (PKA) som aktiverer ATGL og HSL. Til slutt nedbrytes TAG til FFA og glyserol (lipolyse). LPL, lipoprotein lipase; ACC 1, acetyl-CoA-karboksyklase 1; FAS, fettsyresyntase; G3P, glyserol-3-fosfat; DGAT, diacylglycerolacyltransferase; β-AR, β-adrenergreseptor; NA, noradrenalin; AC, adenylylsyklase; PKA, proteinkinase A; ATGL, adipocyttriglyseridlipase; HSL, hormonsensitiv lipase; MGL, monoacylglycerollipase; TAG, triacylglycerol; DAG, diacylglycerol; MAG, monoacylglycerol. Figuren modifisert fra (44).

Ved insulinresistens klarer ikke insulin å hemme lipolysen. og reduksjon av FFA og glyserol er svekket. Til slutt fører dette til økning i FFA-nivåer i blodet, i både fastende tilstand og i forbindelse med måltider (44, 49).

1.8 SAFit2

SAFit2 er en hemmer av FK506-bindende protein 51 (FKBP51) (50). Den kjemiske formelen til SAFit2 er $C_{46}H_{62}N_2O_{10}$ (51). Strukturformelen er vist i figur 1.9.



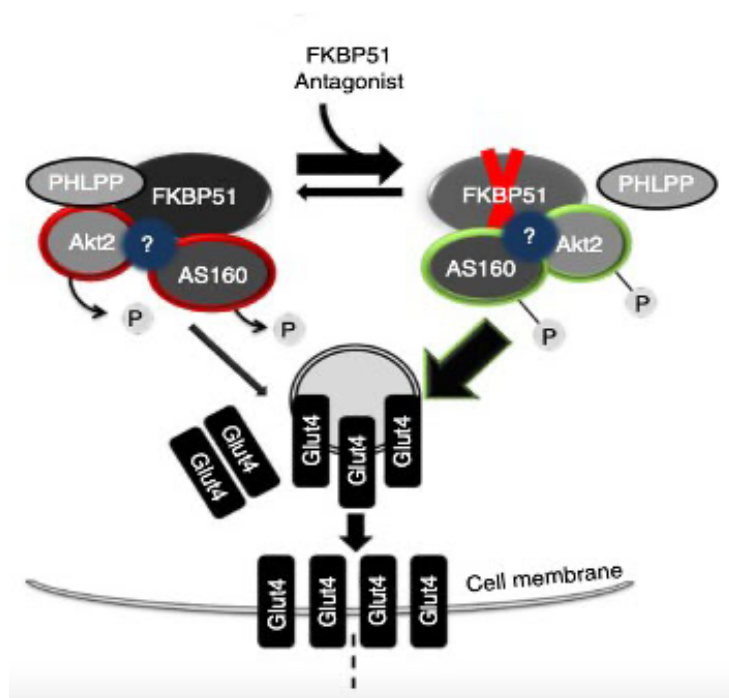
Figur 1.9: Strukturformelen til SAFit2. Figuren er hentet fra (51).

FKBP51-proteinet reagerer på stressrespons og fungerer som en regulator av stress-reaktivitet (50, 52). Proteinet har blitt sett som et terapeutisk mål for stressrelaterte lidelser (depresjon, posttraumatisk stresslidelse), metabolske forstyrrelser (fedme og diabetes) og kronisk smerte (52). FKBP51-proteinet har peptidylprolyliseraseaktivitet og klassifiseres som et immunofilin (50, 52). Immunofiliner er proteiner som binder seg til immunsuppressive legemidler som ciklosporin eller FKBP5. De er klassifisert i to grupper, ciklosporin A-bindende syklofiliner og FK506-bindende proteiner (53-55). Stress og glukokortikoider stimulerer ekspresjon av FKBP51-proteinet. FKBP51-proteinet nedregulerer glukokortikoidreseptor og fysiologisk stressrespons (50, 52). FKBP51-proteinet uttrykkes i høyest grad i adipocytter, skjelettmuskelceller og lymfocytter (56).

Det er vist i en studie fra mus og skjelettmuskelceller fra mus i kultur at FKBP51-proteinet har en viktig rolle i energi- og glukosehomeostasen (50). Studien fant en sammenheng mellom FKBP51 og AS160, et substrat av AKT2 som er involvert i glukoseopptak, og fant også at FKBP51 nedregulerte alle 3 AKT-isoformene (AKT1, AKT2 og AKT3) (50). Blant disse tre

isoformene har AKT2 en viktig rolle i insulinsignalering, og nedregulering av AKT2 assosieres med fedme og diabetes (50). Studien viste at FKBP51-proteinet hadde en effekt på glukosemetabolismen i mus (50).

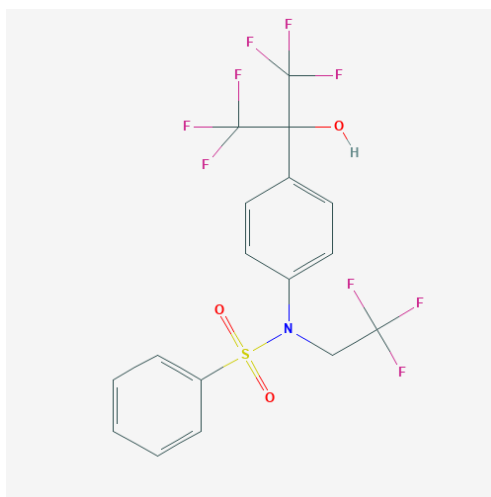
Studien viste at SAFit2, en hemmer av FKBP51-proteinet, økte fosforyleringen av AS160, økte GLUT-4-mengden i cellemembranen, og til slutt forbedret glukoseopptaket i skjelettmuskelceller fra mus i kultur (50). SAFit2 binder seg til FKBP51-proteinet og hindrer interaksjon mellom PHLPP (PH-domene leucinrik repeterende proteinfosfatase) og AKT2. PHLPP er proteinfosfatase som direkte defosforylerer AKT2. Interaksjonshindring mellom PHLPP og AKT2 førte til økt fosforylering av AKT2. AKT2-fosforylering førte videre til fosforylering av AS160 som til slutt førte til økt GLUT-4-translokasjon til plasmamembranen og dermed økt glukoseopptak inn i cellen (50, 56). Figur 1.10. viser antatt mekanisme til FKBP51-antagonisme med SAFit2.



Figur 1.10: Mekanismen til FKBP51-hemming med SAFit2. SAFit2 hemmer FKBP51-proteinet og forbedrer AKT2-AS160 signalering som fører til GLUT-4-translokasjon og letter glukoseopptak inn i cellen. FKBP51, FK506-bindende protein 51; PHLPP, PH-domene leucinrik repeterende proteinfosfatase; AKT2, Proteinkinase B-beta (PKB- β); AS160, AKT-substrat på 160 kDa; GLUT-4, glukosetransportprotein 4. Figuren er modifisert fra (50).

1.9 LXR-agonisten T0901317

T0901317 er en selektiv LXR-reseptor-agonist (57). Den kjemiske formelen til T0901317 er $C_{17}H_{12}F_9NO_3S$ (58). Strukturformelen er vist i figur 1.11.



Figur 1.11: Strukturformelen til T0901317. Figuren er hentet fra (58).

LXR-reseptor tilhører gruppen kjernereseptorer (59). Det finnes to isoformer av LXR-reseptor, LXR- α og LXR- β (59, 60). LXR- β uttrykkes i alle vev, mens LXR- α uttrykkes i høyest grad i nyrer, tarm, fettvev, skjelettmuskulatur og makrofager (59, 61). LXR-reseptorer er involvert i kolesterol- og lipidmetabolismen (60, 62).

LXR-reseptorer har også en viktig rolle i glukosemetabolismen (63, 64). Denne rollen har blitt påvist i flere dyrestudier. Det ble funnet at aktivering av LXR-reseptoren med agonisten T0901317 fører til reduksjon av plasmaglukosenivåer ved å undertrykke glukoneogenese i hepatocytter fra mus (63, 65). I dyrestudiene ble det også funnet at LXR-agonisten T0901317 fører til økt GLUT-4-uttrykk i fett- og skjelettmuskelceller fra mus og på denne måten bidrar til normal glukosehomeostase (64, 66).

Det er få studier som har undersøkt effekten av LXR-agonisten T0901317 på glukoseopptak i humane celler. Det ble funnet i en studie at LXR-agonisten T0901317 fører til økt GLUT-4-uttrykk i humane skjelettmuskelceller og økt GLUT-1- og GLUT-3-uttrykk i SGBS celler. Studien viste også at LXR-agonisten T0901317 forbedrer glukoseopptak i humane adipocytter og hepatocytter, men ikke i skjelettmuskelceller (61).

1.10 Oppgavens formål

Dyreforsøk fra mus har vist at SAFit2, en hemmer av FK506-bindende protein 51 (FKBP51), forbedrer AKT2-AS160 signalering, øker GLUT-4 i cellemembranen og forbedrer glukoseopptaket i skjelettmuskelceller (50). Dermed kan SAFit2 anses som et potensielt nytt verktøy i behandling av fedme og diabetes type 2. Foreløpig er det kun få studier som har undersøkt effekten av SAFit2 på skjelettmuskelceller fra mus og det finnes ingen data fra studier på skjelettmuskelceller fra mennesker.

Hovedformålet med denne oppgaven er å studere effekten av SAFit2 på glukoseopptak, i nærvær og fravær av insulin, i skjelettmuskelceller og fettceller.

Delmål for oppgaven:

- Effekt av SAFit2 på basalt og insulinstimulert glukoseopptak i humane skjelettmuskelceller i kultur.
- Effekt av SAFit2 på basalt og insulinstimulert glukoseopptak i skjelettmuskelceller fra mus i kultur.
- Effekt av SAFit2 på basalt og insulinstimulert glukoseopptak i humane fettceller (SGBS) i kultur.
- Effekt av SAFit2 på basalt og insulinstimulert glukoseopptak i humane skjelettmuskelceller i kultur etter behandling med andre stoffer som påvirker GLUT-4-ekspressjon (f.eks. LXR-agonisten T0901317).
- Effekt av SAFit2 og LXR-agonisten T0901317 på GLUT-4 og GLUT-1-ekspressjon i humane skjelettmuskelceller i kultur.
- Effekt av SAFit2 og LXR-agonisten T0901317 på fosforylering av AKT2 og AS160 i humane skjelettmuskelceller i kultur, i nærvær og fravær av insulin.

2 Materialer og metode

2.1 Materialer

2.1.1 Utstyr

Tabell 2.1: Oversikt over utstyr som ble brukt

Leverandør	Utstyr	Sted
AB Applied Biosystems	ABI PRISM™ 7000 Sequence Detection System	Waltham, MA, USA
Applied Biosystems™	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Foster City, CA, USA
Applied Biosystems™	MicroAmp™ Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free	Foster City, CA, USA
Applied Biosystems™	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Foster City, CA, USA
Applied Biosystems™	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Foster City, CA, USA
BioRad	Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer nitrocellulose (membran)	København, Danmark
BioRad	Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer nitrocellulose (membran) Steaks	København, Danmark
Bio-Rad Laboratories	Chemidoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software	Hercules, CA, USA
Bio-Rad Laboratories	Bio-Rad Powerpac™ HC	Hercules, CA, USA
Bio-Rad Laboratories	4-20 % Mini-Protein® TGX™ Precast Protein Gels	Hercules, CA, USA
Biosan	V-1 Plus, Personal Vortex	Riga, Latvia

Corning®	Corning™ Costar™ Stripette™ serological pipettes	NY, USA
Corning Inc	24-well Corning® CellBIND® tissue culture plates	Schiphol-Rijk, Nederland
Corning Inc	6-well Corning® CellBIND® tissue culture plates	Schiphol-Rijk, Nederland
Corning Inc	Corning® Centrifuge Tube, Centristar™ Cap (15 ml og 50 ml)	Schiphol-Rijk, Nederland
Costar®	Pipetter	Kennebunk, ME, USA
Eppendorf AG	Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Hamburg, Tyskland
Esco Micro Pte. Ltd.	Esco CelCulture®, CO2 Incubator	Singapore
Gibco®, Invitrogen™, Gibco Life Technologies	Countess™ automated cell counter	Eugene, OR, USA
Gibco®, Invitrogen™, Gibco Life Technologies	Countess™ counting chamber slides	Eugene, OR, USA
GraphPad Software	GraphPad Prism version 9.0.1	San Diego, CA, USA
Integra LifeSciences	FIREBOY™ Safety Bunsen Burner	Plainsboro Township, NJ, USA
Kubota Corporation	Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010	Osaka, Japan
Labnet International Inc.	Digital Dry Bath	Edison, NJ, USA
Olympus	Olympus CKX41 microscope med digitalkamera	Tokyo, Japan

PerkinElmer®	Packard Tri-Carb™ Liquid Scintillation Counter 1900 TR	Waltham, MA, USA
PerkinElmer®	Pico Prias Vial, 6 ml, Anti Static	Waltham, MA, USA
PerkinElmer®	VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader	Waltham, MA, USA
QIAGEN	RNeasy® Plus Mini Kit	Hilden, Tyskland
Sarstedt AG & Co.	Pipettespisser	Nürnberg, Tyskland
Stovall Life Science Inc.	The Belly Dancer®	Dubuque, IA, USA
Thermo Fisher Scientific	Dynabeads® MX 12-tube Mixing Wheel	Roskilde, Danmark
Thermo Fisher Scientific	Heraeus Fresco21 Centrifuge	Roskilde, Danmark
Thermo Fisher Scientific	Nanodrop™ Lite Spectrophotometer	Roskilde, Danmark
Thermo Fisher Scientific	NUNC™ EasyFlask™ 75 ml flaske	Roskilde, Danmark
Thermo Fisher Scientific	NUNC™ EasyFlask™ 25 ml flaske	Roskilde, Danmark
TPP®/MIDSCI®	Cell scrapers 24 cm	St. Louis, MO, USA
VWR® International	Ministar Silverline Microcentrifuge	Radnor, PA, USA
VWR® International	Reagent reservoirs	Radnor, PA, USA
VWR® International	Disposable Pasteur pipettes, 230 mm	Radnor, PA, USA

2.1.2 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.2: Oversikt over kjemikalier og reagenser som ble brukt

Leverandør	Kjemikalier/reagenser	Sted
Agilent Technologies Inc.	Nuclease-free H ₂ O	Cedar Creek, TX, USA
Agilent Technologies Inc.	Agilent Total RNA Isolation Mini Kit	Cedar Creek, TX, USA
Applied Biosystems™	Power-SYBR® Green PCR Master Mix	Foster City, CA, USA
Applied Biosystems™	Taqman Reverse Transcription Reagents-kit	Foster City, CA, USA
AstraZeneca Plc.	SAFit2	Cambridge, Storbritannia
AstraZeneca Plc.	Primer for Taqman® PCR (TBP)	Cambridge, Storbritannia
BioRad	Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	København, Danmark
BioRad	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	København, Danmark
BioRad	Bromfenylblått	København, Danmark
BioRad	Clarity™ Western ECL substrates	København, Danmark
BioRad	SDS	København, Danmark
BioRad	Tris/glycine/SDS-buffer	København, Danmark
BioRad	Tween 20	København, Danmark
Bio-Rad Laboratories	Anti-Rabbit Antibody Conjugated to Horseradish Peroxidase	Hercules, CA, USA

Bio-Rad Laboratorier	SDS	Hercules, CA, USA
Bio-Rad Laboratories	Trypan Blue Solution, 0,4 %	Hercules, CA, USA
Cayman Chemical Company	T0901317	Ann Arbor, MI, USA
Cell Signaling Technology	Monoklonalt antistoff pAKT2 og total AKT2	Danvers, MA, USA
Cell Signaling Technology	Monoklonalt antistoff pAS160 og total AS160	Danvers, MA, USA
Gibco® Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) med Glutamax™	Paisley, Storbritannia
Gibco® Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS uten Mg ²⁺ og Ca ²⁺)	Paisley, Storbritannia
Gibco® Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies)	Føtalt kalveserum (FCS)	Paisley, Storbritannia
Gibco® Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies)	Fungizone® (250 µg/ml amfotericin B)	Paisley, Storbritannia
Gibco® Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies)	Penicillin-Streptomycin (10 000 IE/ml)	Paisley, Storbritannia
Gibco® Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies)	Trypsin 0,25 %	Paisley, Storbritannia
Merck	Glyserol	Darmstadt, Tyskland
Merck	Tris-HCl	Darmstadt, Tyskland

Merck	Triklorreddiksyre (TCA)	Darmstadt, Tyskland
Novo Nordisk A/S	Insulin, ActRapid® Penfill® 100IE/ml	Bagsværd, Danmark
PerkinElmer®	2-[1- ¹⁴ C]-Deoxy-D-glukose, 250 µCi	Waltham, MA, USA
PerkinElmer®	Ultima Gold™ XR	Waltham, MA, USA
QIAGEN	Buffer RLT Plus RNeasy Plus Lysis buffer	Venlo, Nederland
Sigma-Aldrich™	BSA	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Cortisol	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Deksametason	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Gentamicin (50 mg/ml)	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	4-(2-Hydroksyetyl)piperazin-1- etansulfonsyre (HEPES)	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Dimetylsulfoksid (DMSO)	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	IBMX	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	β-merkaptoetanol	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Phosphatase Inhibitor Cocktail	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Tri Base	St. Louis, MO, USA

Sigma-Aldrich™	T3	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Transferrin	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	D-glukose	St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich™	Rosiglitazone	St. Louis, MO, USA
ThermoFisher Scientific	Human Epidermal Growth Factor (hEGF)	Roskilde, Danmark
ThermoFisher Scientific	Primers for TaqMan® PCR (GLUT-1, GLUT-4, RPLP0)	Roskilde, Danmark
ThermoFisher Scientific	Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Roskilde, Danmark
ThermoFisher Scientific	RNase-inhibitor	Roskilde, Danmark
ThermoFisher Scientific	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Roskilde, Danmark
ThermoFisher Scientific	Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A	Roskilde, Danmark
ThermoFisher Scientific	Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B	Roskilde, Danmark
VWR	NaOH	Poole, England
VWR	NaCl	Poole, England

2.2 Donorkarakteristika

Humane skjelettmuskelceller (satellittceller) ble isolert fra biopsier fra *musculus vastus lateralis* (67). Denne muskelen er én av de fire muskelkomponentene i lårmuskelen. *M. vastus lateralis* er den største komponenten i lårmuskelen og er plassert lateralt, dvs. på utsiden av lårmuskelen (68). I likhet med satellittceller i skjelettmuskulatur kan satellittceller i kultur aktiveres til myoblaster og differensieres til myotuber (lange muskelfibre med flere kjerner). På grunn av deres aktiverings- og differensieringsevne representerer satellittceller en unik modell for å studere human skjelettmuskulatur (69).

I denne oppgaven er satellittceller fra *m. vastus lateralis* omtalt som AT-celler. Tabell 2.3 viser en fullstendig oversikt over donorkarakteristika.

Tabell 2.3: Donorkarakteristika for AT-celler.

Donorkode	Kjønn	Alder (år)	KMI (kg/m ²)
<i>AT7</i>	Mann	24	23,0
<i>AT8</i>	Mann	28	26,0
<i>AT10</i>	Mann	24	19,7
<i>AT17</i>	Mann	23	25,5
<i>AT18</i>	Mann	21	27,0
<i>AT22</i>	Mann	24	23,9

2.3 Dyrking av humane skjelettmuskelceller

2.3.1 Opprettelse av cellebank

Skjelettmuskelceller isolert fra biopsi (satellittceller) ble benyttet for å opprette en cellebank. Det ble først gjort en celleoppskalering over flere passasjer før cellene ble overført til ampuller (kryorør). Celleampuller ble deretter frosset i en nitrogentank ved -196 °C.

2.3.2 Utsåing av celler

Det ble benyttet proliferasjonsmedium for celleutsåing (vedlegg 1.1). Proliferasjonsmediet ble satt til oppvarming på et varmebad til 37 °C i et 50-ml Falcon-rør. Ampuller med AT-celler ble midlertidig satt på is etter at de ble hentet fra nitrogentanken. Celleampullene ble tint i hånden før cellene ble resuspendert i omtrent 700 µl proliferasjonsmedium. Cellesuspensjon ble overført til et nytt 50-ml Falcon-rør med 10 ml proliferasjonsmedium.

For nedfrysning av celler ble det benyttet DMSO for å hindre krystallisering av vann og celleødeleggelse. DMSO er toksisk for celler og dermed var det nødvendig at man fortynner og fjerner det før man sår ut celler i dyrkningsflasker (70). Cellesuspensjon ble dermed sentrifugert ved 1300 rotasjoner per minutt (rpm) i 5 minutter i Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010. I sentrifugeringsprosessen ble det dannet cellepelletten og supernatanten som inneholder DMSO. Cellepelletten ble resuspendert i 10 ml proliferasjonsmedium etter at supernatanten ble sugd av (fjerning av DMSO). Cellesuspensjon ble overført til en 75 cm² NUNC flaske og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Mediet ble skiftet dagen etter og deretter hver andre eller tredje dag frem til 80-90 % konfluens.

2.3.3 Splitting av celler

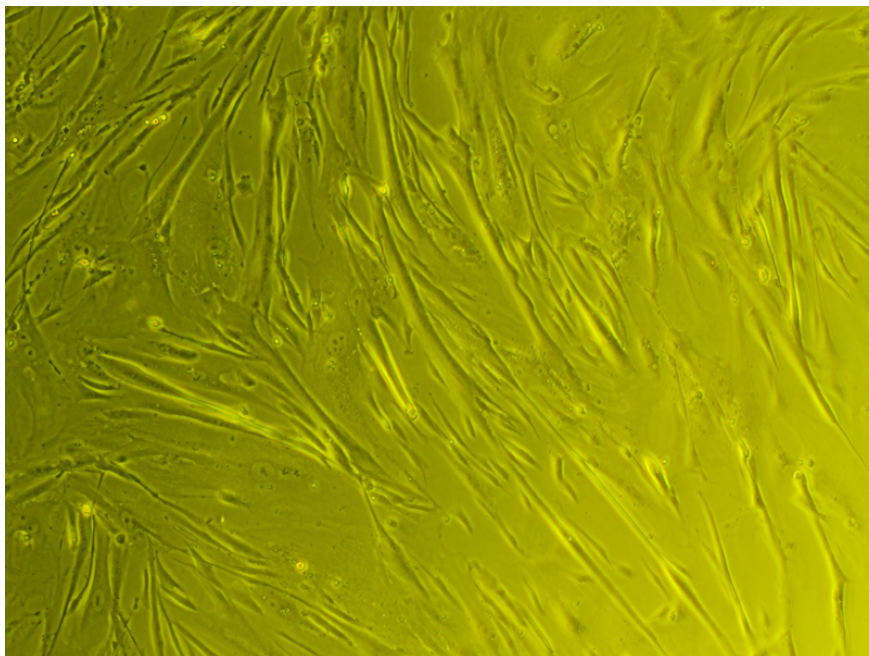
Etter at cellene har blitt 80-90 % konfluente, ble cellene splittet og overført til 24-brønners brett. Det gamle mediet i 75 cm² NUNC flasker ble sugd av og cellene ble vasket to ganger med 10 ml DPBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺. For å få cellene til å løsne fra dyrkningsflasker, ble det tilsatt 1 ml 0,25 % trypsin og cellene ble satt inn i inkubator og inkubert ved 37 °C i 2-3 minutter. Dyrkningsflaskene ble deretter dunket et par ganger for å sørge for at alle cellene hadde løsnet og en visuell inspeksjon ble utført. Trypsin ble inaktivert ved å tilsette 4 ml proliferasjonsmedium og flaskeinnholdet ble overført til et 50-ml Falcon-rør. Deretter ble cellesuspensjonen sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter. Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml proliferasjonsmedium etter at supernatanten ble sugd av og kastet.

Før cellene ble sådd ut til CellBind 24-brønners brett, ble det bestemt antall levende celler i cellesuspensjon. Cellene ble telt i en CountessTM automatisk celledetektor. Ifølge protokollen bør det være 20 000 celler og 0,5 ml totalvolum medium per brønn i 24-brønners brett (vedlegg

2.1). 20 µl cellesuspensjonen ble blandet med 20 µl trypanblått i et Eppendorf-rør. Det ble tatt ut 10 µl av denne blandingen og satt inn i celletelleren. Trypanblått ble benyttet for å kunne skille levende celler fra de døde. I motsetning til døde celler har levende celler en intakt cellemembran og deres cytoplasma forblir ufarget i reaksjon med trypanblått (71). Utfra celledtall ble det bestemt volum av cellesuspensjon og proliferasjonsmedium som måtte tas ut og blandet slik at det blir 20 000 celler/0,5 ml medium/brønn. Deretter ble det overført 0,5 ml av denne blandingen til hver brønn i 24-brønners brett. Brettene ble deretter satt i inkubator og inkubert ved 37 °C.

2.3.4 Proliferasjon og differensiering

Etter at cellene ble sådd ut i 24-brønners brett, ble proliferasjonsmedium byttet hver andre eller tredje dag frem til cellene ble 80-90 % konfluente. Proliferasjonsmediet ble byttet med differensieringsmedium ved 80-90 % konfluens (vedlegg 1.2). Cellene differensierte i en uke og differensieringsmediet ble byttet hver andre eller tredje dag. I denne fasen differensierte celler fra myoblaster til myotuber (lange muskelfibre med flere kjerner).



Figur 2.1: Humane skjelettmuskelceller. Humane skjelettmuskelceller sett med 10x forstørrelse.

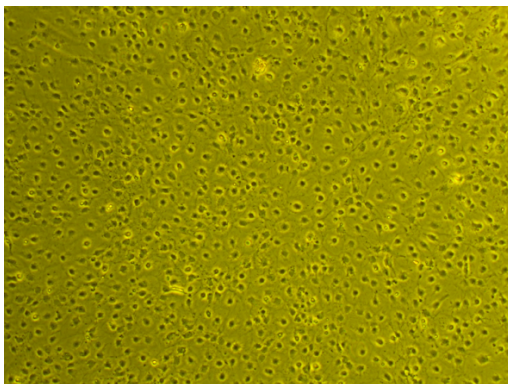
2.4 Dyrking av skjelettmuskelceller fra mus

I oppgaven ble det benyttet skjelettmuskelceller fra to typer mus, C57BL/6J (B6) og A/J. A/J-musene er fedmeresistente, mens B6-musene er fedmemottakelige (72). Satellittceller ble isolert fra muskelmasse fra bakbenet og benyttet for cellebankoppsettelse (73). Museceller (satellittceller) ble dyrket på nesten samme måte som humane skjelettmuskelceller som beskrevet i underkapittel 2.3. I motsetning til humane skjelettmuskelceller ble det benyttet vekstmedium for utsåing av museceller (vedlegg 3.1). Cellene ble sådd ut på 75 cm² NUNC celleflasker med kollagen I coating. NUNC celleflasker ble coated på forhånd med 0,01 % kollagen I løsning. 4 ml kollagen løsningen ble tilsatt celleflasker og flaskene ble oppbevart i kjøleskap over natt. Dagen etter ble kollagen løsningen fjernet, og celleflasker ble satt til tørking i avtrekkskap i noen timer. Etter tørkingen var flaskene klar til å bli brukt i forsøkene.

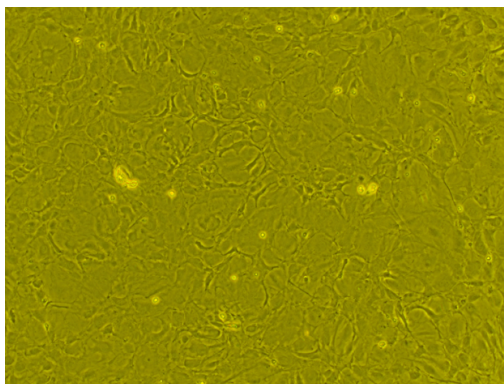
Vekstmediet ble skiftet hver andre eller tredje dag frem til cellene var omtrent 80% konfluente. Deretter ble cellene splittet og overført til 24-brønners brett. Ifølge protokollen bør det være 30 000 celler og 0,5 ml totalvolum medium per brønn i 24-brønners brett (vedlegg 2.2). Først ble det benyttet brettene som var coated med kollagen I løsning. Cellene i disse brettene løsnet relativt fort og dermed ble det ikke mulig å benytte dem i forsøkene. Disse brettene ble erstattet med CellBind 24-brønners brett som ble benyttet i videre forsøk med museceller.

Ved 80% konfluens ble vekstmediet byttet med differensieringsmedium for museceller (vedlegg 3.2). Cellene differensierte i 4 dager.

A



B



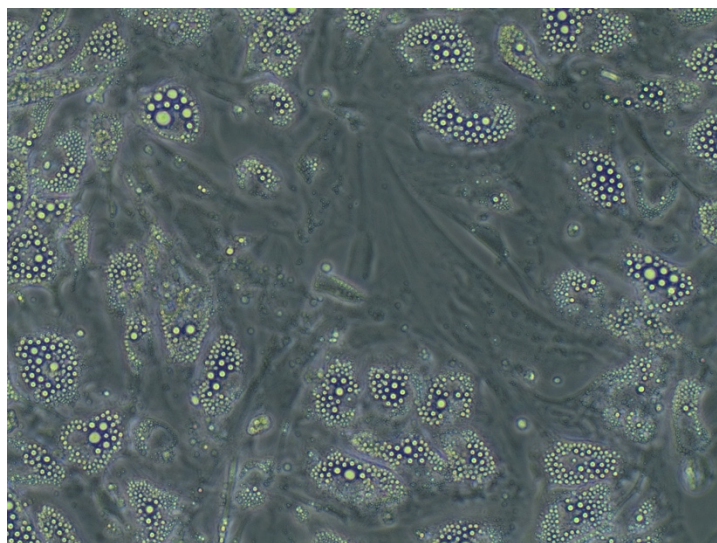
Figur 2.2: Skjelettmuskelceller fra mus. A. Skjelettmuskelceller fra A/J-mus sett med 4x forstørrelse. **B.** Skjelettmuskelceller fra B6-mus sett med 4x forstørrelse.

2.5 Dyrking av humane fettceller

I oppgaven ble det også benyttet humane fettceller (adipocytter) som ble isolert fra biopsi fra en person med Simpson-Golabi-Behmel syndrom (SGBS). Disse cellene ble navngitt etter dette syndromet som SGBS-celler (74). Fordelen med SGBS-celler er at de kan oppskaleres over flere passasjer (opptil 50) uten at de mister differensieringsevnen. Ferdigdifferensiert utviser disse celler den samme funksjon og oppførselen som modne adipocytter. SGBS-celler har også vist evne til å øke glukoseopptak flere ganger etter stimulering med insulin (74).

En ampulle med SGBS-celler ble hentet fra nitrogentanken og satt til tining. SGBS-celler ble resuspendert i 20 ml 0F-medium med 10% FCS (vedlegg 6.1) og sådd ut i en flaske. Mediet ble skiftet dagen etter og så hver tredje eller fjerde dag frem til splitting.

Da cellene var klare for splitting, ble det tilsatt trypsin for å få cellene til å løsne. Cellene ble inkubert ved 37 °C i 2-3 minutter. Deretter ble cellene telt og sådd ut i CellBind 24-brønners brett. Det ble sådd ut omtrent 30 000 celler i 1ml 0F-medium med 10% FCS per brønn. Mediet ble skiftet hver tredje eller fjerde dag frem til differensieringsfasen. I de første fire dagene i differensieringsfasen ble det benyttet Qick-diff medium (vedlegg 6.3). Det ble tilsatt 1 ml Qick-diff mediet per brønn. Etter de fire dagene ble det tilsatt 1 ml 3FC medium (vedlegg 6.2) i hver brønn. Mediet ble skiftet hver tredje eller fjerde dag. Cellene differensierte totalt i 14 dager.



Figur 2.3: Humane fettceller (SGBS-celler). SGBS-celler sett med 10x forstørrelse.

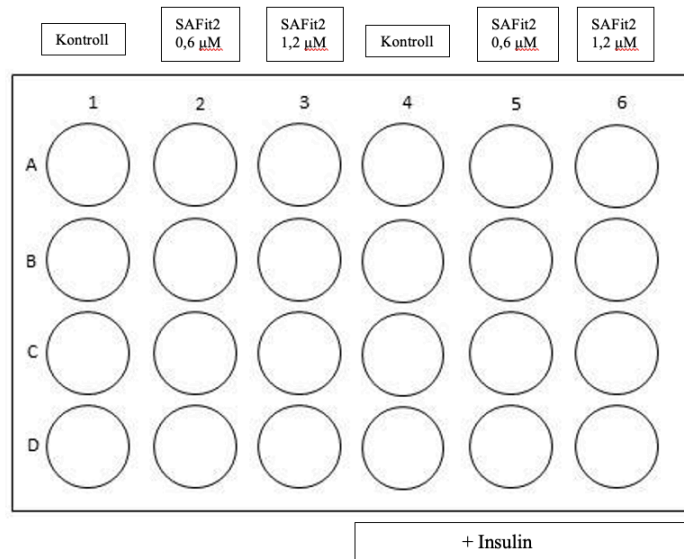
2.6 Deoksyglukoseopptak

Glukoseopptak er brukt i mange studier for å studere glukosemetabolisme i skjelettmuskelceller (75). I oppgaven ble det benyttet radioaktivmerket deoksyglukose (2-[1-¹⁴C]-Deoksy-D-glukose) for å undersøke effekt av SAFit2 på glukoseopptak, både enkeltvis og i kombinasjon med LXR-agonisten T0901317. 2-Deoksy-D-glukose er en glukoseanalog som hemmer glykolyseenzymet heksokinase ved å være en konkurrerende hemmer. I likhet med glukose blir 2-deoksyglukose fosforylert av heksokinase til fosfatderivat (2-deoksyglukose-fosfat), men blir ikke ytterligere metabolisert (76). 2-deoksyglukose-fosfat akkumuleres inn i celler og letter videre måling siden det ikke blir omdannet til biprodukter (75).

I oppgaven er det benyttet forskjellige protokoller for deoksyglukoseopptak. I de første forsøkene med skjelettmuskelceller fra menneske og i forsøkene med celler fra mus, som undersøkte effekt av SAFit2, ble det brukt serumfritt differensieringsmedium (DMEM) med 5,5 mM glukose under deoksyglukoseopptak. I forsøkene med skjelettmuskelceller fra menneske, som undersøkte effekt av SAFit2 i kombinasjon med LXR-agonisten T0901317, ble det først brukt serumfritt differensieringsmedium (DMEM) med 5,5 mM glukose, deretter 1,0 mM glukose under deoksyglukoseopptak. Høye glukosekonsentrasjoner kan påvirke deoksyglukoseopptaket siden glukose er bedre substrat for glykolyseenzymet heksokinase enn deoksyglukose (75). Derfor ble det benyttet to ulike glukosekonsentrasjoner, og ved bruk av lavere glukosekonsentrasjon (1,0 mM) ble cellene sultet i en time, før glukoseopptaket ble målt. Ved sulting ble cellene inkubert i serumfritt differensieringsmedium uten glukose. I forsøkene med adipocytter, som undersøkte effekt av SAFit2, ble det benyttet serumfritt differensieringsmedium (DMEM) med 1,0 mM glukose under deoksyglukoseopptak.

2.6.1 Forbehandling med SAFit2

Som nevnt i avsnitt 2.3.4 ble humane skjelettmuskelceller differensiert i en uke. Sjette dag i differensieringsfasen ble cellene forbehandlet med 2 ulike konsentrasjoner av SAFit2, 0,6 µM og 1,2 µM. Som negativ kontroll ble det brukt 0,1% løsning av DMSO. Brettene ble satt tilbake i inkubator og inkubert i 24 timer. Forsøksoppsettet er vist i figur 2.4.



Figur 2.4: Figur viser forsøksoppsettet for 24-brønners brett der skjelettmuskelceller ble forbehandlet med 0,6 μM og 1,2 μM SAFit2.

Etter 24 timers forbehandling med SAFit2 ble mediet sugd av, og det ble tilsatt 125 μl isotopmedium per brønn (vedlegg 7.1). Isotopmediet bestod av serumfritt differensieringsmedium (DMEM) og radioaktivmerket deoksyglukose. Halvpart av brettet ble i tillegg behandlet med insulin (se figur 2.4). Cellene ble videre inkubert i 1 time. I forsøkene ble det benyttet glukosekonsentrasjon på 5,5 mM og insulin på 10^{-7} M.

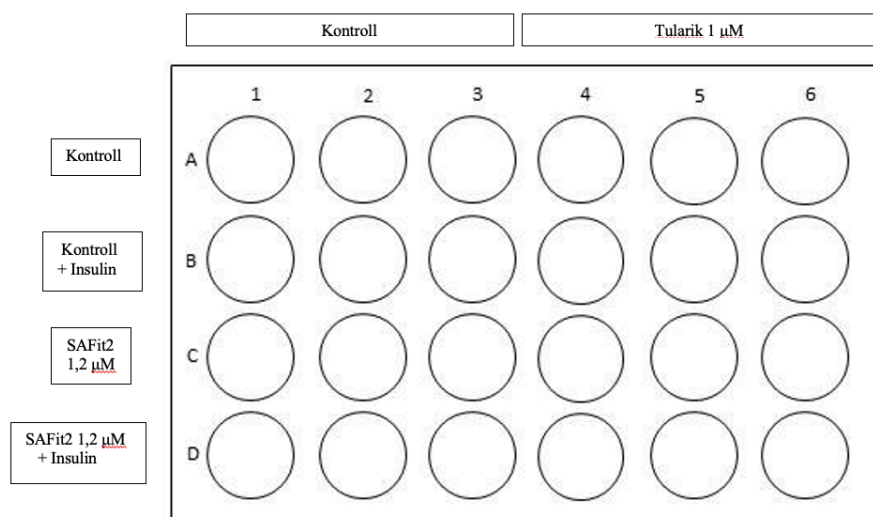
Etter 1 time med inkubering ble det utført en vaskeprosess med 1 ml DPBS, 2 ganger. Videre ble det tilsatt 125 μl av 0,1 M NaOH som førte til lysering av celler. Brettene ble satt inn i fryseren og oppbevart frem til analysering.

I forsøkene med museceller ble SAFit2 tilsatt på tredje dag, mens i forsøkene med fettceller ble det tilsatt på trettende dag i differensieringsfasen. Det ble brukt samme forsøksoppsettet som for humane skjelettmuskelceller. I forsøkene med museceller ble det benyttet glukosekonsentrasjon på 5,5 mM og insulin på 10^{-7} M. Fettcellene ble sultet i 1 time etter forbehandling med SAFit2, dvs. at cellene ble inkubert med et medium uten glukose i en time, før glukoseopptak ble målt. Dermed ble det tilsatt serumfritt differensieringsmedium uten glukose. Sulting av fettcellene ble utført også på grunn av høy insulinkonsentrasjon i differensieringsmediet. Etter en time med sulting ble det tilsatt isotopmediet med radioaktivmerket deoksyglukose (vedlegg 7.2) og insulin, og cellene ble satt tilbake i inkubator

i 1 time. I forsøkene med fettceller ble det benyttet glukosekonsentrasjon på 1,0 mM og insulin på 10^{-7} M.

2.6.2 Forbehandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2

Tredje dag i differensieringsfasen ble skjelettmuskelceller forbehandlet med T0901317 i konsentrasjon 1 μ M. LXR-agonisten T0901317 ble tilsatt til halvparten av brettet. Den andre halvparten av brettet ble forbehandlet med 0,1% DMSO som ble brukt som en kontroll. Brettene ble inkubert i 3 dager, frem til sjette dag i differensieringsfasen. Den sjette dagen ble det tilsatt både 1 μ M T0901317 og 1,2 μ M SAFit2. Både T0901317 og SAFit2 ble tilsatt i halvpart av brettet. 0,1 % DMSO ble igjen benyttet som en kontroll. Forsøksoppsettet er vist i figur 2.5. Brettene ble inkubert videre i 24 timer.



Figur 2.5: Figuren viser forsøksoppsettet for 24-brønners brett der skjelettmuskelceller ble forbehandlet med både 1 μ M T0901317 og 1,2 μ M SAFit2.

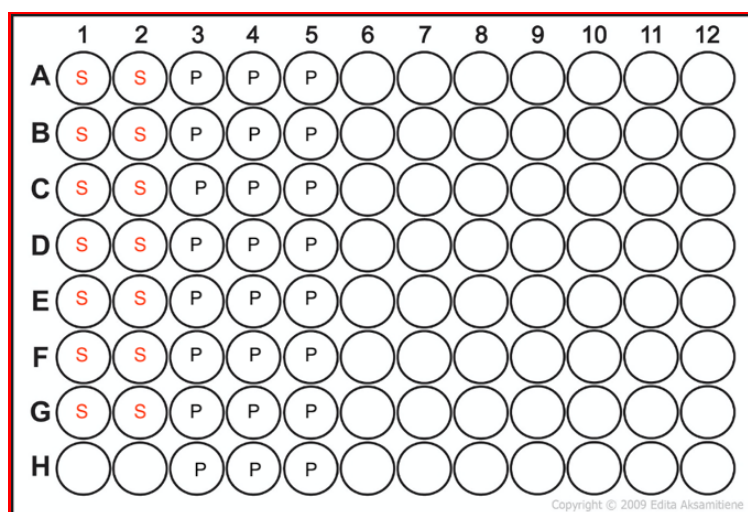
Etter 24 timers inkubering ble mediet sugd av, og det ble tilsatt 125 μ l isotopmedium per brønn. Halvpart av brettet ble i tillegg behandlet med 10^{-7} M insulin (se figur 2.5). I to forsøk ble cellene behandlet med DMEM-mediet med 5,5 mM glukose i 1 time. Men i 3 forsøk ble cellene først sultet i glukosefritt medium i 1 time og deretter behandlet med DMEM-mediet med 1,0 mM glukose i 1 time.

Isotopmediet ble sugd av etter en time og cellene ble vasket 2 ganger med 1 ml DPBS. Etter vasking med DPBS ble det tilsatt 125 µl 0,1 M NaOH og brettene ble satt inn i fryseren og oppbevart frem til analysing.

2.6.3 Bradfords metode for kvantitativ proteinanalyse

Bradfords metode for kvantitativ proteinanalyse er den vanligste metoden for måling av total proteinkonsentrasjon i en prøve (77). Målingene er basert på UV-absorpsjon, dvs. mengde UV-lys som ble absorbert ved bølgelengde 595 nm. I metoden benyttes det et fargestoff Coomassie Blue G250 som absorberer UV-lys ved 595 nm. Coomassie Blue G250 bindes til proteiner i prøven og farger dem blått (77).

Cellebrettene og BSA-standarder ble satt til tining i inkubator ved 37 °C etter at de ble hentet fra fryseren. Etter tining ble det tilsatt 50 µl av hver standardkonsentrasjon i to paralleller i NUNC 96-brønners brett. 25 µl av hver prøve fra hver cellebrettbrønn ble overført til NUNC 96-brønners brett (se figur 2.6). Celleprøvene ble fortynnet med 0,1 M NaOH til sluttvolum på 50 µl (fortynning 1:1). 200 µl av fortynnet Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ble tilsatt til brønner med standarder og celleprøver i NUNC 96-brønners brett. Deretter ble brettene inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Den konsentrerte Bio-Rad-løsningen ble fortynnet med destillert vann (fortynning 1:5). Etter 5 minutters inkuberingstid ble brettene analysert og proteinmengde målt på VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader.



Figur 2.6: Forsøksoppsettet for kvantitativ proteinanalyse ved Bradfords metode. S, standarder; P, prøver.

2.6.4 Måling av celleassosiert radioaktivitet (CA)

Cellebrettene ble satt til tining ved 37°C etter at de ble hentet fra fryseren. Etter tining ble 50 µl av hver prøve fra hver cellebrettbrønn overført til Pico Prias Vial tellerør. I et nytt tellerør ble det tilsatt 50 µl av isotopmediumrester fra deoksyglukoseforsøkene. Deretter ble det tilsatt 3 ml av tellevæske til alle tellerørene, men i et nytt tellerør ble det tilsatt kun tellevæske alene. Dette røret ble benyttet som en negativ kontroll. Tellerørene ble inkubert i en time ved romtemperatur. Etter en time med inkubering ble prøvene analysert i Packard Tri-Carb™ Liquid Scintillation Counter 1900 TR og det ble målt mengde av radioaktivmerket deoksyglukose som ble tatt opp i cellene.

2.7 Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR)

Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR) er en kvantitativ metode som benyttes for å bestemme uttrykk av et gen. Denne metoden er basert på måling av mengde mRNA som dannes fra et gen (78). I denne oppgaven ble qPCR benyttet til å undersøke eventuelle forandringer i gentranskripsjon av GLUT-4 og GLUT-1 etter behandling av skjelettmuskelcellene med SAFit2 og LXR-agonisten T0901317.

2.7.1 Utsåing, dyrking og høsting av celler til qPCR

For utsåing av skjelettmuskelceller ble det benyttet 25 cm² NUNC celleflasker. Det ble dyrket skjelettmuskelceller fra 3 ulike donorer. For hver donor ble det sådd ut 4 flasker med celler med totalvolum 5 ml per flaske. Dyrkingsprosessen er beskrevet i avsnitt 2.3.

I differensieringsfasen ble en av de flaskene behandlet med 1 µM T0901317 de siste 4 dagene. En annen flaske ble behandlet med 1,2 µM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen. Den tredje flasken ble behandlet både med 1 µM T0901317 og 1,2 µM SAFit2. Den ble først behandlet med T0901317 de siste 4 dagene og den siste dagen med SAFit2 i tillegg. Den fjerde flasken ble behandlet med 0,1 % DMSO og benyttet som en kontroll.

Etter behandling med T0901317 og SAFit2 ble cellene vasket 2 ganger med 2 ml DPBS. Deretter ble det tilsatt 500 µl RNeasy Plus Lysis Buffer (lyseringsbuffer) til hver celleflaske.

Etter skraping ble flaskeinnholdet overført til Eppendorfrør og videre oppbevart ved -80 °C frem til isolering av RNA.

2.7.2 Isolering av RNA

Eppendorfrørene med cellelysate ble satt til tining etter at de ble tatt ut fra fryseren. For isolering av RNA ble det benyttet RNeasy Plus Mini Kit fra QIAGEN. 500 µl av innholdet fra Eppendorfrørene ble overført til Prefilter Spin Cup. Prefilter Spin Cup ble deretter plassert i et 2 ml samlerør og sentrifugert ved maksimal hastighet i 5 minutter.

500 µl 70 % etanol ble tilsatt filtratet som ble eluert i 2 ml samlerør i forrige prosesseringstrinn, mens Prefilter Spin Cup ble kastet etter sentrifugering. 500 µl av denne blandingen ble overført til RNA Binding Spin Cup som ble plassert i et nytt 2 ml samlerør. RNA Binding Spin Cup ble deretter sentrifugert ved maksimal hastighet i 1 minutt. Resten av blandingen (omtrent 500 µl) ble overført til det samme RNA Binding Spin Cup og sentrifugert på nytt ved maksimal hastighet i 1 minutt. Samlerøret med filtratet ble kastet etter sentrifugering, mens RNA Binding Spin Cup ble beholdt for videre prosessering.

RNA Binding Spin Cup ble plassert i et nytt samlerør og vasket med 600 µl Low-Salt Wash buffer. RNA Binding Spin Cup ble sentrifugert ved maksimum hastighet i 1 minutt. Oppsamlet filtrat ble kastet etter eluering og RNA Binding Spin Cup ble sentrifugert på nytt ved maksimum hastighet i 2 minutter.

Etter sentrifugering ble det tilsatt DNase løsning til RNA Binding Spin Cup som ble inkubert ved 37°C i 15 minutter. DNase løsning ble laget ved å blande 50 µl DNAase Digestion buffer og 5 µl RNase-fritt DNase I.

Etter inkubering ble RNA Binding Spin Cup først vasket med 600 µl High-Salt Wash buffer og deretter med 600 µl og 300 µl Low-Salt Wash buffer henholdsvis. RNA Binding Spin Cup ble sentrifugert etter hver vasking ved maksimal hastighet i 1-2 minutter. Etter hver sentrifugering ble oppsamlet filtratet kastet. Etter den siste sentrifugeringsprosessen ble samlerøret kastet og RNA Binding Spin Cup ble plassert i et nytt 1,5 ml samlerør.

30 µl elueringsbuffer ble tilsatt direkte på membran av RNA Binding Spin Cup som videre ble inkubert ved romtemperatur i 2 minutter og deretter sentrifugert ved maksimal hastighet i 1 minutt. Eluert RNA ble frosset ved -80 °C og oppbevart for videre analysering.

2.7.3 Kvantifisering av RNA

NanoDrop™ Lite Spektrofotometer ble benyttet for å bestemme konsentrasjonen av RNA i hver prøve. Absorbansen ble målt ved 260 nm etter påføring av 1 µl av hver prøve. Før målingene ble elueringsbuffer brukt som en blankprøve. Blankprøven ble benyttet for å fjerne mulige bakgrunnssignaler som kan interferere med RNA-prøvene. Etter kvantifisering av RNA ble det bestemt mengde av hver prøve som skulle benyttes i cDNA-syntese.

2.7.4 cDNA-syntese

TaqMan Reverse Transkription Reagens-kit (Applied Biosystems™) ble benyttet i cDNA-syntetisering. Fra hver prøve med RNA ble et volum som tilsvarer 0,3 µg RNA overført til et mini-Eppendorfrør. Deretter ble det tilsatt nukleasefritt vann til et totalvolum på 13,2 µl. Til hvert mini-Eppendorfrør ble det tilsatt 6,8 µl reaksjonsmiksen som inneholder RNase inhibitor, RT-buffer, revers transkriptase (RT), deoksynukleotider og tilfeldige primere (vedlegg 4.1). Mini-Eppendorfrørene ble deretter plassert i Thermal Cycler 9000 for cDNA-syntetisering. Selve cDNA-syntetiseringsprosess foregikk i 3 faser. Prøvene ble først eksponert for primere ved 25 °C i 10 minutter. I denne fasen ble primere festet til sine komplementære sekvenser på RNA. I neste fase ble prøvene eksponert for revers transkriptase ved 37 °C i 80 minutter. I den siste fasen ble revers transkriptase inaktivert ved 85 °C i 5 minutter. Etter syntetisering ble prøvene med cDNA satt i fryseren ved -20 °C og oppbevart frem til qPCR.

2.7.5 qPCR

Prøvene med cDNA ble satt til tining etter at de ble hentet fra fryseren. Etter tining ble det tatt ut 2 µl av hver prøve og overført til et Eppendorfrør for å lage en cDNA-miks. cDNA-miksen ble brukt for å lage en standardrekke. Først ble det laget standard 1000 ved å fortenne cDNA-miksen 1:5 med nukleasefritt vann. Fra standard 1000 ble det laget standard 500, 250 og 125 ved bruk av fortenningsrekker med fortykning 1:2 (vedlegg 4.2). Disse standardene ble brukt

for å lage en standardkurve som senere ble benyttet for å estimere mengde cDNA som ble amplifisert.

Hver prøve med cDNA ble fortynnet med nukleasefritt vann 1:5 før cDNA-amplifisering (vedlegg 4.3). I tillegg ble det laget en SYBR® Green PCR-miks med spesifikke primere for GLUT-4-, GLUT-1- og RPLP0-genet (vedlegg 4.4). For å korrigere for varierende RNA-mengde i hver prøve ble det benyttet syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (RPLP0) som et referansegen. Tabell 2.4. viser oversikt over primere og deres sekvens benyttet i qPCR.

Tabell 2.4. Oversikt over primere og deres sekvens benyttet i qPCR.

Gener	Primersekvenser
RPLP0	Fwd: CCA TTC TAT CAT CAA CGG GTA CAA Rev: AGC AAG TGG GAA GGT GTA ATC C
GLUT-4	Fwd: ACC CTG GTC CTT GCT GTG TT Rev: ACC CCA ATG TTG TAC CCA AAC T
GLUT-1	Fwd: CAG CAG CCC TAA GGA TCT CTC A Rev: CCG GCT CGG CTG ACA TC

RPLP0, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; **GLUT-4**, glukosetransportprotein type 4; **GLUT-1**, glukosetransportprotein type 1; **Fwd**, «forward primer»; **Rev**, «reverse primer».

2,5 µl av hver standardkonsentrasjon, hver fortynnende cDNA-prøve og nukleasefritt vann ble tilsatt til hver brønn i en MicroAmp® Optial Reaction Plate. Standarder ble tilsatt i 3 paralleller, mens fortynnende cDNA-prøver og nukleasefritt vann i 2 paralleller. Nukleasefritt vann ble benyttet som en negativ kontroll. Til hver brønn i MicroAmp® Optial Reaction-platen ble det deretter tilsatt 22,5 µl av SYBR® Green PCR-miksen (totalvolum 25 µl). MicroAmp® Optial Reaction-platen ble plassert i en StepOnePlus™ Real-Time PCR Thermal Cycling Block (Applied Biosystem) for cDNA-amplifisering.

2.8 Westernblotting

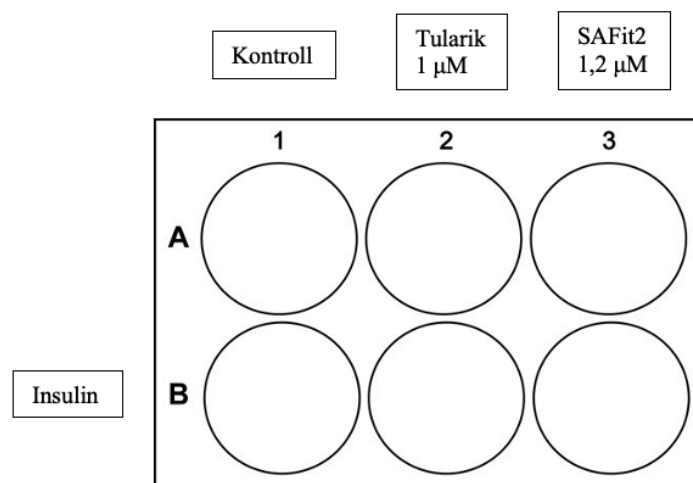
Westernblotting er en metode som ble benyttet for separasjon og identifikasjon av proteiner. Proteinseparasjon er basert på molekylstørrelse og skjer ved hjelp av gelelektroforese som er etterfulgt av proteinoverføring til en cellulosemembran (blotting). Immunologisk deteksjon brukes for proteinidentifikasjon ved hjelp av en fremkallingsvæske. Det ble benyttet to typer antistoff, et primærantistoff som spesifikk gjenkjenner målprotein og et sekundærantistoff som spesifikk bindes til det primære (79).

I denne oppgaven ble Westernblotting benyttet for identifikasjon av AKT2 og AS160, proteinene involvert i insulinsignalering i skjelettmuskelceller. Uttrykk av AKT2- og AS160-protein etter behandling med SAFit2 og LXR-agonisten T0901317 ble sammenlignet med uttrykk etter kontrollbehandling.

2.8.1 Utsåing, dyrking og høsting av celler

For utsåing av skjelettmuskelceller ble det benyttet 6-brønners brett. Det ble dyrket skjelettmuskelceller fra 3 ulike donorer. For hver donor ble det sådd ut ett brett med celler. Ifølge protokollen bør det være 100 000 celler og 2 ml totalvolum medium per brønn i 6-brønners brett (vedlegg 2.1). Dyrkingsprosessen er beskrevet i avsnitt 2.3.

I differensieringsfasen ble 2 brønner behandlet med 1 μM T0901317 de siste 4 dagene. 2 brønner ble behandlet med 1,2 μM SAFit2 på sjette dag i differensieringsfasen. De siste to brønnene ble behandlet med 0,1 % DMSO og benyttet som en kontroll. Den siste differensieringsdagen ble halv av brettet behandlet med insulin med konsentrasjon på 10^{-7} M i 15 minutter. Forsøksoppsettet er vist i figur 2.7.



Figur 2.7. Figur viser forsøksoppsettet for 6-brønners brett der skjelettmuskelceller ble behandlet med både 1 μM T0901317 og 1,2 μM SAFit2.

Etter 15 minutters inkubering med insulin ble cellene vasket 2 ganger med 2 ml DPBS. Deretter ble det tilsatt 100 μl harvesting buffer til hver brønn (vedlegg 5.1). Etter skraping ble innholdet fra hver brønn overført til Eppendorfrør og videre sonikert og kokt ved 100 $^{\circ}\text{C}$ i 5 minutter. NanoDropTM Lite spektrofotometer ble benyttet for å måle proteinkonsentrasjon av hver prøve. 10 % β -merkaptoetanol (20 μl) og 5 % bromfenylblått (10 μl) ble deretter tilsatt til hvert Eppendorfrør. Deretter ble det utført en ny runde med kokingsprosessen ved 100 $^{\circ}\text{C}$ i 5 minutter. Til slutt ble eppendorfrørene med prøvene oppbevart ved -20 $^{\circ}\text{C}$ for videre analysering.

2.8.2 Gelelektroforese

For utførelse av gelelektroforese ble det benyttet Mini-PROTEAN[®] TGXTM gradientgeler med 4-20% akrylamid. Det varierende prosentinnholdet av akrylamid regulerer gelstetthet (80). Akrylamidkonsentrasjon øker nedover gelen og gjør den tettere og tettere. Dette fører til saktere vandring av store molekyler gjennom gelen. Derimot vandrer små molekyler lengre nedover gelen på grunn av mindre størrelse (80).

Etter fjerning av grønn teip på undersiden og den grønne kammen på toppen av geler, ble hver gel satt i en Mini Protean[®] elektroforeseboks som ble fylt med elektroforesebuffer (vedlegg 5.2). I den første brønnen i gelen ble det tilsatt 5 μl av BioRad Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards (består av ulike proteiner med kjent molekylstørrelse). I de andre brønnene i

gelen ble det tilsatt et volum som tilsvarer 50 µg protein fra hver prøve basert på proteinmålingene tatt på NanoDrop™ Lite spektrofotometer. Deretter ble elektroforese startet, først på 80 V i 10 minutter og deretter på 200 V i 30-40 minutter.

2.8.3 Blotting

Etter elektroforese ble gelen med separerte proteinene satt på en nitrocellulosemembran mellom to stabler med filterpapir i en kassett, og deretter satt til blotting i Bio-Rad PowerPac™ HC ved 2,5 A og 25 V i 7 minutter. Totalt ble det benyttet 3 membraner og 6 stabler med filterpapir. De ble først fuktet i blottebuffer (vedlegg 5.3).

2.8.4 Blokking med primær- og sekundærantistoff

Etter blotting ble hver membran med overførte proteiner delt i to. Grunnen til dette er at proteinene AKT2 og AS160 har ulik molekylstørrelse og dermed ble godt separert. Etter separasjon lå AS160-proteinet i den øvre delen av membran, mens AKT2-proteinet lå i den nedre delen. Til slutt ble det 6 membrandel, to membrandel per donor (den ene for AKT2 og den andre for AS160).

Hver membrandel ble overført til en plastkar, og det ble tilsatt 10 ml 5 % tørrmelkløsning til hvert plastkar med membran. Plastkarene ble satt på The Belly Dancer® og inkubert i 1 time ved romtemperatur. I denne prosessen ble det hindret en uspesifikk binding av antistoffene (79). For å lage 5 % tørrmelkløsning ble det tørrmelkpulver løst opp i 1xTTBS (vedlegg 5.4).

Etter en time med inkubering på The Belly Dancer® ble hver membrandel overført til et 50 ml-rør. I hvert 50 ml-rør ble det tilsatt 5 ml løsning med primærantistoff. I rørene med øvre del av membran ble det tilsatt antistoff mot AS160 mens i rørene med nedre del av membran ble det tilsatt antistoff mot AKT2. Både antistoff mot AS160 og AKT2 ble fortynnet 1:1000 med 5% tørrmelkløsning (vedlegg 5.5). Rørene med membrandel ble deretter satt på Dynabeds® MX 12-tube Mixing Wheel og oppbevart i kjøleskap over natt.

Dagen etter ble membrandelene overført til plastkarene og vasket 5 ganger med 10 ml 1xTTBS i 7 minutter på The Belly Dancer® ved romtemperatur. Etter vasking ble det tilsatt 5 ml løsning med sekundærantistoff i plastkarene. Det ble benyttet anti-kanin antistoff mot det primære

antistoffet. Det sekundære antistoffet ble fortynnet 1:3000 med 2,5 % tørrmelkløsning (vedlegg 5.5). Membrandelene ble videre inkubert på The Belly Dancer[®] i en time.

2.8.5 Fremkalling

Etter inkubering med sekundærantistoff ble membrandelene igjen vasket 5 ganger med 10 ml 1xTTBS i 7 minutter på The Belly Dancer[®] ved romtemperatur. Deretter ble det tilsatt 6 ml fremkallingsvæske til plastkarene og membrandelene ble inkubert i 5 minutter på The Belly Dancer[®] ved romtemperatur. Fremkallingsvæsken ble laget av to reagenser fra BioRad[™] Clarity[™] Western ECL Substrate, SuperSignal[®] West Dura Stable Peroxid Buffer og SuperSignal[®] West Dura Luminol/Enhancer Solution. Blandingsforholdet for disse to reagensene var 1:1. Etter inkubering med fremkallingsvæsken ble membrandelene lagt mellom to transparente plastfolier og satt i ChemiDoc Imaging System for bånddeteksjon av overførte proteiner.

2.8.6 Stripping og rebløkking av membran

Etter fremkalling ble membrandelene vasket 4 ganger med 10 ml 1xTTBS i 10 minutter på The Belly Dancer[®] ved romtemperatur. Deretter ble det tilsatt 10 ml Thermo Scientific Restore[™] Western Blot Stripping buffer (strippevæske) og membrandelene ble inkubert i 15 minutter. Etter inkubering med strippevæske ble det utført 5 nye runder av vaskingsprosess med 1xTTBS i 10 minutter. Deretter ble membrandelene først blokket med 5 ml 5 % tørrmelkløsning i en time, og så inkubert med 5 ml løsning med primærantistoff på Dynabeds[®] MX 12-tube Mixing Wheel over natt.

Dagen etter ble membrandelene vasket med 1xTTBS, inkubert med sekundærantistoff, vasket på nytt med 1xTTBS og til slutt fremkalt ved hjelp av ChemiDoc Imaging System.

2.9 Statistikk

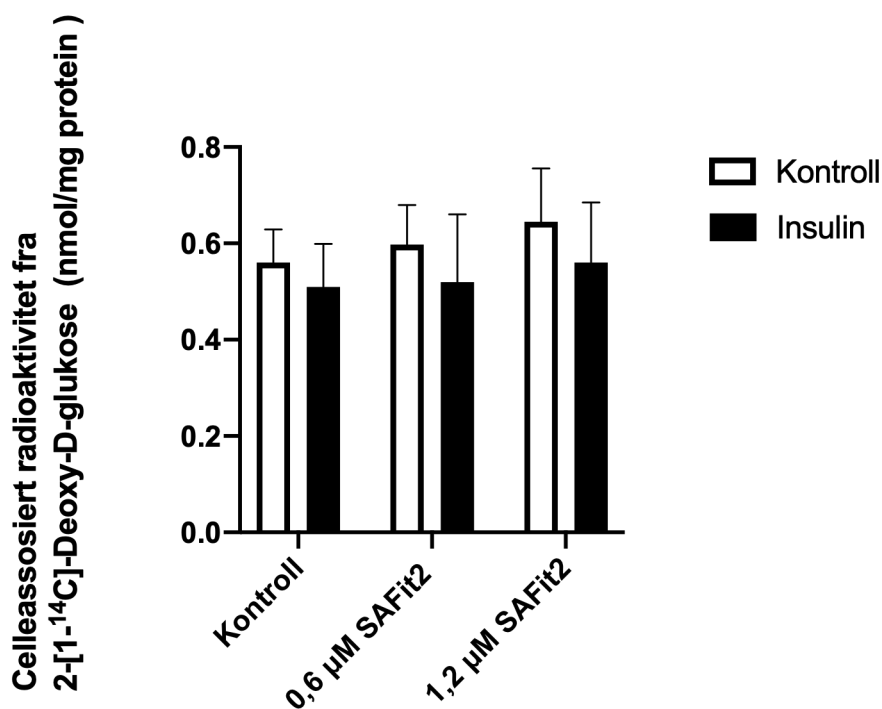
Dataene i denne oppgaven er presentert som gjennomsnitt \pm SEM (standard error of the mean). De fleste forsøkene ble utført 4 ganger. Forsøkene der AT-cellene ble forbehandlet med SAFit2 og LXR-agonisten T0901317 ble utført 2-3 ganger. Det ble gjort 2-4 paralleller for hver behandling i hvert forsøk. For gjennomføring av de statistiske analysene ble det benyttet programmet GraphPad Prism 9. Dataene fra forsøkene ble analysert ved en parett t -test. Det ble brukt signifikansnivået på 5 % ($\alpha = 0,05$).

3 Resultater

3.1 Effekter av forbehandling med SAFit2 på deoksyglukoseopptak

3.1.1 Behandlingseffekter i humane skjelettmuskelceller

For å studere effekter av SaFit2 på glukoseopptak ble humane skjelettmuskelceller forbehandlet i 24 timer med 0,6 μM og 1,2 μM SAFit2, før opptak av deoksyglukose ble målt. Det ble undersøkt hvorvidt SAFit2 påvirker både basalt og insulinstimulert deoksyglukoseopptak, og eventuelle forskjeller i opptak mellom ubehandlede og behandlede AT-celler. Undersøkelsen er basert på en studie hvor det ble vist at FKBP51-antagonisme med SAFit2 økte deoksyglukoseopptaket i skjelettmuskelceller fra mus uavhengig av insulin (50). Deoksyglukoseopptaket er vist i figur 3.1. Forsøksprotokollen er beskrevet i avsnitt 2.6.1.

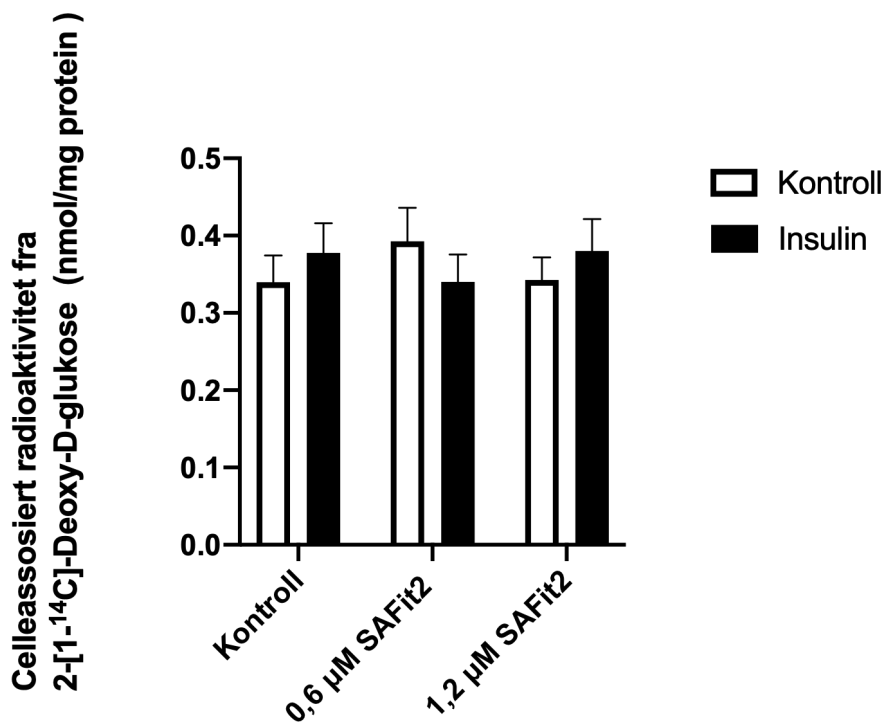


Figur 3.1: Effekter av forbehandling med SAFit2 på deoksyglukoseopptak i humane skjelettmuskelceller. Figur viser opptak av deoksyglukose i skjelettmuskelceller forbehandlet med 0,6 μM og 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen, i nærvær og fravær av 10^{-7} M insulin. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Glukosekonsentrasjon benyttet i forsøkene er 5,5 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra fire uavhengige forsøk (n=4).

Figur 3.1 viser ingen signifikant forskjell i opptak av deoksyglukose mellom ubehandlede humane skjelettmuskelceller og samme celler forbehandlet med SAFit2, verken i nærvær eller fravær av insulin.

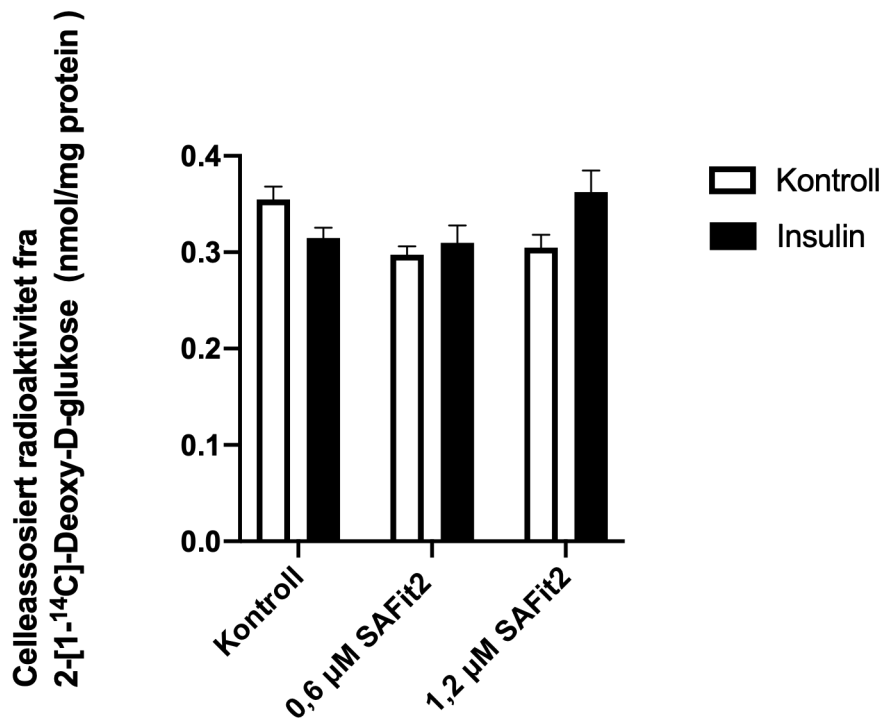
3.1.2 Behandlingseffekter i skjelettmuskelceller fra mus

Siden det ikke ble påvist behandlingseffekter av SAFit2 i humane skjelettmuskelceller, ble effekter av SAFit2 på deoksyglukoseopptak undersøkt i skjelettmuskelceller fra to ulike musestammer. Effekter av SAFit2 i musceller ble undersøkt i fravær og nærvær av insulin, og sammenlignet med ubehandlede musceller. Det var ønskelig å undersøke om vi kunne reproducere funnet fra studien til Balsevich et al. hvor det ble vist at FKBP51-antagonisme med SAFit2 økte deoksyglukoseopptaket i musceller uavhengig av insulin (50). Celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt etter 24 timers forbehandling av B6- og A/J-celler med 0,6 μM og 1,2 μM SAFit2. Figur 3.2 og 3.3 viser henholdsvis deoksyglukoseopptaket i A/J- og B6-musceller. Forsøksprotokollen er beskrevet i avsnitt 2.6.1.



Figur 3.2: Effekter av forbehandling med SAFit2 på deoksyglukoseopptak i A/J-celler fra mus. Figuren viser opptak av deoksyglukose i A/J-musceller forbehandlet med 0,6 μM og 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen, i nærvær og fravær av 10^{-7} M insulin. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Glukosekonsentrasjon benyttet i forsøkene er 5,5 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra fire uavhengige forsøk (n=4).

Figur 3.2 viser ingen signifikant forskjell i opptak av deoksyglukose mellom ubehandlede og forbehandlede A/J-celler fra mus, verken i nærvær eller fravær av insulin.



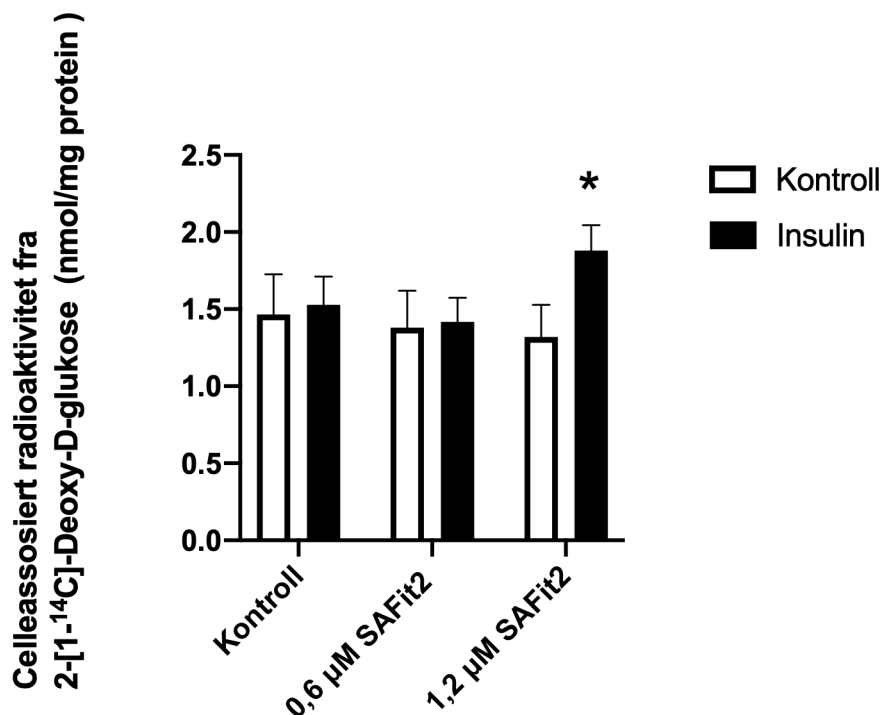
Figur 3.3: Effekter av forbehandling med SAFit2 på deoksyglukoseopptak i B6-celler fra mus. Figuren viser opptak av deoksyglukose i B6-museceller forbehandlet med 0,6 µM og 1,2 µM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen, i nærvær og fravær av 10^{-7} M insulin. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Glukosekonsentrasjon benyttet i forsøkene er 5,5 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra fire uavhengige forsøk (n=4).

Figur 3.3 viser at det heller ikke var noen forskjell i opptak av deoksyglukose mellom ubehandlede og forbehandlede B6-celler fra mus, verken i nærvær eller fravær av insulin.

3.1.3 Behandlingseffekter i SGBS-celler

Da ble det ikke vist behandlingseffekter av SAFit2 i skjelettmuskelceller fra menneske eller mus, ble effekter av SAFit2 undersøkt i humane adipocytter, SGBS-celler. Det er vist at glukoseopptaket i SGBS-celler er insulinstimulert, og at det er et høyt uttrykk av GLUT-4 i ferdigdifferensierte SGBS-celler (74). På grunn av dette ble effekter av SAFit2 også undersøkt i SGBS-celler, både i fravær og nærvær av 10^{-7} M insulin, og sammenlignet med ubehandlede SGBS-celler. Celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt etter 24 timers forbehandling av

SGBS-celler med 0,6 μM og 1,2 μM SAFit2. Figur 3.4 viser deoksyglukoseopptaket i SGBS-celler. Forsøksprotokollen er beskrevet i avsnitt 2.6.1.

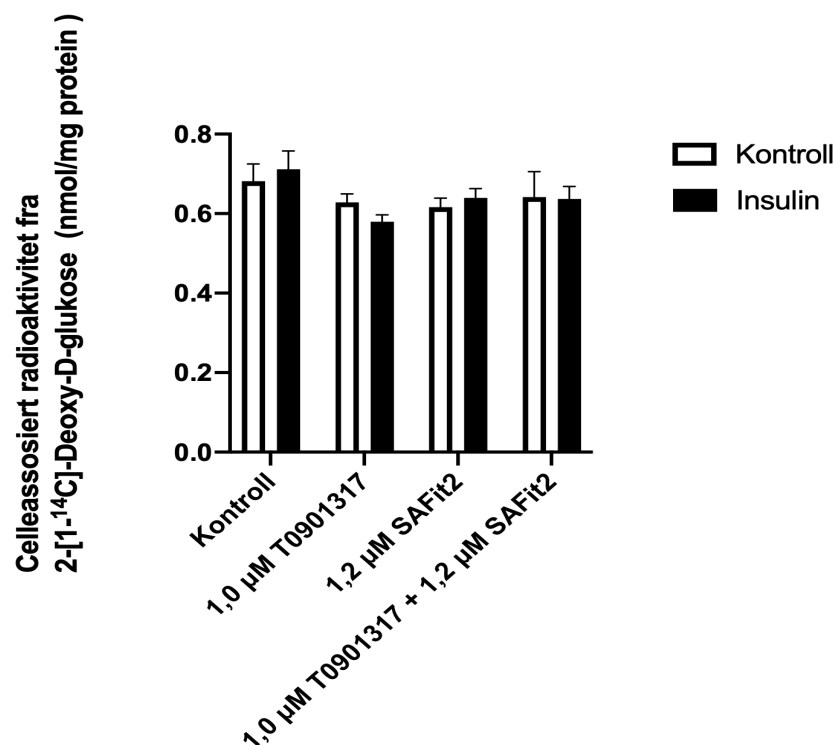


Figur 3.4: Effekter av forbehandling med SAFit2 på deoksyglukoseopptak i SGBS-celler. Figuren viser opptak av deoksyglukose i SGBS-celler forbehandlet med 0,6 μM og 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen, i nærvær og fravær av insulin 10^{-7} M. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Glukosekonsentrasjon benyttet i forsøkene er 1,0 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra fire uavhengige forsøk (n=4). * $p < 0,05$ sammenlignet med 1,2 μM SAFit2 uten insulin.

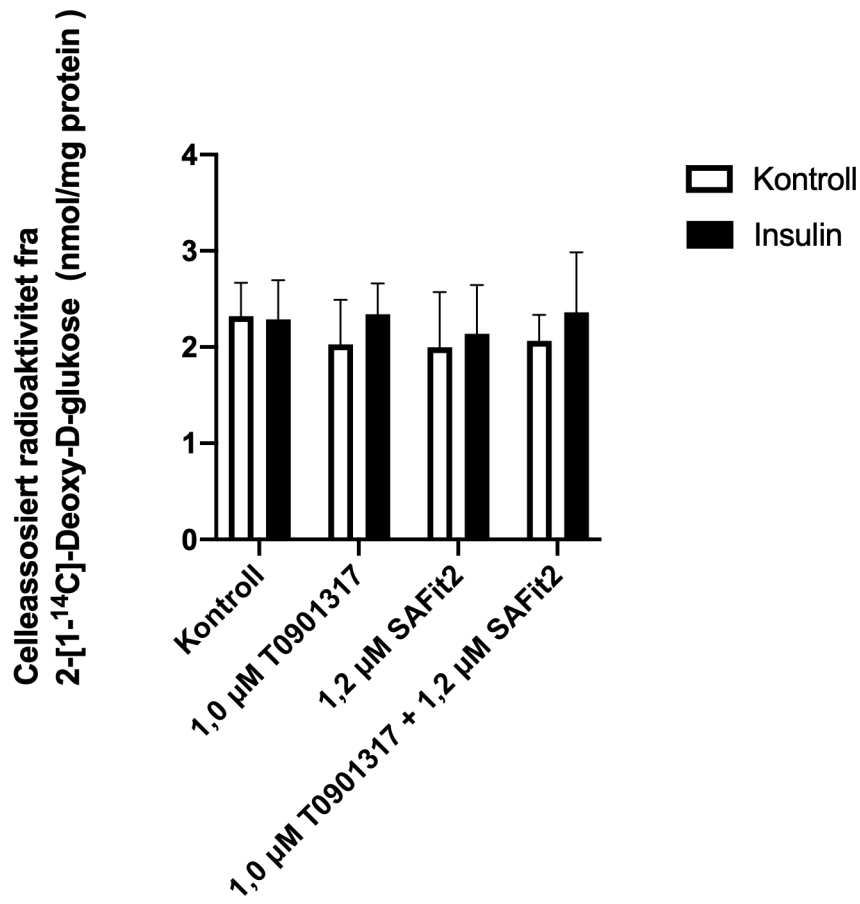
Figur 3.4 viser ingen behandlingseffekt av 0,6 μM SAFit2 på deoksyglukoseopptak i SGBS-celler, verken i nærvær eller fravær av insulin. Det er heller ikke noen effekt av 1,2 μM SAFit2 på basalt deoksyglukoseopptak i SGBS-celler, men det ble vist en signifikant økning av insulinstimulert deoksyglukoseopptak i nærvær av 1,2 μM SAFit2 i SGBS-cellene.

3.2 Effekter av forbehandling med både LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 på deoksyglukoseopptak

Det er vist i en studie at behandlingen med LXR-agonisten T0901317 økte uttrykk av GLUT-4 i humane skjelettmuskelceller (61). Derfor ble effekter av SAFit2 undersøkt i nærvær av LXR-agonisten T0901317. Celleassosiert radioaktivitet ble målt etter 4 dagers forbehandling av AT-celler med 1,0 μM T0901317 og i tillegg forbehandling med 1,2 μM SAFit2 i de siste 24 timene. Det ble undersøkt om SAFit2 og T0901317 (enkeltvis eller i kombinasjon) påvirket deoksyglukoseopptaket i AT-celler både i nærvær og fravær av 10^{-7} M insulin. Figur 3.5 og 3.6 viser deoksyglukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller med to ulike glukosekonsentrasjoner i isotopmediet, 5,5 mM (Figur 3.5) og 1,0 mM (Figur 3.6). Forsøksprotokollen er beskrevet i avsnitt 2.6.2.



Figur 3.5: Effekter av forbehandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 på deoksyglukoseopptak i humane skjelettmuskelceller. Figuren viser basalt og insulinstimulert opptak av deoksyglukose i skjelettmuskelceller forbehandlet med 1,0 μM T0901317 de siste fire dagene i differensieringsfasen og i tillegg med 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen, i nærvær og fravær av insulin 10^{-7} M. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Glukosekonsentrasjon benyttet i forsøkene er 5,5 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 6 brønner totalt, fra to uavhengige forsøk (n=2).

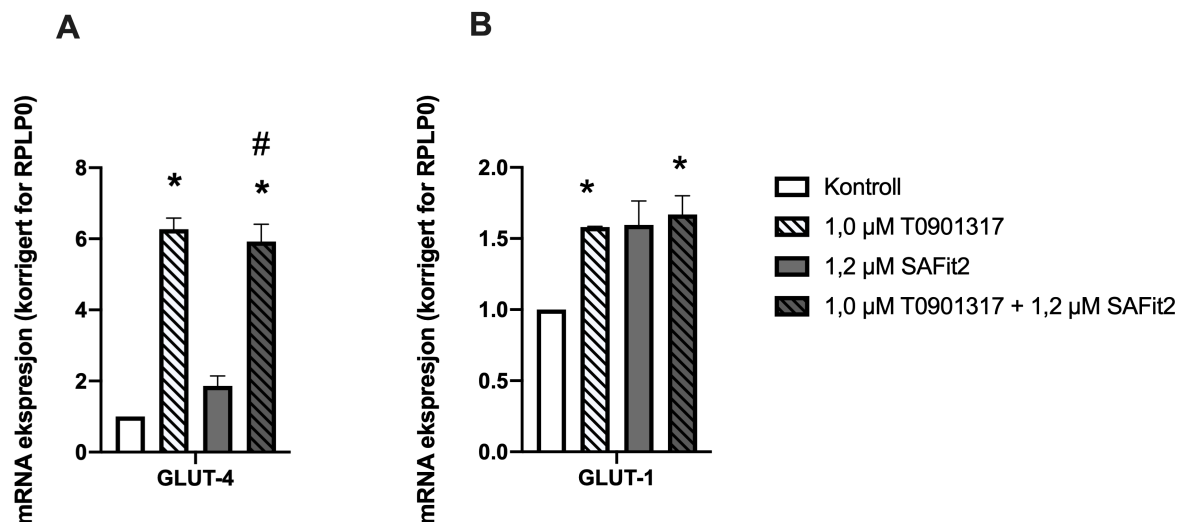


Figur 3.6: Effekter av forbehandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 på deoksyglukoseopptak i i humane skjelettmuskelceller. Figuren viser basalt og insulinstimulert opptak av deoksyglukose i skjelettmuskelceller behandlet med 1,0 µM T0901317 de siste fire dagene i differensieringsfasen og i tillegg med 1,2 µM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen, i nærvær og fravær av insulin 10^{-7} M. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Glukosekonsentrasjon benyttet i forsøkene er 1,0 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra tre uavhengige forsøk (n=3).

Figur 3.5 og 3.6 viser ingen behandlingseffekt verken av SAFit2 eller LXR-agonisten T0901317 på deoksyglukoseopptak i AT-celler, verken i nærvær eller fravær av insulin. Det er heller ikke vist noen effekt av kombinasjonsbehandling med SAFit2 og LXR-agonisten T0901317, verken på basalt eller insulinstimulert deoksyglukoseopptak.

3.3 Genekspresjon av GLUT-4 og GLUT-1 i skjelettmuskelceller

I studien til Balsevich et al. ble det påvist at FKBP51-antagonisme med SAFit2 økte GLUT-4-mengden i plasmamembranen i myotuber fra mus (50). Som nevnt i avsnitt 3.2 økte behandlingen med LXR-agonisten T0901317 uttrykk av GLUT-4 i skjelettmuskelceller (61). Basert på disse to studiene ble det undersøkt uttrykk av GLUT-4 og GLUT-1 i skjelettmuskelceller etter behandling med SAFit2 og LXR-agonisten T0901317 ved hjelp av qPCR. Forsøksprotokollen er beskrevet i avsnitt 2.7.1. Figur 3.7 viser uttrykk av GLUT-4 og GLUT-1 i AT-celler etter behandling med 1,0 μM T0901317 og 1,2 μM SAFit2.

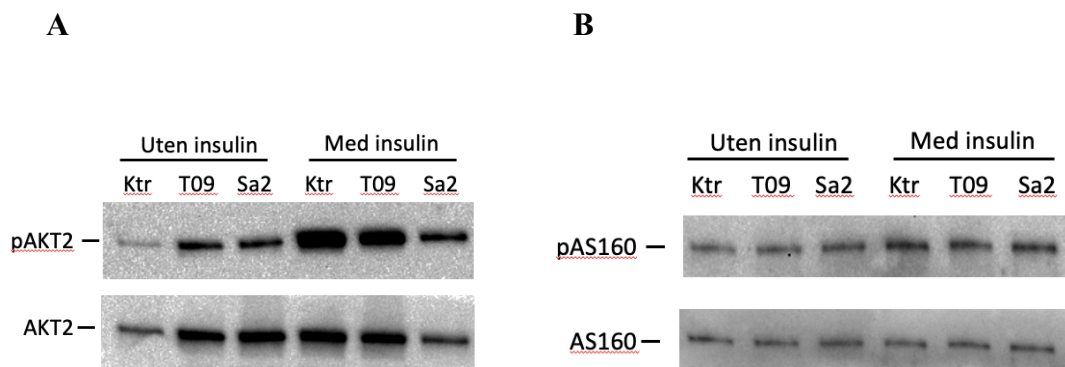


Figur 3.7: mRNA ekspresjon av GLUT-4 og GLUT-1 etter behandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 i humane skjelettmuskelceller. A. Figuren viser mRNA-uttrykk av GLUT-4 i skjelettmuskelceller behandlet med 1,0 μM T0901317 de siste fire dagene i differensieringsfasen og i tillegg med 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. B. Figuren viser mRNA-uttrykk av GLUT-1 i skjelettmuskelceller behandlet med 1,0 μM T0901317 de siste fire dagene i differensieringsfasen og i tillegg med 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra tre uavhengige forsøk, normalisert i forhold til kontroll (n=3). * $p < 0,05$ sammenlignet med kontroll, # $p < 0,05$ sammenlignet med 1,2 μM SAFit2.

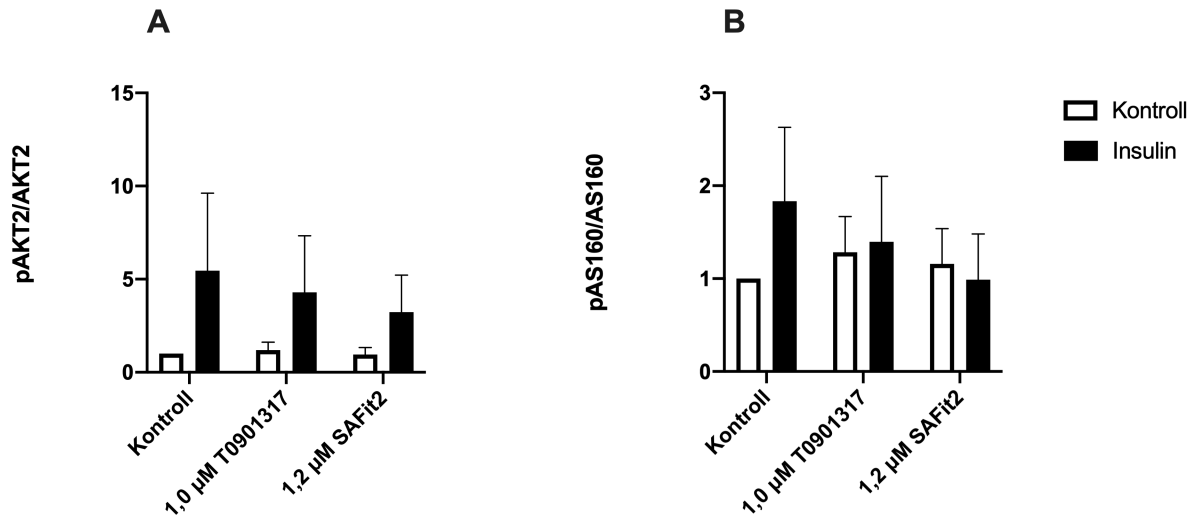
Figur 3.7 viser økt mRNA-uttrykk av både GLUT-4 og GLUT-1 i AT-celler etter behandling med LXR-agonisten T0901317, både i nærvær og fravær av SAFit2. Det var tendens til økning av både GLUT-4 og GLUT-1 av SAFit2 alene, men ingen signifikante effekter.

3.4 Fosforylering av AS160 og AKT2 i skjelettmuskelceller

I studien til Balsevich et al. ble det påvist at FKBP51-antagonisme med SAFit2 økte fosforylering av AKT2 og AS160 i myotuber fra mus (50). Basert på dette funnet ble det undersøkt fosforylering av AKT2 og AS160 i skjelettmuskelceller etter behandling med SAFit2 og LXR-agonisten T0901317. Forsøksprotokollen er beskrevet i avsnitt 2.8.1. Uttrykk og kvantifisering av fosforylert AKT2 og AS160 ble evaluert etter 3 uavhengige forsøk ved hjelp av Westernblotting. Figur 3.8 viser westernblott med båndene for fosforylert AKT2 (pAKT2) og total AKT2 (AKT2) (figur A), og fosforylert AS160 (pAS160) og total AS160 (AS160) (figur B). Kvantifisert relativt uttrykk av fosforylert AKT2 (figur A) og AS160 (figur B) i AT-celler etter behandling med 1,0 μM T0901317 og 1,2 μM SAFit2 er vist i figur 3.9. Figur 3.8 viser ett representativt forsøk, figur 3.9 viser kvantifiserte blott fra tre forsøk.



Figur 3.8: Westernblott for AS160 og AKT2 etter behandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 i humane skjelettmuskelceller. 1,0 μM T0901317 ble tilsatt de siste fire dagene i differensieringsfasen og 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Insulin 10^{-7} M ble tilsatt 15 minutter før cellene ble høstet. Figuren viser ett representativt av tre forsøk. **A.** Fosforylert AKT2 (pAKT2) og total AKT2 (AKT2). **B.** Fosforylert AS160 (pAS160) og total AS160 (AS160). Ktr, kontroll. T09, T0901317. Sa2, SAFit2.



Figur 3.9: Fosforylering av AKT2 og AS160 etter behandling med LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 i humane skjelettmuskelceller. Cellene ble behandlet med 1,0 μM T0901317 de siste fire dagene i differensieringsfasen og 1,2 μM SAFit2 den siste dagen i differensieringsfasen. 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll. Insulin 10^{-7} M ble tilsatt 15 minutter før cellene ble høstet. **A.** Fosforylert AKT2 relatert til total AKT. **B.** Fosforylert AS160 relatert til total-AS160. Resultatene viser kvantifiserte blott fra tre uavhengige forsøk, presentert som gjennomsnitt ± SEM normalisert til ubehandlet kontroll (n=3).

Figur 3.9 viser ingen signifikant effekt verken av SAFit2 eller LXR-agonisten T0901317 på fosforylering av AKT2 og AS160, verken i nærvær eller fravær av insulin.

4 Diskusjon

4.1 Metodologiske betraktninger

4.1.1 Cellemodellene

I denne oppgaven ble det benyttet tre ulike cellemodeller, humane skjelettmuskelceller, skjelettmuskelceller fra mus og humane adipocytter.

Humane skjelettmuskelceller (satellittceller), som nevnt i avsnitt 2.2, ble isolert fra biopsier fra *musculus vastus lateralis* (67, 69). Satellittceller kan aktiveres til myoblaster og differensieres til myotuber *in vitro* (69, 81). Etter biopsiisolering kan disse cellene oppbevares i nitrogentanken uten at de mister sitt aktiverings- og differensieringsevne (81). Evnen til å bevare de viktigste genene og metabolske egenskapene, og mulighet for nøyaktig kontroll av det ekstracellulære miljøet utgjør at de isolerte satellittcellene etter differensiering til myotuber blir en bra modell for studering av skjelettmuskulatur (69, 82). Myotubene er også en god modell for å studere glukose- og fettmetabolisme i skjelettmuskulatur på grunn av deres morfologiske, biokjemiske og metabolske likheter med skjelettmuskelceller *in vivo* (69, 83).

In vivo kommuniserer muskelceller med andre celler ved hjelp av bioaktive stoffer eller ved direkte kontakt. Ved dyrking av muskelceller *in vitro* mangler det ekstracellulære miljøet og dermed mangler kommunikasjonen med andre celler (69). Insulinstimulert glukoseopptaket i dyrkede myotuber er relativt lavt i forhold til skjelettmuskelceller *in vivo* på grunn av lavt uttrykk av GLUT-4-transportøren. Uttrykket av GLUT-1 er mye høyere enn uttrykk av GLUT-4 i myotuber *in vitro* sammenlignet med skjelettmuskelceller *in vivo* (69, 84, 85). En annen begrensning med muskelceller *in vitro* er at deres prolifererings- og differensieringsevne reduseres ved økende passasjeantall. Metabolske prosesser i muskelceller (som f.eks. glukoseopptak, glykogensyntese, glukoseoksidasjon og fettsyre beta-oksidasjon) reduseres også ved økende passasjeantall (86). I denne oppgaven ble det benyttet celler med lavt passasjeantall (p3 og p4) for å unngå påvirkning av cellulære metabolske prosesser, samt påvirkning av cellenes prolifererings- og differensieringsevne.

På grunn av deres likheter i markører som uttrykkes er skjelettmuskelceller fra mus en bra modell for å studere human skjelettmuskulatur, men om de har lik fenotype og funksjon er fremdeles ikke kjent (87). I denne studien ble det benyttet skjelettmuskelceller fra to ulike musestammer, B6- og A/J-mus. Det kan være forskjell på skjelettmuskelceller fra ulike musestammer. En rapport antar at det finnes transkripsjonsvariasjoner mellom ulike cellemodellene i kultur (88). Det er vist et høyt uttrykk av GLUT-4 i en mye benyttet cellelinje fra skjelettmuskel fra mus, C2C12-celler (89). Nivået av GLUT-4 i skjelettmuskelcellene fra mus benyttet i denne oppgaven er ikke kjent.

Humane fettceller (adipocytter), som nevnt i avsnitt 2.5, ble opprinnelig isolert fra biopsi fra en person med Simpson-Golabi-Behmel syndrom (SGBS) (74). Disse cellene (SGBS-celler) kan oppskaleres over flere passasjer (opptil 50) uten at de mister differensieringsevnen. Ferdigdifferensiert utviser disse cellene den samme funksjon og oppførselen som modne adipocytter (74). SGBS-cellene er en god modell for å studere glukose- og fettmetabolisme i humane adipocytter *in vivo* (74). De har også vist evne til å øke glukoseopptaket flere ganger etter stimulering med insulin (74, 90). SGBS-celler, generelt som alle de andre celler i kultur, er en god modell for å studere effekt av enkelthormoner og enkeltfaktorer, men ulempen er mangelen på kommunikasjon med andre celler siden deres funksjon *in vivo* avhenger av deres kommunikasjon med miljøet (74).

4.1.2 Metodene

Westernblotting ble brukt for å måle fosforylert AKT2 og AS160 i humane skjelettmuskelceller. Fosforyleringsnivået av AKT2 og AS160 ble målt med spesifikke antistoffer og justert til total AKT2 og AS160 ved hjelp av antistoffer mot total AKT2 og total AS160. qPCR ble benyttet for å måle uttrykk av GLUT-1 og GLUT-4 i humane skjelettmuskelceller. Uttrykket av GLUT-1 og GLUT-4 ble korrigert for uttrykk av RPLP0-genet. RPLP0-genet ble brukt som et referansegen (kontrollen) siden dets uttrykk ikke påvirkes av testen vår. Referansegenet brukes for å korrigere for varierende mengde av RNA i prøvene (91).

For å studere glukosemetabolisme i de ulike cellemodellene ble det brukt glukoseopptak (75). Ved måling av glukoseopptaket ble benyttet radioaktivmerket deoksyglukose (2-[1-¹⁴C]-

Deoksy-D-glukose). Mengde av akkumulert deoksyglukose ble korrigert for totalproteinmengden (målt med Bradfords metode) for å justere for varierende cellemengden. I denne oppgaven ble det benyttet to ulike glukosekonsentrasjoner. I starten ble det benyttet 5,5 mM glukose og deretter 1,0 mM glukose. Høye glukosekonsentrasjoner kan påvirke deoksyglukoseopptaket siden glukose er bedre substrat for glykolyseenzymet heksokinase enn deoksyglukose (75). Den høye glukosekonsentrasjonen ga lave telletall ved glukoseopptaket. Lave telletallene kan føre til unøyaktighet siden effekten kan forsvinne i spredning. Derfor ble det også benyttet 1,0 mM glukose for eventuelt å kunne se en tydelig effekt. Den lave glukosekonsentrasjonen ga høyere telletallene ved glukoseopptaket, men effekten av behandlingene ble ikke tydeligere ved lavere glukosekonsentrasjoner.

4.2 Diskusjon av resultatene

4.2.1 Insulineffekter i de undersøkte cellemodellene

Diabetes type 2 skyldes insulinmangel og insulinresistens. En utilstrekkelig insulinproduksjon og nedsatt insulinvirkning fører til en reduksjon i glukosetransporten til leveren og et redusert glukoseopptak i muskel- og fettceller (1, 3). Insulin spiller en viktig rolle i glukoseomsetning i skjelettmuskulatur og fettvev (7). Insulin stimulerer glukoseopptak i både skjelettmuskelceller og adipocytter (7, 44). I skjelettmuskelceller og adipocytter er insulin-stimulert glukoseopptak avhengig av GLUT-4-transportøren som uttrykkes høyest i disse to vevene (7, 24).

Ut fra litteraturen var det forventet en effekt av insulin på glukoseopptaket i skjelettmuskelceller (7, 44, 92). I denne studien førte insulin ikke til signifikant økning av glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller. En mulig forklaring til dette kan være at uttrykket av GLUT-4-transportøren er lavere i skjelettmuskelceller *in vitro* enn *in vivo* (69, 84, 85). I noen studier på skjelettmuskelceller fra mus ble det rapportert at insulin stimulerte insulin glukoseopptaket i disse cellene. Forsøkene i disse rapportene ble utført i C2C12-celler (50, 93). I denne studien ble det ikke påvist en signifikant effekt av insulin på glukoseopptaket i skjelettmuskelceller fra mus. Årsaken til dette er ikke kjent, men grunnen til dette kan være bruk av andre musestammer. Det er kanskje forskjell på skjelettmuskelceller fra ulike musestammer. En rapport viste at insulinfølsomhet var høyere i C2C12-celler enn i celler fra andre musestammer (89). Den samme rapporten viste at C2C12-celler har et høyt uttrykk av GLUT-4 (89). Det er ikke kjent

om skjelettmuskelceller fra mus benyttet i denne studien har et høyt uttrykk av GLUT-4 eller ikke.

SGBS-celler har tidligere vist evne til å øke glukoseopptaket flere ganger etter stimulering med insulin (74, 90). Utfra dette var det forventet et høyt glukoseopptak etter stimulering med insulin. Resultatene våre viste et høyere glukoseopptak etter stimulering med insulin ved 1,2 μM SAFit2, men ikke ved 0,6 μM SAFit2 og ved kontroll (figur 3.4). Årsaken til dette er dessverre ikke kjent.

Insulin utøver sin effekt ved å binde seg til sin reseptor. Når insulin binder seg til sin reseptor i skjelettmuskulatur, fører det til aktivering av nedstrøms signalveien inn i skjelettmuskelceller. Dette fører til fosforylering av AKT2 og AS160 som fremmer translokasjon av GLUT-4 lagringsvesikler (GSV) (7). Dermed var det forventet at insulin ville gi økt fosforylering av AKT2 og AS160 i cellene våre. Resultatene våre viste at insulin tenderte til å øke fosforylert AKT2 i humane skjelettmuskelceller sammen lignet med kontroll (figur 3.9 A). Ved analyse av fosforylert AS160 tenderte insulin også til å gi økt fosforylering av AS160 sammenlignet med basal tilstand. Etter behandling med 1,0 μM T0901317 og 1,2 μM SAFit2 førte insulin ikke til en tydelig endring av fosforylert AS160 sammenlignet med ubehandlet kontroll (figur 3.9 B). Det ble gjort tre forsøk, og spredningen mellom forsøkene var stor. Det er derfor nødvendig å gjøre flere forsøk for å si noe sikkert om dette.

4.2.2 Effekter av SAFit2 alene

En tidligere studie fra mus viste at SAFit2 økte fosforyleringen av AS160, økte GLUT-4-mengden i plasmamembranen, og til slutt forbedret glukoseopptaket (50). Foreløpig er det få studier som har undersøkt effekten av SAFit2 på skjelettmuskelceller fra mus og det finnes ingen data fra studier på skjelettmuskelceller fra mennesker. Derfor har jeg i denne studien undersøkt effekter av SAFit2 på glukoseopptaket i ulike cellemodeller, og på genekspressjon og fosforylering av AKT2 og AS160.

I resultatene våre førte SAFit2 ikke til en signifikant endring i glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller og SGBS-celler sammenlignet med kontroll. Det finnes ikke publiserte studier som har undersøkt effekt av SAFit2 på glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller

og fettceller. Resultatene fra studien vår gir ingen indikasjon på at SAFit2 påvirker glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller og SGBS-celler.

SAFit2 førte heller ikke til en signifikant endring i glukoseopptaket i skjelettmuskelceller fra mus i våre forsøk. Foreløpig finnes det få publiserte studier som har undersøkt effekt av SAFit2 på glukoseopptaket i mus. Studien vår klarte ikke å reprodusere funnet fra studien til Balsevich et al. (50). Årsaken til dette er ikke kjent, men en mulig grunn til dette kan være bruk av andre musestammer enn den som ble benyttet i studien til Balsevich et al. I studien til Balsevich et al. ble det benyttet C2C12-celler (50). Det er mulig at det er forskjell på skjelettmuskelceller fra ulike musestammer.

I studien til Balsevich et al. økte SAFit2 fosforylering av AS160 og GLUT-4-mengden i plasmamembranen i skjelettmuskelceller fra mus (50). Effekten av SAFit2 på fosforylering av AS160 og GLUT-4-uttrykk er undersøkt i få publiserte studier i skjelettmuskelceller fra mus. Det finnes ikke publiserte studier som har undersøkt effekten av SAFit2 på fosforylering av AS160 eller GLUT-4-uttrykk i humane skjelettmuskelceller. Resultatene våre tyder på at SAFit2 alene ikke førte til en signifikant endring i fosforylering av AS160 og uttrykk av GLUT-4.

4.2.3 Effekter av SAFit2 i kombinasjon med T0901317

I dyreforsøk fra mus ble det funnet at LXR-agonisten T0901317 førte til økt GLUT-4-uttrykk i fett- og skjelettmuskelceller og på denne måten bidrar til normal glukosehomeostase (64, 66). Det er få publiserte studier som har undersøkt effekten av LXR-agonisten T0901317 på glukoseopptak i humane skjelettmuskelceller. Hessvik et al. fant at LXR-agonisten T0901317 førte til økt GLUT-4-uttrykk i humane skjelettmuskelceller, men ikke forbedret glukoseopptaket (61). Vi ønsket i denne studien å studere om kombinasjonen av LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 ville øke effekten på uttrykket av GLUT-4 og glukoseopptak i nærvær og fravær av insulin. I tillegg undersøkte vi effekter av T0901317 på insulinstimulert fosforylering av AKT2 og AS160 i skjelettmuskelceller.

Resultatene våre viste at LXR-agonisten T0901317 førte til en signifikant økning av GLUT-1- og GLUT-4-uttrykket i humane skjelettmuskelceller, både i nærvær og fravær av SAFit2. Men resultatene våre viste ingen signifikant effekt av SAFit2 alene på uttrykket av GLUT-1 og GLUT-4. LXR-agonisten T0901317 førte ikke til en bedring av glukoseopptaket i humane

skjelettmuskelceller, verken i nærvær eller fravær av SAFit2. Funnet fra denne studien tyder på at kombinasjonen av LXR-agonisten T0901317 og SAFit2 ikke øker effekten på glukoseopptak, men flere studier er nødvendige siden antall forsøk var lite.

Det finnes ikke publiserte studier som har undersøkt effekt av LXR-agonisten T0901317 på fosforylering av AKT2 og AS160 i humane skjelettmuskelceller. I resultatene våre førte LXR-agonisten T0901317 ikke til en signifikant endring i fosforylering av AKT2 og AS160 i skjelettmuskelceller, men antall forsøk var lite og spredningen stor, så det er vanskelig å konkludere.

4.3 Veien videre

Alle forsøkene i denne studien ble utført på celler isolert fra friske individer. Siden studien vår ikke viste noen effekt av SAFit2 i disse celler, hadde vært interessant å se effekten av SAFit2 på celler isolert fra andre donorer som f.eks. individer med type 2 diabetes.

Antall forsøk i denne studien var lite og dermed bør det gjøres ytterligere forsøk for å kunne konkludere med sikkerhet om det er noen effekt av SAFit2 eller ikke. I studien vår ble det benyttet to konsentrasjoner av SAFit2 (0,6 og 1,2 μM), og behandlingstiden var en time. Det bør gjøres forsøk med andre konsentrasjoner og behandlingstider for å se hvordan det kan påvirke effekten av SAFi2. I studien til Balsevich et al. ble det benyttet C2C12-type museceller. Denne studien har benyttet celler fra to andre musestammer og dermed hadde vært fint å undersøke effekten av SAFit2 i C2C12-celler.

5 Konklusjon

Denne studien viser at basalt og insulinstimulert glukoseopptak i ulike cellemodeller ikke ble påvirket av ett døgn behandling med FKBP51-hemmeren SAFit2, verken i humane skjelettmuskelceller, i skjelettmuskelceller fra mus eller i humane adipocytter. Behandlingen med LXR-agonisten T0901317, som påvirker GLUT-4-ekspressjon, hadde ingen påvirkning på effekt av SAFit2 på glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller. I genekspressionsanalysen av skjelettmuskelceller etter behandlingen med SAFit2 ble det ikke observert signifikant endring i ekspressjon av GLUT-1 og GLUT-4, mens behandlingen med LXR-agonisten T0901317 førte til økning i ekspressjon av både GLUT-1 og GLUT-4, både i nærvær og fravær av SAFit2. Studien vår viste ingen signifikant endring i fosforylering av AS160 og AKT2 i skjelettmuskelceller, verken etter behandling med SAFit2 eller etter behandling med LXR-agonisten T0901317. Flere studier kreves for å kunne støtte funnene i denne studien og konkludere med sikkerhet om det er effekt av SAFit2 på glukoseopptak i skjelettmuskulaturen og fettvevet.

Litteraturliste

1. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2017;389(10085):2239-51.
2. Leahy JL. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research*. 2005;36(3):197-209.
3. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J*. 2012;27(4):269-73.
4. Hruby VJ. Chapter 16 - Glucagon:: Molecular Biology and Structure-Activity. In: Bittar EE, Bittar N, editors. *Principles of Medical Biology*. 10: Elsevier; 1997. p. 387-401.
5. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15019.
6. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26(2):19-39.
7. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*. 2018;98(4):2133-223.
8. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, et al. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev*. 2017;38(5):379-431.
9. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(1):31-44.
10. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 Suppl 2:S135-48.
11. Moller DE, Flier JS. Insulin Resistance — Mechanisms, Syndromes, and Implications. *New England Journal of Medicine*. 1991;325(13):938-48.
12. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473-81.
13. Hantzidiamantis PJ, Lappin SL. Physiology, Glucose: In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [updated 22.09.2020; cited 2021 02.03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545201/>.
14. Sanders LM. Carbohydrate: Digestion, Absorption and Metabolism. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press; 2016. p. 643-50.
15. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5793, D-Glucose: PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information; [cited 2021 02.03]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucose>.
16. Nakrani MN, Wineland RH, Anjum F. Physiology, Glucose Metabolism: In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [updated 14.08.2020; cited 2021 02.03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560599/>.
17. Blanco A, Blanco G. Chapter 14 - Carbohydrate Metabolism. In: Blanco A, Blanco G, editors. *Medical Biochemistry*: Academic Press; 2017. p. 283-323.
18. Harris RA, Johnson JS. Glycolysis Overview. *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier; 2019.

19. Hauge JG. Glykolysen: Store norske leksikon [Internet]. Store norske leksikon; [updated 23.10.2019; cited 2021 03.03]. Available from: <https://snl.no/glykolysen>.
20. Feher J. 2.9 - ATP Production I: Glycolysis. In: Feher J, editor. Quantitative Human Physiology (Second Edition). Boston: Academic Press; 2017. p. 218-26.
21. Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev*. 2016;8(1):5-9.
22. Zierler K. Whole body glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1999;276(3):E409-E26.
23. Vargas E, Podder V, Carrillo Sepulveda MA. Physiology, Glucose Transporter Type 4: In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [updated 10.07.2020; cited 2021 07.03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537322/>.
24. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(4):267-77.
25. Huang S, Czech MP. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*. 2007;5(4):237-52.
26. Stöckli J, Fazakerley DJ, James DE. GLUT4 exocytosis. *Journal of Cell Science*. 2011;124(24):4147.
27. Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Physiological Reviews*. 2013;93(3):993-1017.
28. Holck P. Musklene: Store norske leksikon [Internet]. Store medisinske leksikon - Store norske leksikon; [updated 02.11.2020; cited 2021 09.03]. Available from: <https://sml.snl.no/musklene>.
29. Dave HD, Shook M, Varacallo M. Anatomy, Skeletal Muscle: In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [updated 22.09.2020; cited 2021 09.03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537236/>.
30. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*. 2015;96(3):183-95.
31. Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(10):1175-83.
32. Morales PE, Bucarey JL, Espinosa A. Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins. *J Diabetes Res*. 2017;2017:1789395.
33. Mazibuko-Mbeje S, Dlodla P, Nkambule B, Obonye N, Louw J. The Role of Glucose and Fatty Acid Metabolism in the Development of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. In: Sakuma K, editor. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. London, United Kingdom: IntechOpen; 2018. p. 9-14.
34. Cahová M, Vavřínková H, Kazdová L. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiol Res*. 2007;56(1):1-15.
35. Helseinformatikk N. Insulin og skifte mellom karbohydrat- og lipidmetabolisme: Norsk Helseinformatikk [Internet]. Norsk Helseinformatikk; [updated 08.12.2020; cited 2021 10.03]. Available from: <https://nhi.no/kroppen-var/hormoner/insulin-og-skifte-mellom-karbohydrat-og-lipidmetabolisme/>.
36. Kelley DE. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1699-702.

37. Watt MJ, Hoy AJ. Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2011;302(11):E1315-E28.
38. Jeukendrup AE. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;967:217-35.
39. Kelley DE, Goodpaster BH. Skeletal Muscle Triglyceride. *Diabetes Care*. 2001;24(5):933.
40. Roden M. How Free Fatty Acids Inhibit Glucose Utilization in Human Skeletal Muscle. *Physiology*. 2004;19(3):92-6.
41. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:30.
42. The Editors of Encyclopedia Britannica. Adipose tissue: Encyclopedia Britannica [Internet]. *Encyclopedia Britannica*; 2009 [updated 11.07.2019; cited 2021 13.03]. Available from: <https://www.britannica.com/science/adipose-tissue>.
43. Holck P. Fettvev: Store norske leksikon [Internet]. *Store medisinske leksikon - Store norske leksikon*; [updated 02.03.2020; cited 2021 13.03]. Available from: <https://sml.sn.no/fettvev>.
44. Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction: Endotext [Internet]. *MDText.com, Inc.*; 2000 [updated 04.04.2020; cited 2021 14.03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>.
45. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9(2):191-200.
46. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol*. 2016;231(3):R77-r99.
47. Song Z, Xiaoli AM, Yang F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*. 2018;10(10).
48. Harris CA, Haas JT, Streeper RS, Stone SJ, Kumari M, Yang K, et al. DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*. 2011;52(4):657-67.
49. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*. 2015;7(11):9453-74.
50. Balsevich G, Häusl AS, Meyer CW, Karamihalev S, Feng X, Pöhlmann ML, et al. Stress-responsive FKBP51 regulates AKT2-AS160 signaling and metabolic function. *Nature Communications*. 2017;8(1):1725.
51. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 86277887, SAFit2: PubChem [Internet]. *National Center for Biotechnology Information*; 2014 [updated 13.03.2021; cited 2021 15.03]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/SAFit2>.
52. Hähle A, Merz S, Meyners C, Hausch F. The Many Faces of FKBP51. *Biomolecules*. 2019;9(1).
53. Wikipedia contributors. Immunophilins: Wikipedia [Internet]. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*; [updated 17.01.2021; cited 2021 15.03]. Available from: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Immunophilins&oldid=1000848735>.
54. Harikishore A, Yoon HS. Immunophilins: Structures, Mechanisms and Ligands. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;9(1):37-47.

55. Sinars CR, Cheung-Flynn J, Rimerman RA, Scammell JG, Smith DF, Clardy J. Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):868-73.
56. Häusel AS, Balsevich G, Gassen NC, Schmidt MV. Focus on FKBP51: A molecular link between stress and metabolic disorders. *Mol Metab*. 2019;29:170-81.
57. MedChemExpress. T0901317: MedChemExpress [Internet]. MedChemExpress; [cited 2021 16.03]. Available from: <https://www.medchemexpress.com/T0901317.html>.
58. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 447912: PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information; [cited 2021 16.03]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/t0901317>.
59. Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev*. 2013;65(2):710-78.
60. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14(22):2831-8.
61. Hessvik NP, Bakke SS, Smith R, Ravna AW, Sylte I, Rustan AC, et al. The liver X receptor modulator 22(S)-hydroxycholesterol exerts cell-type specific effects on lipid and glucose metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012;128(3-5):154-64.
62. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*. 2007;445(7124):219-23.
63. Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP, Schmidt RJ, et al. Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278(2):1131-6.
64. Gao M, Liu D. The liver X receptor agonist T0901317 protects mice from high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Aaps j*. 2013;15(1):258-66.
65. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 7:31-55.
66. Baranowski M, Zabielski P, Błażnio-Zabielska AU, Harasim E, Chabowski A, Górski J. Insulin-Sensitizing Effect of LXR Agonist T0901317 in High-Fat Fed Rats is Associated with Restored Muscle GLUT4 Expression and Insulin-Stimulated AS160 Phosphorylation. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2014;33(4):1047-57.
67. Lund J, D ST, Wiig H, Stadheim HK, Helle SA, J BB, et al. Glucose metabolism and metabolic flexibility in cultured skeletal muscle cells is related to exercise status in young male subjects. *Arch Physiol Biochem*. 2018;124(2):119-30.
68. Biondi NL, Varacallo M. Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb, Vastus Lateralis Muscle: In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [updated 10.08.2020; cited 2021 05.02]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532309/>.
69. Aas V, Bakke SS, Feng YZ, Kase ET, Jensen J, Bajpeyi S, et al. Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res*. 2013;354(3):671-82.
70. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep*. 2019;9(1):4641.
71. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3.B.1-a3.B.

72. Bardova K, Horakova O, Janovska P, Hansikova J, Kus V, van Schothorst EM, et al. Early differences in metabolic flexibility between obesity-resistant and obesity-prone mice. *Biochimie*. 2016;124:163-70.
73. Hessvik NP, Boekschoten MV, Baltzersen MA, Kersten S, Xu X, Andersén H, et al. LXR {beta} is the dominant LXR subtype in skeletal muscle regulating lipogenesis and cholesterol efflux. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(3):E602-13.
74. Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obesity facts*. 2008;1(4):184-9.
75. Perriott LM, Kono T, Whitesell RR, Knobel SM, Piston DW, Granner DK, et al. Glucose uptake and metabolism by cultured human skeletal muscle cells: rate-limiting steps. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2001;281(1):E72-E80.
76. Zhao J, Ma Y, Zhang Y, Fu B, Wu X, Li Q, et al. Low-dose 2-deoxyglucose and metformin synergically inhibit proliferation of human polycystic kidney cells by modulating glucose metabolism. *Cell Death Discovery*. 2019;5(1):76.
77. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
78. Lobert S, Hiser L, Correia JJ. Chapter 4 - Expression Profiling of Tubulin Isoforms and Microtubule-Interacting Proteins Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. In: Wilson L, Correia JJ, editors. *Methods in Cell Biology*. 95: Academic Press; 2010. p. 47-58.
79. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429-34.
80. Wikipedia contributors. Polyacrylamide gel electrophoresis: Wikipedia [Internet]. Wikipedia, The Free Encyclopedia; [updated 09.01.2021; cited 2021 05.02]. Available from: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polyacrylamide_gel_electrophoresis&oldid=999264360.
81. Blau HM, Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(9):5623-7.
82. Berggren JR, Tanner CJ, Houmard JA. Primary cell cultures in the study of human muscle metabolism. *Exerc Sport Sci Rev*. 2007;35(2):56-61.
83. Thompson DB, Pratley R, Ossowski V. Human primary myoblast cell cultures from non-diabetic insulin resistant subjects retain defects in insulin action. *J Clin Invest*. 1996;98(10):2346-50.
84. Sarabia V, Lam L, Burdett E, Leiter LA, Klip A. Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin. *J Clin Invest*. 1992;90(4):1386-95.
85. Al-Khalili L, Chibalin AV, Kannisto K, Zhang BB, Permert J, Holman GD, et al. Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(5):991-8.
86. Nehlin JO, Just M, Rustan AC, Gaster M. Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism. *Biogerontology*. 2011;12(4):349-65.
87. Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. Are human and mouse satellite cells really the same? *J Histochem Cytochem*. 2010;58(11):941-55.

88. Abdelmoez AM, Sardón Puig L, Smith JAB, Gabriel BM, Savikj M, Dollet L, et al. Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;318(3):C615-c26.
89. Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage. *J Pharm Pharmacol.* 2020;72(12):1667-93.
90. Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, et al. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(1):8-15.
91. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 2013;54(4):391-406.
92. Sarabia V, Ramlal T, Klip A. Glucose uptake in human and animal muscle cells in culture. *Biochem Cell Biol.* 1990;68(2):536-42.
93. Fu WC, Li HY, Li TT, Yang K, Chen JX, Wang SJ, et al. Pentadecanoic acid promotes basal and insulin-stimulated glucose uptake in C2C12 myotubes. *Food Nutr Res.* 2021;65.

Vedlegg

1. Medier til dyrking av humane skjelettmuskelceller

1.1 – Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM med Glutamax inneholdende 1 g glukose/liter 50 ml FCS

12,5 1 M HEPES

500 µl gentamicin (50 mg/ml)

2,5 ml Penicillin/Streptomycin (10 000 enheter/ml)

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml amfotericin B)

500 µl hEGF (10 µg/ml)

500 µl deksametason (0,39 mg/ml)

3,3 ml BSA 7,5 % løsning

1.2 – Differensieringsmedium

500 ml DMEM med Glutamax inneholdende 1 g glukose/liter

10 ml FCS

2,5 ml Pen/Strep (10 000 enheter/ml)

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml amfotericin B)

12,5 ml 1 M HEPES

500 µl gentamicin (50 mg/ml)

25 pmol insulin (21,5 µl 1000 x fortynnet Insulin Actrapid fra Novo Nordisk, 0,6 mM)

2. Protokoller for utsåing av celler

2.1 – Humane skjelettmuskelceller

Type	Recommended by PBRC			UiO		
	Bottom Area [cm ²]	Number of cells to be seeded [3500 cells/cm ²]	Expected number of cells at harvesting	We seed per well	Medium volume	Siril S. Bakke Harvested
75 cm ² flask	75	262500	3000000	600000?	10 ml/flask	8000000
25 cm ² flask	25	87500	1000000	150000	3 ml/flask	
60 mm dish	21,3	74550	1120000	150000		
		[10000 cells/cm ²]				
6 well plate	9,6	96000	384000	100000	2 ml/well	
12 well plate	3,8	38000	152000	50000	1 ml/well	
24 well plate	2	20000	80000	25000	0.5 ml/well	
96 well plate	0,32	3200	12800	7000	100 µl/well	

2.2 – Museceller

Type brønn	Antall (celler/brønn)	Mengde cellesuspensjon (µl/brønn)	Matrigel-fortynning (µl)	Metode
96 brønner (NUNC)	10.000	100 µl	50 µl	Substratoksidasjon
96 brønner (Scintiplat® 96 TC)	10.000	100 µl	50 µl	SPA
24 brønner glassbunn	30.000	500 µl	250 µl	Live cell imaging
12 brønner (Corning®)	60.000	1000 µl	500 µl	qPCR

3. Medier til dyrking av museceller

3.1 – Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium (Growth)

500 ml Hams F-10 Glutamax nutrient mixture

100 ml Føtal bovint serum (FBS)

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

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

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

3.2 – Differensieringsmedium

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

10 ml Hesteserum

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

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

4. Buffere og medier til qPCR

4.1 - Reaksjonsblanding

13,2 µl DEPS-dH₂O + prøve

2,0 µl 10 x Taqman RT buffer

0,8 µl dNTP-miks

2,0 µl 10 x RT tilfeldige heksamere

1,0 µl RNase-hemmer (20 U/µl)

1,0 µl Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)

4.2 – Standarder

cDNA-mix: 2 µl fra hver prøve (2 µl × 12 prøver = 24 µl)

Std. 1000 (1:5 fortynnet cDNA-mix):

2,5 µl × 3 paralleller × 4 gener = 30 µl × 2 = 60 µl → 80 µl
80 µl/5 = 16 µl → 16 µl cDNA-mix + 64 µl nukleasefritt vann

Std. 500 (1:2 fortynnet std. 1000):

40 µl std. 1000 + 40 µl nukleasefritt vann

Std. 250 (1:2 fortynnet std. 500):

40 µl std. 500 + 40 µl nukleasefritt vann

Std. 125 (1:2 fortynnet std. 500):

40 µl std. 250 + 40 µl nukleasefritt vann

4.3 – Fortynning av cDNA-prøver

2,5 µl × 2 paralleller × 4 gener = 20 µl → Lager 40 µl av hver prøve

Skal fortynnes 1:5 → 40 µl/5 = 8 µl → 8 µl prøve + 32 µl nukleasefritt vann

4.4 – SYBR Green PCR-miks

12,5 µl 2 x SYBR Green Master Mix

0,25 µl Forward primer

0,25 µl Reverse primer

9,5 µl DEPC-dH₂O

5. Buffere og medier til Westernblotting

5.1 – Harvesting buffer

600 µl 2 x Samplebuffer

6 µl av 10 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail

6 µl av 10 µl/ml Phosphatase Inhibitor Cocktail 2

2 x Samplebuffer

10 ml 0,5 mol/l Tris-HCl

8 ml glyserol

8 ml 10 % (w/v) SDS

14 ml dH₂O

5.2 – Elektroforesebuffer

25 mmol/l Tris

192 mmol/l glycin

0,1 % (w/v) SDS

Fortynnet 1:10 med dH₂O, pH 8,3

5.3 – Blottebuffer

200 ml 5 x Transferbuffer

600 ml dH₂O

200 ml etanol

5.4 – 1 x TTBS

100 ml 10 x TBS

900 ml dH₂O

0,5 ml 0,05 % Tween 20

10 x TBS

61 g Tris base

90 g NaCl

1000 ml MilliQ-vann

pH justert til 8,4 med konsentrert HCl

5.5 – Antistoff fortynningene i 5 ml tørrmelkløsning

Fortynning	Mengde antistoff
1:500	10 µl
1:1000	5 µl
1:1500	3,33 µl
1:2000	2,5 µl
1:3000	1,67 µl

6. Medier til dyrking av SGBS-celler

6.1 0F (serumfritt basalmedium)

500 ml DMEM/Nutrient Mix F12

5 ml biotin/pantothenate

5 ml L-gluamine

10 ml P/S

6.2 3FC-medium

10 ml 0F (-FCS)

100 µl Transferrin (1 mg/ml)

2 µl Insulin (100 µM)

10 µl Cortisol (100 µM)

10 µl T3 (200 nM)

6.3 Qickdiff-medium

10 ml 3FC

10 µl Dexamethasone (25 µM)

5 µl IBMX (1M)

2 µl Rosiglitazone (10 mM)

7. Isotopmedier

7.1 – Isotopmedium (1)

3,5 ml DMEM med 5,5 mM glukose

35 µl 100µCi/ml 2-[1-¹⁴C]-Deoksy-D-glukose (1 µCi/ml)

7.2 – Isotopmedium (2)

3,5 ml DMEM uten glukose

35 µl 100 mM glukose (1,0 mM)

35 µl 100µCi/ml 2-[1-¹⁴C]-Deoksy-D-glukose (1 µCi/ml)