

# **Utrykk av gener i skjelettmuskel fra sykelig overvektige**

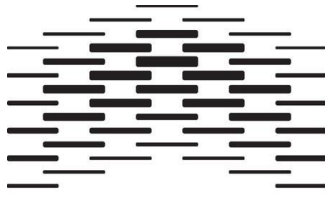
*In vivo og in vitro sammenlikning av sykelig overvektige  
med normal glukosetoleranse og type 2-diabetes*

Image not shown



Marianne Odnakk Ludahl

Desember 2011



HØGSKOLEN I OSLO  
OG AKERSHUS

Fakultet for helsefag

Institutt for farmasi og bioingeniørfag

# **Utrykk av gener i skjelettmuskel fra sykelig overvektige**

*In vivo og in vitro sammenlikning av sykelig overvektige  
med normal glukosetoleranse og type 2-diabetes*

Marianne Odnakk Ludahl

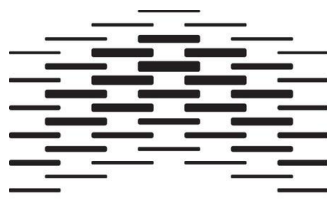
**Masteroppgave for graden Master i Biomedisin**

Masteroppgave, 60 studiepoeng

Utført ved

Institutt for farmasi og bioingeniørfag

Fakultet for helsefag



HØGSKOLEN I OSLO  
OG AKERSHUS

Desember 2011

Veileder

Førsteamanuensis Vigdis Aas

## Innhold

Forord .....	i
Sammendrag .....	ii
Summary in English.....	iv
Forkortelser .....	vi
1 Innledning .....	1
1.1 Overvekt og fedme.....	1
1.2 Insulinresistens og T2D.....	2
1.3 Skjelettmuskulatur .....	3
1.3.1 Skelettmuskelens oppbygning .....	4
1.3.2 Insulinets funksjon på skjelettmuskulatur.....	5
1.3.3 Metabolisme av glukose i skjelettmuskulatur.....	7
1.3.4 Metabolisme av lipider i skjelettmuskulatur.....	8
1.4 Skjelettmuskelceller som in vitro-modellsystem .....	10
1.5 Genuttrykkstudier .....	11
1.5.1 CD36/FAT .....	11
1.5.2 CPT1B.....	12
1.5.3 TIP47 /ADFP .....	13
1.5.4 PDK4 .....	15
1.5.5 ATGL .....	16
1.5.6 MHCI/MHCII .....	17
1.6 Metodeteori .....	17
1.6.1 RT Real-time PCR .....	17
1.6.2 Relativ kvantifiseringsanalyse .....	18
1.6.3 Referansegen.....	18
1.7 Formål med oppgaven .....	19
2 Materiale og metode .....	20
2.1 Pasientmateriale .....	20
2.2 Opprettelse av primærkultur og dyrking av celler .....	21
2.2.1 Isolering av satelittceller fra muskelbiopsi .....	22

---

2.2.2	Celledyrking.....	22
2.3	Isolering av totalt RNA fra myotuber etablert i kultur.....	22
2.3.1	Lysering .....	22
2.3.2	Isolering av RNA .....	23
2.4	Isolering av totalt RNA fra muskelbiopsier i RNAlater .....	23
2.4.1	Homogenisering .....	23
2.4.2	Isolering av RNA .....	23
2.4.3	Rensing av isolert RNA .....	24
2.5	RT real-time PCR.....	24
2.5.1	cDNA-syntese .....	24
2.5.2	Real time PCR.....	24
2.5.3	Kontroll av resultater fra RT real-time PCR .....	26
2.5.4	Oppsett av gel for kontroll av-PCR produkt .....	27
2.5.5	Beregning av genuttrykk .....	27
2.6	Glukseoksidasjon i dyrkede myotuber .....	28
2.6.1	Substratoksidasjonsforsøk med radioaktiv glukose.....	28
2.6.2	Proteinmåling.....	29
2.7	Statistiske analyser .....	29
3	Resultater .....	31
3.1	Donorkarakteristika .....	31
3.2	Dyrking av myoblaster og isolering av RNA fra myotuber .....	31
3.3	Isolering av RNA fra muskelbiopsier .....	34
3.4	Genuttrykk <i>in vivo</i> og <i>in vitro</i> .....	35
3.4.1	Uttrykk av CD36/FAT .....	37
3.4.2	Uttrykk av CPT-1 .....	38
3.4.3	Uttrykk av TIP47 .....	39
3.4.4	Uttrykk av ADFP.....	41
3.4.5	Uttrykk av TIP47 i forhold til ADFP.....	42
3.4.6	Uttrykk av PDK4.....	44
3.4.7	Uttrykk av MHCI.....	46

---

3.4.8	Uttrykk av MHCIIa .....	47
3.4.9	Uttrykk av MHCI i forhold til MHCIIa .....	49
3.4.10	Uttrykk av ATGL .....	51
3.4.11	Genuttrykk <i>in vitro</i> kontra <i>in vivo</i> .....	53
3.5	Glukoseoksidasjon .....	54
4	Diskusjon .....	56
4.1	Klassifisering og valg av donorer .....	57
4.2	Dyrking av myoblaster fra EO-pasienter .....	57
4.3	Isolering av RNA .....	59
4.3.1	Isolering av RNA fra myotuber i kultur .....	59
4.3.2	Isolering av RNA fra muskebiopsier .....	59
4.4	Genetiske analyser .....	59
4.4.1	Bearbeidelse av real-time PCR data .....	59
4.4.2	CD36/FAT .....	60
4.4.3	CPT1B .....	61
4.4.4	TIP47 og ADFP .....	61
4.4.5	PDK4 .....	63
4.4.6	MHC I/IIa .....	64
4.4.7	ATGL .....	65
4.4.8	Genuttrykk i biopsi kontra primærcellekultur .....	66
4.5	Glukosemetabolisme .....	67
5	Konklusjon .....	69
	Kildeliste .....	71
	Appendiks .....	77

## Forord

Denne oppgaven har blitt delvis utført ved Institutt for farmasi og bioingeniørfag ved Fakultet for helsefag ved Høyskolen i Oslo og Akershus (HiOA), Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo (UiO) og ved genteknologisk seksjon ved Sykehuset i Vestfold HF (SiV HF) i Tønsberg i perioden februar 2011 til desember 2011.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min veileder Førsteamanuensis Vigdis Aas for å ha gitt meg muligheten til å jobbe med en masteroppgave innen et så interessant og aktuelt tema. Tusen takk for meget god rådgivning og støtte gjennom hele prosessen. Takk for all kunnskap du har delt med meg, for all tillit du har gitt meg, samt for all hjelp og tips under skriveprosessen.

Takk også til alle på Farmasi ved Institutt for farmasi og bioingeniørfag ved HiOA for den inkluderende mottagelsen og støtten jeg har fått under hele prosessen. Jeg vil spesielt takke Ane Gedde-Dahl. Tusen takk for all hjelp og din smittsomme entusiasme.

En stor takk til forsker Eili Tranheim Kase ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk institutt ved UiO for all hjelp og praktiske råd i oppstartsfasen. Jeg vil også takke resten av gjengen ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap for lånet av utstyr og reagenser. Tusen takk for at dere alltid tok dere tid til å svare på spørsmål og hjelpe en til tider noe forvirret gjest.

Tusen takk til seksjonsleder Mette Lundstøm Dahl ved genteknologisk seksjon ved SiV HF i Tønsberg for å ha gitt meg mulighet til å utføre alle PCR-analysene på laboratoriet. Tusen takk for all din hjelp, all kunnskap du gladelig har delt med meg og for din positivitet som har holdt meg oppe når forsøk ikke har gått som planlagt. Tusen takk til forsker Inger-Lill Anthonisen ved samme avdeling for god hjelp og rettleiding ved RT real-time PCR-analysene. Jeg vil samtidig takke alle ved genteknologisk laboratorium for å ha gitt meg rom til å jobbe med masteroppgaven min til tross for hektiske arbeidsdager.

Tusen takk til Trine Thoresen som har tatt seg tid til å lese korrektur til tross for sin travle hverdag.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke min kjære familie. Takk til min kjære Jørn som har gitt meg anledning til å gjennomføre denne masteren og for å ha holdt ut til tross for sin sykdom. Tusen takk til min kjære mamma som alltid har stilt opp når vi har trengt det. Uten dere hadde dette ikke vært gjennomførbart.

Tønsberg desember 2011

Marianne Odnakk Ludahl

## Sammendrag

*Introduksjon:* Antall tilfeller av type 2-diabetes (T2D) øker faretruende verden over. Utviklingen av sykdommen skyldes en interaksjon mellom vårt moderne levesett og en genetisk predisposisjon. Det er en økende kunnskap om den genetiske sammenhengen, men den er foreløpig av lav prediktiv verdi.

Ca. 80 % av personer med T2D er overvektige, men kun 30 % av pasienter som gjennomgår bariatrisk kirurgi ved Senter for sykkelig overvekt i Tønsberg har etablert T2D til tross for ekstrem fedme. Med utgangspunkt i muskelbiopsier fra disse pasienter var formålet med denne oppgaven å forsøke å detektere en forskjell i uttrykket av gener involvert i glukose- og fettsyremetabolismen hos sykkelig overvektige pasienter med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert T2D både i *in vivo*- og *in vitro* studier.

*Metode:* Muskelbiopsier fra sykkelig overvektige pasienter med NGT og etablert T2D, tatt under bariatrisk kirurgi, ble benyttet til denne studien. Det ble isolert RNA fra muskelbiopsier (*in vivo*-studier) og fra myocytter dyrket i kultur (*in vitro*-studier) fra tilsvarende donor. Ved hjelp av litteraturstudier og tidligere arbeid utført på dette materiale, ble det valgt å studere genuttrykket av CD36/FAT, CPT1, PDK4, TIP47, ADFP, MHCI, MHCIIa og ATGL. Genuttrykket ble målt ved hjelp av RT real-time PCR og normalisert mot referansegene GAPDH og 36B4. I tillegg ble myotubenes evne til å metabolisere glukose målt ved hjelp av flux-studier med radioaktivmerket glukose. Det ble innhentet informert samtykke fra alle pasienter og godkjenning av regional etisk komité før uttak av muskelbiopsier.

*Resultater:* Det var ingen signifikant forskjell i genuttrykket av overfor nevnte gener mellom sykkelig overvektige pasienter med NGT og etablert T2D verken i muskelbiopsier (*in vivo*) eller i kultiverte myocytter (*in vitro*). Det var derimot en tendens til endret uttrykk av flere av genene hvis kvinnene ble analysert separat. Kvinnelige pasienter med T2D hadde tendens til økt uttrykk av CD36/FAT *in vivo*, redusert uttrykk av ADFP både *in vivo* og *in vitro*, redusert uttrykk av PDK4 *in vivo*, redusert uttrykk av MHCI *in vivo* og økt uttrykk av MHCIIa *in vivo* sammenliknet med kvinner med NGT. Det var et signifikant høyere uttrykk av nesten alle genene *in vivo* kontra *in vitro*. Unntaket var TIP47 som var signifikant lavere uttrykt *in vivo* kontra *in vitro*. Det var ingen signifikant forskjell i metabolismen av glukose mellom de to gruppene, men studier av kun kvinnene viste en klar tendens til at myotuber etablert fra kvinner med T2D hadde redusert glukoseoksidasjonskapasitet.

*Diskusjon/Konklusjon:* Resultatene presentert i denne oppgaven viste ingen signifikant forskjell i uttrykket av de overnevnte genene mellom pasienter med NGT og T2D verken i *in vivo* eller *in vitro*-studier. Det var derimot en tendens til at genuttrykket av utvalgte gener i energimetabolismen i muskel fra sykkelig overvektige kvinner med T2D var

forskjellig sammenliknet med sykelig overvektig kvinner med NGT i *in vivo*-studiene. Studier *in vitro* viste dessuten at myotuber etablert fra sykelig overvektige kvinner med T2D bar med seg av noe den samme endringen som var registrert i *in vivo*-studiene. Dette gjorde seg utslag i at disse cellene også hadde noe til lavere uttrykk av ADFP og MHCI og høyere uttrykk av MHCIIa. Endringen i genuttrykket som ellers ble registrert mellom *in vivo* og *in vitro*-studiene kan ha årsak i de store miljøforskjellene som forelå mellom de to systemene.

Resultatene fra denne studien gir en indikasjon på at kvinner og menn bør studeres hver for seg for å øke sjansen til å finne forskjeller som fører til utvikling av T2D. Ved fremtidige studier kan det dessuten være nyttig å etterstrebe et miljø *in vitro* som likner miljøet *in vivo* spesielt med hensyn til energisubstrattilgang. Dette vil kunne fremprovosere de forskjellene som foreligger mellom sykelig overvektige pasienter med T2D og NGT.



## Summary in English

*Introduction:* The prevalence of type 2 diabetes (T2D) is rapidly increasing all over the world. The development of the disease is due to an interaction between our modern lifestyle and a genetic predisposition. It is an increasing knowledge about the genetic context, but so far of low predictive value.

Approximately 80 % of persons with T2D are obese, but only 30 % of patients who undergoing bariatric surgery at The Morbid Obesity Center in Tønsberg have established T2D in spite of extreme obesity. Based on muscle biopsies from these patients, the aim of this study was to try to detect differences in gene expression between patients with normal glucose tolerance (NGT) and T2D in an *in vivo*- and an *in vitro*-system.

*Method:* Muscle biopsies from morbidly obese patients with NGT and T2D, taken during bariatric surgery, were used for this study. RNA was isolated from muscle biopsies for *in vivo* studies and from muscle cells, grown in cultures from the corresponding donor, for *in vitro*-studies. Gene expression of CD36/FAT, CPT1, PDK4, TIP47, ADFP, MHCI, MHCIIa and ATGL was measured by RT real-time PCR and normalized against the reference genes GAPDH and 36B4. Muscle cell ability to metabolize glucose was also measured by flux studies using radioactive labelled glucose. The biopsies were obtained with informed consent and approval by the National Committee for Research Ethics.

*Results:* There was no significant difference in gene expression of the above mentioned genes among morbidly obese patients with NGT and T2D either in muscle biopsies (*in vivo*) or in cultured muscle cells (*in vitro*). There was, however, a tendency of differences in expression of several genes if women were analyzed separately. Muscle from female patients with T2D had a tendency towards increased expression of CD36/FAT *in vivo*, reduced expression of ADFP both *in vivo* and *in vitro*, reduced expression of PDK4 *in vivo*, reduced expression of MHCI *in vivo* and increased expression of MHCIIa *in vivo* compared with women with NGT. There was a significantly higher expression of almost all genes *in vivo* versus *in vitro*. TIP47, however, was significantly lower expressed *in vivo* than *in vitro*. There was no significant difference in the metabolism of glucose between the two groups, but studies of women only showed a clear tendency towards reduced glucose oxidation capacity in myotubes from women with T2D.

*Discussion/Conclusion:* The results presented in this thesis showed no significant differences in the expression of the above mentioned genes between morbidly obese patients with T2D and NGT in either *in vivo* or *in vitro* studies. There was, however, a tendency that morbidly obese women with T2D had a different gene expression compared to morbidly, obese women with NGT in the *in vivo* studies. Studies *in vitro* showed that muscle cells established from morbidly obese women with T2D maintained some of the changes that were detected in the *in vivo* studies. This was reflected as

slightly lower expression of ADFP and MHCI and a higher expression of MHCIIa in these cells. The differences in gene expressions, which generally were registered between *in vivo* and *in vitro* studies, may be explained by major environmental differences between the two systems.

The results from this study provide an indication that women and men should be studied separately in order to increase the opportunity to detect differences that lead to development of T2D. In future studies, it will also be useful to strive for an environment *in vitro* that resembles the environment *in vivo*, particularly with regard to energy substrate access. This could provoke the differences that exist between morbidly obese patients with T2D and NGT.

## Forkortelser

36B4	syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4
ACC	acetyl-CoA karboksylase
ADFP	fettcellerelatert differensieringsprotein
Akt	protein kinase B
AMPK	adenosin monofosfat aktivert protein kinase
ATGL	fett triglyserid lipase
ATP	adenosintrifosfat
BMI	kroppsmasse indeks
BSA	bovint serum albumin
CD36/FAT	"cluster of differentiation 36" /fettsyre translokase
cDNA	komplementær deoksyribonukleinsyre
CGI-58	komparativ genidentifiserer-58
Ci	curie
CO <sub>2</sub>	karbondioksid
CoA	koenzym A
CP	kryssningspunkt
CPT 1B	karnitin palmitoyltransferase B (muskel)
DAG	diacylglyserol
DMSO	dimetylsulfoksid
DNA	deoksyribonukleinsyre
ECM	ekstracellulær matriks
EO	ekstrem overvektig
FATP	fettsyretransporterende protein
FCS	føtalt kalveserum
FFA	frie fettsyrer
GAPDH	glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GLUT	glukosetranspørter
Hb	hemoglobin
HbA1c	glykosylert hemoglobin
IL-6	interleukin 6
IMTG	intramyocellulært triacylglyserol
IR	insulinreseptor
IRS	insulinreseptorsubstrat
JNK	c-jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
LCFA	langkjedede frie fettsyrer
LD	lipiddråper
MHC	myosin tung kjede
mRNA	messenger ribonukleinsyre
NFκB	kjernefaktor κB
NGT	normal glukosetoleranse
O <sub>2</sub>	oksygen
PAT	perilipin, ADFP, TIP47
PDC	pyruvat dehydrogenase kompleks
PDK	pyruvat dehydrogenase kinase
PI3K	fosfoinositid 3-kinase
PIP <sub>2/3</sub>	fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat/ fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfat
REK	Regional etisk komitè
PKB	proteinkinase B (Akt)
PKC	proteinkinase C
RNA	ribonukleinsyre
RPM	omdreining per minutt
RT real-time	PCR revers transkriptase real-time polymerase kjedereaksjon
SkGM	skjelettmuskelcelle vekstmedium
SIV HF	Sykehuset i Vestfold helseforetak
SSO	Senter for sykelig overvekt
T2D	type 2-diabetes
TAG	triacylglyserol

TCA	trikarboksylysyresyklus (krebssyklus)
TIP47	"tailor interacting protein of 47 kDa"
TNF $\alpha$	tumornekrosefaktor $\alpha$
WHO	verdens helseorganisasjon

# 1 Innledning

Type 2-diabetes (T2D) mellitus er den vanligste metabolske sykdommen på verdensbasis og utløses både av miljørelaterte og genetiske faktorer. Nærmere 80 % av pasienter som har konstatert T2DM er overvektige (kroppsmasseindeks (BMI) $>25 \text{ kg/m}^2$ ) [1]. Dette er en klar indikasjon på at overvekt er en risikofaktor for utvikling av sykdommen. Ved senter for sykkelig overvekt (SSO) ved Sykehuset i Vestfold helseforetak (SIV HF) opereres ca. 200 ekstremt overvektige (BMI $>40 \text{ kg/m}^2$ ) årlig. I overkant av 30 % av disse pasientene har T2D [2].

Årsaken til utvikling av insulinresistens og T2D er foreløpig ikke kartlagt i detalj. Det er akkumulering av bevis for at intermediære fettsyrer fra fettsyremetabolismen hopper seg opp i vev utenom fettvevet og spiller en sentral rolle ved utvikling av sykdommen. Spesielt sees dette i skjelettmuskulatur [3]. Skjelettmuskulatur står for  $>80 \%$  av det insulinstimulerte glukoseopptaket og er derfor sentral i patogenesen for insulinresistens og T2D.

T2D er en heterogenetisk sykdom og kunnskap om den genetiske arkitekturen er stadig økende [4]. Men foreløpig forklarer disse funnene bare en liten del av risikoen for utvikling av sykdommen og har dermed liten klinisk relevans.

## 1.1 Overvekt og fedme

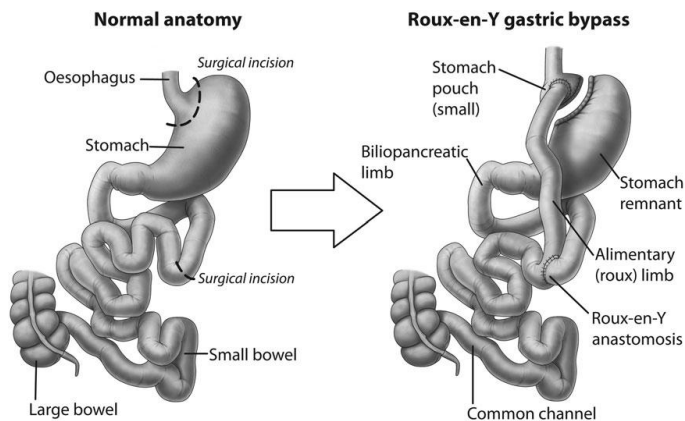
Overvekt er et økende problem og kan karakteriseres som en epidemi på verdensbasis med over 1,5 milliard overvektige (voksne over 20 år) [5]. Problemet er også økende for barn og i 2010 registrert WHO 43 millioner overvektige barn under 5 år. Tidligere var fedme og overvekt knyttet til industrialiserte land med høyt inntektsnivå, men denne forskjellen viskes stadig mer ut [5]. Overvekt og fedme er en stor risikofaktor for flere alvorlige sykdommer som blant annet T2D, kardiovaskulære sykdommer (hjertesykdommer og hjerneslag) og noen former for kreft (endometrie, tykktarm og brystkreft) og er nå en av de største årsakene til dødelighet verden over [6].

Ved karakterisering av overvekt og fedme benyttes som oftest BMI, definert som vekt i kilo delt på høyden i meter i andre ( $\text{kg/m}^2$ ). BMI over  $25 \text{ kg/m}^2$  er definert som overvekt og BMI over  $30 \text{ kg/m}^2$  som fedme. Sykelig overvekt defineres med BMI  $\text{kg/m}^2$  over  $40 \text{ kg/m}^2$  (ekstrem overvekt) eller BMI over  $35 \text{ kg/m}^2$  med følgesykdom som hypertensjon og T2D [5].

Årsaken til fedme og overvekt er blant annet en global endring i inntak av energirik mat som inneholder mye mettet fett og sukker og lite vitaminer og mineraler. Dette vil samtidig med lite fysisk aktivitet, mer stillesittende arbeid og økt urbanisering føre til en

ubalanse i kaloriinntak og kaloriforbruk. Dette vil igjen føre til lagring av energi i form av fett [5].

Tiltak for å redusere antall overvektige og fete er først og fremst livsstilendringer, men dette er ofte ikke nok for dem som er definerte som sykkelig overvektige. Kirurgiske inngrep (Roux-en-Y gastric bypass, figur 1.1) har vist seg å være en behandlingsform med god effekt for denne gruppen pasienter med påfølgende sterk reduksjon av både vekt og overvektsrelaterte sykdommer [6].



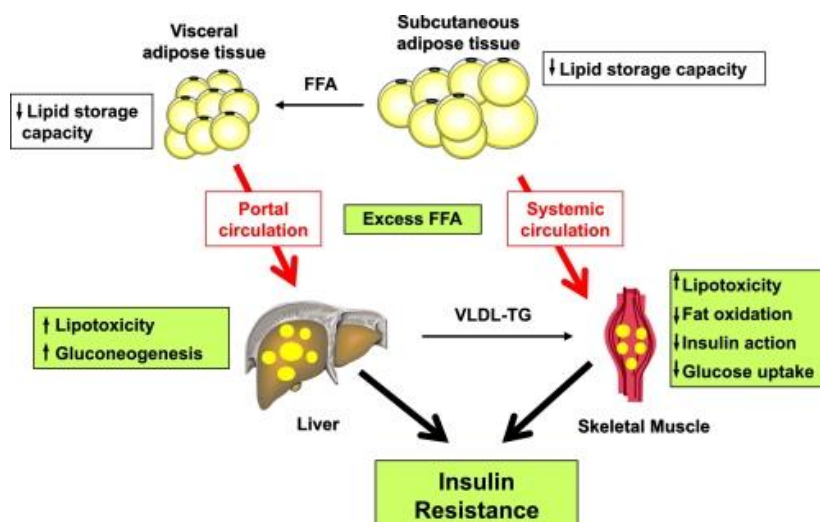
**Figur 1.1 Roux-en-Y gastric bypass.** Tynntarmen og magesekken rearrangeres. Magesekken kuttes slik at kun en liten bit er gjenværende. Denne kobles deretter på tynntarmen (jejunum) [7].

## 1.2 Insulinresistens og T2D

T2D er en kronisk, metabolsk sykdom. På verdensbasis er T2D den vanligste formen for diabetes og utgjør 90 % av alle diabetestilfellene [8]. Sykdommen kommer snikende og oppdages ofte ikke før komplikasjoner har intruffet. En ubehandlet diabetestilstand er skadelig for mange av kroppens systemer, spesielt nerver og blodårer.

Forekomsten av T2D har økt betydelig de siste 15-20 årene og spesielt blant unge voksne. Dette har sannsynligvis en sammenheng med en sterk økning av kroppsvekten. WHO ser på den raske økningen av T2D som en epidemi og regner med en økning i dødeligheten med årsak i T2D på mer enn 50 % de neste tiårene [8].

Patogenesen styres både av genetiske og miljørelaterte faktorer, og det har vist seg at det er visceral fedme som er spesielt ugunstig (fig 1.2) [9].



**Figur 1.2 Fettindusert insulinresistens:** Opphoping av lipider i insulinfølsomt vev vil påvirke insulinets funksjon og føre til insulinresistens og nedsatt glukosetoleranse. FFA; frie fettsyrer, VLDL-TG; Very low density lipoprotein-triglyserid [10].

Et av de tidligste funnene ved T2D er utvikling av insulinresistens [11]. Insulinresistens er definert som en defekt i insulinets funksjon. Hormonet vil ikke lenger kunne nedregulere hepatisk glukosefrigjøring og heller ikke fremme perifert glukoseopptak. Dette kan kompenseres ved at  $\beta$ -cellene i pancreas øker produksjonen og utskillelsen av insulin slik at resultatet blir hyperinsulinemi.

Det er en akseptert teori at insulinresistens er et resultat av lipotoksisitet hos overvektige [12]. Økt konsentrasjon av frie fettsyrer (FFA) i plasma og akkumulering av intramuskulært triacylglyserol (IMTG) sees generelt hos overvektige personer [13]. Man antar at det ikke er opphoping av IMTG i seg selv som er årsaken til utvikling av insulinresistens, men opphoping av lipidmetabolitter fra nedbryting av IMTG som fører til at insulinkaskaden følger en anormal reaksjonsvei. Diacylglyserol (DAG) og ceramider er lipidmetabolitter som kan hemme insulinsignalet på ulike måter. DAG kan aktivere flere isoformer av protein kinase C (PKC). Dette vil hemme signalet fra insulinreseptoren ved at PKC fosforylerer insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1) på en serin/treonin-enhet og dermed inaktiverer signalet fra reseptoren [14]. Ceramider kan føre til insulinresistens ved å hindre insulinstimulert Akt-fosforylering [14]. I tillegg kan ceramider aktivere inflammatoriske signalveier ved å aktivere både c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) og nukleær faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) og som også har vist seg å være involvert i utvikling av insulinresistens [15].

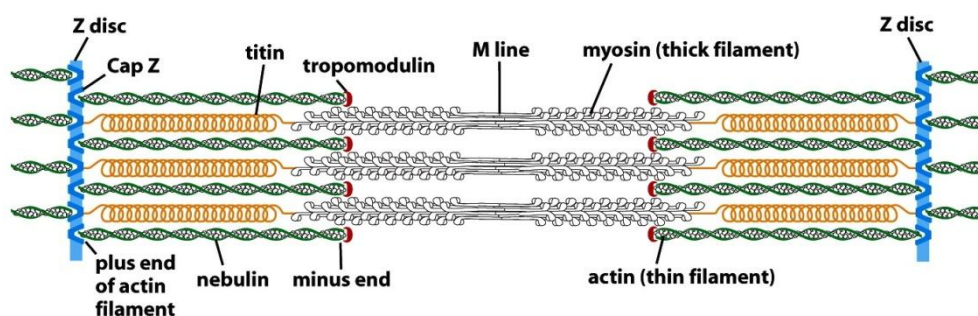
### 1.3 Skjelettmuskulatur

Skjelettmuskulatur står for ca 20 % av kroppens totale energiforbruk ved hvile og ~70 % under fysisk aktivitet, og er ansvarlig for >80 % av kroppens insulinstimulerte

glukoseopptak fra blodbanen [16]. Muskelvev inneholder mer glykogen enn lever og dessuten tar muskel opp store mengder med sirkulerende lipider og inneholder derfor store lagre av fett i form av triacylglyserol (TAG). Akkumulering av TAG og redusert kapasitet for oksidering av fett har vist seg å føre til utvikling av insulinresistens i skjelettmuskulatur [17]. Eksakt mekanisme på hvordan store lagre av kroppsfett påvirker substratmetabolismen i skjelettmuskulatur er foreløpig ikke klarlagt [18]. Fettvev utskiller flere typer adipokiner og flere av disse kan være viktige aktører i forbindelse med akkumulering av TAG og utvikling av insulinresistens. Resistin og tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) er med på å redusere insulinsensitiviteten, mens leptin og adiponektin øker fettsyreoksidasjonen og reduserer TAG-lagerene. Hvordan de ulike adipokinene bidrar til utviklingen av insulinresistens og T2D er kompleks og er foreløpig mangelfull [19]. Det vil derfor bli fokusert på lipidenes og ikke adipokinenes rolle i utviklingen av T2D i denne oppgaven.

### 1.3.1 Skelettmuskelens oppbygning

Skjelettmuskulatur består av ulike muskelfibre med ulike strukturer, molekylær sammensetning og funksjonelle egenskaper. Dette er viktig med hensyn til muskelens fysiologi og fleksibilitet. Muskelfibre består av funksjonelle enheter som kalles sarkomerer (figur 1.3). Hver sarkomer består av myosin (tykke filamenter) og aktin (tynne filamenter). Det er interaksjonen mellom disse proteinene som fører til muskelkontraksjon.

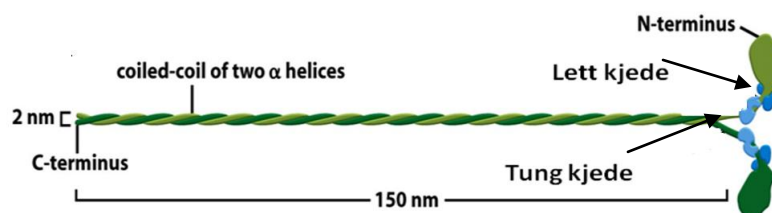


**Figur 1.3 Sarkomer:** Forkortelse av sarkomere (muskelkontraksjon) skjer ved at myosinfilamentene sklir langs aktinfilamentene [20].

Myosin består av tunge og lette polypeptidkjeder (figur 1.4) og nåværende dominerende klassifiseringssystem for muskelfibre er basert på ulike isoformer av myosinets tunge kjede (MHC). Humane muskelfibre har tre ulike isoformer; MHC I (type I), MHC IIa (type IIA) og MHC IIx/d (type IIB). Muskelens fysiologiske egenskaper er knyttet til fibertypen, hvor type I-fibre kontraherer langsomt og type II raskt. Type I har høy oksidativ kapasitet og bruker fortrinnsvis lipider som brennstoff ved hvile og moderat aktivitet. Type IIB er glykolytiske og bruker mest glukose og glykogen som brennstoff. Type IIA



har en oksidativ kapasitet som ligger mellom type I og type IIB [21]. Skjelettmuskulatur består av en blanding av de ulike muskelfibrene. Human muskulatur består for det meste av en blanding type I og type IIA og en mindre andel type IIB [21]. En studie på *vastus lateralis* (lårmuskel) tatt fra utrente, friske menn og kvinner i 20-årene viste at sammensetningen av de ulike muskelfibertypene varierte mellom menn og kvinner. Menn hadde mer av type IIA i forhold til type I og en mindre andel type IIB, mens kvinnene hadde mest av type I i forhold til type IIA og en mindre andel type IIB [22]. Det er vist tidligere at det kan være en sammenheng mellom den relative prosentandelen av type II fibre i forhold til type I fibre og utvikling av fedme og insulinresistens/T2D [23], og at både miljørelaterte og genetiske faktorer kan påvirke muskelfibersammensetningen [24]. Muskelfibre kan både øke i volum og skifte fibertypesammensetning under påvirkning. Dette gjør muskelen i stand til å forandre seg i forhold til ulike funksjonelle krav for eksempel knyttet til trening og rehabilitering. Fibertypeovergang fra type IIB til IIA er den mest vanlige, men overgang fra type I til type II og omvendt er også mulig [25].



**Figur 1.4 Myosin:** Myosin dannes av seks polypeptidkjeder, to tunge og fire lette kjeder. De tunge kjedene danner en tvinnet halestruktur (coiled-coil) med myosinhoder i enden som interagerer med aktin og fører til kontraksjon. De tunge kjedene i myosinhodene inneholder også et ATP-bindende sete og fungerer som et enzym for hydrolyseringen av ATP til ADP+Pi og frigjøring av energi nødvendig for muskelkontraksjon [25].

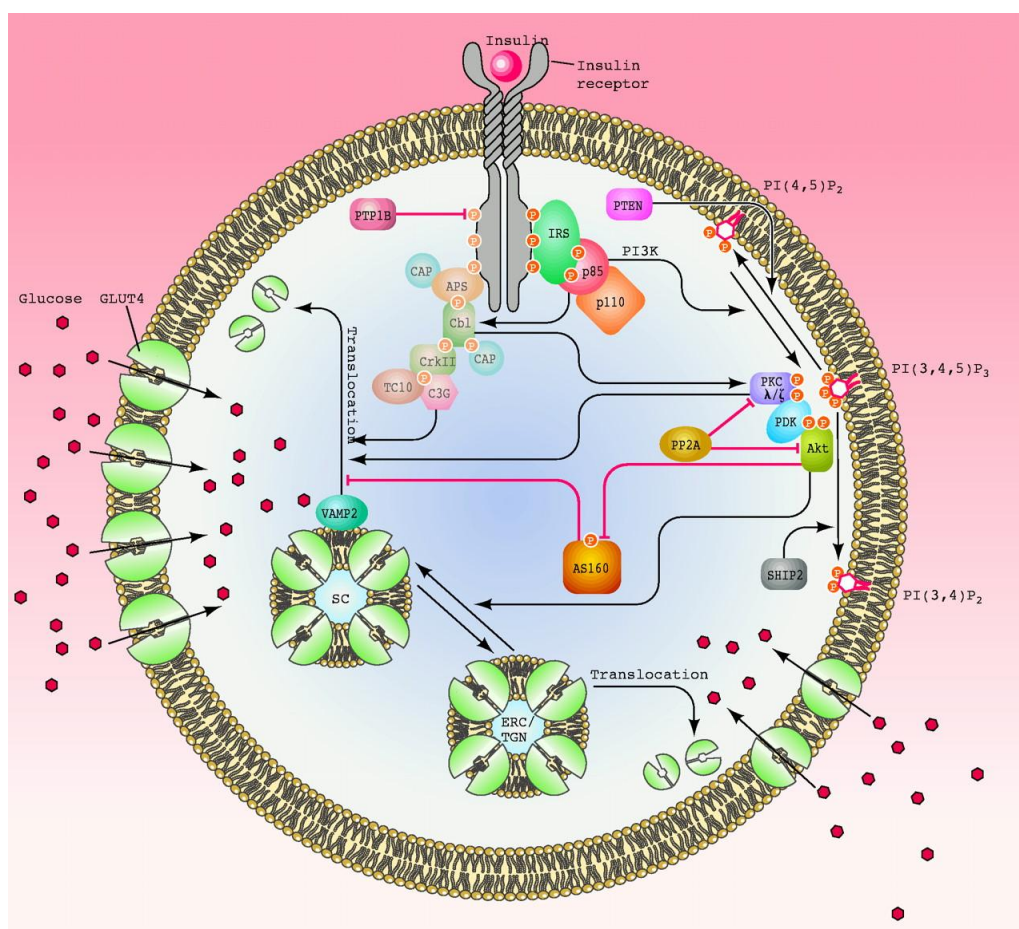
En viktig egenskap hos skjelettmuskulatur er at den er metabolsk fleksibel. Dette er definert som muskelens evne til å bytte mellom oksidering av fett ved faste til oksidering av glukose ved ernært tilstand. Ved T2D er denne egenskapen endret [26]. Hyperglykemi sees ved insulinresistens og studier har vist at dette kan føre til nedsatt oksidasjon av fettsyre og dessuten en mulig årsak til utvikling av en infleksibel muskulatur hos personer med T2D [27]. Denne muskulaturen vil ved behov ha en redusert evne til å bytte mellom glukoseoksidering og fettsoksidering [28].

### 1.3.2 Insulinets funksjon på skjelettmuskulatur

Insulinstimulert glukoseopptak i skjelettmuskulatur er en viktig del av kroppens evne til å opprettholde den totale glukosebalansen. Glukosetransportør isoform 4 (GLUT4) er den viktigste transportøren ved regulert glukoseopptak både som respons på hormoner som insulin og som respons på stimuli (trening/muskelkontraksjon) [29]. Kontraksjonsmediert glukoseopptak aktiveres av andre signalveier enn insulin, og blir ikke påvirket av

tilstander som insulinresistens. Dette er sannsynligvis årsaken til at fysisk aktivitet kan være nyttig ved behandling av T2D [30].

Glukoseopptak i skjelettmuskelceller skjer ved fasilitert diffusjon ned en konsentrasjonsgradient. Denne prosessen blir mediert av spesifikke glukosetransportører, primært isoform 4 (GLUT4). Ved basal tilstand er kun 3-10 % av GLUT4 lokalisert i plasmamembranen, mens >90 % er lokalisert i intracellulære vesikler (figur 1.5) [31]. Ved insulinstimulering og muskelkontraksjoner vil GLUT4 translokere til plasmamembranen. Insulinet utøver sin funksjon ved å binde seg til insulinreseptoren (IR). Dette fører til en konfigurasjonsendring i reseptorens intracellulære domene og til en aktivering av reseptorens intracellulære tyrosin kinase (fig 1.5). Denne kinasen vil deretter kunne fosforylere insulinreseptorsubstrater (IRS). Det er identifisert tre ulike IRS hos mennesker (IRS-1, IRS-2, og IRS-4) [31]. Disse har ulikt ekspresjonsmønster i ulike vev, og IRS-1 har vist seg å være viktigst ved insulinavhengig translokering av GLUT4 i muskulatur [32]. Fosforylert IRS-1 vil aktivere fosfoinositid 3-kinase (PI3K) ved å binde seg til den regulatoriske enheten på dette enzymet. PI3K vil fosforylere fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) og danne fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfat (PIP<sub>3</sub>). Dette fører til aktivering av PIP<sub>2</sub>/PIP<sub>3</sub>-avhengig kinase (PDK1). PDK1 vil deretter fosforylere og aktivere Akt/protein kinase B (PKB) [33]. Aktivert Akt vil deretter fosforylere "Akt-substrate of 160kDa" (AS160). AS160 er et Rab GTPase-aktiverende protein og tidligere studier har vist at dette proteinet inaktiverer Rab-proteiner lokalisert på GLUT4-inneholdende vesikler og dermed hindre eksocytose og translokering av GLUT4 [34]. Fosforylering vil føre til inaktivering av AS160. Dette vil opphøre hemmingen av Rab-proteiner slik at GLUT4 kan translokere fra vesiklene til plasmamembranen (figur 1.5). I tillegg er Akt en viktig mediator for syntese av glykogen og fettsyrer [35].



**Figur 1.5 Insulinstimulert glukoseopptak:** Når insulin bindes til insulinreseptoren vil IRS-1 fosforyleres på en tyrosinenhet som igjen vil aktivere PI3K/Akt- kaskaden. Dette vil tilslutt føre til translokering av GLUT 4 fra intracellulære vesikler til membranen. APS: adptorprotein assosiert med plekkstrin homlogi og SH2 domener, AS160: Akt substrat på160 kDa, CAP: c-Cbl-assosiert protein, C3G: Crk SH3-bindende guanine nukleotid-frigjørende faktor, ERC: endosomal resirkulerende enhett, IRS: insulin reseptor substrat, PDK: fosfoinositid-avhengig kinase, PI3K: fosfoinositide 3-kinase, PI(3,4)P2: fosfatidylinositol-3,4-bisfosfat, PI(3,4,5)P3: fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfat, PI(4,5)P2: fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat, PP2A: protein fosfatase 2A, PTP1B: protein tyrosin fosfatase 1B, PTEN: fosfatase og tensin homolog, SC: spesialisert enhet, SHIP2: SH2-inneholdende inositol fosfatase 2, TGN: trans-Golgi nettverk, VAMP2: vesikel-assosiert membranprotein2 [31].

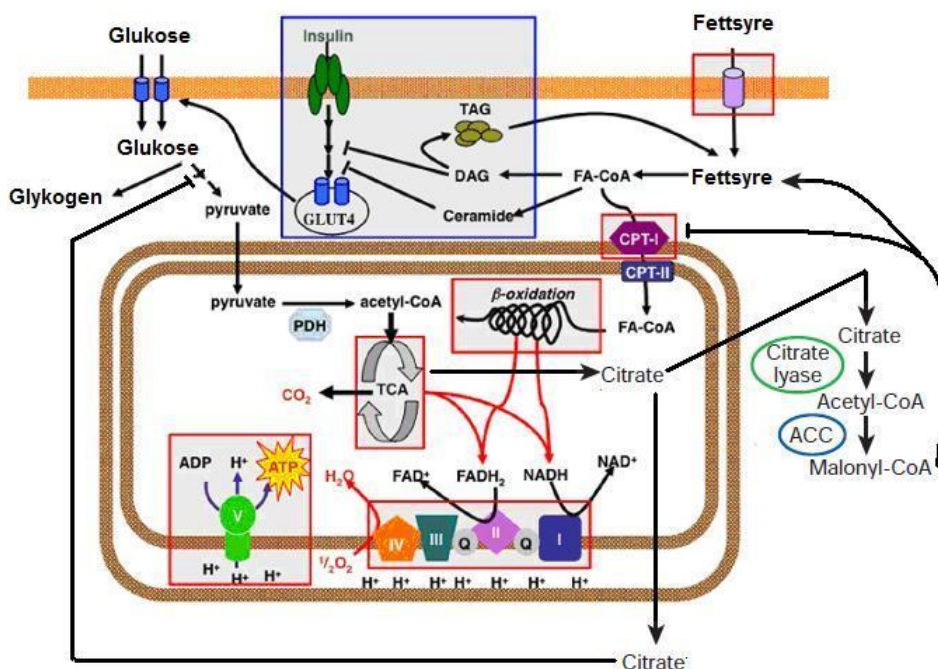
### 1.3.3 Metabolisme av glukose i skjelettmuskulatur

Glukose vil raskt bli fosforylert intracellulært av heksokinase og omdannet til glukose 6-fosfat (figur 1.6). Heksokinaseaktiviteten varierer med muskelfibertype og høyest aktivitet er funnet i type I fibre [36]. Glukose 6-fosfat kan bli oksidert videre for energiproduksjon via glykolyse, Krebs syklus og elektrontransportkjeden eller brukt til dannelsen av glykogen for lagring.

Metabolismen av glukose 6-fosfat via glykolyse hemmes ved faste og stimuleres av insulin og fysisk aktivitet. Glykolyse i cytoplasma består av biokjemiske reaksjoner hvor glukose omdannes til pyruvat og laktat. I glykolytisk muskulatur (MHC II) med lav oksidativ kapasitet, vil mye av pyruvat som dannes under glykolyse bli omdannet til

laktat. I oksidativ muskulatur vil pyruvat som dannes etter glukoseopptak bli dekarboksylert til acetyl-CoA og videre fullstendig oksidert i mitokondrier [37]. Glykolysen reguleres av hormoner (insulin, glukagon) og cellens energibehov (ATP/AMP-ratio). Glykolysen er viktig både for dannelsen av pyruvat og for dannelsen glyserol 3-fosfat som er viktig for lipogenesis (TAG-syntese).

I mitokondriene vil pyruvat dehydrogenase omdanne pyruvat til acetyl-CoA. Acetyl-CoA bindes til oksaloacetat og danner citrat som går inn i Krebs syklus (figur 1.6). Denne syntesen katalyseres av citrat syntetase. Hvis produksjonen av acetyl-CoA, fra degradering av pyruvat og fra  $\beta$ -oksidasjonen av fettsyrer, overskrider kapasiteten i Krebs syklus, vil noe av acetyl-CoA bli transportert ut til cytosol som citrat. Her blir det spaltet til acetyl-CoA og oksaloacetat. Denne cytoplasmatiske andelen av acetyl-CoA kan deretter bli brukt til syntese av malonyl-CoA som er en inhibitor for transport av fettsyrer inn i mitokondrier (figur 1.6).



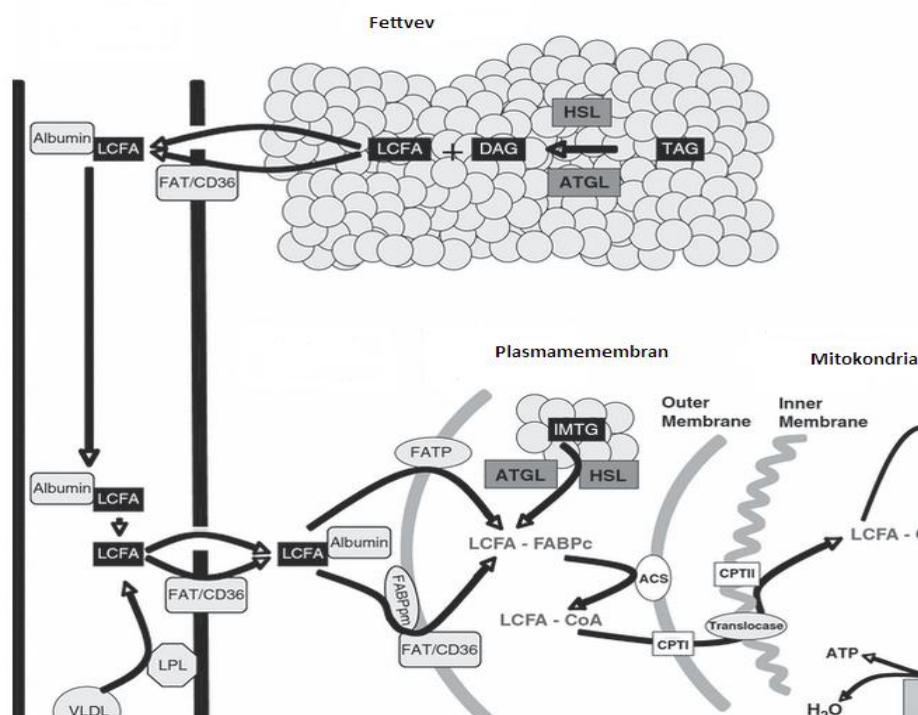
**Figur 1.6: Metabolisme av glukose og lipider:** Acetyl-CoA karboksylase (ACC), adenosin difosfat (ADP), adenosin trifosfat (ATP), carnitine palmitoyltransferase 1 (CPTI), carnitine palmitoyltransferase 2 (CPTII), diacylglycerol (DAG), fettsyre-koenzym A (FA-CoA), flavin adenindinukleotid (FAD), redusert form av FAD (FAD<sub>2</sub>), glukosetransportør 4 (GLUT4), nicotinamid adenin dinukleotid (NAD), redusert form av NAD (NADH), triacylglycerol (TAG), tricarboxylic acid cycle (TCA, krebsyklus), Pyruvat dehydrogenase (PDH). Modifisert fra [38].

### 1.3.4 Metabolisme av lipider i skjelettmuskulatur

Frigjøringen av langkjedede frie fettsyrer (LCFA) fra omliggende fettvev og opptak og oksidering i muskel involverer mange regulatoriske trinn inkludert: lipolyse og LCFA frigjøring fra fettvev, transport av LCFA via blodbanen til muskulatur, transport over

plasmamembranen, lipolyse av intramuskulært triacylglyserol (TAG), aktivering av LCFA ved kobling til CoA, transport til mitokondrier, transport over mitokondriemembranen og tilslutt fullstendig oksidering til adenosin trifosfat (ATP) og vann.

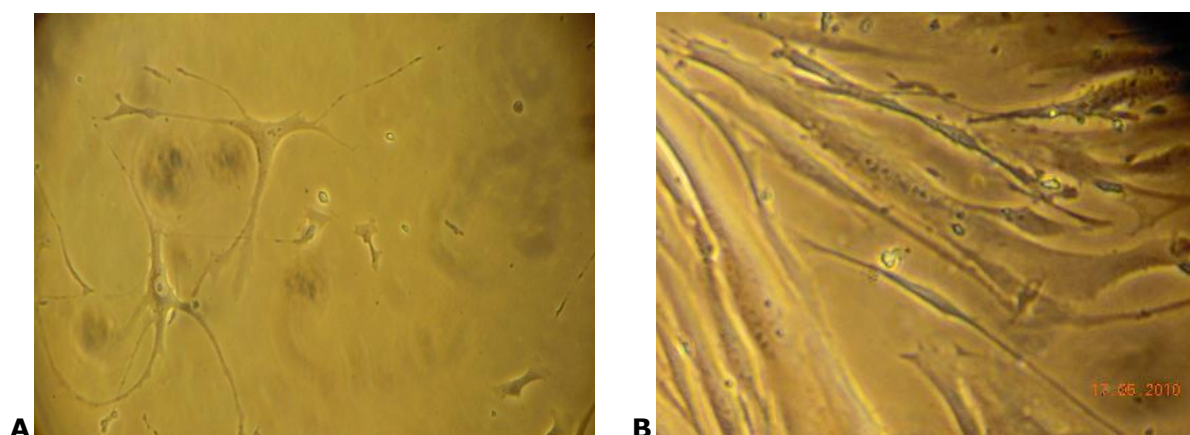
Det er en klar sammenheng mellom akkumulering av lipider intramuskulært og utvikling av overvekt og T2D. Forbruk av intramuskulært triacylglyserid (TAG) er en balanse mellom lipolyse og lipidsyntese og begge er avhengig av oksidering av fett i mitokondrier og av tilgang på LCFA via blodbanen (figur 1.7). Økt mengde frie fettsyrer (FFA) i plasma er assosiert med insulinresistens og aktivering av inflammatoriske prosesser [17]. En defekt i fettsyreoksidasjonen resulterer i akkumulering av TAG og intracellulære lipidmetabolitter som DAG og ceramider. Disse kan som tidligere nevnt aktivere serin/treonin-kinaser (JNK, NFκB og PKC) som igjen er ansvarlig for inaktivering av signalet fra insulinreseptoren. Resultatet blir redusert glukosetransport og nedsatt glykogensyntese.



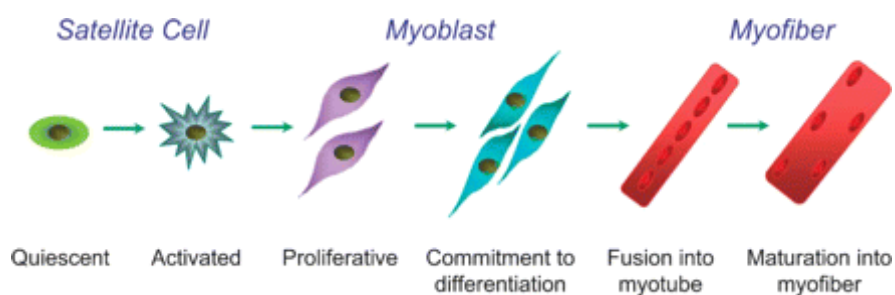
**Figur 1.7 Ulike trinn ved regulering av LCFA (long chain fat acid) oksidasjonen:** LCFA frigjøres ved lipolyse av fettvev og fraktes via blodbanen bindet til albumin. LCFA transporteres via blodbanen til muskelceller og deretter over plasmamembranene ved hjelp av FABPpm og FAT/CD36 og FATP. LCFA vil enten lagres i lipiddråper som IMTG eller bli aktivert med CoA for deretter å bli transportert til mitokondrier og fullstendig oksidert til ATP og vann. Adipose triglyserid lipase (ATGL), hormon sensitiv lipase (HSL), triacylglyserol (TAG), diacylglyserol (DAG), langkjedet fettsyre (LCFA), fettsyre transportprotein (FATP), plasmamembranassosiert fettsyrebindende protein (FABPpm), fettsyre translokase (FAT/CD36), cytosolisk fettsyrebindende protein (FABPc), very low-density lipoprotein (VLDL), lipoprotein lipase (LPL), carnitine palmitoyltransferase-I (CPTI), carnitine palmitoyl transferase-II (CPTII), adenosintrifosfat (ATP). Modifisert fra [39].

## 1.4 Skjelettmuskelceller som *in vitro*-modellsystem

Skjelettmuskelceller i kultur er et mye brukt *in vitro*-system for å studere ulike funksjoner i muskelceller. Disse kulturene etableres ved å isolere satelittceller fra muskelvev. Satelittceller er mononukleære progenitorceller som kan gi opphav til dannelse av ny muskulatur. *In vivo* er disse lokalisert under basale lamina og aktiveres ved skader, sykdom eller ved trening. Isolerte satelittceller kan aktiveres *in vitro* til myoblaster (figur 1.8 A). Disse cellene har mulighet til å proliferere og differensiere. Ved differensiering vil det dannes multinukleære myotuber ved at myoblaster fusjonerer med hverandre (figur 1.8 B). Dette vil tilsutt føre til dannelse av muskelfibre (fig 1.9).



**Figur 1.8:** A: Myoblaster fra sykeliq overvektige pasienter etablert i kultur, B: Differensierte myotuber fra sykeliq overvektige pasienter etablert fra sykeliq overvektige pasienter etablert i kultur. Bildet ble tatt med digitalkamera gjennom mikroskopets okolar (40x linse).



**Figur 1.9 Myogenese:** Satelittceller aktiveres til myoblaster som deretter prolifererer og differensierer til myotuber og til slutt danner nye muskelfibre. Modifisert fra [40].

Tidligere studier har vist at kultiverte myotuber har liknende egenskaper som muskler *in vivo* [41]. Metoden gjør det derfor mulig å studere muskelens metabolske og biokjemiske egenskaper under nøye kontroll av det ekstracellulære miljøet.

Studier utført på myotuber etablert fra pasienter med T2D har vist at cellene bevarer sitt fenotypiske uttrykk og egner seg dermed godt som et *in vitro*-system for videre studier vedrørende denne sykdommen [41]. Tidligere studier har også vist at det er mulig å skille mellom ervervede og genetiske effekter på metabolske prosesser som er påvirket ved T2D ved å bruke dette modellsystemet [42].

## 1.5 Genuttrykkstudier

Det er gjennomført mange studier i søket etter en genetisk forklaring på hvordan insulinresistens og T2D utvikles. Globale mRNA profiler har gitt verdifull informasjon om potensielle, mulige forandringer i genuttrykket, men funnene er foreløpig av lav prediktiv verdi og forklarer bare en liten del av risikoen for utvikling av sykdommen [35, 43].

Arveligheten for T2D regnes likevel for å være høy (>50 %) og er estimert på bakgrunn av studier av monozygote tvillinger og på studier av første generasjonsseleksjoner [44]. Genomvide assosiasjonsstudier (GWAS) har vært med på å identifisere mer enn 40 diabetesassosierte loci [45]. Det er flere assosiert med redusert  $\beta$ -cellefunksjon (*KCNJ11*, *TCF7L2*, *WFS1*, *HNF1B*, *SLC30A8*, *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *NOTCH2*, *CAMK1D*, *THADA*, *KCNQ1*, *MTNR1B*, *GCKR*, *GCK*, *PROX1*, *SLC2A2*, *G6PC2*, *GLIS3*, *ADRA2A*, og *GIPR*) sammenliknet med redusert insulinsensitivitet (*PPARG*, *IRS1*, *IGF1*, *FTO*, og *KLF14*) og overvekt (*FTO*). Av disse er det mutasjoner i *TCF7L2*, assosiert med  $\beta$ -celle dysfunksjon, som har vist seg å ha størst effekt på utvikling av T2D. *TCF7L2* koder for en transkripsjonsfaktor i Wnt-veien og induserer dermed transkripsjonen av en rekke gener. Totalt sett er det likevel bare 10 % av T2D-tilfellene som kan identifiseres av en identifisert sårbarhetsregion, så langt med liten effekt fra hvert locus.

Flere studier viser at fettsyremetabolismen spiller en viktig rolle for utvikling av insulinresistens og T2D. Det er derfor valgt å studere genuttrykket av viktige aktører i fettsyremetabolismen i denne oppgaven. Det er i tillegg valgt å se på uttrykket av viktige mitokondrielle enzymer som regulerer samspillet mellom lipidmetabolismen og glukosemetabolismen og dessuten uttrykket av muskefibertypesammensetningen som også har vist seg å ha ulik favorisering av type energisubstrat [46].

### 1.5.1 CD36/FAT

Fettsyrer transporteres inn i muskelceller via passiv diffusjon og via proteinmedierte mekanismer. Flere fettsyretransportører er blitt identifiserte, men "cluster of differentiation 36"/ fettsyretranslokase (CD36/FAT) regnes som en nøkkeltransportør for fettsyrer inn i muskelceller [39]. CD36/FAT er et glykosylert transmembranprotein med minst to transmembrane domener og uttrykkes proporsjonalt med fettsyreoksidasjonen [47]. CD36/FAT er lokalisert i plasmamembranen, i subcellulære domener og dessuten i

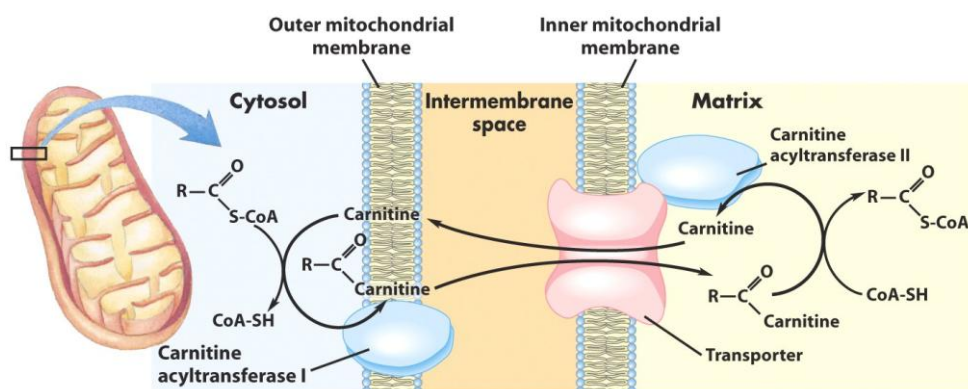
mitokondriemembranen [32]. Tidligere studier har vist at CD36/FAT har en viktig rolle sammen med karnitin palmitoyl transferase 1 (CPT1B) ved transport av fettsyrer over mitokondriemembranen [48]. Eksakt mekanisme for hvordan signalet for translokering av CD36/FAT fra intracellulære vesikler til plasmamembranen og mitokondriemembranen indueres, er foreløpig manglende, men det antas at adenosin monofosfat aktivert protein kinase (AMPK)-aktivering og cellens energistatus bidrar til translokeringen [49].

Konstant tilgang på høye konsentrasjoner av fettsyrer fra sirkulasjonen forbindes med konstant relokalisering av FAT/CD36 til plasmamembranen hos overvektige personer [39]. En akutt translokering av proteinet sees også ved muskelkontraksjon og ved insulinstimulering [50]. Ved trening økes fettsyreoksideringen og studier har vist at dette blant annet skyldes et økt innhold av CD36/FAT i mitokondriemembranen [51]. Hvordan CD36/FAT sitter i de ytre mitokondriemembranene og eksakt funksjon er foreløpig ikke klarlagt. Noen studier viser at CD36/FAT fungerer i tett samarbeid med CPT1B [39]. En annen forskningsgruppe mener å kunne vise at proteinet ikke er i direkte kontakt med CPT1B, men er lokalisert oppstrøms for long-chain fatty acid acyl-CoA syntetase (LCFA acyl-CoA syntetase) på ytre mitokondriemembran og at hovedfunksjonen er å overføre long chain fatty acid-CoA (LCFA-CoA) til CPT1B [52].

### 1.5.2 CPT1B

Karnitin palmitoyl transferase 1 (CPT1B) er et transmembranprotein lokalisert i ytre mitokondriemembran (figur 1.10). CPT1B regnes som et nøkkelenzym i fettsyreoksidasjonen og har vist seg å kunne ha betydning for utvikling av insulinresistens og T2D [53]. Proteinets eksponering er aktivert ut i cytosol og bytter ut CoA-gruppen i LCFA-acyl-CoA med karnitin. Det dannes LCFA-acylkarnitin som transporteres videre over den indre mitokondriemembranen av karnitin acylkarnitin translokase. I mitokondriens matriks vil karnitin palmitoyl transferase 2 (CPT2) bytte ut karnitingruppen med CoA-grupper og karnitin blir fraktet tilbake til cytosol (fig 1.10). LCFA-acyl-CoA vil gå videre inn i  $\beta$ -oksidasjonen som er det første trinnet i en fullstendig nedbrytning av fettsyrer og syntese av ATP.





**Fig 1.10: CPT1B og dens funksjon i mitokondrier.** I ytre mitokondriemembran vil CPT1 erstatte CoA-gruppen på LCFA -acyl-CoA med karnitin. LCFA-acylkarnitin vil videre bli fraktet over den indre mitokondriemembranen via acylkarnitin translokase. CPT2 i cytosol vil deretter erstatte karnitin med CoA. Langkjedet fettsyre (LCFA), karnitin palmitoyl transferase (CPT) [54].

I mammalske celler finnes CPT1B i 3 ulike isoformer avhengig av hvilket vev de uttrykkes i. CPT1BA uttrykkes hovedsakelig i lever, CPT1BB hovedsakelig i muskel og CPT1BC i hjerne/testis. Alle isotypene finnes også i mindre grad uttrykt i andre typer vev.

Malonyl-CoA inhiberer CPT1B aktiviteten ved å binde seg til CPT1B og sterisk hindre enzymaktivitet. Malonyl-CoA er det initierende produktet i dannelsen av lipider *de novo* (figur 1.11) og består av to grupper acetyl-CoA. Dannelsen av malonyl-CoA katalyseres av acetyl-CoA karboksylase 2 (ACC2). ACC2-aktiviteten reguleres av AMPK som fosforylerer ACC på serin enheter. Dette vil inaktivere enzymet og dermed hemmes produksjonen av malonyl-CoA. Denne prosessen kan reverseres av fosfataser og aktiviteten til malonyl-CoA vil derfor raskt kunne skifte ved ulike energibehov [53].

Studier har rapportert om økt mengde av malonyl-CoA i skjelettmuskulatur fra pasienter med T2D noe som vil føre til redusert oksidasjon av fettsyrer ved økt CPT1B inhibering [55]. Inhibering av CPT1B har dessuten vist seg å føre til akkumulering av fett i muskulatur og senere til utvikling av insulinresistens [56].

### 1.5.3 TIP47 /ADFP

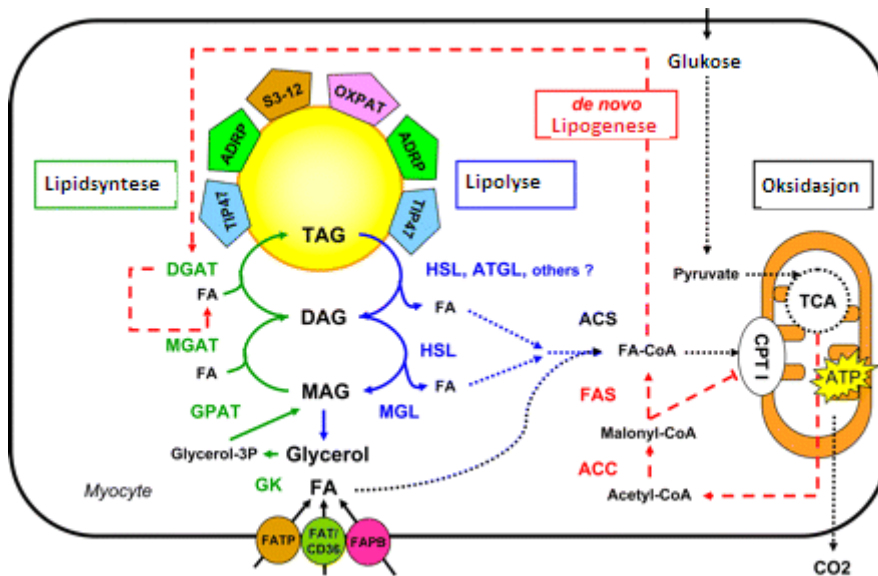
Ved ektopisk fettakkumulering sees opphoping av lipider intracellulært i lipiddråper i vev utenom fettvev. Disse fettdråpene har vist seg å ha stor betydning for utvikling av metabolsk syndrom og T2D [57]. Lipiddråpene består av en kjerne med nøytrale lipider, hovedsakelig triacylglyserol (TAG) og kolesterolestere (figur 1.11). Denne kjernen er dekket med en ytre kappe bestående av fosfolipider, kolesterol og assosierte proteiner. Kappen inneholder minst en type PAT protein (perilipin, ADFP, TIP47). Disse proteinene beskytter TAG mot ukontrollert nedbryting ved å hindre lipasers tilgang til kjernen. PAT familien består av 5 medlemmer: perilipin, fettcellerelatert differensieringsprotein (ADFP), tail interacting protein of 47 kDa (TIP47), S3-12 og PAT-1. PAT proteinene har

ulike vevsspesifisitet. Perilipin og S3-13 finnes kun i fettvev og steroidogent vev, mens ADFP og TIP47 stort sett er jevnt fordelt i alt annet vev [58].

ADFP er hovedproteinet i lipiddråper i celler utenom fettceller og økt uttrykk sees ved ektopisk akkumulering av nøytrale lipider [58], mens redusert uttrykk er registrert hos insulinresistente personer [59]. Mens ADFP sannsynligvis virker primært ved å hindre tilgang av lipaser til lipiddråpene, er det uvisst hvordan de fjernes og blir mål for proteosomal degradering. Økt ADFP er registrert hos overvektige personer som gjennomgikk et vektsreduksjonsprogram bestående av trening og spesifikk diett [60]. De registrert i tillegg at lipiddråpenes størrelse ble betydelig redusert og at konsentrasjonen av intramuskulære triglyserider ikke endret seg hos disse personene. Disse observasjonene kan være en type beskyttelsesmekanisme som cellen aktiverer for å hindre skadelige effekter fra massiv nedbryting av fettsyrer [60]. En annen studie på overvektige personer registrerte også at trening og vekttap førte til redusert lipiddråpestørrelse og at økt insulinsensitivitet kunne sees i sammenheng med dette [61].

TIP47 ble først identifisert som et mulig transportprotein for mannose-6-fosfat-reseptor, men senere studier har vist at det er et viktig PAT protein. TIP47 finnes lokalisert både i cytosol og forankret til lipiddråper. En studie viste at hemming av TIP47 førte til nedsatt inkorporering av TAG i lipiddråper [62]. Dette viser at TIP47 sannsynligvis også har en viktig rolle for innpass av lipider i lipiddråper.

En annen studie av ADFP knock-out mus viste at TIP47 i lipiddråpene økte kompensatorisk for manglende ADFP [58]. Disse studiene viste i tillegg at antall og størrelsen på lipiddråpene var lik uavhengig om ADFP eller TIP47 var uttrykt, noe som kan tyde på at disse to proteinene har lik mulighet til å pakke lipiddråper.



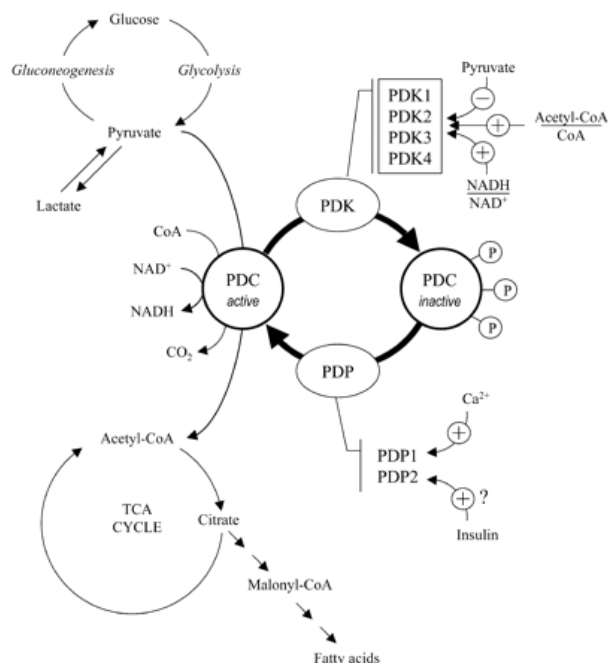
**Figur 1.11 Lipidråper:** Lipidråper er viktige subcellulære organeller ved regulering av fettsyreoksidasjon i myocytter. Lipidsyntese: grønn, Lipolyse: blå, Lipogenese: rød, mitokondrieoksidasjon: sort. Tail interacting protein of 47KDa (TIP47), Hormonsensitiv lipase (HSL), adipose triglyserid lipase (ATGL), monoglyserid lipase (MGL); monoacylglyserol acyltransferase (MGAT), acyl-coenzyme A syntase (ACS), trikarboksylsyresyklus (TCA), karnitin palmitoyltransferase I (CPT1) [46].

#### 1.5.4 PDK4

Reguleringen av mengden glukose som blir oksidert, er nøye kontrollert av flere prosesser, inkludert opptak (eksempel via GLUT4) og mitokondriell fluks. Pyruvat dehydrogenasekomplekset (PDC) i mitokondrier katalyserer omdannelsen av pyruvat til acetyl CoA og regnes som et regulerende trinn i glukoseoksidasjonsprosessen [63]. PDC inneholder tre komponenter som katalyserer omdannelsen av pyruvat til acetyl-CoA (pyruvat dehydrogenase (E1), dihydrolipoamid acetyltransferase (E2) og dihydrolipoamid dehydrogenase (E3)) og to komponenter som regulerer aktiviteten til komplekset (pyruvat dehydrogenase kinase (PDK) og dehydrogenasefosfat fosfatase (PDP)). PDK og PDP fosforylerer og defosforylerer henholdsvis spesifikke serinenheter på E1 som resulterer i inaktivering/ativering av PDC. Inaktivering av komplekset resulterer i hemming av oksideringsprosessen av glukose og en favorisering mot fettsyreoksidasjon. Fire ulike typer av PDK er funnet hos mennesker (PDK 1-4), hvor PDK4 er spesielt godt uttrykt i muskel og lever [64].

Aktiviteten til PDK er også nøye regulert. PDK består av to enheter ( $\alpha$  og  $\beta$ ), hvor  $\alpha$ -enheten har kinaseaktivitet og  $\beta$ -enheten er den regulatoriske enheten. PDK-aktiviteten inhiberes av pyruvat, generert fra glykolysen eller fra sirkulerende laktat, og aktiveres av acetyl-CoA og NADH, produkter fra PDC-aktivitet og fettsyreoksidasjon (figur 1.12) [65].

PDK4-aktiviteten økes av glukokortikoider og av frie fettsyrer, mens den nedreguleres av økt insulinkonsentrasjon. Økt PDK4-aktivitet i muskulatur vil føre til nedregulert oksidasjon av glukose og dermed kunne føre til hyperglykemi. Det er ved tidligere studier registrert et økt uttrykk av PDK4 i skjelettmuskulatur ved T2D [66].



**Figur 1.12: Regulering av glukoseoksidasjonen ved pyruvat dehydrogenasekomplekset.** PDC-aktiviteten inaktiveres ved fosforylering av pyruvat dehydrogenase kinase (PDK) og aktiveres ved defosforylering av pyruvat dehydrogenase fosfat fosfatase (PDP). Aktiv PDC omdanner pyruvat til acetyl-CoA i mitokondrier som deretter går vider inn i TCA. Pyruvat dehydrogenasekompleks (PDC), trikarboksylsyresyklus (TCA) (Krebs syklus) [65].

### 1.5.5 ATGL

Adipose triglyceride lipase (ATGL) katalyserer det første trinnet i lipolysen ved hydrolyse av TAG til DAG (figur 1.11) og regnes nå som en sentral aktør ved regulering av intracellulære TAG-lagre [67]. Full enzymaktivitet krever interaksjon med et aktivatorprotein (komparativ gene identifiserer-58 (CGI-58)). Den eksakte rollen og graden av regulering av ATGL hos mennesker er ikke godt karakterisert. Tidligere studier har vist at ATGL er viktig for fettsyreoksidasjon, for å hindre lipotoksisitet i muskelen [68] og at ATGL kun er uttrykt i type 1 muskelfibre (MHCI) [69]. Dette gjør ATGL til en viktig aktør i både intracellulær fettsyreoksidasjon og lagring.

Økt ATGL-uttrykk sees i muskulatur fra personer som gjennomgår et vektreduksjonsprogram med trening, hvor behovet for oksidering av fett i muskulaturen økes [70]. Det er i tillegg registrert at en ubalanse mellom uttrykket av ATGL og hormonsensitiv lipase (HSL) kan føre til akkumulering av DAG og utvikling av insulinresistens [71].

### 1.5.6 MHCI/MHCII

Skjelettmuskulatur består av, som tidligere nevnt, en miks av ulike fibertyper med ulik oksidativ kapasitet (ref punkt 1.3). Studier har vist at overvekt og T2D er assosiert med en lavere prosentandel av oksidative type I-fibre (MHCI) og høyere prosentandel av glykolytiske type II-fibre (MHCII) sammenliknet med slanke personer [72]. Det er også vist at type I-fibre er mer insulinsensitive enn type II-fibre [73]. Metabolske karakteristika som redusert oksidativ enzymaktivitet, økt glykolytisk aktivitet og økt intracellulær lipidkonsentrasjon, er faktorer som kan relateres til insulinresistens, og derfor også til muskelens fibertypesammensetning [74].

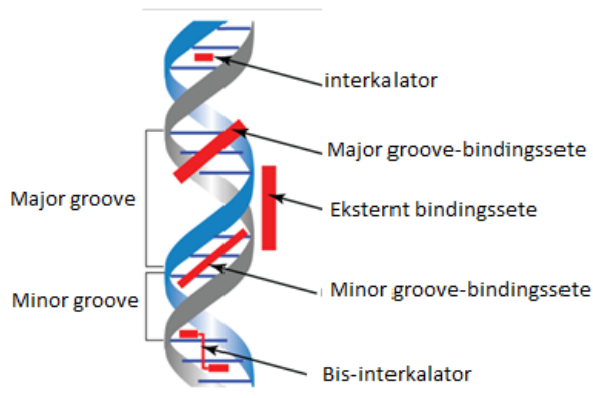
## 1.6 Metodeteori

### 1.6.1 RT Real-time PCR

Revers transkripsjon (RT) etterfulgt av real-time polymerase kjedereaksjon (PCR) er en veletablert metode for å studere genekspressjon i celler eller vev, og defineres som standard metode for genuttrykksanalyser [75]. Metoden har høy sensitivitet og gir mulighet til å kvantifisere små forandringer i et genuttrykk.

RNA i prøvemateriale transkriberes til cDNA ved hjelp av enzymet revers transkriptase. Deretter amplifiseres spesifikke nukleotidesequenser ved bruk av genspesifikke primere. Primere er designet slik at de vil definere et spesifikt område på genet av interesse. Metoden skiller seg fra vanlig PCR ved at fluorescensintensiteten måles under hele amplifiseringsprosessen og vil derfor være et mål på mengden amplifisert produkt.

Den enkleste og billigste metoden for å kvantifisere et PCR-produkt på, er å bruke SybrGreen I [76]. Dette er et fluorescerende fargestoff som vil binde seg til minor-groove på alt dobbeltrådig DNA (figur 1.13) under PCR prosessen. Metoden fordrer at RNA-materialet i utgangspunktet er uten DNA-forurensninger. Et dyrere, men mer spesifikt alternativ, er bruk av spesifikke fluorescensmerkede prober som kun vil binde seg til genet av interesse.



**Figur 1.13:** Skjematisk fremstilling av ulike bindingssteder for DNA-bindende fargestoffer [77].

### 1.6.2 Relativ kvantifiseringsanalyse

Det er flere kvantifiseringsmetoder som kan benyttes for genuttryksanalyser. Generelt regner man med to typer kvantifiseringer ved real-time PCR, relativ og absolutt. En relativ kvantifisering er basert på måling av et relativt uttrykk av målgenet versus et referansegene (housekeeping gen). For å undersøke en fysiologisk forandring i et genuttrykk, vil dette være en god nok metode. En absolutt kvantifisering er derimot basert på tilstedeværelse av en intern eller ekstern kalibrator kurve/standardkurve bestående av standarder med stabilt, nøyaktig definert materiale med kjente konsentrasjonsverdier. Metoden krever nøye validering spesielt med hensyn til effektivitet.

### 1.6.3 Referansegene

Mange faktorer kan ha innvirkning på den sanne biologiske variasjonen og ulike faktorer kan resultere i en ikke-spesifikk variasjon. Dette kan blant annet ha årsak i ulike kvalitet og mengde av templat, ulikt utbytte fra ekstraksjonsprosessen og varierende effektivitet for de enzymatiske reaksjonene under revers transkripsjon og PCR-amplifisering. Bruk av referansegener eller eventuelt et gjennomsnitt av flere, er en vanlig måte å korrigere for disse variasjonene på [78]. Referansegene velges ut på bakgrunn av at de er jevnt uttrykt i det materiale som skal benyttes under forsøkene og at eksperimentelle forhold ikke innvirker på uttrykket av disse genene. Uttrykket av et referansegene bør kontrolleres for hvert forsøksdesign. Flere studier har vist at flere mye brukte referansegener blir regulert og kan variere under ulike forsøk [79]. Variasjonen i uttrykk av et referansegene mellom ulike typer prøver fra forskjellige donor skal variere minst mulig og standardavviket (SD) for CP-verdiene (CP=crossing point; avlest verdi for PCR reaksjoner utført på LightCycler 480, Roche) bør være  $<1$  CP. Det vil si at den ikke skal overstige ikke-biologiske variasjoner som pipeteringsfeil eller liknende [80, 81]. Bruk av referansegener er spesielt nyttig fordi de blir påvirket av alle variasjonskilder under hele eksperimentet på samme måte som genene vi er interessert i å måle uttrykket av. Ved å

bruke en ratio mellom genet av interesse og et referansegene eller gjennomsnitt av flere vil man derfor korrigere (normalisere) for ulikheter i kvalitet og kvantitet.

Valg av referansegene for ulike forsøk er en viktig del av et genekspresjonsekperiment og bør valideres for hver eksperimentell intervensjon. GAPDH (glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase) og 36B4 (syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4) er referansegene som tidligere er benyttet ved studier av genuttrykk i muskulatur [79, 82].

## 1.7 Formål med oppgaven

Det er tidligere utført mange studier hvor overvektsrelatert insulinresistens og T2D er studert [4, 83]. Kunnskapen om den genetiske sammenhengen er økende, men forklarer til dags dato kun en liten del av risikoen for utvikling av T2D.

Formålet med den oppgaven var å undersøke om det var mulig å finne en årsak til at kun 30 % av pasienter som gjennomgår bariatrisk kirurgi ved SIV HF utvikler T2D. Det er uvisst hvor den primære årsaken til utvikling av insulinresistens og T2D er lokalisert, men siden skjelettmuskulatur er hovedsete for insulinstimulert glukoseopptak, og at det i muskulatur er registrert økt tilstedeværelse av fett ved ektopisk fettakkumulering hos overvektige, var det nærliggende å lete etter en mulig årsak her. I denne studien var det ønskelig å undersøke om det var en forskjell i uttrykket av ulike gener i skjelettmuskulatur fra sykkelig overvektige med NGT og etablert T2D i *in vivo*- og *in vitro*-studier.

For å komme nærmere et svar på ovenfor nevnte problemstilling ble følgende delspørsmål stilt i denne oppgaven:

- Er det noen forskjell i uttrykket av sentrale gener i energimetabolismen mellom en gruppe sykelige overvektige pasienter med NGT sammenliknet med en gruppe sykelige overvektige pasienter med T2D *in vivo*?
- Er det noen forskjell i uttrykket av sentrale gener i energimetabolismen mellom en gruppe sykelige overvektige pasienter med NGT sammenliknet med en gruppe sykelige overvektige pasienter med T2D ved studier av muskelceller dyrket *in vitro*?
- Er det noen forskjell i uttrykket av utvalgte gener *in vivo* kontra *in vitro*?
- Er det noen korrelasjon mellom de ulike kliniske dataene og eventuelle funn i de genetiske studiene *in vivo* (biopsi) eller *in vitro* (celler i kultur)?
- Er det noen forskjell i hvordan muskelceller etablert fra de to pasientgruppene metaboliserer glukose?

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Pasientmateriale

Muskelbiopsier ble tatt fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrån, indre bukmuskel) i forbindelse med Roux-en-Y gastric bypass operasjoner (bariatrisk kirurgi) ved SSO ved SIV HF i Tønsberg. Det ble tatt ut to muskelbiopsier fra hver pasient; en til etablering av *in vitro* system (etablering av primærkultur) og en til *in vivo* karakterisering av genuttrykk. Det ble gitt informert samtykke fra alle pasienter før uttak og prosjekter var godkjent av regional etisk komité (REK).

Muskelbiopsiene ble tatt fra pasienter som hadde en gjennomsnittlig BMI på 41 kg/m<sup>2</sup> ved operasjonstidspunktet. Alle pasientene var definerte som sykkelig overvektige. Fra dette materialet ble det valgt ut 7 pasienter med normal glukosetoleranse (NGT) (tabell 2.1) og 7 pasienter med diagnostisert type 2-diabetes (T2D) (tabell 2.2). Utvalget ble gjort på bakgrunn av fastende verdier for glukose og HbA1c (tabell 2.3) og opplysninger om behandling med antidiabetika (metformin, sulfonyleureapreparater eller insulin). Gruppene bestod av både kvinner og menn.

**Tabell 2.1:** Donorkarakteristika for pasienter med sykkelig overvekt med normal glukosetoleranse (NGT).

Donor-kode	Alder	Kjønn	BMI kg/m <sup>2</sup>	Glukose mmol/L	HbA1c %	Triglyserider mmol/L	Insulin pmol/L	Legemidler
<b>EO17</b>	41	K	49	4,8	5,4	1,2	91	Ingen oppgitt
<b>EO21</b>	33	M	68	6,1	4,0	1,7	218*	Ingen oppgitt
<b>EO22</b>	34	M	62	5,2	5,7	2,0	126	Ingen oppgitt
<b>EO23</b>	42	M	40	5,3	5,1	2,6	74	Ingen oppgitt
<b>EO32</b>	45	K	41	4,5	5,4	0,8	23	Ingen oppgitt
<b>EO35</b>	24	K	46	5,5	5,2	1,8	77	Remeron Apodorm Cipralex
<b>EO55</b>	39	K	39	4,7	5,8	1,0	149	Ingen oppgitt
<b>Median</b>	39 (34-44)		46 (39-65)	5,2 (4,7-5,7)	5,4 (4,7-5,8)	1,7 (1,0-2,2)	91 (50-167)	

Forkortelser: EO= ekstremt overvektige, BMI = Body mass index, HbA1c=glykosylert hemoglobin. Median vist med interkvartilbredde. \*Høy insulinverdi, mulig plassert i feil gruppe.



**Tabell 2.2:** Donorkarakteristika for pasienter med ekstrem overvekt med type 2-diabetes (T2D)

Donor-kode	Alder	Kjønn	BMI kg/m <sup>2</sup>	Glukose mmol/L	HbA1c %	Triglyserider mmol/L	Insulin pmol/L	Legemidler
EO14	43	K	40	6,9	8,5	1,6	119	Metformin Amaryl
EO33	51	M	37	8,1	6,5	1,1	85	Metformin Amlodipin Magnyl Simvastatin
EO37	35	M	34	6,1	6,7	0,8	36	Metformin Amaryl Atacand + Simvastatin Albyl-E
EO46	48	K	49	7,6	6,5	2,6	147	Insulin Insulatard
EO54	44	K	54	6,7	5,5	2,4	85	Metformin Simvastatin Aprovel Cetirizin Neurontintin Magnyl Esidrex
EO56	34	K	41	6,8	5,6	3,4	149	Clozapin Lamictal Metformin Omeprazol Spirix Venlaxafin Apodorm Nozinan Vival
EO57	49	K	54	8,0	7,7	1,2	145	Sibutramin *
<b>Median</b>	44 (37-49)		41 (37-52)	6,9 <sup>a</sup> (6,5-7,8)	6,5 <sup>a</sup> (5,7-7,7)	1,6 (1,0-2,8)	119 (70-149)	

EO= ekstremt overvektige, BMI = Body mass index. Median er vist med interkvartilbredde. a:  $P \leq 0,05$  mot EO-NGT (tabell 2.1). \*Pasienten fikk diagnosen T2D rett før det kirurgiske inngrepet og var derfor ikke under behandling med antidiabetika.

**Tabell 2.3: Referanseverdier.**

Analyse	Referanseverdier
Fastende glukose (mmol/L)	4,0-6,0
HbA1c (%)	HbA1c: <6,0 HbA1c regulert diabetes: <7,0
Triglyserider (mmol/L)	<2,60
Insulin (pmol/L)	<210

Verdier hentet fra Unilabs.no.

## 2.2 Opprettelse av primærkultur og dyrking av celler

Satelittceller fra muskelbiopsier, tatt under bariatrisk kirurgi av sykelige overvektige pasienter, ble isolert og differensiert til myoblaster (appendiks I). Celler fra 1. passasje ble frosset ned (-196 °C) for etablering av biobank. Myoblaster fra utvalgte pasienter ble senere dyrket opp ved fysiologiske forhold og differensiert til myotuber. Disse ble benyttet til genuttrykkanalyser *in vitro* og til glukoseoksidasjonsstudier.

### 2.2.1 Isolering av satelittceller fra muskelbiopsi

Isolering av satelittceller fra muskelbiopsier ble utført ved Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo og var basert på en tidligere studie av Blau et al. [84] (appendiks I).

Muskelbitene ble kuttet opp og behandlet med trypsin/EDTA i 20-30 minutter ved 37°C for frigjøring av celler. Suspensjonen ble deretter satt til sedimentering og supernatanten ble overført til nye rør. Behandlingen ble gjentatt inntil 3 ganger på gjenværende bunnfall. Supernatantene ble slått sammen og ført kalveserum (FCS) tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 10 %. Suspensjonen ble sentrifugert (450g) og supernatanten ble sugd av. Cellepelletten ble deretter løst opp i skjelett-muskelcelle vekstmedium (SkGM-medium) og overført til dyrkningsflasker belagt med ekstracellulær matriks-gel (ECM-gel). Cellene ble dyrket ved 37°C i CO<sub>2</sub>-inkubator (5 %) med fuktig atmosfære. Når cellene hadde nådd en konfluens på ca 80 %, ble cellene splittet og dyrket videre til de igjen hadde nådd en konfluens på ca 80 %. Disse cellene ble frosset ned i flytende nitrogen (appendiks II) og definert som passasje 1.

### 2.2.2 Celledyrking

Myoblaster fra passasje 1 ble dyrket opp ved fysiologiske forhold og differensiert til myotuber (appendiks III). Disse ble benyttet til *in vitro* studier.

Kryorør med celler fra passasje 1 ble raskt tint ved 37 °C (vannbad) og deretter fortynnet 1:5 med M1-medium. Suspensjonen ble sentrifugert (450g) i 7 minutter. Supernatantene ble sugd av og cellepelletten ble løst i proliferasjonsmedium (SkGM, 37 °C). Cellene ble sådd ut på 6-brønners brett belagt med ECM-gel og dyrket ved 37°C i CO<sub>2</sub>-inkubator (5 %) med fuktig atmosfære. Proliferasjonsmedium ble skiftet ca hvert 3. døgn inntil cellene hadde nådd en konfluens på ca 80 %. Mediet ble deretter byttet til M3-medium (differensieringsmedium) for å initiere differensiering av myoblaster til myotuber. M3-mediet ble byttet hver 2. dag. Cellene ble høstet på dag 8 etter initiert differensiering.

## 2.3 Isolering av totalt RNA fra myotuber etablert i kultur

Det ble benyttet kolonnebasert kit fra Agilent til dette formålet (appendiks IV).

Prosedyre som angitt i bruksanvisningen ble fulgt. RNA ble isolert fra 4 brønner på et 6-brønners brett.

### 2.3.1 Lysering

Mediet ble sugd av og 300-600 µl lyseringsbuffer med β-markaptoetanol ble tilsatt hver brønn. Lyseringsbufferen inneholdt guanidin thiocyanat, som denaturerte alle proteiner inklusiv RNase. Cellene ble skrapet av bunnen ved hjelp av en pipettespiss og

suspensjonen ble deretter overført til eppendorfrør (2 ml). Vortexer ble benyttet til å homogenisere lysatet ytterligere.

### 2.3.2 Isolering av RNA

Lysatet ble overført til en prefilter-spinnkolonne og deretter sentrifugert ved maksimal hastighet ( $\geq 8000g$ ) i 5 minutter for å fjerne tilstedeværende celledabri. Filtratet ble deretter tilsatt likt volum 70 % etanol. 700  $\mu$ l av denne blandingen ble overført til en RNA-isoleringskolonne og sentrifugert ved maksimal hastighet i 30 sekunder. RNA vil i denne prosessen feste seg til kolonnematerialet. Dette sentrifugeringstrinnet ble gjentatt for det resterende volumet. Kolonnen ble deretter DNase-behandlet for å fjerne eventuell tilstedeværende DNA. RNA ble eluert med en elueringsbuffer tilhørende kittet.

Konsentrasjonen av RNA ble målt med NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometer (NanoDrop Technologies, appendiks VI). Renheten ble vurdert ved 260/280 nm ratio ( $\approx 2$ ) og 260/230 nm ratio ble også registrert. Renset RNA ble frosset ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4 Isolering av totalt RNA fra muskelbiopsier i RNAlater

Ved isolering av RNA fra muskelbiopsier ble det benyttet en kombinasjon av to ulike metoder (appendiks V). RNA ble først isolert med TRIzol® (Invitrogen) i henhold til bruksanvisning. Deretter ble isolert RNA rensset med et kolonnebasert kit (RNeasy, Qiagen).

### 2.4.1 Homogenisering

Muskelbitene ble først delvis tint og RNAlater-løsningen fjernet. Synlig fett ble kuttet vekk og muskelbitene ble deretter veid. Homogenisering ble utført i rør tilsatt 1 ml TRIzol® (Invitrogen) og keramiske kuler (Hard tissue homogenizing CK28, Precellys 24) i Precellys 24 homogenisator (2x30 sekunder, 6500 rpm). Cellelysate ble overført til nye rør og sentrifugert ved  $12000g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) i 10 min for fjerning av ekstracellulær matriks, polysakkarider og høymolekylært DNA. Supernatanten ble deretter overført til nye rør.

### 2.4.2 Isolering av RNA

Supernatanten ble tilsatt 200  $\mu$ l kloroform. Rørene ble blandet og inkubert i avtrekk ved romtemperatur i 3 minutter. Rørene ble deretter sentrifugert ved  $12000g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) i 15 minutter. Den øverste vandige fasen (RNA-fasen) ble forsiktig avpipettert til nye rør og tilsatt 500  $\mu$ l 100 % isopropanol. Rørene ble inkubert ved romtemperatur i 10 min for utfelling av RNA. Sentrifugert deretter rørene ved  $12000g$  i 10 minutter ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Supernatanten ble avpipettert og kastet. Pelleten ble vasket med 1 ml 75 % etanol og deretter luftetørket i 10 minutter ved romtemperatur. Volumet ble justert til ca 100  $\mu$ l med RNase-fritt vann og inkubert ved  $55^{\circ}\text{C}$  i 10 minutter for å løse opp utfelt RNA.

Suspensjonen ble deretter satt på is for avkjøling til romtemperatur. DNase ble tilsatt RNA-suspensjonen for å fjerne eventuell tilstedeværende DNA.

### 2.4.3 Rensing av isolert RNA

RNA-suspensjonen ble rensset for eventuelle rester av reagenser fra isoleringsmetoden med TRIzol®. Dette ble utført ved å benytte et kolonnebasert RNeasy kit fra Qiagen i henhold til bruksanvisningen (appendiks V). Guanidin thiocynatholdig lyseringsbuffer (RLT-buffer) og 100 % etanol ble tilsatt suspensjonen. Blandingen ble overført til en spinnkolonne og sentrifugerte ved  $\geq 8000g$  i 15 sekunder. Dette resulterte i at RNA festet seg til kolonnematerialet (silikamembran). Eluatet ble kastet og kolonnen ble deretter vasket i etanolbasert vaskebuffer (RPE-buffer). RNA ble tilslutt eluerte med 30  $\mu$ l RNasefritt vann. Konsentrasjonen av RNA ble målt med NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometer (NanoDrop Technologies, appendiks VI). Renheten ble vurdert ved 260/280 nm ratio ( $\sim 2$ ) og 260/230 nm ratio (1,8-2,0). Rensset RNA ble frosset ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5 RT real-time PCR

Revers transkripsjon Real-time-polymerase kjedereaksjon (RT real-time PCR) ble benyttet for å måle genekspressjonen av de ulike genene som var utvalgt ut for å studere energimetabolismen og muskelfibersammensetningen i det definerte materialet (appendiks VII).

### 2.5.1 cDNA-syntese

Det ble benyttet et kommersielt kit (High-Capacity cDNA Revers Transcription, Applied Biosystems) og varmeblokk for syntese av cDNA. En master mix bestående av standardiserte mengder med dNTP, random primere, revers transkriptase og RNase inhibitor ble blandet sammen i henhold til bruksanvisningen. 6,8  $\mu$ l av denne blandingen ble tilsatt et volum tilsvarende 1  $\mu$ g RNA. Volumet ble justert til 20  $\mu$ l med RNase-fritt vann. Reaksjonsblandingen ble inkubert ved  $25^{\circ}\text{C}$  for templat/heksamer priming og deretter overført til  $37^{\circ}\text{C}$  for cDNA-syntese. Reaksjonen ble stoppet ved å inaktivere revers transkriptase ved  $99^{\circ}\text{C}$ . Det ble i tillegg tatt med et rør uten tilsats av RNA. Dette fungerte som en negativ kontroll ved Real-Time PCR.

### 2.5.2 Real time PCR

Real-time PCR ble utført på LightCycler 480 (Roche) med LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I reaksjonsmiks i henhold til bruksanvisning (Roche, appendiks 7). Dette instrumentet avleser "crossing point" (CP)-verdier som er definert som det punktet hvor fluorescensen stiger merkbart over bakgrunnsfluorescensen.

Alle cDNA-prøvene ble fortynnet 1:25 med RNase-fritt vann. Det ble samtidig tatt ut 1 µl ufortynnet cDNA fra hver prøve som ble blandet sammen til en cDNA-miks. Denne miksen ble fortynnet 1:25 med RNase-fritt vann og deretter benyttet videre til å lage en fortynningsrekke bestående av fire 2-ganger fortynninger. Denne fortynningsrekken ble satt opp for hver genekspressjonsanalyse og ble benyttet både til å avlese en relativ konsentrasjonsverdi for hvert enkelt gen og dessuten til vurdering av PCR-analysens effektivitet.

Mastermiks til PCR oppsettene ble laget ved å blande primere (tabell 2.4), master miks (5x konsentrasjon) og RNase fritt vann. 15 µl av denne blandingen ble tilsatt hver brønn på et 96-brønners brett. Det ble deretter tilsatt 5 µl av fortynningsløsningene eller prøver (cDNA fortynnet 1:25) per brønn. Hvert brett hadde med to typer negative kontroller (NTC), RNasefritt vann og negativ kontroll fra cDNA-syntesen. Hver cDNA-miksfortynning ble satt opp i tripletter og hver prøve/negativ kontroll i dubletter. Brettet ble deretter sentrifugert og satt i LightCycler 480. Reaksjonsbetingelser er angitt i tabell 2.5. Instrumentet ble programmert til 42 sykler. Den relative mengden templat ble beregnet ut i fra fortynningsrekken. Resultatet ble deretter normaliser mot referansegenene GAPDH, 36B4 og gjennomsnittet av disse.

**Tabell 2.4:** Primere benyttet i oppgaven.

Gener	Genbanknummer	Primer
GAPDH	J04038/M33197	F: TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC R: GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
36B4	M17885	F: CCA TTC TAT CAT CAA CGG GTA CAA R: AGC AAG TGG GAA GGT GTA ATC C
CPT1B	L39211	F: CGG TGG AAC AGA GGC TGA A R: CGA GGC GAT ACA TAT GCT GAT G
CD36/FAT	L06850	F: AGT CAC TGC GAC ATG ATT AAT GGT R: CTG CAA TAC CTG GCT TTT CTC AA
PDK4	BC040239	F: TTT CCA GAC CAA CCA ATT CAC A R: TGC CCG CAT TGC ATT CTT A
ATGL	BC017280	F: TCA GAC GGC GAG AAT GTC ATT AT R: TGC AGA CAT TGG CCT GGA T
TIP47	NM001164189.1	F: CAC TCG CTG GGC AAG CTT R: CTT GAC AGT TTC CAT CAG GCT TAG
ADFP	NM001122	F: GGT GAT GGC AGG CGC AT R: TAG AAG TGA GGA GGC TGT CAG ACA
MHCI	NM005963	F: CCA GAC TGT GTC TGC TCT CTT CAG R: CAG GAC AAG CTC ATG CTC CAT
MHCIIa	NM017534	F: AAG GTC GGC AAT GAG TAT GTC A R: CAA CCA TCC ACA GGA ACA TCT TC

**Tabell 2.5:** LightCycler ble programmert med følgende reaksjonsbetingelser:

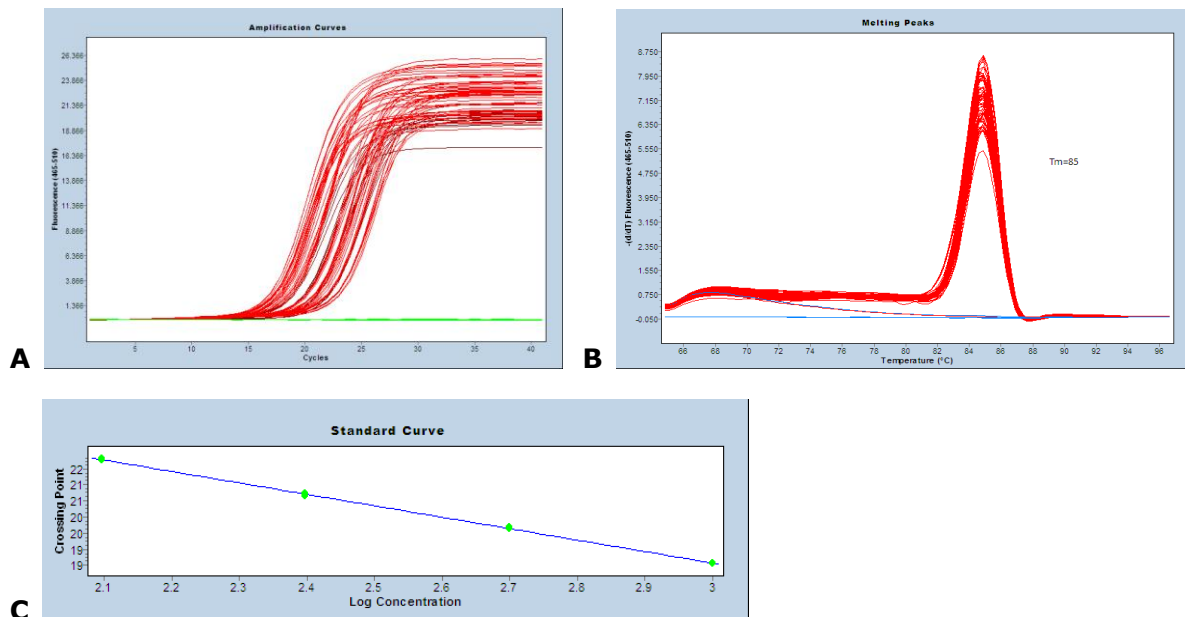
Analyse modus	Temperatur	Tid
Preinkubering	95 °C	10 minutter
Denaturering av DNA	95 °C	10 sekunder
Annealing	60 °C	10 sekunder
Extension	72 °C	20 sekunder

### 2.5.3 Kontroll av resultater fra RT real-time PCR

Alle PCR-resultater ble kontrollert ved å studere amplifiseringskurver og smeltepunktsskurver. Amplifiseringskurvene skal ha et gitt utseende (figur 2.2 A). Ugunstige forhold under PCR-reaksjonen kan endre dette utseende og gjentagelse/optimalisering må vurderes. Smeltepunktsskurvene (figur 2.2 B) lages på bakgrunn av at produkter med ulik størrelse dissosierer ved ulike temperaturer. Denne informasjonen skaffer PCR-instrumentet ved å gjøre temperaturavhengig fluorescensmålinger. Temperaturen i løsningen økes sakte fra ca 50 °C til ca 95 °C. Etter som DNA-dupleksene smelter fra hverandre vil fluorescensintensiteten synke. Ved disse forsøkene var det kun ønskelig med en smeltepunktsskurve, siden alle genene ble analysert separat.

Fortynningsrekkene ble kontrollert og skulle ha en lineær sammenheng når CP-verdien for hver enkel fortynning ble plottet mot logaritmen til den relative konsentrasjonsverdien for hver fortynning (figur 2.2 C). I de tilfellene hvor instrumentet ga melding om at konsentrasjonsverdier var avlest av en ekstrapolert fortynningskurve, ble fortynningsrekker satt opp på nytt med fem 10-gangers fortynninger for kontroll av lineariteten i det ekstrapolerte området.

I tillegg ble effektiviteten til hvert oppsett kontrollert og sammenliknet. For at ulike oppsett skal kunne sammenliknes bør effektiviteten mellom oppsettene være tilnærmet lik [85].



**Figur 2.2:** A: Amplifiseringskurve, B: Smeltepunktsskurve, C: Fortynningskurve

#### 2.5.4 Oppsett av gel for kontroll av-PCR produkt

For å kontrollere at alle primere som ble benyttet i denne studien kun ga ett produkt, ble PCR-produkt fra de repektive primerene analysert ved hjelp av gelelektroforese (appendiks VIII). Til dette ble det benyttet en av fortynningene i fortynningsrekken. Det ble dessuten i enkelte tilfeller satt opp gel på enkelte prøver i de tilfeller der smeltepunktsskurven hadde en skulder eller der det var antydning til at flere produkter var amplifisert.

100 bp stige og PCR-produkt (blandet med 6xloading dye) ble applisert på en støpt agarosegel. Gelen var i forkant tilsatt GelGreen. Dette er et fluorescerende fargestoff som vil farge all tilstedeværende nukleinsyre. Gelen ble avleste i en G-BOX (SynGene) med programmet GeneSnap (SynGene).

#### 2.5.5 Beregning av genuttrykk

Det er flere ulike metoder for beregning av genuttrykk [75, 85, 86]. I denne oppgaven ble den relative konsentrasjonsverdien (utregnet av LC480) benyttet til videre utregninger. Disse verdiene ble beregnet på bakgrunn av fortynningsrekkene som ble satt opp ved hver realtime-PCR-analyse av de respektive genene. For å kunne benytte disse verdiene settes det som krav at alle PCR-oppsettene i genuttrykkstudiet har lik effektivitet og dessuten at variasjonen mellom de ulike oppsettene er minst mulig. Genuttrykket ble normalisert mot to ulike referansegener (GAPDH og 36B4) og gjennomsnittet av disse. Dette ble utført ved å dele de relative konsentrasjonsverdiene for målgene med de relative konsentrasjonene for referansegenene.

## 2.6 Glukoseoksidasjon i dyrkede myotuber

Metoden som ble benyttet for måling av glukoseoksidasjonen i denne studien (appendiks IX), er en veletablert metode for å måle substratoksidasjon i et *in vitro*-system med myotuber [87, 88]. Metoden gir et mål på cellenes opptak og oksidasjon av energirike substrater. Metabolsk anormalitet kan endre på denne kapasiteten og det var derfor interessant ved denne studien å se om det var mulig å detektere noen forskjell mellom sykelige overvektige pasienter med og uten T2D.

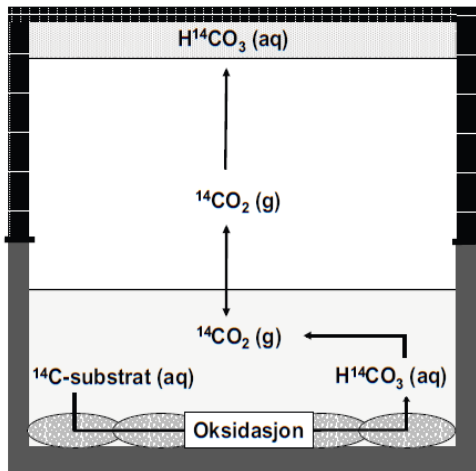
### 2.6.1 Substratoksidasjonsforsøk med radioaktiv glukose

Forsøk ble utført på 8. differensieringsdag på myotuber dyrket i 6-brønners Brett. Differensieringsmedium ble erstattet av 1ml DMEM med 10 mM HEPES og 2  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{14}\text{C}$ ]glukose. Brettet ble deretter satt til inkubering i 2 timer ved 37 °C (fuktig,  $\text{CO}_2$ -rik atmosfære (5 %)). 500  $\mu\text{l}$  ble deretter overført til små dyrkningsflasker (25  $\text{cm}^2$ ) og tettet igjen med en gummikork med filterkurv med sammenbrettet filterpapir. 300  $\mu\text{l}$  fenyletylamin:metanol (1:1) ble tilsatt filterkurven og 100  $\mu\text{l}$  1M perklorisyre (PCA) ble tilsatt til bunnen av flasken med sprøyte gjennom korken. Dette førte til at  $\text{CO}_2$  fra oksidasjon av glukose ble frigjort i form av  $\text{CO}_2$ -gass og deretter ble felt ut i form av  $\text{HCO}_3$  i det basiske filteret (figur 2.2). Blandingen fikk stå ved romtemperatur i 2 timer før filterpapiret ble tatt ut og overført til scintillasjonsrør for telling av radioaktivitet. 300 $\mu\text{l}$  tellevæske ble deretter tilsatt hvert rør.

For å måle andelen av glukose som var tatt opp, men ikke oksidert, ble gjenværende radioaktivitet i cellene også telt. Dette ble utført ved at cellene ble vasket 2-3 ganger med iskald PBS og deretter lysert ved tilsatts av 500  $\mu\text{l}$  0.05M NaOH. Cellene ble skrapet av med en celskraper og deretter overført til nye rør. Suspensjonen ble oppbevart ved -20 °C før telling av radioaktivitet. Før telling ble suspensjonen tint og deretter sonikert for å sikre fullstendig homogenisering. 300  $\mu\text{l}$  av suspensjonen ble overført til tellerør og tilsatt 3 ml tellevæske. Cellelysatet ble i tillegg benyttet til måling av total mengde proteiner (se punkt 2.7.2). Det totale opptaket ble deretter beregnet ved å legge sammen andel fullstendig oksidert og andel gjenværende radioaktiv glukose.

I tillegg ble det satt opp telling av mengden radioaktivitet i DMEM med 10 mMHEPES og 2  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]glukose for måling av mengden utgangsradioaktivitet. Alle prøver + blank ble målt i TRI-CARB, 1900TR væske scintillasjonsanalysator (Pacard). Prøvene ble telt i 5 minutter.





**Figur 2.2: Prinsipp for substratoksidasjonsmetoden.** [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ] glukose oksideres til  $\text{CO}_2$  i myotubene.  $\text{CO}_2$  fanges opp av filter i form av  $\text{H}^{14}\text{CO}_3$ . Oksidasjon kvantifiseres ved å måle mengden [ $^{14}\text{C}$ ] i filteret. Glukoseopptak kvantifiseres som summen av mengde oksidert og mengde celleassosiert.

## 2.6.2 Proteinmåling

Total mengde proteiner ble målt i hver prøve og var et målt på antall celler til stede under oksidasjonsforsøket. Oksidasjonen ble i etterkant relatert til mengden proteiner i prøvene for å korrigere for eventuelle ulikheter i antall celler under forsøkene.

10  $\mu\text{l}$  blank (NaOH 0,05M), standarder bestående av ulike BSA-fortynninger i NaOH (0,3 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,10 mg/ml, og 0,05 mg/ml) og homogenisert cellelysat ble tilsatt en mikrotiterplate (2 paralleller). Det ble deretter tilsatt 200  $\mu\text{l}$  fargereagens (BIO-Rad Proteinassay reagenskonsentrat, fortynnet 1:5 med vann). Etter kort inkubering ble mengden proteiner målt spektrofotometrisk ved 595nm i Victor<sup>TM</sup> mikrotiterplaterleser (Wallac 1420, Perkin Elmer). Instrumentet lagde standardkurve ut i fra de ulike BSA-fortynningene og proteinkonsentrasjonen ble beregnet ut i fra denne standardkurven.

## 2.7 Statistiske analyser

Resultatene fra forsøkene gjennomført ved dette studiet er presentert som medianverdier i hver donorgruppe (NGT og T2D) med interkvartilbredde hvis ikke annet er oppgitt. Statistiske analyser ble gjennomført ved hjelp av Mann-Whitney test og signifikansnivået ble satt til  $\alpha=0,05$ .

Korrelasjonsanalyser ble utført med Pearson, hvor  $r=0,5\text{-}1,0$  ble vurdert som god korrelasjon,  $r=0,30\text{-}0,49$  middels korrelasjon og  $r=0,10\text{-}0,29$  mindre korrelasjon [89]. Signifikansnivået ble satt til  $\alpha=0,05$  for vurderingen av korrelasjonsanalysen.

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av GraphPad versjon 4,00 for Windows (GraphPad Software, SanDiego, CA).

## 3 Resultater

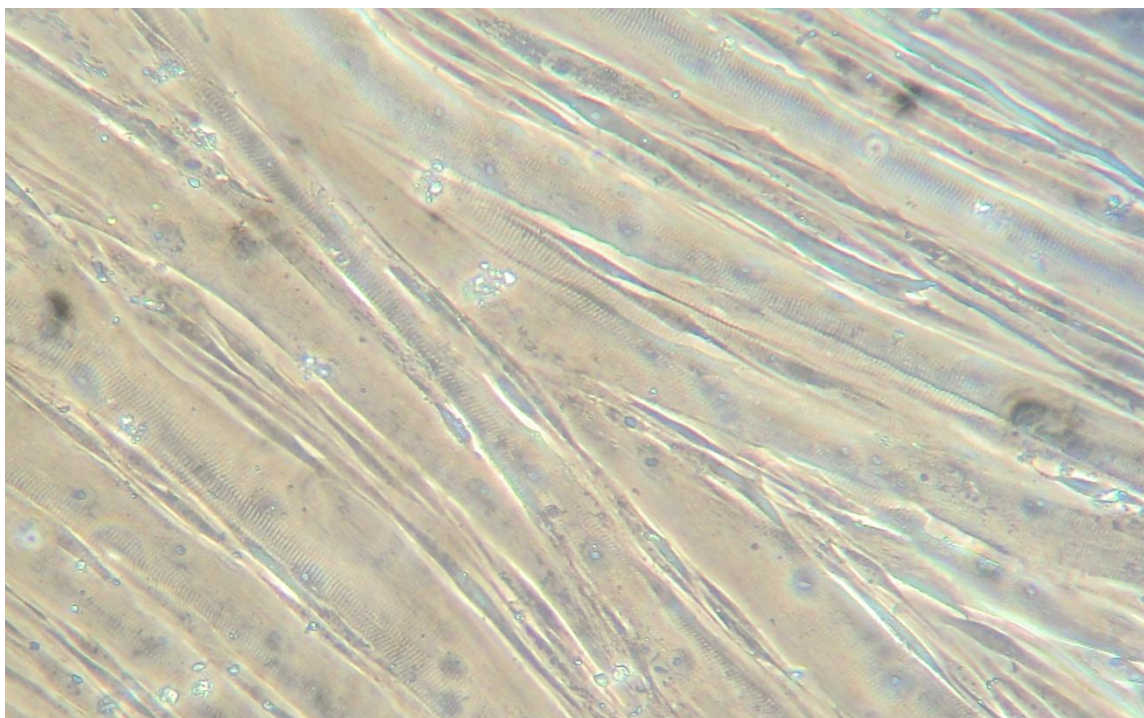
### 3.1 Donorkarakteristika

Pasienter med NGT og T2D ble sammenliknet med hensyn til de kliniske dataene. Det var ingen statistisk forskjell mellom pasientene med NGT og T2D med hensyn til BMI, alder eller fastende triglyserider (tabell 2.1 og 2.2). Derimot hadde pasientene i T2D-gruppen en statistisk signifikant høyere verdi både for fastende glukose og HbA1c til tross for at alle bortsett fra en ble behandlet med antidiabetika.

### 3.2 Dyrking av myoblaster og isolering av RNA fra myotuber

Primærkulturer etablert fra satelittceller er en mye brukt teknikk for studier av muskel *in vitro*. Det var tidligere etablert en biobank av myoblaster fra muskelbiopsier tatt fra sykkelig overvektige pasienter som hadde gjennomgått en bariatrisk operasjon ved SSO ved SIV HF i Tønsberg. Ved opptining av disse cellene viste det seg at celler fra de ulike donorene oppførte seg noe ulikt ved dyrking i kultur.

Det var variasjon i antall proliferasjonsdøgn før cellene oppnådde en ønsket konfluens på ca 80 % (tabell 3.1). Det var også variasjon i hvordan de visuelt artet seg i kultur etter 7 dager i differensieringsmedium. Visuelt kunne det være tegn til lite differensierte myotuber i enkelte primærkulturer, mens det ble registrert godt modne myotuber med tverrstripet fiberstruktur i andre cellekulturer (figur 3.1). Myotubenes modningsgrad ble ikke målt ved denne studien.



**Figur 3.1: Myotuber differensiert i kultur med multiple kjerner og tverrstriper.** Myoblaster fra 1. passasje ble dyrket opp inntil de nådde en konfluens på ca. 80 %. Differensiering av myoblaster ble deretter initiert ved å bytte mediumsammensetningen. Bildet er tatt på 8. differensieringsdag av donor EO22 med digitalkamera gjennom mikroskopets okolar (linse 40x).

Utbytte av RNA isolert fra ulike donorceller (tabell 3.1) varierte, men det var ingen signifikant forskjell i utbytte av RNA isolert fra myotuber etablert fra de to donorgruppene ( $p > 0,05$ ). Isolering av RNA med kolonnebaser kit fra Agilent er en etablert teknikk for isolering av RNA fra muskelceller i kultur. Metoden er tidligere benyttet ved Farmasøytisk Institutt ved UiO. Problemer med dårlig utbytte ved bruk av denne teknikken var ikke kjent der.

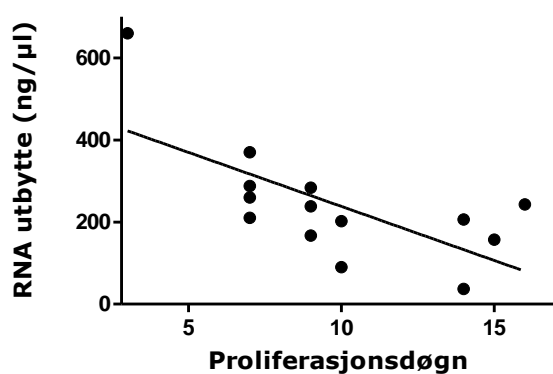
Renheten målt med 260/280 nm ratio var godkjent for alle prøver ( $\sim 2,0$ ) (tabell 3.1). Renheten målt med 260/230 nm ratioen var derimot ikke tilnærmet lik anbefalte verdier (1,8-2,0). Denne renheten har ikke tidligere blitt målt på RNA isolert med Agilent kippet ved Farmasøytisk Institutt ved UiO. Det har imidlertid ikke tidligere forårsaket problemer ved bruk av RNA isolert med denne teknikken til RT real-time PCR applikasjoner. Det ble derfor valgt ikke å ta hensyn til 260/230 nm ratioen ved karakterisering av renheten på isolert RNA med dette kippet.

I denne studien ble det funnet en negativ korrelasjon mellom antall proliferasjonsdøgn og RNA-utbytte (figur 3.2). Det kan ikke utelukkes at dette kan ha hatt innvirkning på kvaliteten på isolert RNA selv om renheten var lik.

**Tabell 3.1:** Resultater fra dyrking av myoblaster fra EO-donorer.

Donor gruppe	Donor-kode	Antall proliferasjons-døgn før M3	RNA-utbytte (ng/μl)	260/280 nm ratio	260/230 nm ratio
NGT	EO17	14	206	2,1	1,1
NGT	EO21	3	660	2,1	1,6
NGT	EO22	14	37	2,1	1,6
NGT	EO23	7	260	2,1	1,2
NGT	EO32	9	238	2,1	1,0
NGT	EO35	15	157	2,1	1,0
NGT	EO55	7	288	2,1	1,4
<b>Median</b>		9 (7-14)	238 (157-288)	2,1	1,2 (1,0-1,6)
T2D	EO14	9	167	2,0	1,0
T2D	EO33	16	243	2,1	1,0
T2D	EO37	10	202	2,1	1,4
T2D	EO46	7	210	2,1	1,6
T2D	EO54	10	90	2,1	1,4
T2D	EO56	7	370	2,1	1,5
T2D	EO57	9	284	2,1	1,9
<b>Median</b>		9 (7-10)	210 (167-284)	2,1	1,4 (1,0-1,6)

Median er vist med interkvartilbredde.



**Figur 3.2: Antall proliferasjonsdøgn korrelert til RNA-utbytte.** Myoblaster fra 1. passasje ble dyrket opp inntil konfluens på ca. 80 %. Differensiering av myoblaster ble deretter initiert ved å bytte mediumsammensetning. RNA ble isolert på 8. differensieringsdag med kolonnebasert kit (Agilent). Utbytte av RNA ble målt med NanoDrop®.  $r = -0,7$  ( $p = 0,009$ ).  $N = 14$ .

### 3.3 Isolering av RNA fra muskelbiopsier

Muskelbiopsiene ble først tint noe og mesteparten av RNA-løsningen fjernet. Deretter ble synlig fett fjernet før biten ble veid. En kan likevel ikke se bort fra at rester av RNA-løsning og ikke-synlig fett kan ha bidratt til biopsivekten (tabell 3.2).

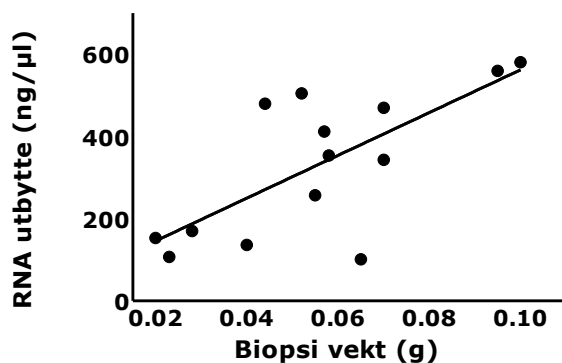
Det var godt samsvar mellom mengde biopsimateriale og RNA-utbytte (figur 3.3).

Renheten på det isolerte RNA var bra og tilfredstilte kravet både for 260/280 nm ratio ( $\sim 2,0$ ) og 260/230 nm ratio (1,8-2,0) (tabell 3.2). Det var ingen signifikant forskjell i utbytte av RNA (ng/ $\mu$ l)/mg biopsi isolert fra pasienter med NGT og T2D ( $p > 0,05$ ).

**Tabell 3.2:** Resultater fra RNA-isolering fra biopsier.

Donor gruppe	Donor-kode	Antall mg biopsi	RNA-utbytte (ng/ $\mu$ l)	RNA utbytte (ng/ $\mu$ l)/mg biopsi	260/280 nm ratio	260/230 nm ratio
NGT	EO17	95	560	5,9	2,1	2,1
NGT	EO21	70	470	6,7	2,0	2,1
NGT	EO22	65	101	1,6	2,1	2,1
NGT	EO23	100	581	5,8	2,1	2,1
NGT	EO32	44	480	10,9	2,1	2,2
NGT	EO35	57	412	7,2	2,1	2,2
NGT	EO55	52	505	9,7	2,0	2,1
<b>Median</b>		65 (52-95)	480 (412-560)	6,7 (5,8-9,7)	2,1 (2,0-2,1)	2,1 (2,1-2,2)
T2D	EO14	23	107	4,7	2,0	1,8
T2D	EO33	70	343	4,9	2,1	2,0
T2D	EO37	20	153	7,7	2,0	2,0
T2D	EO46	28	170	6,1	2,0	2,0
T2D	EO54	40	136	3,4	2,1	2,1
T2D	EO56	58	354	6,1	2,1	2,0
T2D	EO57	55	257	4,7	2,1	2,0
<b>Median</b>		40 (23-58)	170 (136-343)	4,9 (4,7-6,1)	2,1 (2,0-2,1)	2,1 (2,0-2,1)

Median er vist med interkvartilbredde.



**Figur 3.3: Korrelasjon mellom biopsivekt og RNA-utbytte.** RNA ble isolert fra muskelbiopsier ved bruk av TRIzol ekstraksjonssystem. Det ble deretter ytterligere rensset med et kolonnebasert system (RNeasy). Utbytte ble målt med NanoDrop®.  $r=0,7$  ( $p=0,004$ ).  $N=14$ .

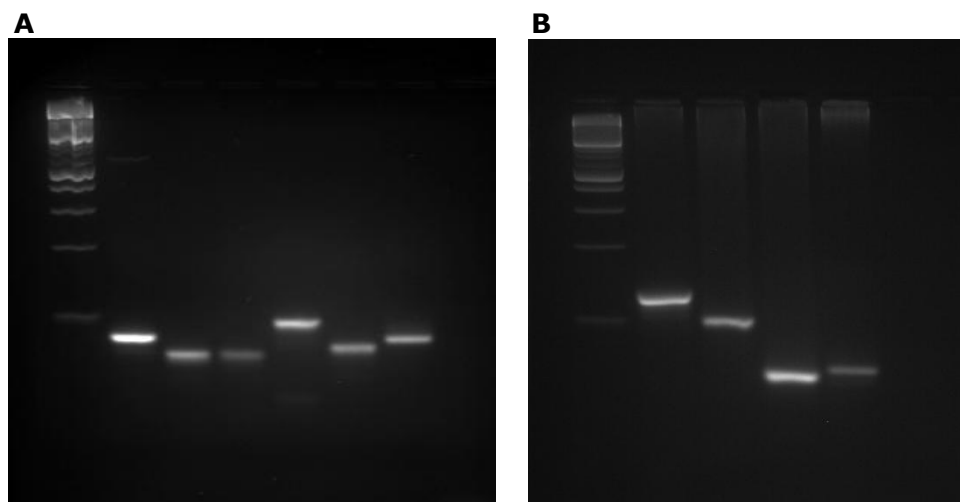
### 3.4 Genuttrykk *in vivo* og *in vitro*

Viktige aktører i energimetabolismen ble valgt ut for å undersøke om det var mulig å detektere en forskjell mellom sykkelig overvektige pasienter med NGT og med etablert T2D. Det var dessuten ønskelig å undersøke om genuttrykket var likt i et *in vivo*-system kontra et *in vitro*-system fra samme pasient.

Kvinner var i overtall i dette materiale, og det ble derfor valgt i tillegg å se på genuttrykket kun hos kvinnene for ytterligere å fjerne en variabel mellom gruppene.

De ulike genene ble valgt på bakgrunn av tidligere studier utført på dette materialet [90] og med utgangspunkt i litteraturen.

Alle primersettene ble kontrollert både ved smeltepunktsanalyser og ved gelanalyse av PCR-produkter (figur 3.4). Resultatene fra begge analysene viste at alle primersettene kun ga ett produkt. Det kunne anes et ekstra bånd i gel A, brønn 2 (GAPDH). I følge baseparstigen tilsvarte dette båndet et stort produkt (>500 bp) og var etter all sannsynlighet en forurensing siden dette ikke var synlig på smeltepunktsanalysen.



**Figur 3.4: PCR-produkt fra alle primerpar ble separert på en 4 % NuSieve agarose gel ved elektroforese og visualisert ved hjelp av GE-Box** A: Vist i følgende rekkefølge fra venstre: 100basepar stige, glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), karnitin palmitoyl transferase 1 B (CPT1B), tail interacting protein of 47 kDa (TIP47), fettcellerealtert differensierings protein (ADFP), pyruvat dehydrogenase kinase isoenzym 4 (PDK4), kontroll uten templat (NTC). B: Vist i følgende rekkefølge fra venstre: 100basepar stige, myosin tung kjede type I (MHC1), myosin tung kjede type IIA (MHCIIA), Adipose triglyserid lipase (ATGL), cluster of differentiation 36/ fettsyre translokase (CD36/FAT), NTC.

Alle genuttrykk ble normalisert mot referansegener tidligere benyttet til genuttrykksstudier i muskel (GAPDH, 36B4 og et gjennomsnitt av disse) [79, 82]. Uttrykket av referansegener skal være upåvirket av reaksjonsforholdene og standard avviket (SD) for CP-verdiene bør være  $<1\text{CP}$ . I disse oppsettene var SD for GAPDH i biopsi og cellekultur på henholdsvis 0,3 CP og 0,4 CP og for 36B4 0,5 CP og 0,4 CP. Beregnet på hele materiale (biopsi + cellekultur) hadde GAPDH en variasjon  $\text{SD}=0,9\text{CP}$  og 36B4  $\text{SD}=1,0\text{CP}$ . Dette var en indikasjon på at både GAPDH og 36B4 var stabilt uttrykt både i muskelbiopsimaterialet og cellekulturmaterialet og ble dermed godkjent som referansegener i denne studien.

Resultatene viste at det var noe forskjell på uttrykket av GAPDH og 36B4 i biopsi kontra i cellekultur. Dette var synlig ved beregning av SD for hele materiale (biopsi + cellekultur) som endret seg tett opp til anbefalt grense på  $\text{SD}<1\text{CP}$ . Ved beregning av % forskjell fra gjennomsnittsverdien for CP for begge gruppene, var GAPDH mer uttrykt i biopsimaterialet (10 %) og 36B4 mer uttrykt i cellekulturmaterialet (9 %). Dette var også årsaken til at det relative uttrykket ble høyere for de enkelte genene der referansegene var lavt uttrykt i utgangspunktet. Litteraturen viser til at det ved slike tilfeller kan være hensiktsmessig å normalisere målgenene opp i mot et gjennomsnitt av referansegene [91]. Dette er derfor utført og vist som søyle 3 i alle genuttrykksstudiene.

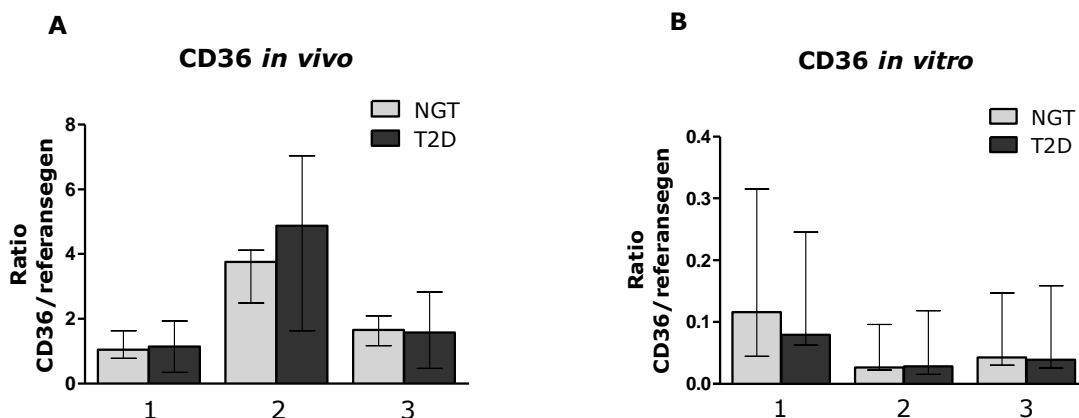


Amplifiseringseffektiviteten må være tilnærmet like for referansegene og målgene for at disse kan benyttes i utregninger av relative verdier. Dette ble utført ved å se på hvordan  $\Delta CP$  (CP for målgene minus CP for referansegene) varierte med templatfortynninger (fortynningsrekken med cDNA-miks). Logaritmen til den relative konsentrasjonsverdien ble deretter plottet mot  $\Delta CP$ -verdiene. Hvis stigningstallet for kurven var tilnærmet lik null, indikerte dette at PCR-effektiviteten for referansegene og målgene var lik. I disse forsøkene var alle stigningstall  $<0,001$  som indikerte en lik PCR-effektivitet for referansegene (GAPDH og 36B4) og målgene (CD36/FAT, CPT1B, TIP47, ADFP, PDK4, MHC1, MHCIIa og ATGL).

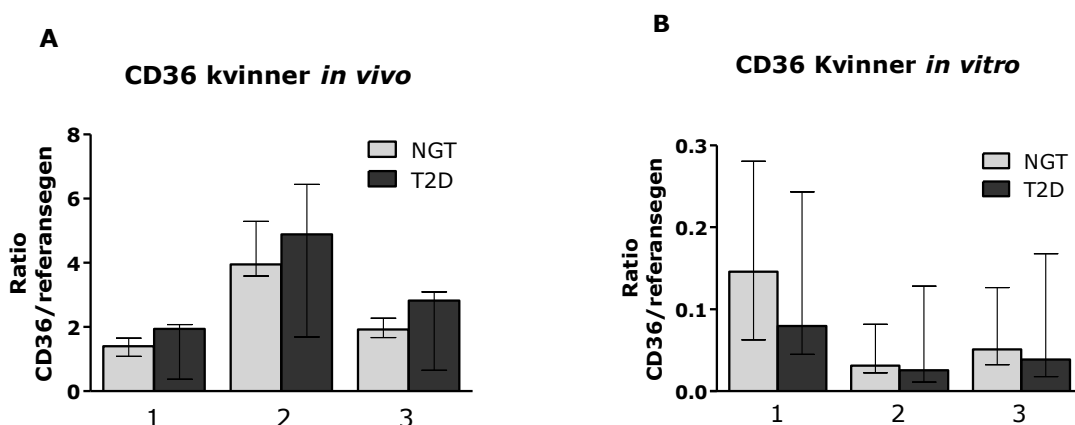
### 3.4.1 Uttrykk av CD36/FAT

CD36/FAT er et viktig transportprotein for frie fettsyrer. Det er lokalisert både på plasmamembranen og på ytre mitokondriemembran. Proteinet translokeres til de ulike cellebestanddelene etter behov. Tidligere studier har vist en permanent translokering av CD36/FAT ved overvekt og insulinresistens/T2D [92]. Andre studier har vist at translokeringen av CD36/FAT var svekket hos insulinresistente personer sammenliknet med personer med NGT [93], og at proteinuttrykket av CD36/FAT dessuten var økt hos overvektige med insulinresistens som trolig skyldtes en kompensasjon for manglende translokering av proteinet [94]. Det var derfor interessant å undersøke om CD36/FAT også var økt hos personer med T2D i denne studien.

Det var ingen signifikant forskjell i uttrykk av CD36/FAT hos pasienter med etablert T2D i forhold til pasienter med NGT i dette materialet (figur 3.5 A og B). Analyse av kun kvinnene i gruppen ga heller ingen signifikant forskjell, men det var større tendens til at kvinnelige pasienter med etablert T2D hadde et høyere uttrykk av CD36/FAT *in vivo* (figur 3.6 A). Dette var ikke tilfelle *in vitro* (figur 3.6 B).



**Figur 3.5: Uttrykk av "cluster of differentiation 36"/ fetttsyre translokase (CD36/FAT) hos sykelig overvektige pasienter med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N=7$  for begge gruppene.

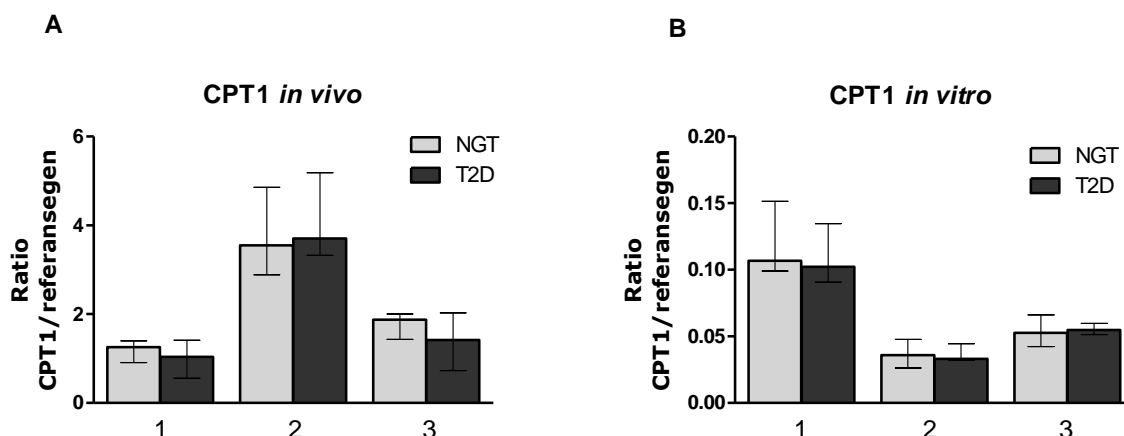


**Figur 3.6: Uttrykk av "cluster of differentiation 36"/ fetttsyre translokase (CD36/FAT) hos sykelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N=4$  for NGT gruppen og  $n=5$  for T2D.

### 3.4.2 Uttrykk av CPT-1

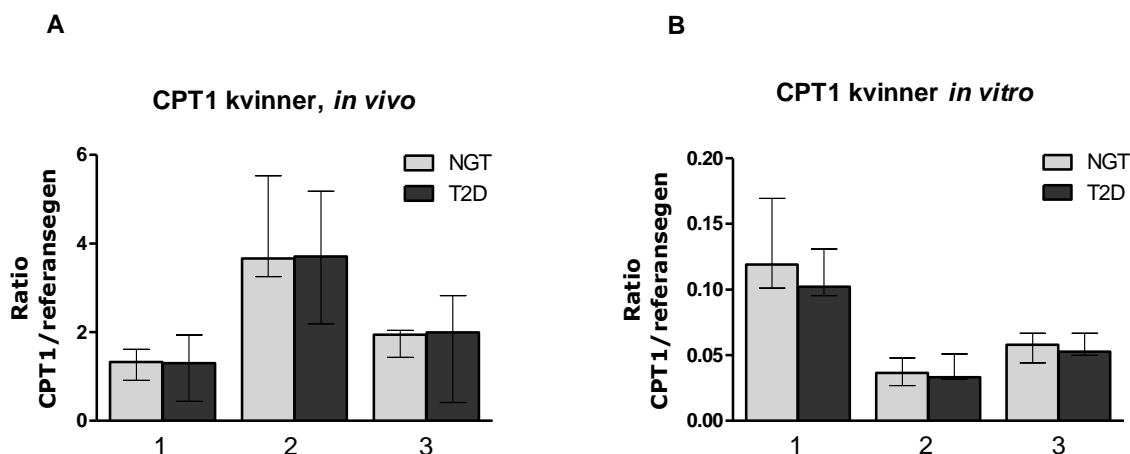
CPT1B regnes som et nøkkelprotein for opptak av frie fettstoffer til mitokondrier [15] og dermed et sentralt enzym i metabolismen av fettstoffer. Tidligere studier har vist at CPT1B uttrykket er redusert hos insulinresistente, overvektige personer [95]. Det var derfor interessant å undersøke om CPT1B uttrykket var redusert hos personer med T2D sammenliknet med personer med NGT i denne studien.

Det var ingen signifikant forskjell i genuttrykket av CPT1B hos pasienter med NGT og T2D, verken *in vivo* eller *in vitro* (figur 3.7 A og B). Dette var også gjeldende ved analysering av kun kvinner i de ulike gruppene (figur 3.8 A og B).



**Figur 3.7: Uttrykk av karnitin palmitoyl transferase 1 B (CPT1B) hos sykkelig overvektige pasienter med normal glukosetoleranse (NGT) og type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).**

1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot acidic syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N = 7$  for begge gruppene.



**Figur 3.8: Uttrykk av karnitin palmitoyl transferase 1 B (CPT1B) hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).**

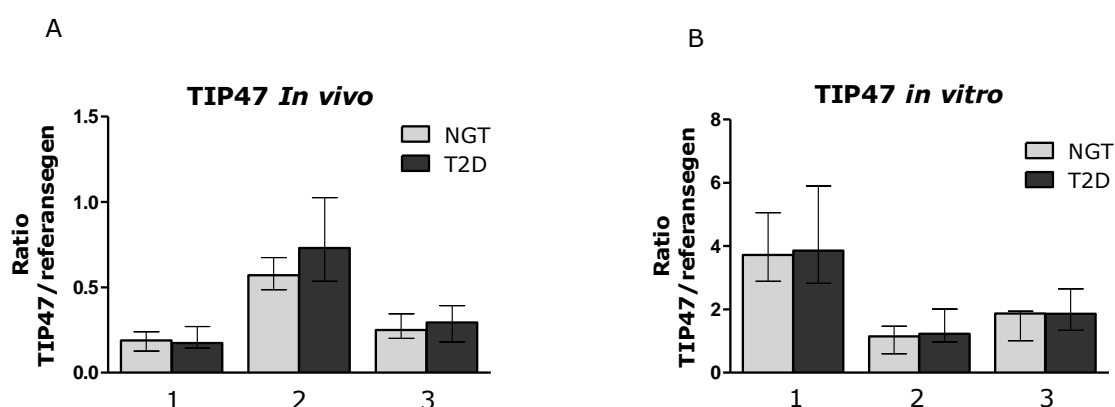
1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N = 4$  for NGT og  $n = 5$  for T2D.

### 3.4.3 Uttrykk av TIP47

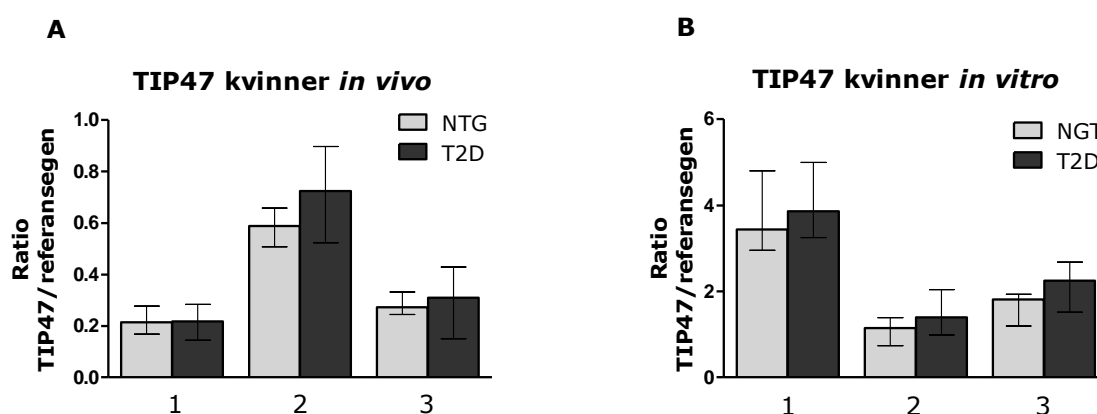
TIP47 er lokalisert i kappen rundt lipiddråper og er med på å hindre lipasens tilgang til TAG-kjernen. Tidligere studier har indikert at nedregulering av PAT-proteiner, der i

blant TIP47, kan være årsaken til opphoping av intramuskulære lipidmetabolitter (DAG, ceramider) og utvikling av insulinresistens [96]. Det var derfor i dette studiet interessant å undersøke om TIP47 var nedregulert hos pasienter med T2D i forhold til pasienter med NGT i denne studien.

Det var ingen signifikant forskjell i uttrykk av TIP47 mellom pasienter med NGT og T2D verken *in vivo* eller *in vitro* (figur 3.9 A og B). Det samme var gjeldende ved studier av kun kvinnene i de to gruppene (figur 3.10 A og B).



**Figur 3.9: Uttrykk av "tail interacting protein of 47 kDa" (TIP47) hos sykkelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N = 7$  for begge gruppene.

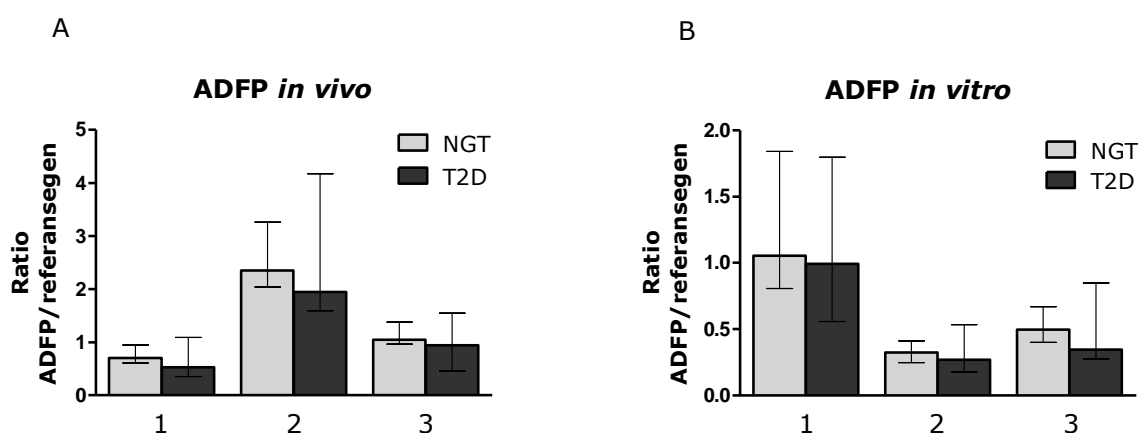


**Figur 3.10: Uttrykk av "tail interacting protein of 47 kDa" (TIP47) hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N = 4$  for NGT og  $n = 5$  for T2D.

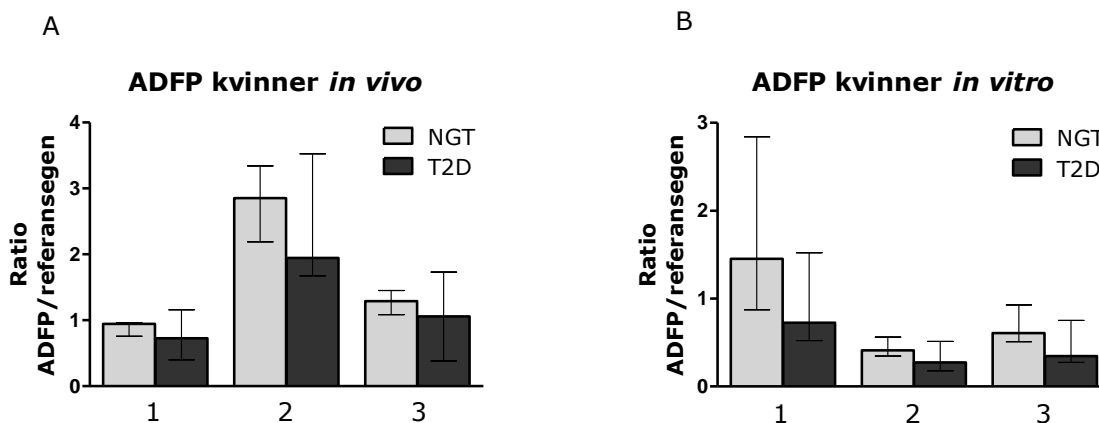
### 3.4.4 Uttrykk av ADFP

ADFP er på lik linje som TIP 47 et viktig protein i proteinkappen rundt lipiddråpene og dermed også en viktig aktør i lipidmetabolismen. Dette proteinet finnes kun bundet til lipiddråper og degraderes raskt i endosomer ved frigjøring fra lipiddråpene. Det er, som tidligere nevnt under punkt 3.4.3 (TIP47), en indikasjon på at nedregulering av PAT proteiner kan føre til opphoping av intramuskulære lipider og utvikling av insulinresistens. Det var derfor interessant å undersøke om uttrykket av dette proteinet var nedregulert hos personer med T2D i forhold til personer med NGT i denne studien.

Det var ingen signifikant forskjell i uttrykk av ADFP mellom pasienter NGT og T2D verken *in vivo* eller *in vitro* (figur 3.11 A og B.). Det samme var gjeldende ved studier av kun kvinnene i de to gruppene, men resultatene viste en tendens til at kvinner med T2D hadde et noe lavere uttrykk av dette genet både *in vivo* og *in vitro* (figur 3.12 A og B).



**Figur 3.11: Uttrykk av adipose differentiation related protein (ADFP) hos sykelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N=7$  for begge gruppene.



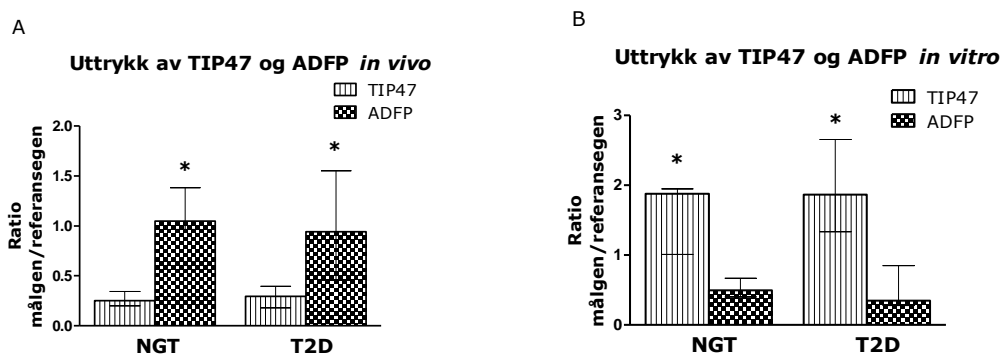
**Figur 3.12: Uttrykk av adipose differentiation related protein (ADFP) hos sykelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N = 4$  for NGT og  $n = 5$  for T2D.

### 3.4.5 Uttrykk av TIP47 i forhold til ADFP

Studier har vist at uttrykket av TIP47 og ADFP reguleres i forhold til hverandre. Det vil si at den ene oppreguleres hvis den andre nedreguleres [58]. Det var derfor interessant å undersøke om det var noen forskjell mellom uttrykket av TIP47 kontra ADFP i dette materialet. Det ble dessuten utført en korrelasjonsanalyse mellom *in vivo* konsentrasjonen av triglyserider (TG) og uttrykket av ADFP og TIP47. Siden det ikke var noen signifikant forskjell mellom gruppene verken for konsentrasjonene av TG eller genuttrykket av TIP47 og ADFP, ble gruppene slått sammen ved denne analysen.

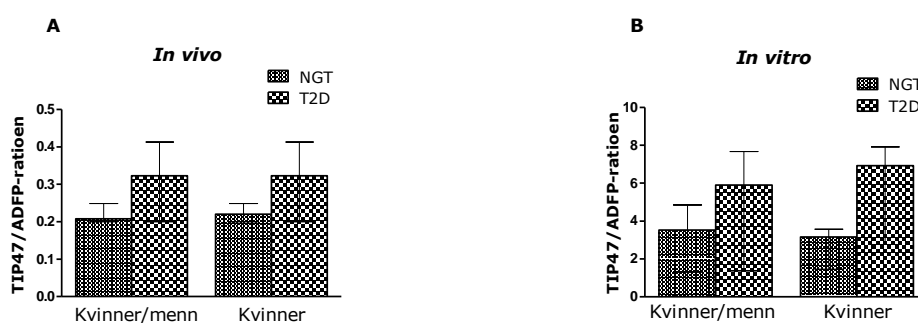
Det var et signifikant høyere uttrykk av ADFP i forhold til TIP47 både hos pasienter med NGT og etablert T2D ved studier *in vivo* (figur 3.13A). Det var derimot et signifikant høyere uttrykk av TIP47 i forhold til ADFP *in vitro* (figur 3.13 B). Pasienter med T2D hadde en tendens til høyere TIP47/ADFP-ratio både *in vivo* og *in vitro* (figur 3.14 A og B). Dette var også gjeldende i studier av kun kvinnene.

Det ble ikke påvist noen korrelasjon mellom TIP47 eller ADFP i forhold til konsentrasjonen av TG (figur 3.15) i dette materialet. Innvirkning av tilfeldige feil på korrelasjonsanalysen var sannsynligvis årsaken til at korrelasjonskoeffisienten likevel ble forholdsvis høy siden  $p > 0,05$ .



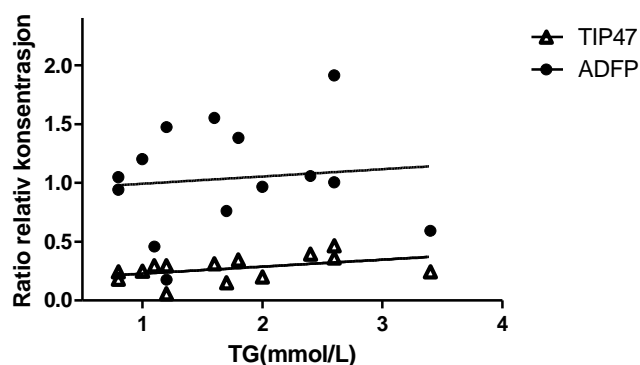
**Figur 3.13: Uttrykk av "tail interacting protein of 47 kDa" (TIP47) og fettcellerelatert differensieringsprotein (ADFP) hos sykkelig overvektige pasienter med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes 2 (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).**

Normalisert mot et gjennomsnitt av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4). Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde. \* $p < 0,05$ .  $N=7$  for alle datasett.



**Figur 3.14: Uttrykk av "tail interacting protein of 47 kDa" (TIP47)/ fettcellerelatert differensieringsprotein (ADFP)-ratioen hos sykkelig overvektige pasienter med normal glukose toleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes 2 (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).**

Genuttrykk normalisert mot et gjennomsnitt av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4) er benyttet ved beregning av ratioen mellom TIP47 og ADFP. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasett.  $N=7$  for kvinner/menn med NGT og T2D in vivo og in vitro,  $n=4$  for kvinner med NGT og  $n=5$  for kvinner med T2D in vivo og in vitro.



**Figur 3.15: Korrelasjon mellom "tail interacting protein of 47 kDa" (TIP47) og fettcellerelatert differensieringsprotein (ADFP) (uttrykk *in vivo*) og konsentrasjonen av tri glyserider (TG) i plasma.** TIP47:  $r=0,44$  ( $p=0,11$ ), ADFP:  $r=0,11$  ( $p=0,72$ ).  $N= 14$

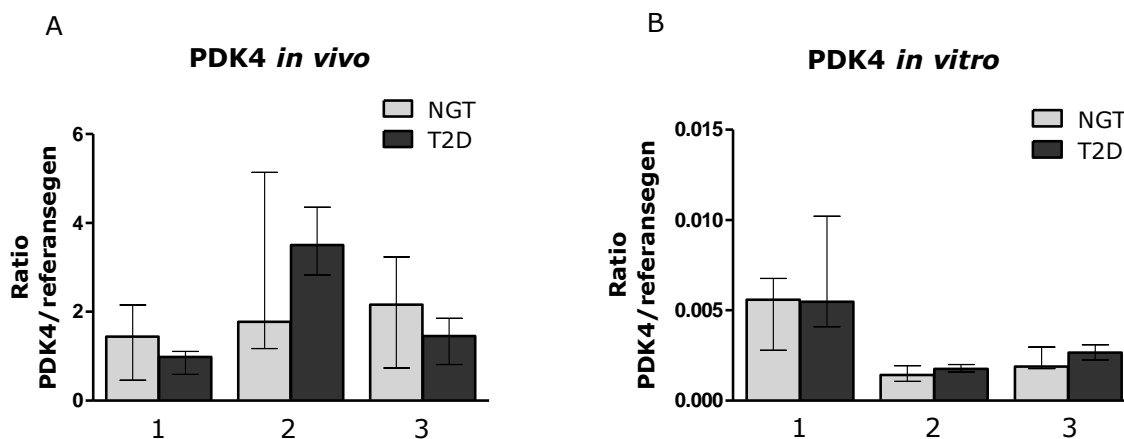
### 3.4.6 Uttrykk av PDK4

PDK4 er et viktig enzym i oksidasjonen av glukose ved at det inaktiverer pyruvat dehydrogenase komplekset (PDC) i mitokondrier og dermed blokkerer omdannelsen av pyruvat til acetyl CoA. Det er ved tidligere studier funnet at PDK4-aktiviteten økes ved T2D [66]. Det var derfor interessant å undersøke om PDK4-uttrykket også var økt hos pasienter med T2D i forhold til pasienter med NGT ved denne studien.

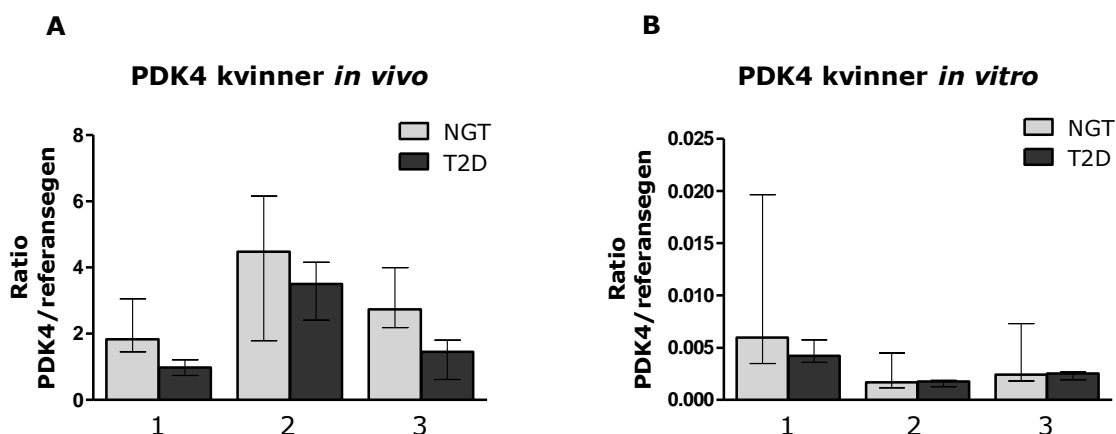
Det var ingen signifikant forskjell i genuttrykket av PDK4 mellom pasienter med NGT og T2D verken *in vivo* eller *in vitro* (figur 3.16 A og B). Ved studier av kun kvinner, ble det heller ikke vist noen signifikant forskjell, men her var det en tendens til at PDK4 var nedregulert hos pasienter med T2D *in vivo* (figur 3.17 A). Dette var i motsetning til tidligere studier utført på personer med T2D. Denne tendensen var knapt synlig *in vitro* (figur 3.17 B).

Det ble i også utført en korrelasjonsanalyse mellom uttrykket av PDK4 *in vivo* og konsentrasjonen av fastende glukose (figur 3.18 A) og HbA1c (figur 3.18 B). Siden det ikke var statistiske forskjeller i uttrykket av PDK4 mellom de to gruppene ble gruppene slått sammen ved denne analysen. Resultatet viste at det var en negativ korrelasjon mellom uttrykket av PDK4 og konsentrasjonen for fastende glukose. Siden denne forskjellen ble detektert *in vivo* var det dessuten interessant å undersøke om dette også var gjeldene *in vitro*. Korrelasjonsanalysen indikerte derimot at det ikke var noen korrelasjon mellom glukosekonsentrasjonen og PDK4-uttrykket *in vitro* ( $r=0,05$ ,  $p=0,8$ ) (data ikke vist). Det var ingen korrelasjon mellom genuttrykk av PDK4 og HbA1c.

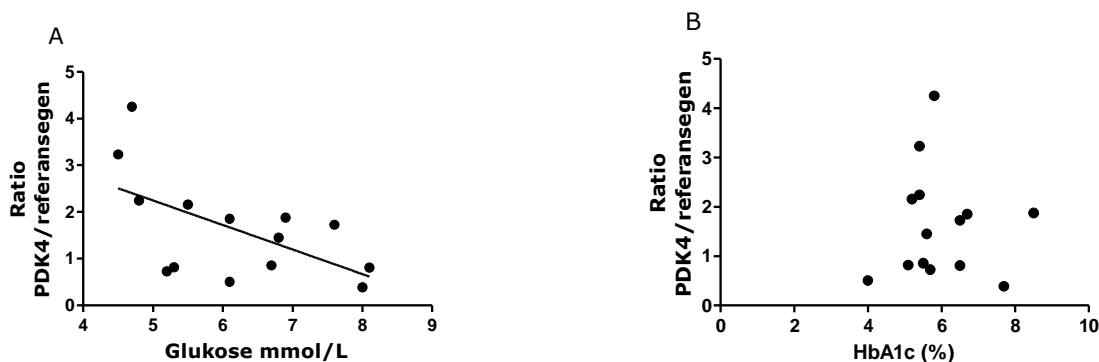




**Figur 3.16: Uttrykk av pyruvat dehydrogenase kinase isoenzym 4 (PDK4) hos sykelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N=7$  for begge gruppene.



**Figur 3.17: Uttrykk av pyruvat dehydrogenase kinase isoenzym 4 (PDK4) hos sykelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og etablert type 2-diabetes (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasettene.  $N=4$  for NGT og  $n=5$  for T2D.

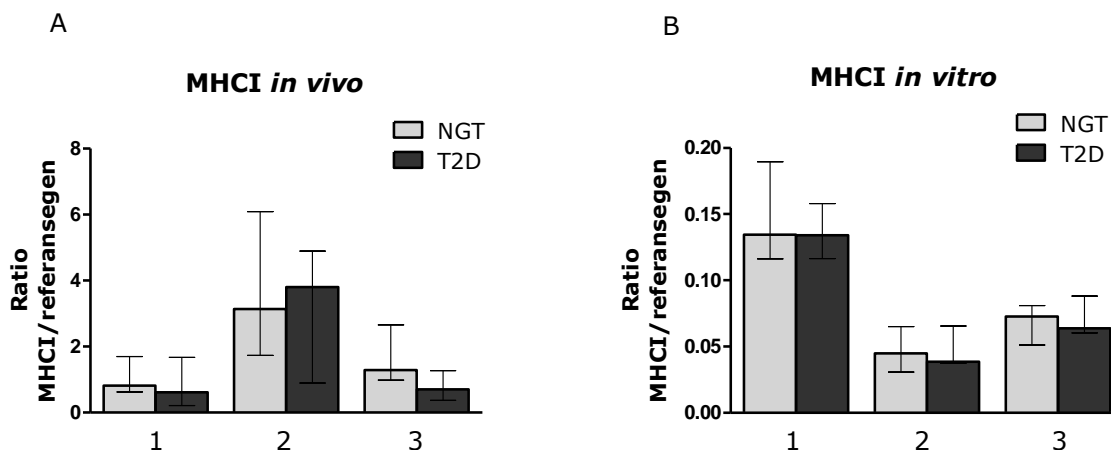


**Figur 3.18: Korrelasjon mellom genuttrykk av pyruvat dehydrogenase kinase isoenzym 4 (PDK4) *in vivo* og fastende verdier for glukose (A) og fastende verdier for glykosylert hemoglobin (HbA1c) (B).** Korrelasjon mellom PDK4 og glukose:  $r=-0,58$  ( $p=0,03$ ). Korrelasjon mellom PDK4 og HbA1c:  $r=0,02$  ( $p=0,95$ ).  $N=14$  for alle datasett.

### 3.4.7 Uttrykk av MHCI

Skjelettmuskulatur består av en blanding av ulike muskelfibre. Tidligere studier har vist at fedme, spesielt ektopisk fettakkumulering, er assosiert med lavere uttrykk av MHCI og settes derfor i sammenheng med utvikling av metabolsk syndrom [16]. Det var derfor interessant å undersøke om MHCI-uttrykket hos pasienter med T2D var lavere enn hos pasienter med NGT i denne studien.

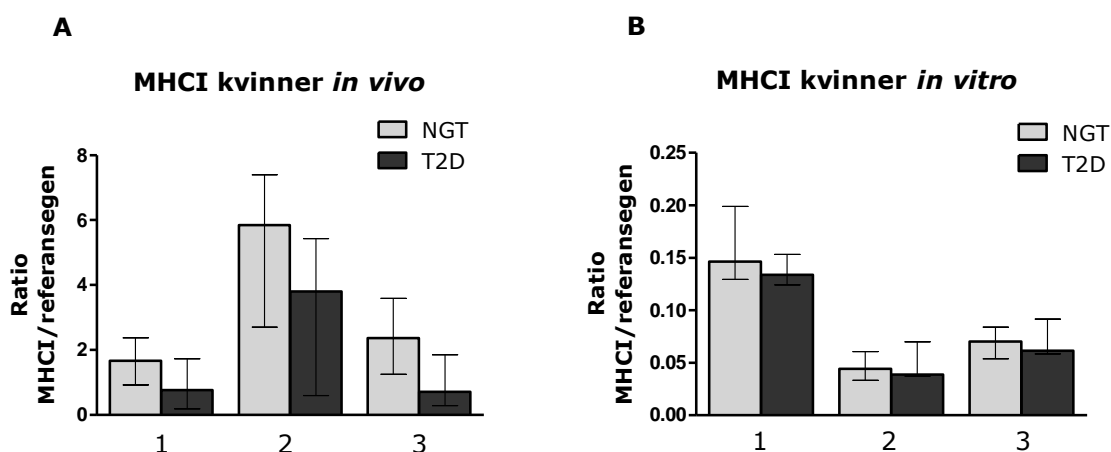
Det var ingen signifikant forskjell i uttrykket av MHCI mellom pasienter med NGT og T2D verken *in vivo* eller *in vitro* (figur 3.19 A og B). Ved studie av kun kvinnene var det heller ingen signifikant forskjell mellom gruppene, men resultatet viste en klar tendens til et høyere uttrykk av MHCI i gruppen med NGT sammenliknet med gruppen med T2D *in vivo* (figur 3.20 A). Dette var knapt synlig *in vitro* (figur 3.20 B).



**Figur 3.19: Uttrykk av myosin tung kjede type I (MHCI) hos sykkelig overvektige med normalglukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).**

1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4.

Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ .  $N = 7$  for begge gruppene.



**Figur 3.20: Uttrykk av myosin tung kjede type I (MHCI) hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).**

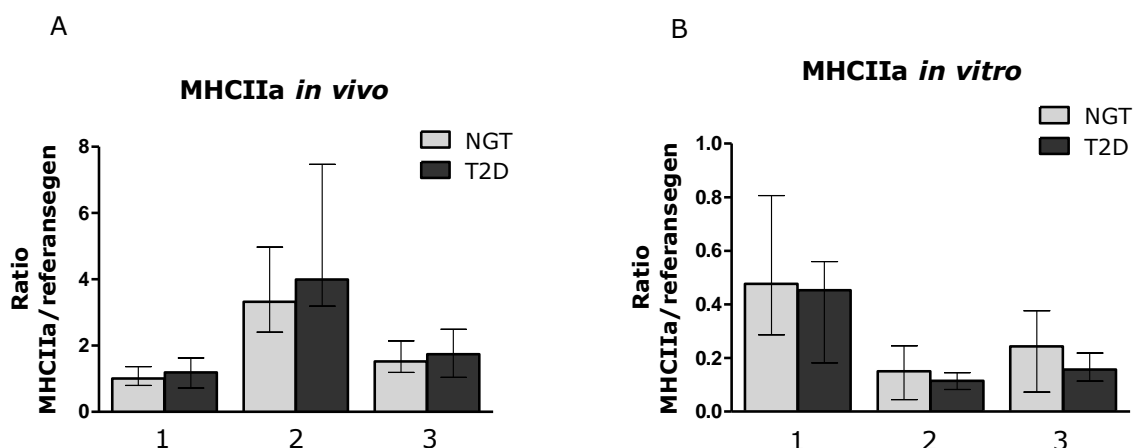
1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4.

Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ .  $N = 4$  for NGT og  $n = 5$  for T2D.

### 3.4.8 Uttrykk av MHCIIa

MHCII er muskelfibertyper som for det meste benytter glukose og glykogen som energikilde. Tidligere studier har vist at personer med T2D har et høyere uttrykk av MHCII sammenliknet med personer med NGT [97]. Det var derfor interessant å undersøke om MHCIIa var høyere uttrykt hos personer med T2D sammenliknet med personer med NGT i denne studien.

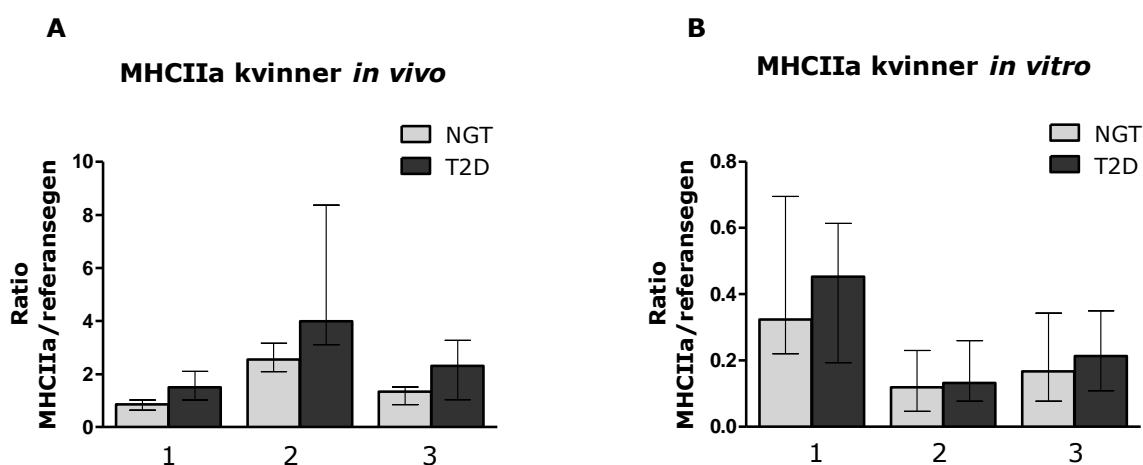
Det var ingen signifikant forskjell mellom uttrykk av MHCIIa verken *in vivo* eller *in vitro* mellom pasienter med NGT og T2D (figur 3.21 A og B). Ved studier av kun kvinnene i gruppene, ble det heller ikke detektert en signifikant forskjell, selv om resultatene her viste en tendens til økt uttrykk av MHCIIa i gruppen med T2D sammenliknet med gruppen med NGT *in vivo* (figur 3.22 A). Dette var noe mindre synlig *in vitro* (figur 3.22 B).



**Figur 3.21: Uttrykk av myosin tung kjede type IIa (MHCIIa) hos sykkelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).**

1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4.

Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ .  $N=7$  for begge gruppene.



**Figur 3.22: Uttrykk av myosin tung kjede type IIa (MHCIIa) hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).**

1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4.

Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ .  $N=4$  for NGT og  $n=5$  for T2D.

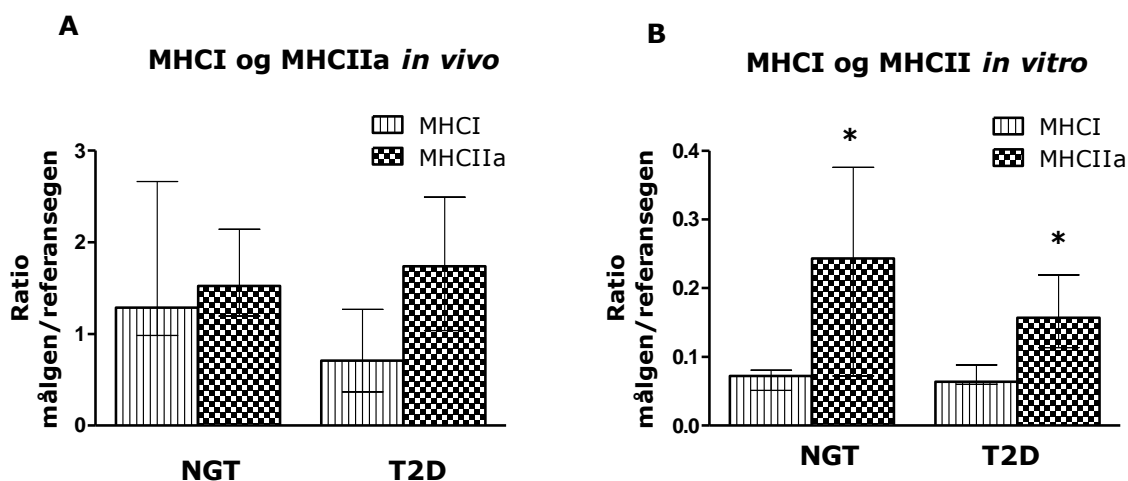
### 3.4.9 Uttrykk av MHCI i forhold til MHCIIa

Som tidligere nevnt er det ved tidligere studier vist at personer med T2D har en annen muskelfibersammensetning enn personer med normal glukosetoleranse. Det var derfor interessant å undersøke om uttrykket av MHCI relativt til MHCIIa varierte mellom de to gruppene.

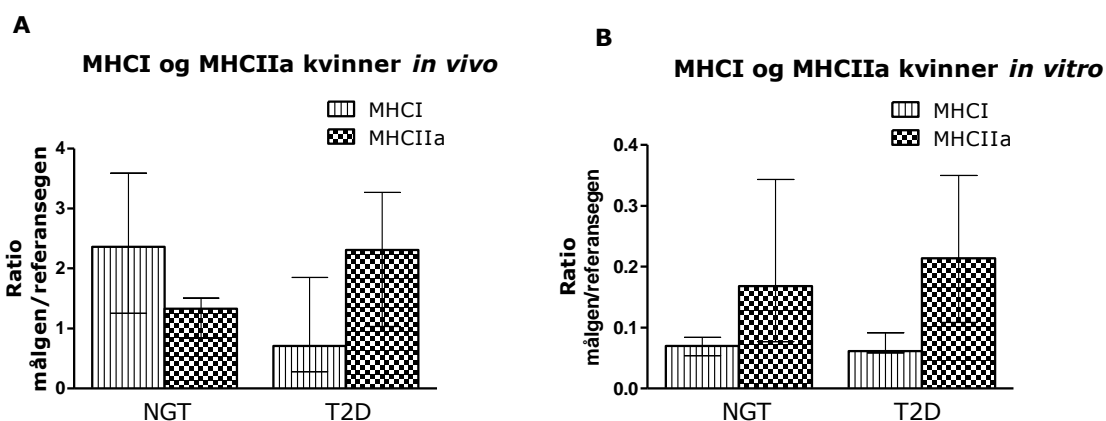
Det var ingen signifikant forskjell mellom uttrykket av MHCI og MHCIIa mellom pasienter med NGT og T2D *in vivo* (figur 3.23 A). Derimot var det et signifikant høyere uttrykk av MHCIIa i forhold til MHCI både i gruppen med NGT og med T2D *in vitro* (figur 3.23 B).

Ved studier av kun kvinnene var det ingen signifikant forskjell i uttrykket av MHCI kontra MHCIIa verken *in vivo* eller *in vitro* (figur 3.24 A og B). Ved *in vivo*-studiet var det derimot en tydeligere tendens til at kvinner med NGT hadde et høyere uttrykk av MHCI-fibre sammenliknet med MHCIIa, mens det var motsatt for kvinnelige pasienter med T2D (figur 3.24 A). Dette var ikke tilfelle *in vitro*, hvor uttrykke av MHCIIa hadde en tendens til å være høyere uttrykt i forhold til MHCI i begge gruppene (figur 3.24 B). Ratioen mellom MHCI og MHCIIa viste en tendens til å være lavere hos pasienter med T2D i forhold til pasienter med NGT *in vivo*. Denne tendensen ble enda tydeligere ved studier av kun kvinnene. *In vitro* kunne denne tendensen anes hos kvinnene.

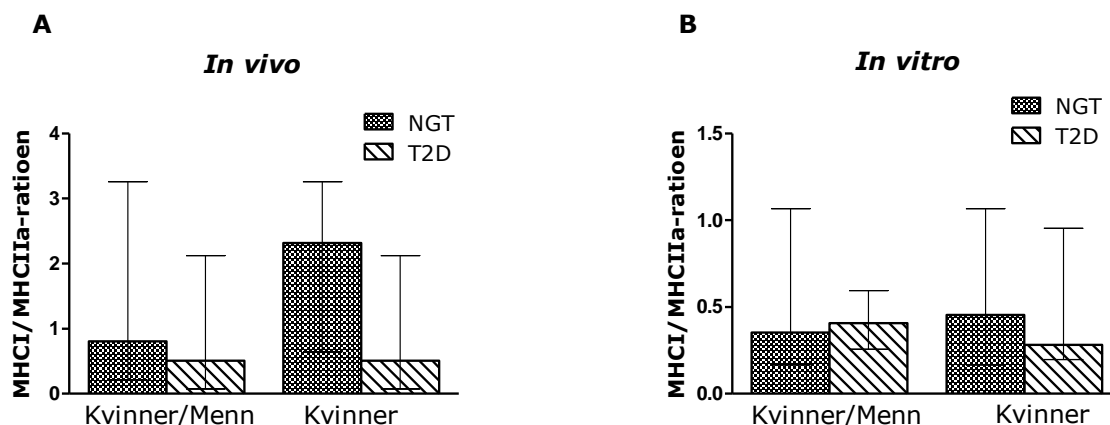
Det ble i tillegg utført en korrelasjonsanalyse mellom BMI og uttrykket av MHCI og MHCIIa (*in vivo*). Siden det var en klar tendens til at det var en forskjell mellom gruppene, ble det valgt å se på korrelasjonen i hver gruppe. Det var ingen korrelasjon mellom BMI og uttrykket av MHCI eller MHCII verken i gruppen med NGT (3.26 A) eller i gruppen med T2D (3.26 B) i dette materiale.



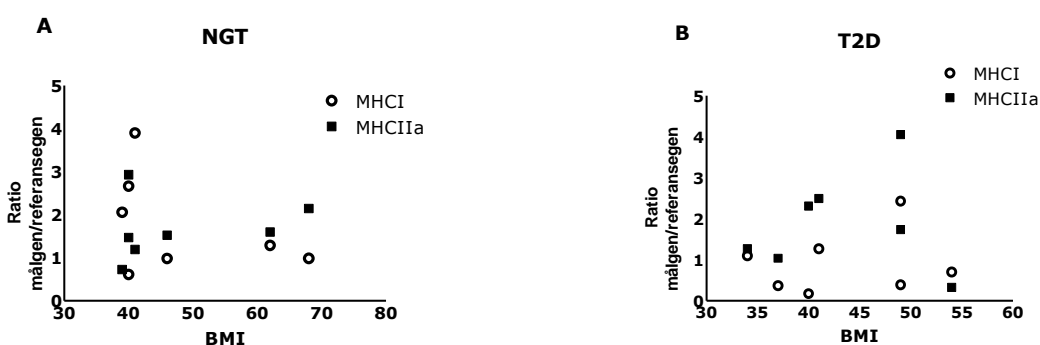
**Figur 3.23: Uttrykk av myosin tung kjede type I (MHC I) og myosin tung kjede type IIa (MHC IIa) hos sykkelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** Uttrykket av genene er normalisert mot et gjennomsnitt av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4). Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde. \*  $p < 0,05$ .  $N = 7$  for både NGT og T2D.



**Figur 3.24: Uttrykk av myosin tung kjede type I (MHC I) og myosin tung kjede type IIa (MHC IIa) hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** Uttrykket av genene er normalisert mot et gjennomsnitt av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4). Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$  for alle datasett.  $N = 4$  for NGT og  $n = 5$  for T2D.



**Figur 3.25: Uttrykk av myosin tung kjede type I (MHC I)/myosin tung kjede type IIa (MHC IIa)-ratioen hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) in vivo (A) og in vitro (B).** Genuttrykk normalisert mot et gjennomsnitt av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4) ble benyttet ved bergning av ratioen mellom MHC I og MHC IIa.  $N=7$  for kvinner/menn med NGT og T2D in vivo og in vitro,  $n=4$  for kvinner med NGT og  $n=5$  for kvinner med T2D in vivo og in vitro. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P>0,05$  for alle datasett.

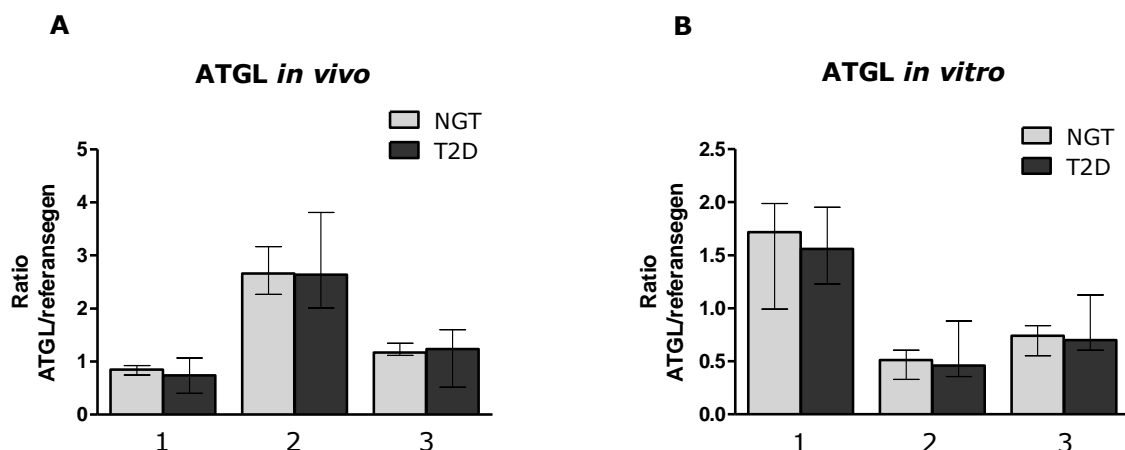


**Figur 3.26: Korrelasjonen mellom BMI og uttrykket av myosin tung kjede type I (MHC I) og myosin tung kjede type IIa (MHC IIa) hos sykkelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) (A) og med type 2-diabetes (T2D) (B).** NGT: BMI/MHC I:  $r=-0,43$  ( $p=0,3$ ), BMI/MHC IIa:  $0,24$  ( $p=0,6$ ). T2D; T2D: BMI/MHC I:  $r=0,20$  ( $p=0,67$ ), BMI/MHC IIa:  $r=0,06$  ( $p=0,9$ ).  $N=7$  for alle grupper

### 3.4.10 Uttrykk av ATGL

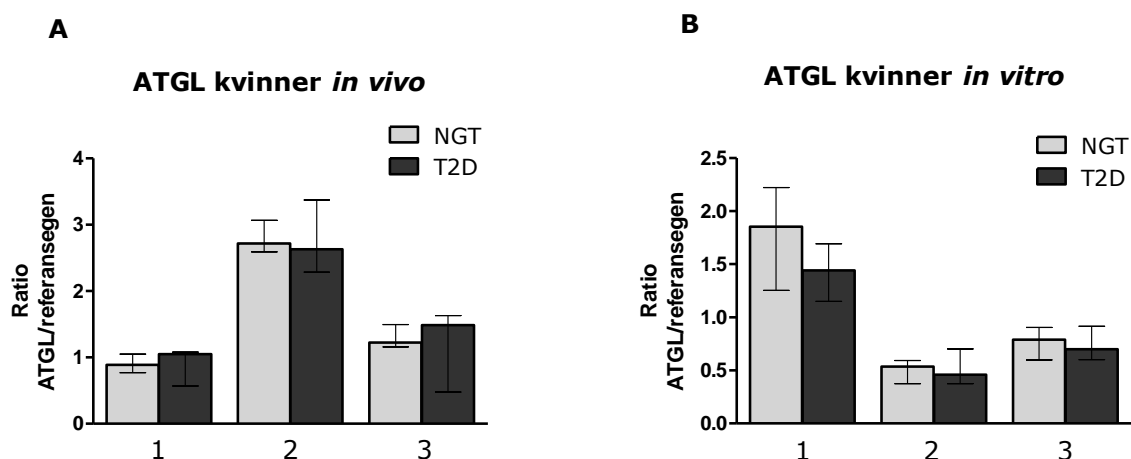
ATGL er en lipase som katalyserer hydrolysen av TAG til DAG. Tidligere studier har vist at overvektige personer med T2D har et økt uttrykk av dette enzymet [71]. Det var derfor interessant å undersøke om pasienter med T2D hadde et økt uttrykk av ATGL i forhold til pasienter med NGT i denne studien.

Det var ingen signifikant forskjell i uttrykket av ATGL i gruppen med T2D sammenliknet med gruppen med NGT verken *in vivo* eller *in vitro* (figur 3.27 A og B). Ved studier av kun kvinnene i de to gruppene var det heller ingen signifikant forskjell (figur 3.28 A og B).



**Figur 3.27: Uttrykk av adipose triglyserid lipase (ATGL) hos sykkelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** 1:

Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ .  $N=7$  for begge gruppene.



**Figur 3.28: Uttrykk av adipose triglyserid lipase (ATGL) hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og med type 2-diabetes (T2D) *in vivo* (A) og *in vitro* (B).** 1: Normalisert mot glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), 2: Normalisert mot

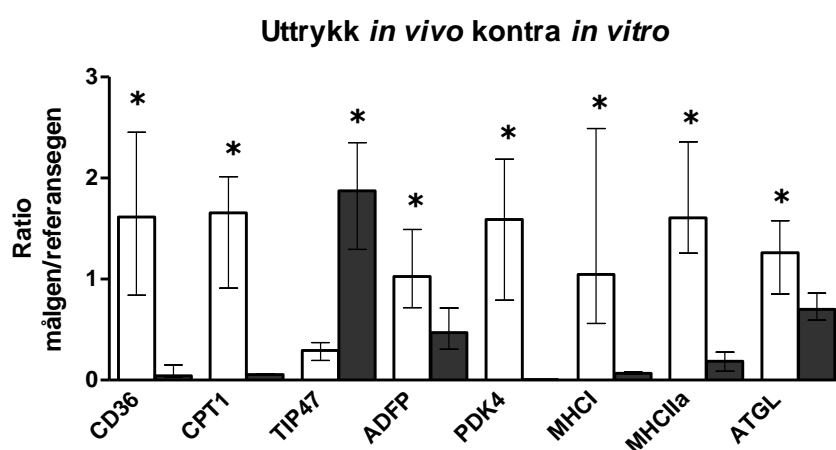
syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4), 3: Normalisert mot et gjennomsnitt av GAPDH og 36B4. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ .  $N=4$  for NGT og  $n=5$  for T2D.



### 3.4.11 Genuttrykk *in vitro* kontra *in vivo*

Tidligere studier på dette materialet ga en indikasjon på at cellene bevarte sine fenotypiske egenskaper med hensyn til metabolske funksjoner *in vitro* [90]. Det var derfor interessant å undersøke om genuttrykket *in vitro* også var likt genuttrykket *in vivo*.

I dette materialet var det signifikant høyere uttrykk av nesten alle de utvalgte genene *in vivo* kontra *in vitro* (figur 3.29). TIP47 var det eneste genet som hadde et signifikant høyere uttrykk *in vitro* sammenliknet med *in vivo*. For å vise hvor mye genuttrykkene var endret *in vivo* kontra *in vitro*, ble forholdet mellom de to uttrykkene regnet ut (tabell 3.3). Utrykket av PDK4 hadde den største forskjellen, mens uttrykket av ATGL varierte minst mellom de to systemene (tabell 3.3).



**Figur 3.29: Uttrykk av gener *in vivo* og *in vitro*.** Uttrykket av utvalgte gener normalisert mot et gjennomsnitt av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4). Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde. \* $p < 0,05$ .  $N=14$  for alle datasett. "Cluster of differentiation" 36/ fettsyre translokase (CD36/FAT), karnitin palmitoyl transferase 1 B (CPT1B), "tail interacting protein of 47 kDa" (TIP47), fettcellerelatert differensieringsprotein (ADFP), pyruvat dehydrogenase kinase isoenzym 4 (PDK4), myosin tung kjede type I (MHC1), myosin tung kjede type IIa (MHCIIa), adipose triglyserid lipase (ATGL).

**Tabell 3.3: Utrykk av gener in vivo/in vitro.**

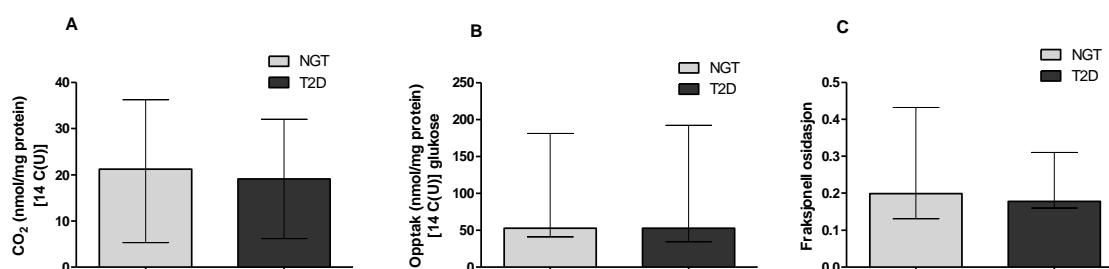
CD36/FAT	CPT1B	TIP47	ADFP	PDK4	MHCI	MHCIIa	ATGL
32 (16-70)	28 (19-39)	0,2 (0,1-0,2)	2 (1-4)	449 (259-339)	16 (8-25)	11 (4-15)	2 (1-2)

Ratioen mellom uttrykket av de enkelte genene in vivo og in vitro (ratio målgen/referanse gen in vivo delt på målgen/referansegen in vitro). Det er benyttet verdier normalisert mot et gjennomsnitt av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og syreholdig ribosomalt fosfoprotein 36B4 (36B4) ved utregningene. Resultatene er presentert som median med interkvartilbredde. N=14 for alle datasett. "Cluster of differentiation 36"/ fetttsyre translokase (CD36/FAT), karnitine palmitoyl transferase 1 B (CPT1B), "tail interacting protein of 47 kDa" (TIP47), fettcellerelatert differensieringsprotein (ADFP), pyruvat dehydrogenase kinase isoenzym 4 (PDK4), myosin tung kjede type I (MHCI), myosin tung kjede type IIa (MHCIIa), adipose triglyserid lipase (ATGL).

### 3.5 Glukoseoksidasjon

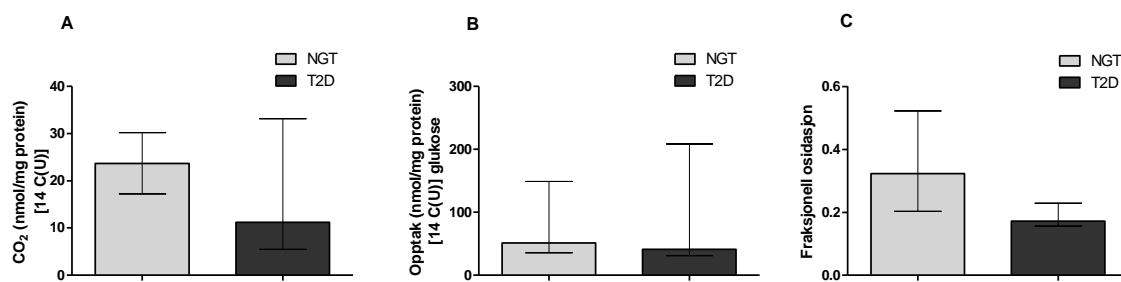
Det var ønskelig å undersøke om muskelceller fra pasienter med NGT og med T2D i et *in vitro*-system tok opp og oksiderte glukose i samme grad.

Det ble ved disse forsøkene ikke detektert noen signifikant forskjell mellom de to donorgruppene ( $p > 0,05$ ) med hensyn til glukoseoksidasjon, opptak eller fraksjonell oksidasjon (figur 3.30). Ved analyse av kun andelen av kvinner i gruppene, ble det vist en tendens til lavere oksidasjon og fraksjonell oksidasjon (figur 3.31). Basalopptaket var tilnærmet likt for begge gruppene, men muskelceller fra kvinnelige pasienter med T2D viste en klar tendens til å oksidere en mindre andel glukose i forhold til de med normal glukosetoleranse.



**Figur 3.30: Glukoseoksidasjon (A), totalt glukoseopptak (B) og fraksjonell oksidasjon (C) hos sykelig overvektige med normal glukosetoleranse (NGT) og type 2-diabetes (T2D).**

Myotubene ble eksponert for [<sup>14</sup>C]-glucose (2 uCi/ml) i 2 timer, CO<sub>2</sub> fanget i 2 timer og cellene høstet i 0,5 ml NaOH. Resultatet er presentert som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ . N=7 for NGT-gruppen og n=6 for T2D-gruppen.



**Figur 3.31: Glukose oksidasjon (A), totalt opptak av glukose (B) og fraksjonell oksidasjon (C) hos sykkelig overvektige kvinner med normal glukosetoleranse (NGT) og type 2-diabetes (T2D).** Myotubene ble eksponert for [<sup>14</sup>C]-glucose (2 uCi/ml) i 2 timer, CO<sup>2</sup> fanget i 2 timer og cellene høstet i 0,5 ml NaOH. Resultatet er presenter som median med interkvartilbredde.  $P > 0,05$ .  $N=4$  for NGT og  $n=5$  for T2D.

## 4 Diskusjon

Antall diabetestilfeller har økt raskt de siste årene, og det internasjonale diabetesforbundet (IDF) har estimert antall diabetestilfeller på verdensbasis til 366 millioner i 2011 [98]. Av disse har over 90 % T2D. Tidligere epidemiologiske studier, både på monozygote tvillinger, førstegenerasjons slektninger og på ulike etniske grupper, har vist at T2D har en arvelighet på >50 % [45]. Den raske økningen av T2D tilfellene som nå registreres er derimot en klar indikasjon på at den genetiske predisposisjonen for sykdommen trigges av miljøpåvirkninger og vårt moderne levesett. Mange studier har blitt gjennomført i søket etter å finne den genetiske årsaken til utviklingen av T2D, men resultatene er foreløpig av lav prediktiv verdi. Overvekt og fedme har en klar sammenheng med utvikling av livsstilsindusert T2D, siden 80 % av disse personene er definerte som overvektige ( $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ ) [1]. Av pasientene som gjennomgår en bariatrisk operasjon ved SSO ved SIV HF i Tønsberg har bare 30 % av pasientene en T2D-diagnose til tross for ekstrem fedme [2]. For å komme nærmere en forklaring på hvorfor kun 30 % av pasientene har etablert T2D ble det satt i gang et samarbeidsprosjekt mellom SSO ved SIV HF, Institutt for farmasi og bioingeniørfag ved HiOA og Farmasøytisk institutt ved UiO. Ved å kombinere både kliniske og basalvitenskapelige undersøkelsesmetoder var målet å komme noe nærmere en forståelse av T2D-gåten i forhold til fedme. Muskelbiopsimaterialet, tatt under bariatrisk kirurgi ved SSO ved SIV HF, gir muligheten til å studere en spesiell undergruppe av pasienter hvor alle lider av sykkelig overvekt og som derfor vil ha like forutsetninger for å kunne utvikle miljøpåvirkede metabolske lidelser.

Det er tidligere blitt utført en masteroppgave på myoblaster fra samme biobank som er benyttet i denne oppgaven. Oppgaven gikk ut på å studere fettsyre- og glukosemetabolismen i disse cellene ved bruk av funksjonelle tester. Dette for om mulig å avdekke om det var en forskjell mellom pasienter med NGT og med T2D [90]. Resultatet fra denne studien tydet på at det kunne være en forskjell i både metabolismen av fettsyrer og glukose mellom sykkelig overvektige med NGT og med T2D. Det var derfor interessant å undersøke om uttrykket av viktige gener involvert i glukose- og lipidmetabolismen også var ulikt i disse to pasientgruppene, både ved *in vivo*- og *in vitro*-studier.

Det var i tillegg ønskelig å undersøke om eventuelle funn i genuttryksstudiet kunne korreleres opp mot biokjemiske analysedata fra pasientene.

## 4.1 Klassifisering og valg av donorer

Til denne studien ble det valgt ut pasienter fra to ulike grupper; NGT og T2D.

Klassifiseringen av pasienter med NGT ble utført på bakgrunn av verdier for fastende glukose og HbA1c, mens pasienter som var under diabetesbehandling ble valgt til T2D-gruppen. Alle blodprøver ble dessverre ikke tatt på operasjonsdagen siden dette ikke var rutine ved uttaket av de første prøvene (EO1-EO21). Blodprøvedataene var fra konsultasjonstidspunktet og kunne dermed være inntil to år gamle. Det kan derfor ikke utelukkes at enkelte av pasientene i NGT-gruppen kan ha utviklet insulinresistens/T2D før operasjonstidspunktet uten at dette har blitt oppdaget. Dette var også gjeldende for EO55 hvor blodprøve ved en feiltagelse ikke ble tatt på operasjonsdagen.

Pasienter i T2D-gruppen hadde signifikant høyere verdier for fastende glukose og HbA1c enn NGT-gruppen. Pasienter medisinerert med antidiabetika vil ofte kunne ha fastende glukoseverdier litt i overkant av 6 mmol/L uten at dette vil ha noen betydning. Pasient med donorkode EO57 hadde derimot glukoseverdi på 8 mmol/L uten en forhøyet verdi for HbA1c, noe som kan tyde på at blodprøven ikke var tatt fastende. Pasient med donorkode EO14 hadde, i tillegg til noe forhøyet verdier for fastende glukose, også en forhøyet verdi for HbA1c. Dette tydet på at denne pasienten sannsynligvis hadde en noe dårlig regulert diabetes tilstand.

Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene med hensyn til insulinkonsentrasjonen. Pasient med donorkode EO21 i NGT-gruppen hadde derimot en insulinkonsentrasjon rett over anbefalt verdi (>210 pmol/L). Siden blodprøvedata for denne pasienten ikke var fra operasjonsdagen, kan det ikke utelukkes at pasienten er plassert i feil gruppe.

Mange av pasientene med T2D ble behandlet med statiner. Dette medikamentet reduserer konsentrasjonen av TG med opptil 20 % [99]. De fleste pasientene i T2D-gruppen ble dessuten behandlet med antidiabetika, blant annet metformin. Metformin aktiverer AMP-aktivert protein kinase (AMPK) som er viktig for kroppens totale energibalanse [100]. Det kan ikke utelukkes at disse medikamentene også kan ha bidratt til å maskere en eventuell forskjell mellom gruppene.

## 4.2 Dyrking av myoblaster fra EO-pasienter

Det var tydelige variasjoner i hvordan myoblaster fra ulike donorer prolifererte og differensierte i primærkultur. Antall viable celler ble ikke målt etter opptining av myoblaster, men det ble notert stor variasjon i mengden celler som hadde festet seg til ECM etter 48-timers kultivering. Dette resulterte i at antall proliferasjonsdyktige celler/ml proliferasjonsmedium varierte mye ved oppstart, og det kan ikke utelukkes at dette kan

ha hatt innvirkning på resultatene videre i studiet. Det ble observert at myoblaster som trengte mange døgn for å oppnå en konfluens på ca. 80 % også hadde tendens til å differensiere sent. Disse kulturene inneholdt dessuten noe lite differensierte myotuber etter 7 dager i M3-medium. Mulige årsaker til denne forskjellen mellom primærcelekkulturene kan være ulik påkjønning under isolering av satelittceller eller at satelittceller fra ulike donorer prolifererer/differensierer ulikt i primærkultur på grunn av ukjente biologiske variasjoner.

Påvirkning av andre cellebiologiske funksjoner kan også ligge til grunn for ulik proliferasjons- og differensieringshastighet. Det ble som nevnt ikke tatt hensyn til antall viable celler etter tining ved etablering av primærkultur ved disse forsøkene. I kulturer, hvor konsentrasjonen av viable celler var lav ved etablering, må nødvendigvis cellene proliferere flere ganger for å oppnå en konfluens på ca. 80 % sammenliknet med en kultur med høyere konsentrasjon av viable celler. Humane myoblaster i kultur har en definert proliferativ kapasitet i likhet med andre somatiske celler og vil etter et visst antall delinger være begrenset av en terminal vekstarrest kalt replikativ senescens. Årsaken til dette er først og fremst en progressiv telomerforkortelse som tilslutt irreversibelt vil trekke cellen ut av cellyklus. Myoblaster som har kommet til dette stadiet vil ikke lenger kunne proliferere. De vil dermed kunne differensiere til myofibriller. Effekten av dette er studert av A. Bigot et al. som viste at celler som har inngått replikativ senescens differensierte senere og dessuten fusjonerte dårligere enn andre myofibriller [101]. De observerte dessuten et økende uttrykk av to fibroblastiske faktorer (bindevevsvekstfaktor (CTGF) og kollagen IV) ved økende antall celledelinger. En annen studie viste i tillegg at senescente celler har et endret uttrykk av mange gener som en konsekvens av denne biologiske prosessen [102]. Det kan ikke utelukkes at enkelte av kulturene i denne studien kan ha overgått den proliferative kapasiteten, og at dette kan ha hatt innvirkning på resultatene presentert i denne oppgaven.

Ved fremtidige studier på muskelceller i kultur kan det derfor være nødvendig å legge inn flere kontrollrutiner i dyrkningsprosessen slik at man med sikkerhet kan utelukke at de overnevnte faktorene kan ha inntruffet. Forslag til slike kontrollrutiner vil være:

Telle antall viable celler etter opptining. Antall viable celler/ml bør være konstant ved oppstart av kulturer.

Kontrollere differensieringsgraden til myotubene ved for eksempel å måle genuttrykket av myogenin [40].

## 4.3 Isolering av RNA

### 4.3.1 Isolering av RNA fra myotuber i kultur

Isolering av RNA fra primærkulturene ga variabelt utbytte. Utbyttet var dessuten synkende ved økende antall proliferasjonsdøgn. Som tidligere nevnt ble cellenes tilstand/differensieringsgrad ikke kontrollert. Det variable RNA-utbytte kan derfor skyldes både cellenes fysiologiske karakter og tekniske begrensninger vedrørende isoleringsmetoden.

### 4.3.2 Isolering av RNA fra muskebiopsier

Før muskelbitene ble homogenisert ble synlig fettvev skåret vekk. Det kan være en mulighet for at muskelbitene også inneholdt fettvev på innsiden uten at dette ble registrert. Teoretisk kan dette ha påvirket resultatene presentert i denne oppgaven siden muskel og fettvev har ulikt uttrykk av de respektive genene. Det regnes derimot med at innslaget av fettvev var minimalt, og det er derfor valgt å se bort i fra dette ved denne studien.

Isolering av RNA fra muskelbiopsiene var vanskeligere enn antatt. Flere metoder ble testet ut, både med hensyn til homogenisering (morter med flytende nitrogen, snitting av 4 µm-tynne snitt ved bruk av cryostat, homogenisator med keramiske kuler) og isolering av RNA (RNA/Protein Purification Kit (Norgen), RNeasy Fibrous kit (Qiagen), Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen)). Det ble forsøkt å kombinere ulike metoder for homogenisering og RNA-isolering. Problemet ga seg utslag i lavt RNA-utbytte og dårlig renhet (260/280 nm). Humane muskelbiopsier er sammensatt av muskelfibre og bindevev. For å få frigjort RNA fra vevsbitene var det derfor nødvendig med et kraftig lyseringsreagens (TRIZOL<sup>®</sup>) og bruk av mekanisk knusing (keramiske CK28-kuler og homogenisator Precellys 24). Renheten ved bruk av denne teknikken var derimot dårlig og hadde sannsynligvis årsak i forurensinger fra ulike reagenser benyttet under RNA-isoleringsteknikkene (eksempel fenol og etanol). Slike stoffer bør renses vekk for ikke å hemme nedstrømsreaksjoner som PCR. RNA isolert fra muskelbitene ble derfor rensset ytterligere ved bruk av et kolonnebasert kit (Rneasy, Qiagen).

## 4.4 Genetiske analyser

### 4.4.1 Bearbeidelse av real-time PCR data

Resultatene ble forsøkt beregnet etter ulike prinsipper beskrevet i litteraturen [85, 86] og anbefalt av instrumentleverandør [103]. Dette ga ulike resultater og dessuten verdifull lærdom om at valg av riktig beregningsmetode og kvalitetskontroll av rådata er essensielt for å gi et riktig bilde av et genuttrykk.

Metoden for beregning av genuttrykket ble valgt på bakgrunn av hva som ble vurdert som riktigst ved denne studien. Det ble valgt å bruke de relative konsentrasjonsverdiene utregnet av LC480, men bruk av disse verdiene krevde at PCR-analysene tilfredstilte visse krav. Effektiviteten mellom PCR-oppsettene skulle være tilnærmet lik og fortynningskurvene, som ble benyttet for avlesning av en relativ konsentrasjonsverdi, måtte dessuten gjelde for hele konsentrasjonsområdet. Disse kravene ble kontrollert og funnet godkjent ved denne studien.

Genuttrykket ble normalisert mot to referansegener. Begge referansegenene ble kontrollert og funnet stabilt uttrykt både i biopsiene og primærkulturene. Variasjonen i uttrykk av referansegener mellom biopsi og cellekultur varierte derimot noe mer enn innen hvert materiale. GAPDH hadde et høyere uttrykk i biopsimaterialet, mens 36B4 hadde et høyere uttrykk i cellekulturmaterialet. Resultatene viste derimot at de akkurat tilfredsstiller kriteriene for å kunne brukes som referansegener i denne studien.

Det er utviklet flere ulike dataprogrammer for å validere referansegener. Disse krever minst 3-5 genkandidater og kunne derfor ikke benyttes i valideringsarbeidet ved denne studien. For å øke reabiliteten ved fremtidige studier kan det være nyttig å teste ut flere referansegener og dessuten benytte dataprogram (eksempel NormFinder) i valideringsarbeidet.

#### 4.4.2 CD36/FAT

Studier har vist at CD36/FAT er essensiell for reguleringen av transport av fettsyrer inn i muskelceller [39]. I tillegg har det vist seg å ha en viktig rolle i mitokondriemembranen i kombinasjon med CPT1B for reguleringen av fettsyreoksidasjonen [39]. Økt uttrykk av CD36/FAT i plasmamembranen har tidligere blitt registrert ved overvekt uten at en øking av genuttrykket ble observert [47]. Dette kan skyldes en konstant redistribusjon av CD36/FAT til plasmamembranen som følge av økt translokering fra subcellulære domener. Ved en tidligere studie ble det registrert at translokeringen av CD36/FAT var svekket hos insulinresistente personer sammenliknet med personer med normal glukosetoleranse [93]. En annen studie viste dessuten at proteinuttrykket av CD36/FAT var økt hos overvektige med insulinresistens og argumentert med at dette trolig skyldes en kompenserende mekanisme for manglende translokering av proteinet [94]. Studier har også vist at CD36/FAT innholdet i mitokondriemembranen er viktig for reguleringen av fettsyreoksidasjonen og at blokkering av CD36/FAT førte til inhibering av denne prosessen [48]. En annen studie har observert at overvektsrelatert reduksjon av fettsyreoksidasjon hadde årsak i redusert antall mitokondrier og ikke en dysfunksjon i selve mitokondrien som tidligere antatt [48, 104].



Det ble ikke vist noen signifikant forskjell i genuttrykket av CD36/FAT mellom pasienter med NGT og T2D i denne studien verken *in vivo* eller *in vitro*. En viss tendens til økt uttrykk hos kvinner med T2D ble derimot registrert, noe som stemmer med tidligere refererte studier. Det å studere kvinner og menn hver for seg i et større antall vil kanskje bidra til at en forskjell i uttrykket for CD36/FAT vil bli mer fremtredende. Mange av de tidligere studiene gir også en klar indikasjon på at dette proteinet reguleres postranslasjonelt, og at det er lokaliseringen som har betydning for proteinets funksjon i fettsyremetabolismen. Nyere studier viser også at et økt uttrykk av dette proteinet ikke automatisk kan relateres til økt funksjon, men at det heller er mekanismer som styrer translokeringen av dette proteinet som har vist seg å være defekt og derfor vil være en viktig prosess å studere i fremtiden [52].

#### 4.4.3 CPT1B

Studier har vist at økt fettsyreopptak uten økt oksidasjon kan føre til akkumulering av intracellulære lipider [105]. CPT1B katalyserer det første trinnet ved import av LCFA over mitokondriemembranen. Tidligere dyreforsøk har vist at hemming av dette enzymet økte den cytoplasmatiske lipidkonsentrasjonen og førte til utvikling av insulinresistens når dyrene ble foret med fettrik kost [56]. Økt uttrykk av proteinet har dessuten vist seg å hindre lipidindusert insulinresistens både *in vivo* [15] og *in vitro* [95], noe som understreker at CPT1B er en viktig aktør i denne sammenhengen.

I denne studien ble det ikke påvist noen forskjell mellom de to gruppene, verken *in vivo* eller *in vitro*. En mulig årsak til *in vivo*-resultatet kan være at de fleste pasientene i T2D-gruppen var medisinerert med metformin. Dette medikamentet aktiverer AMPK og vil blant annet føre til økt lipidoksidasjon ved å aktivere CPT1B [106]. Det er uvisst om økt CPT1B-aktivitet er en følge av økt aktivering av enzymet eller om det er en oppregulering av proteinuttrykket ved genaktivering, men metformin kan teoretisk sett ha oppregulert genuttrykket av CPT1B hos pasientene i T2D-gruppen og dermed utvisket forskjellen mellom gruppene.

Ved fremtidige studier av CPT1B vil det også være viktig å studere prosesser for hemming av dette proteinet (acetyl-CoA karboksylase (ACC), malonyl-CoA) og dessuten dets samspill med andre proteiner som CD36/FAT.

#### 4.4.4 TIP47 og ADFP

Akkumulering av triglyserider i lipiddråper i vev utenom fettvev sees ved overvekt og regnes som en viktig prognostisk faktor for utvikling av insulinresistens og T2D [57]. Den molekylære mekanismen som regulerer dannelsen av lipiddråper ved ektopisk fettakkumulering er foreløpig ikke klarlagt. Flere studier viser at proteinene i kappen rundt lipiddråpene er viktige med hensyn til transport, lipogenese og lipolyse [107].

TIP47 og ADFP er lipidkappeproteiner som har vist seg å være viktige ved dannelse, stabilitet og funksjon av disse dråpene i muskulatur [58]. Knock-out studier har vist at TIP47 oppreguleres hvis ADFP slås ut, og at lipidlagrene blir kraftig redusert hvis ingen av disse proteinene er til stede [58].

Det var ingen signifikant forskjell i uttrykket av TIP47 eller ADFP mellom gruppene i dette materialet verken *in vivo* eller *in vitro*. Tidligere studier har vist at insulinresistente personer har et lavere uttrykk av ADFP, og at vektreduserende intervensjoner og/eller behandling med antidiabetika (eksempel metformin) kan føre til økt uttrykk av dette proteinet [60]. Det ble også vist at økt uttrykk av ADFP førte til dannelsen av flere, men mindre lipiddråper intracellulært og at økt inkorporering av lipider i lipiddråper sannsynligvis beskyttet muskelen for skadelige lipidmetabolitter.

De fleste pasientene med T2D som inngikk i denne studien var medisinert med metformin. Pasientene hadde dessuten gjennomført et 6-ukers vekstreduserende program i forkant av operasjonen. Dette kan være mulige årsaker til at det ikke ble observert noen forskjell i uttrykket av ADFP mellom pasienter med NGT og T2D ved denne studien.

Ved studier av kun kvinnene i dette materialet var det en tendens til at ADFP var noe lavere uttrykt hos pasienter med T2D både *in vivo* og *in vitro*. Tidligere studier har vist at T2D har et redusert uttrykk av ADFP sammenliknet med vektrelaterte personer med NGT, men at uttrykket vil økes ved behandling med metformin [60]. Metformin vil ikke kunne nullstille forskjellen mellom pasienter med NGT og pasienter med T2D noe som kan sees ved at det er en forskjell mellom disse gruppene med hensyn til verdier for fastene glukose og HbA1c. Dette kan derfor være årsaken til at det her ble registrert et noe lavere ADFP-uttrykk hos kvinner med T2D i denne studien.

Det var heller ingen forskjell i uttrykket av TIP47 verken *in vivo* eller *in vitro* mellom de to gruppene, noe som også var gjeldende ved studier av kun kvinnene. TIP47 er lokalisert både i cytoplasma og bundet til lipiddråper og vil ved behov bli translokert mellom disse stedene [107]. Årsaken til at det ikke var noen forskjell i genuttrykket av TIP47 i denne studien kan være at reguleringen av TIP47 i de fleste tilfeller styres posttranslasjonelt.

*In vivo* var uttrykket av ADFP signifikant høyere i forhold til TIP47 både hos pasienter med NGT og T2D. Dette var i tråd med tidligere studier som konstaterer at ADFP er det dominerende lipiddråpeproteinet i muskulatur og dessuten oppregulert ved ektopisk fettakkumulering hvor tilgangen på FFA er høy [107]. *In vitro* var derimot TIP47 signifikant høyere uttrykt. Tidligere studier har vist at uttrykket av ADFP reguleres i

henhold til FFA-tilgangen [59]. Muskelcellene ble dyrket uten FFA-tilgang i dyrkningsmediet ved disse forsøkene, og det var sannsynligvis årsaken til at uttrykket av ADFP var nedregulert *in vitro*. Det høye uttrykket av TIP47 var sannsynligvis en kompensatorisk oppregulering som følge av ADFP-nedregulering [58].

Pasienter med T2D hadde en tendens til noe høyere TIP47/ADFP-ratio både *in vivo* og *in vitro* i forhold til pasienter med NGT. Det var liten forskjell mellom gruppene i forhold til uttrykk av ADFP og TIP47, kun en liten forskjell i uttrykket av ADFP hos kvinnene. Økt TIP47/ADFP-ratio var derimot synlig i hele materialet og tyder på at det kan være en ubalanse i uttrykket av TIP47 kontra ADFP mellom de to gruppene som har betydning for utvikling av T2D. Til nå er det utført få studier hvor samspillet mellom de ulike PAT-proteinene er studert, men det spekuleres i at ulik sammensetning av disse proteinene på lipiddråpene har stor betydning både med hensyn til lipasens tilgang til TAG-kjernen, lipiddråpestørrelse og intracellulær trafikk [107].

Ved fremtidige studier kan det derfor være en ide å fokusere mer på samspillet mellom uttrykket av ADFP og TIP47 på lipiddråper i et større materiale. Dette for å finne ut om ulik sammensetning av ADFP og TIP47 på lipiddråpene kan påvirke konsentrasjonen av de intracellulære lipidmetabolittene, og om dette for eksempel kan sees i sammenheng med en tidligere studie som viste at både toppidrettsutøvere og personer med T2D hadde et økt innhold av TAG intramuskulært, som fører til sykdom hos den ene gruppen (T2D), men ikke den andre (toppidrettsutøvere) [46]. Det vil dessuten være nyttig samtidig å studere både antall og størrelsen på lipiddråpene for å undersøke om dette også kan ha en sammenheng med konsentrasjonene av intracellulære lipidmetabolitter.

#### 4.4.5 PDK4

PDK4 er et viktig enzym i regulering av glukosemetabolismen. Enzymet inhiberer PDC i mitokondrier og vil dermed hindre omdannelsen av pyruvat til acetyl-CoA. Tidligere studier har vist at økt konsentrasjon av frie fettsyrer kan føre til økt PDK4-aktivitet og dermed bidra til utvikling av insulinresistens og T2D [108].

PDK4-aktiviteten økes av faste, ved tilførsel av fettrik kost eller ved trening. Dette er tilstander som øker muskelens tilgang på fettsyrer [109]. Insulin derimot vil føre til nedregulering av PDK4 for å øke oksideringen av glukose [109].

I denne studien var det ingen signifikant forskjell på uttrykket av PDK4 mellom de to gruppene. Dette var gjeldene både for *in vivo*- og *in vitro*-studier. Ved studier av kun kvinnene var det derimot en tendens til at PDK4 var lavere uttrykk hos pasienter med T2D *in vivo*. I en tidligere studie ble det derimot registrert økt PDK4-uttrykk hos personer med T2D [64]. De fleste pasientene med T2D i denne studien var medisinert med

metformin. Metformin er, som tidligere nevnt, en AMPK-agonist. Tidligere studier har vist at PDK4-uttrykket ble redusert ved bruk av dette preparatet [110]. Det kan derfor ikke sees bort i fra at dette kan være årsaken til at PDK4-nivået for kvinner med T2D i dette materialet var noe redusert i forhold til kvinner med NGT.

I en tidligere studie ble det vist at genuttrykket av PDK4 økte hos overvektige personer med NGT som gjennomgikk et livsstilsendrende program (lavkaloridiett og trening). Denne endringen av PDK4-uttrykket var derimot ikke synlig for personer med T2D som gjennomførte det samme programmet [111]. Årsaken til dette kan settes i forbindelse med redusert metabolsk fleksibilitet hos personer med T2D. I dette materialet har alle pasientene gjennomgått en 6-ukers lavkaloridiett rett før det kirurgiske inngrepet. Dette kan teoretisk ha ført til en fastende tilstand som har resultert i økt uttrykk av PDK4 hos pasientene med NGT, men ikke for pasienter med T2D. Dette kan derfor også være en mulig årsak til at PDK4-uttrykk hos kvinner med T2D var noe lavere ved denne studien.

I denne studien var det dessuten en negativ korrelasjon mellom genuttrykket av PDK4 og verdier for fastende glukose. Dette stemmer med litteraturen som sier at uttrykket av PDK4 er kontrollert av næringsinntak, det vil si at økt glukosekonsentrasjone vil nedregulere PDK4-uttrykket [108].

#### 4.4.6 MHC I/IIa

Hos mennesker varierer muskelfibersammensetningen og er avhengig av alder, kjønn, genetik og aktivitetsnivå. Tidligere studier har vist at personer med insulinresistens og T2D har en høyere andel av type IIB-fibre enn personer med NGT [73]. Type IIB-fibre (MHCIIx) er den typen som først og fremst benytter glukose som substrat, men denne fibertypen finnes det lite av i human muskel i forhold til fibertype I og IIA (< 10 %). Type IIA regnes å ligge mellom type I og IIB når det gjelder oksidativ kapasitet og ble derfor valgt som kandidat for type II-fibre i denne studien. Tidligere studier har vist at de ulike muskelfibertypene har ulik insulinsensitivitet. Type I (oksidativ) er mer insulinsensitiv enn type IIA og IIB (glykolytiske) [97]. Dessuten inneholder generelt type I-fibre mer lagret triglyserider enn type II-fibre. Økt innhold av triglyserider hos overvektige vil i en oksidativ muskel (type I) sannsynligvis ikke være avgjørende for utvikling av insulinresistens. En glykolytisk muskel (type II), som er mindre insulinfølsom, vil derimot ha redusert mulighet til å lagre den økende mengden med triglyserider som følge av overvekt. En tidligere studie har vist at denne forskjellen mellom type I- og type II-fibre er viktig for utviklingen av lipidmediert insulinresistens [112].

I denne studien var det ingen signifikant forskjell mellom uttrykket av de ulike fibertypene, men studier av kun kvinnene viste at kvinner med T2D hadde en tendens til

en annen fibertypesammensetning enn kvinner med NGT. Dette var spesielt synlig ved beregning av ratioen mellom MHCI og MHCIIa. Det er ved en tidligere studie funnet at det er en forskjell mellom kvinner og menn med hensyn til muskefibersammensetningen [22]. Studien viste at kvinner hadde mer type I- i forhold til type IIA-fibre, mens menn hadde mer type IIA- i forhold til type I-fibre. Dette kan derfor være en av årsakene til at det på hele materiale ikke kunne detekteres noen forskjell mellom de ulike fibertypene, og det er en indikasjon på at det kan være viktig å studere menn og kvinner hver for seg i tilsvarende studier. Kvinner med NGT i dette materiale hadde tendens til et lavere uttrykk av MHCIIa i forhold til MHCI, mens kvinner med T2D hadde det motsatte forholdet. Dette var i samsvar med tidligere studier som har vist at personer med T2D har en mindre andel av type I-fibre i forhold til type II-fibre [73].

*In vitro* var det et signifikant høyere uttrykk av fibertype IIA i forhold til fibertype I, både hos pasienter med NGT og T2D. Det er tidligere beskrevet at differensiering av muskelceller til type I-fibre muligens kan være delvis blokkert når myoblaster dyrkes *in vitro* [113]. Årsaken til dette er ukjent, men det spekuleres i at manglende faktor, som fravær av fysisk aktivitet og stimuli fra omliggende vev, blant annet nerver, kan være avgjørende faktorer for utvikling av type I-fibre. Dette kan derfor være en årsak til at muskelcellene dyrket i kultur ved denne studien inneholdt større andel av muskelfibertype IIA i forhold til type I.

Ved fremtidige studier av MHCI og MHCIIa kan det være nyttig å studere kvinner og menn hver for seg i et større materiale. Dette vil sannsynligvis øke sjansen til å finne ut om det er en reell forskjell mellom uttrykket av de ulike fibertypene mellom pasienter med NGT og T2D.

#### 4.4.7 ATGL

ATGL katalyserer det første trinnet i hydrolyse av TAG til DAG i muskulatur og fettvev. Balansen mellom opptak, syntese og nedbryting av lipider er kritisk med hensyn til utvikling av insulinresistens og T2D [114]. I muskulatur fra insulinresistente personer er det registrert økt innhold av TAG, og det er sannsynligvis en følge av økt opptak eller redusert oksidering av lipider [115]. Ved tidligere knock-out eller knock-down-studier er det registrert vektøkning, økt insulinsensitivitet og økt glukoseopptak som følge av redusert lipolyse i muskulatur[70]. Disse observasjonene underbygger at TAG-lagre i form av lipiddråper beskytter mot utvikling av insulinresistens. Det foreligger motstridene data med hensyn til ATGL-uttrykket og betydningen i utvikling av insulinresistens og T2D, men nyere publisert data viser at ATGL er generelt økt hos overvektige [116] og at det er forholdet mellom hormonsensitiv lipase (HSL) og ATGL i forhold til akkumulering av DAG som er viktig for utvikling av insulinresistens og T2D [71]. HSL er en lipase med

høy DAG substratspesifisitet og regnes som hovedhydrolasen for DAG i mange typer vev [117].

En tidligere studie har dessuten vist at ATGL kun var uttrykt i muskulatur av fibertype I [69]. ATGL er derfor en viktig kandidat for studier av lipidoksidasjon i muskulatur, hvor muskelfibersammensetningen har vist seg å ha stor betydning for utvikling av insulinresistens og T2D.

I denne studien var det ingen signifikant forskjell mellom de to gruppene med hensyn til genuttrykket av ATGL verken *in vivo* eller *in vitro*. En trolig årsak er at begge gruppene som inngikk i denne studien var overvektige, og at det dessuten ikke var noen signifikant forskjell i uttrykk av type I-fibre mellom de to gruppene. Det var heller ingen synlig forskjell i genuttrykket av ATGL ved studier av kun kvinnene i dette materialet til tross for at det her var en tendens til ulikt uttrykk av type I-fibre. Det lyktes ikke å finne tidligere studier som har sett på hvordan ulike muskelfibersammensetninger kan påvirke uttrykket av ATGL, og det er derfor vanskelig å gi noen mulig årsak på dette resultatet. Det vil derfor være interessant ved fremtidige studier å undersøke om forholdet mellom uttrykket av ATGL og muskelfibertyper har en sammenheng i et større utvalg kvinner eller menn med NGT og T2D.

Ved fremtidige studier av genuttrykket av ATGL kan det også være hensiktsmessig å studere ATGL-uttrykket opp mot HSL-uttrykket siden det er opphoping av intermediære lipidmetabolitter som vil kunne blokkere insulinsignalet og resulterer i insulinresistens.

#### 4.4.8 Genuttrykk i biopsi kontra primærcelekkultur

Det var stor forskjell i uttrykket av de ulike genene *in vitro* kontra *in vivo*. Det var redusert uttrykk av alle genene med unntatt av TIP47. Nedregulert uttrykk *in vitro* i forhold til *in vivo* er tidligere registrert ved andre studier og det spekuleres i om kultivering av satelittceller kan føre til at gener generelt nedreguleres [118].

En mulig årsak til at uttrykket av flere av genene var mye lavere *in vitro* kontra *in vivo* kan også være endringer i muskelcellenes tilgang til ulike substrater i de to miljøene. Muskelcellen ble dyrket i medium med glukose uten tilsats av fettsyrer. Dette kan teoretisk ha ført til at uttrykket av CD36/FAT, CPTIB, ATGL og ADFP var nedregulert på grunn av lav tilgang på frie fettsyrer ekstracellulært. Økt uttrykk av TIP47 derimot kan sees i sammenheng med en kompensatorisk oppregulering på grunn av nedregulert uttrykk av ADFP som tidligere nevnt. Forskjellen i uttrykket av ATGL *in vitro* kontra *in vivo* var mindre sammenliknet med uttrykket av de andre genene. Muskelceller dyrket *in vitro* har et TAG-depot som benyttes til ulike subcellulære prosesser og cellene trenger ATGL for å få tilgang på disse fettsyrene. Dette kan derfor teoretisk være en mulig årsak

til at det her ble registrert en mindre forskjell mellom uttrykket av ATGL *in vitro* kontra *in vivo*.

Muskelcellen *in vitro* vil sannsynligvis stort sett benytte glukose som energisubstrat og vil i den sammenheng trenge økt aktivitet av PDC. Det er ved tidligere studier vist at PDK4-uttrykket reguleres raskt ved endret substrattilgang [119]. Dette kan derfor teoretisk være en mulig årsak til at PDK4-uttrykket var nedregulert *in vitro* kontra *in vivo* ved denne studien. Uttrykket av både MHCI og MHCIIa var mye lavere *in vitro* kontra *in vivo*. Det var vanskelig å finne en mulig årsak til denne endringen av uttrykket av disse to genene bortsett fra et det også tidligere er registrert et lavere uttrykk av disse genene når satelittceller dyrkes i kultur [118].

En annen mulig årsak til at uttrykket av de fleste genene var lavere *in vitro* kontra *in vivo* kan være av teknisk art. RNA isolert fra dyrkede myotuber kan ha inneholdt enkelte faktorer som har hatt hemmende innvirkning på enkelte primerpar og på PCR reaksjonen (muntlig meddelelse, Roche, Mannheim). Som tidligere diskutert under punkt 4.2 er det også en mulighet for at muskeceller med lang prolifereringstid kan ha inngått replikativ senescens som også kan føre til endret genuttrykk *in vitro* sammenliknet med *in vivo*. En annen årsak kan være at RNA ble isolert fra myocytter som var noe lite differensierte noe som sannsynligvis kan påvirke uttrykket av flere gener involvert i denne studien.

## 4.5 Glukosemetabolisme

Det er ved tidligere *in vivo*-studier registrert redusert glukoseopptak og glykogensyntese i skjelettmuskulatur fra personer med T2D [120]. Dette er også vist ved *in vitro*-studier, noe som tyder på satelittceller isolert fra personer med T2D bevarer sitt fenotypiske uttrykk med redusert glukoseopptak og redusert glykogensyntese [41].

En tidligere masteroppgave utført på samme materiale som inngått i denne studien, viste ved *in vitro* studier at muskelceller fra sykelige overvektige personer hadde en tendens til økt glukoseoksidasjon sammenliknet med tynne personer [90]. Studien viste dessuten at opptak og oksidasjon av glukose var noe redusert for pasienter med T2D sammenliknet med pasienter med NGT. Utvalget var derimot lite (n=3) og det konkluderes med at spredningen på dataene også var så stor at endelig konklusjon av den grunn ikke kunne trekkes. Det var derfor ønskelig i denne studien å utvide utvalget for om mulig bekrefte funnene i denne oppgaven. Det var derimot ingen signifikant forskjell verken på opptak eller oksidasjon mellom de to gruppene i denne studien, men studier av kun kvinnene viste at kvinner med T2D hadde tendens til lavere glukoseoksidasjon sammenliknet med kvinner med NGT. Dette var i tråd med de tidligere resultatene. Årsakene til denne observasjonen kan være mange. Det var en tendens til høyere konsentrasjon av

muskelfiber-IIA i muskelcellekulturer etablert fra pasienter med T2D sammenliknet med muskelcellekulturer etablert fra pasienter med NGT. Det var derimot ingen detekterbar sammenheng mellom muskefibertype og endret glukoseoksidasjon mellom gruppene i denne studien.

Tidligere studier har vist at overvektige personer med T2D har redusert heksokinase II-aktivitet [121]. Dette vil resultere i en reduksjon i dannelsen av glukose 6-fosfat og dermed reduksjon i andel oksidert glukose. Tidligere studier har også vist at muskulatur fra personer med T2D har redusert oksidativ fosforyleringskapasitet grunnet lavere innhold av mitokondrier og/eller redusert mitokondriefunksjon [122]. Dette kan også teoretisk være en mulige årsaker til at muskelceller etablert fra kvinnelige pasienter med T2D hadde tendens til redusert glukoseoksidasjon i denne studien.

Ved fremtidige studier av glukosemetabolismen vil disse resultatene gi en indikasjon på at det kan være nyttig å studere kvinner og menn hver for seg i et større utvalg. Det kan dessuten være nyttig å samtidig studere uttrykk av viktige gener relatert til metabolismen av glukose (PDK4 [111], Hexokinase [121]).



## 5 Konklusjon

Resultatene presentert i denne oppgaven viser ingen signifikant forskjell i genuttrykket av CD36/FAT, CPT1, TIP47, ADFP, PDK4, MHCI, MHCIIa eller ATGL mellom et utvalg av sykelig overvektige kvinner og menn med T2D og NGT verken i *in vivo* eller *in vitro*-studier. Studier av kun kvinnene i utvalget ga derimot en indikasjon på at kvinner med T2D hadde endret uttrykk av flere av de ovenfornevnte genene sammenliknet med kvinner med NGT. Kvinner med T2D hadde i *in vivo*-studiene en tendens til høyere uttrykk av CD36/FAT og MHCIIa og lavere uttrykk av ADFP, PDK4 og MHCI sammenliknet med kvinnelige pasienter med NGT. I studier av muskelceller *in vitro* var denne forskjellen mellom gruppene mindre, men synlig for uttrykket av ADFP, MHCI og MHCIIa, noe som kan tyde på at dette kan være sanne genetiske forskjeller mellom de to gruppene. Rasjon mellom TIP47 og ADFP var dessuten høyere for pasienter med T2D sammenliknet med pasienter med NGT, og det kan spekuleres i om ulike sammensetninger av TIP47 og ADFP kan settes i sammenheng med utvikling av T2D. Rasjon mellom MHCI og MHCIIa var også forskjellig mellom de to gruppene. I *in vivo*-studiene hadde kvinner med T2D en klar tendens til høyere uttrykk av MHCIIa i forhold til MHCI, mens det var motsatt for kvinner med NGT. Dette var mindre synlig *in vitro* og hadde sannsynligvis årsak i at kultivering av satelittceller favoriserte en utvikling av muskelceller med MHCIIa-uttrykk på grunn av manglende stimuli fra omliggende vev og endret energisubstratsammensetning.

Resultatene fra denne studien viste dessuten at uttrykket av de utvalgte genene var redusert *in vitro* sammenliknet med *in vivo* med unntak av TIP47 som var oppregulert. Årsaken kan sees i sammenheng med en stor endring i cellenes miljø fra *in vivo* til dyrking *in vitro*.

Kultiverte myotuber etablert fra kvinnelige pasienter med T2D viste en tendens til å oksidere glukose i mindre grad enn myotuber etablert fra kvinner med NGT. Dette ga en indikasjon på at kultiverte muskelceller etablert fra sykelig overvektige med T2D og NGT bærer med seg en genetisk forskjell som påvirker myotubenes evne til å oksidere glukose. Dette kunne derimot ikke settes i sammenheng med genuttrykkstudiene i denne oppgaven.

Det var ingen sammenheng mellom de ulike kliniske dataene og uttrykket av de ulike genene i denne studien med unntak av PDK4-uttrykket som sank med økende glukosekonsentrasjon.

Denne studien gir en indikasjon på at det kan være hensiktsmessig å studere kvinner og menn hver for seg ved studier av genuttrykk og metabolske prosesser i muskulatur fra

sykelig overvektige pasienter. Den raske økingen av antall T2D-tilfeller på verdensbasis tyder dessuten på at det er livsstil og miljø som trigger utviklingen av sykdommen. Det kan derfor ved fremtidige studier være en ide også å forsøke å etterstrebe et miljø *in vitro* som er noe mer likt et miljø *in vivo*, spesielt med hensyn til energisubstrattilgang. Dette er faktorer som kan øke sjansen for å avdekke genetiske ulikheter mellom personer som fører til utvikling av T2D hos den ene men ikke hos den andre i *in vitro*-studier. Det vil dessuten være viktig i fremtidige studier å forsøke å skille mellom gener som regulerer metabolismen på fysiologisk nivå og varianter som er viktig for utviklingen av T2D.

## Kildeliste

1. Schwartz, S.S. and B.A. Kohl, *Glycemic control and weight reduction without causing hypoglycemia: the case for continued safe aggressive care of patients with type 2 diabetes mellitus and avoidance of therapeutic inertia*. Mayo Clin Proc., 2010. **85**(12 Suppl): p. S15-26. .
2. Hofso, D., et al., *Fasting plasma glucose in the screening for type 2 diabetes in morbidly obese subjects*. Obes Surg., 2010. **20**(3): p. 302-7.
3. Dumas, J.F., et al., *Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans?* Diabetes Metab., 2009. **35**(3): p. 159-67.
4. O'Rahilly, S., *Human genetics illuminates the paths to metabolic disease*. Nature., 2009. **462**(7271): p. 307-14.
5. WHO, *Obesity and overweight*, 2011, WHO.
6. Hofso, D., et al., *Obesity-related cardiovascular risk factors after weight loss: a clinical trial comparing gastric bypass surgery and intensive lifestyle intervention*. Eur J Endocrinol., 2010. **163**(5): p. 735-45.
7. Ashrafian, H., et al., *Diabetes resolution and hyperinsulinaemia after metabolic Roux-en-Y gastric bypass*. Obes Rev., 2011. **12**(5): p. e257-72. .
8. WHO, *Diabetes*, 2011, WHO.
9. Phielix, E. and M. Mensink, *Type 2 diabetes mellitus and skeletal muscle metabolic function*. Physiol Behav., 2008. **94**(2): p. 252-8. .
10. Galgani, J.E., C. Moro, and E. Ravussin, *Metabolic flexibility and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab., 2008. **295**(5): p. E1009-17.
11. Guay, C., et al., *Diabetes mellitus, a microRNA-related disease?* Transl Res., 2011. **157**(4): p. 253-64.
12. McGarry, J.D., *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. Diabetes., 2002. **51**(1): p. 7-18.
13. Hulver, M.W., et al., *Skeletal muscle lipid metabolism with obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab., 2003. **284**(4): p. E741-7. .
14. Ye, J., *Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets., 2007. **7**(1): p. 65-74.
15. Bruce, C.R., et al., *Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance*. Diabetes., 2009. **58**(3): p. 550-8.
16. Helge, J.W., et al., *Interrelationships between muscle fibre type, substrate oxidation and body fat*. Int J Obes Relat Metab Disord., 1999. **23**(9): p. 986-91.
17. Lara-Castro, C. and W.T. Garvey, *Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome*. Endocrinol Metab Clin North Am., 2008. **37**(4): p. 841-56.
18. Dyck, D.J., *Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity*. Appl Physiol Nutr Metab., 2009. **34**(3): p. 396-402.
19. Dyck, D.J., G.J. Heigenhauser, and C.R. Bruce, *The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity*. Acta Physiol (Oxf). 2006. **186**(1): p. 5-16.
20. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, ed. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth ed. Vol. 5. 2008, Garland Science.
21. Schiaffino, S., *Fibre types in skeletal muscle: a personal account*. Acta Physiol (Oxf). 2010. **199**(4): p. 451-63. .
22. Staron, R.S., et al., *Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women*. J Histochem Cytochem., 2000. **48**(5): p. 623-9.
23. Kriketos, A.D., et al., *Muscle fibre type composition in infant and adult populations and relationships with obesity*. Int J Obes Relat Metab Disord., 1997. **21**(9): p. 796-801.
24. Simoneau, J.A. and C. Bouchard, *Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle*. Faseb J., 1995. **9**(11): p. 1091-5.

25. Scott, W., J. Stevens, and S.A. Binder-Macleod, *Human skeletal muscle fiber type classifications*. *Phys Ther.*, 2001. **81**(11): p. 1810-6.
26. Thyfault, J.P., R.S. Rector, and R.C. Noland, *Metabolic inflexibility in skeletal muscle: a prelude to the cardiometabolic syndrome?* *J Cardiometab Syndr.*, 2006. **1**(3): p. 184-9.
27. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. *J Clin Invest.*, 2005. **115**(7): p. 1934-41.
28. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. *Diabetes.*, 2000. **49**(5): p. 677-83.
29. Klip, A., *The many ways to regulate glucose transporter 4*. *Appl Physiol Nutr Metab.*, 2009. **34**(3): p. 481-7.
30. Rajan, A.S., *Regulation of Glucose Uptake*, in *Medscape Education 2002*, Medscape Education.
31. Thong, F.S., C.B. Dugani, and A. Klip, *Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway*. *Physiology (Bethesda)*. 2005. **20**: p. 271-84.
32. Huang, C., et al., *Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes*. *J Biol Chem.*, 2005. **280**(19): p. 19426-35. .
33. Whelan, S.A., et al., *Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes*. *J Biol Chem.*, 2010. **285**(8): p. 5204-11. .
34. Koumanov, F., et al., *AS160 phosphotyrosine-binding domain constructs inhibit insulin-stimulated GLUT4 vesicle fusion with the plasma membrane*. *J Biol Chem.*, 2011. **286**(19): p. 16574-82.
35. Prudente, S., E. Morini, and V. Trischitta, *Insulin signaling regulating genes: effect on T2DM and cardiovascular risk*. *Nat Rev Endocrinol.*, 2009. **5**(12): p. 682-93.
36. Wilson, J.E., *Hexokinases*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 1995. **126**: p. 65-198.
37. Yolanta T. Kruszynska, T.P.C., Robert R. Henry, ed. *Regulation of Glucose Metabolism in Skeletal Muscle, Compr Physiol 2011, Supplement 21: Handbook of Physiology, The Endocrine System, The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*. 2001, Copenhensive Physiology. 579-607.
38. Kraegen, E.W., G.J. Cooney, and N. Turner, *Muscle insulin resistance: a case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2008. **105**(22): p. 7627-8.
39. Holloway, G.P., et al., *Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview*. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008. **194**(4): p. 293-309. .
40. Zammit, P.S., T.A. Partridge, and Z. Yablonka-Reuveni, *The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold*. *J Histochem Cytochem.*, 2006. **54**(11): p. 1177-91. .
41. Gaster, M., et al., *The diabetic phenotype is conserved in myotubes established from diabetic subjects: evidence for primary defects in glucose transport and glycogen synthase activity*. *Diabetes.*, 2002. **51**(4): p. 921-7.
42. Minet, A.D. and M. Gaster, *ATP synthesis is impaired in isolated mitochondria from myotubes established from type 2 diabetic subjects*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2010. **402**(1): p. 70-4.
43. Njølstad, P.R., et al., *Fremskritt innen diabetesgenetikk*. *Tidsskrift for Den norsk legeförening*, 2010. **130**(11): p. 1145-1149.
44. Nolan, C.J., P. Damm, and M. Prentki, *Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management*. *Lancet.*, 2011. **378**(9786): p. 169-81. .
45. Herder, C. and M. Roden, *Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance*. *Eur J Clin Invest.*, 2011. **41**(6): p. 679-92.

46. Moro, C., S. Bajpeyi, and S.R. Smith, *Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity*. Am J Physiol Endocrinol Metab., 2008. **294**(2): p. E203-13. .
47. Pelsers, M.M., et al., *Skeletal muscle fatty acid transporter protein expression in type 2 diabetes patients compared with overweight, sedentary men and age-matched, endurance-trained cyclists*. Acta Physiol (Oxf). 2007. **190**(3): p. 209-19. .
48. Bezaire, V., et al., *Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation*. Am J Physiol Endocrinol Metab., 2006. **290**(3): p. E509-15.
49. Chabowski, A., et al., *The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR*. FEBS Lett., 2005. **579**(11): p. 2428-32.
50. Bonen, A., et al., *Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence*. Physiology (Bethesda). 2007. **22**: p. 15-29.
51. Holloway, G.P., et al., *Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise*. J Physiol., 2006. **571**(Pt 1): p. 201-10.
52. Smith, B.K., et al., *FAT/CD36 is located on the outer mitochondrial membrane, upstream of long-chain acyl-CoA synthetase, and regulates palmitate oxidation*. Biochem J., 2011. **437**(1): p. 125-34.
53. Schreurs, M., F. Kuipers, and F.R. van der Leij, *Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome*. Obes Rev., 2010. **11**(5): p. 380-8. .
54. David L. Nelson, M.M.C., ed. *Lehninger Principles of biochemistry*. 5. ed. 2008, W. H. Freeman: New York. 1263.
55. Rasmussen, B.B., et al., *Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle*. J Clin Invest., 2002. **110**(11): p. 1687-93.
56. Dobbins, R.L., et al., *Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats*. Diabetes., 2001. **50**(1): p. 123-30.
57. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet., 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
58. Sztalryd, C., et al., *Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line*. J Biol Chem., 2006. **281**(45): p. 34341-8.
59. Chang, B.H. and L. Chan, *Regulation of Triglyceride Metabolism. III. Emerging role of lipid droplet protein ADFP in health and disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2007. **292**(6): p. G1465-8.
60. Phillips, S.A., et al., *Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity*. Obes Res., 2005. **13**(8): p. 1321-9.
61. He, J., B.H. Goodpaster, and D.E. Kelley, *Effects of weight loss and physical activity on muscle lipid content and droplet size*. Obes Res., 2004. **12**(5): p. 761-9.
62. Bulankina, A.V., et al., *TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets*. The Journal of cell biology, 2009. **185**(4): p. 641-55.
63. Wende, A.R., et al., *PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(24): p. 10684-94.
64. Wu, P., et al., *Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes*. Diabetes., 1999. **48**(8): p. 1593-9.

65. Sugden, M.C. and M.J. Holness, *Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs*. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2003. **284**(5): p. E855-62.
66. Harris, R.A., et al., *Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex*. *Adv Enzyme Regul*, 2002. **42**: p. 249-59.
67. Haemmerle, G., et al., *Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase*. *Science.*, 2006. **312**(5774): p. 734-7.
68. Watt, M.J., et al., *Adipose triglyceride lipase regulation of skeletal muscle lipid metabolism and insulin responsiveness*. *Mol Endocrinol.*, 2008. **22**(5): p. 1200-12.
69. Jocken, J.W., et al., *Adipose triglyceride lipase (ATGL) expression in human skeletal muscle is type I (oxidative) fiber specific*. *Histochem Cell Biol.*, 2008. **129**(4): p. 535-8.
70. Yao-Borengasser, A., et al., *Adipose triglyceride lipase expression in human adipose tissue and muscle. Role in insulin resistance and response to training and pioglitazone*. *Metabolism.*, 2011. **60**(7): p. 1012-20.
71. Badin, P.M., et al., *Altered skeletal muscle lipase expression and activity contribute to insulin resistance in humans*. *Diabetes.*, 2011. **60**(6): p. 1734-42.
72. Nyholm, B., et al., *Evidence of an increased number of type IIb muscle fibers in insulin-resistant first-degree relatives of patients with NIDDM*. *Diabetes.*, 1997. **46**(11): p. 1822-8.
73. Hickey, M.S., et al., *Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans*. *Am J Physiol.*, 1995. **268**(3 Pt 1): p. E453-7.
74. Rabol, R., *Mitochondrial function in skeletal muscle in type 2 diabetes*. *Dan Med Bull.*, 2011. **58**(4): p. B4272.
75. Pabinger, S., et al., *QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis*. *BMC Bioinformatics.*, 2009. **10**: p. 268.
76. Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer, *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. *Biotechniques.*, 1998. **24**(6): p. 954-8, 960, 962.
77. Invitrogen, *Figure 8.151 Schematic diagram showing the different binding modes of dyes (and other ligands) to DNA*. , in *Invitrogen Life Science > References > Molecular Probes: The Handbook > Nucleic Acid Detection and Analysis—Chapter 8 > Nucleic Acid Stains—Section 8.1*, T.H.N.A.D.a.A.C.N.A.S.S. 8.1, Editor 2011, Invitrogen Life Science
78. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. *Genes Immun.*, 2005. **6**(4): p. 279-84.
79. Mahoney, D.J., et al., *Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise*. *Physiological genomics*, 2004. **18**(2): p. 226-31.
80. Julie Logen, K.E., Nick Saunders, ed. *Real-Time PCR Current Technology and Applications*. Vol. 1. 2009, Caister Academic Press. 279.
81. Janssens, N., et al., *Housekeeping genes as internal standards in cancer research*. *Mol Diagn.*, 2004. **8**(2): p. 107-13.
82. Kase, E.T., et al., *Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals*. *Diabetologia.*, 2007. **50**(10): p. 2171-80.
83. Bonadonna, R.C. and R.A. De Fronzo, *Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes*. *Diabete Metab.*, 1991. **17**(1 Pt 2): p. 112-35.
84. Blau, H.M. and C. Webster, *Isolation and characterization of human muscle cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(9): p. 5623-7.
85. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods.*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
86. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res.*, 2001. **29**(9): p. e45.

87. Gaster, M., et al., *Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes*. *Diabetes.*, 2004. **53**(3): p. 542-8.
88. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(4): p. 961-7.
89. Cohan, J.W., ed. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd edn ed. 1988.
90. Damlien, L., *Hvorfor er noen pasienter med ekstrem overvekt beskyttet mot utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes?*, in *Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, matematisk-naturvitenskapelige fakultet2011*, Universitetet i Oslo: Oslo. p. 1-68.
91. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Orntoft, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. *Cancer Res.*, 2004. **64**(15): p. 5245-50.
92. Holloway, G.P., *Mitochondrial function and dysfunction in exercise and insulin resistance*. *Appl Physiol Nutr Metab.*, 2009. **34**(3): p. 440-6.
93. Bonen, A., et al., *Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36*. *Faseb J.*, 2004. **18**(10): p. 1144-6.
94. Corpeleijn, E., et al., *Insulin acutely upregulates protein expression of the fatty acid transporter CD36 in human skeletal muscle in vivo*. *J Physiol Pharmacol.*, 2008. **59**(1): p. 77-83.
95. Sebastian, D., et al., *CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance*. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2007. **292**(3): p. E677-86. .
96. Bell, M., et al., *Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance*. *Diabetes.*, 2008. **57**(8): p. 2037-45.
97. He, J., S. Watkins, and D.E. Kelley, *Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity*. *Diabetes.*, 2001. **50**(4): p. 817-23.
98. Charles, M.-H., *Diabetes evidence demands real action from the UN Summit on Non-communicable diseases*, 2011, The International Diabetes Federation.
99. Colhoun, H.M., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial*. *Lancet.*, 2004. **364**(9435): p. 685-96.
100. Sokolovska, J., et al., *Influence of metformin on GLUT1 gene and protein expression in rat streptozotocin diabetes mellitus model*. *Arch Physiol Biochem.*, 2010. **116**(3): p. 137-45.
101. Bigot, A., et al., *Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts*. *Biol Cell.*, 2008. **100**(3): p. 189-99.
102. Nehlin, J.O., et al., *Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism*. *Biogerontology.*, 2011. **12**(4): p. 349-65.
103. Jasmin Hoebeeck, J.V., *Real-time PCR quality control for gene expression profiling using the LightCycler 480-system*, 2007, Biochemica, Roche.
104. Holloway, G.P., A. Bonen, and L.L. Spriet, *Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals*. *Am J Clin Nutr.*, 2009. **89**(1): p. 455S-62S.
105. Bruce, C.R., et al., *Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status*. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2003. **88**(11): p. 5444-51.
106. Steinberg, G.R., *Role of the AMP-activated protein kinase in regulating fatty acid metabolism during exercise*. *Appl Physiol Nutr Metab.*, 2009. **34**(3): p. 315-22.

107. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. *Biochim Biophys Acta.*, 2009. **1791**(6): p. 419-40.
108. Jeoung, N.H. and R.A. Harris, *Role of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in regulation of blood glucose levels*. *Korean Diabetes J.*, 2010. **34**(5): p. 274-83. .
109. Kiillerich, K., et al., *Low muscle glycogen and elevated plasma free fatty acid modify but do not prevent exercise-induced PDH activation in human skeletal muscle*. *Diabetes.*, 2010. **59**(1): p. 26-32.
110. Wan, Z., et al., *Epinephrine-mediated regulation of PDK4 mRNA in rat adipose tissue*. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2010. **299**(5): p. C1162-70. .
111. Kulkarni, S.S., et al., *Mitochondrial regulators of fatty acid metabolism reflect metabolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. *Metabolism*, 2011. **2**: p. 2.
112. Levin, M.C., et al., *Increased lipid accumulation and insulin resistance in transgenic mice expressing DGAT2 in glycolytic (type II) muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2007. **293**(6): p. E1772-81.
113. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. *Apmis.*, 2001. **109**(11): p. 735-44.
114. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. *J Clin Invest.*, 2000. **106**(4): p. 473-81.
115. Kelley, D.E., *Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance*. *Ann N Y Acad Sci.*, 2002. **967**: p. 135-45.
116. Jocken, J.W., et al., *Skeletal muscle lipase content and activity in obesity and type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2010. **95**(12): p. 5449-53. .
117. Holm, C., *Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis*. *Biochem Soc Trans.*, 2003. **31**(Pt 6): p. 1120-4.
118. Nikolic, N., et al., *Overexpression of PGC-1alpha Increases Fatty Acid Oxidative Capacity of Human Skeletal Muscle Cells*. *Biochem Res Int.*, 2012. **2012**: p. 714074. .
119. Stephens, F.B., et al., *Basal and insulin-stimulated pyruvate dehydrogenase complex activation, glycogen synthesis and metabolic gene expression in human skeletal muscle the day after a single bout of exercise*. *Exp Physiol.*, 2010. **95**(7): p. 808-18. .
120. Peiris, A.N., et al., *Glucose metabolism in obesity: influence of body fat distribution*. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1988. **67**(4): p. 760-7.
121. Pendergrass, M., et al., *Insulin-induced hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM*. *Diabetes.*, 1998. **47**(3): p. 387-94.
122. Szendroedi, J., E. Phielix, and M. Roden, *The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus*. *Nat Rev Endocrinol*, 2011. **13**(10): p. 138.



## Appendiks

### I. Metode for etablering av cellekultur fra muskelbiopsier

#### Ia Materiale

- Ham's F-10 medium, produkt nr 31550, Gibco
- Trypsin/EDTA 0,5 % (bruksløsning 0,05 %), produkt nr 25300-062, Gibco
- Fungizone (250 µg/ml amphotericin), produkt nr 15290-026, Gibco
- L-Glutamine, 200 mM, produkt nr 25030-024, Gibco
- Human skeletal growth medium (SkGM Bullet Kit), produkt nr BW-3160, Lonza
- Hanks balanserte saltløsning (HBSS), produkt nr 14175-053, Gibco
- Ekstracellulær matriksgel (ECM-gel), produkt nr E1270, Sigma
- DMEM, produkt nr D6046, Sigma
- Føtalt kalveserum(FCS), produkt nr 10108-165, Gibco
- Penicilin/Streptomycin, produkt nr P4333, Sigma

#### Ib Utstyr

- Sterile skalpeller
- Petriskål, steril
- Sentrifugerør (50 ml), sterile
- Risteinstrument/enhet
- 25 cm<sup>2</sup> dyrkningsflaske
- Celleinkubator, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>

#### Ic Metode

##### Ic-i Isolering og dyrking av myoblaster

- Klargjør SkGM-mediet:
  - SkGM-bullet kit ÷ insulin:
    - 500 ml SkGM basal medium
    - 0,5 ml hEGF
    - 5 ml Fetuin
    - 0,5 ml Dexamethasone
    - 0,5 ml GA-1000
    - 5 ml BSA
  - 10 ml føtalt kalveserum
  - 5 ml L-glutamin
  - 2,5 ml Fungizone

- Sett mediet til oppvarming i vannbad (37°C). Varm opp Trypsin/EDTA og FCS til 37°C.
- Legg vevsbiten i en petriskål. Vask bort blod med Hams F10 medium og skjær bort fett med en skalpell. Tilsett deretter 10 ml kald Hams F-10.
- Kutt opp vevsbiten så fint som mulig med to skalpeller. Arbeid raskt.
- Overfør suspensjonen til sentrifugerør (50 ml).
- Tilsett deretter 20 ml forvarmet trypsin/EDTA (37°C). Det beregnes 20 ml trypsin/EDTA per 0,4 ml vev.
- Sett røret til risting i 20-30 minutter ved romtemperatur og la deretter røret stå til sedimentering i 1-2 minutter.
- Overfør supernatanten til nytt rør og tilsett FCS til 10 %. Sett på is.
- Tilsett deretter nye 20 ml forvarmet trypsin/EDTA (37°C) til bunnfallet og gjenta risteprosedyren. Gjenta hele denne prosessen to ganger til (tre ganger totalt).
- Slå sammen supernatantene og tilsett FCS til en sluttkonsentrasjon på 10 %. Bruk 50 ml sentrifugerør.
- Sentrifuger ved 450g ved romtemperatur.
- Sug av supernatanten og tilsett passende mengde med forvarmet SkGM medium (løs cellepelleten først opp i 1 ml).
- Overfør cellesuspensjonen til 25 cm<sup>2</sup> flaske (coatet med ECM-gel) og sett flasken til inkubering i 37 °C inkubator med 5 % CO<sub>2</sub>.
- Mediet skal skiftes ca. 48 timer etter utsåing. Deretter skal det skiftes to ganger i uken (3 ml medium til 25 cm<sup>2</sup> flasker).
- Cellene dyrkes til de har nådd en konfluens på 80-90 %. Dette defineres som passasje0. De skal deretter splittes og dyrkes videre i 3 nye 75 cm<sup>2</sup> flasker.

## **Ic-ii Splitting av og utsåing av celler**

- Sug av mediet og vask cellene med HBSS.
- Tilsett trypsin/EDTA (0,5% fortynnet 1:10 i HBSS) til dyrkningsflasken (2 ml til 25 cm<sup>2</sup> flasker og 5 ml til 75 cm<sup>2</sup> flasker) og inkuber i 5 minutter ved 37°C.
- Dunk kraftig i flasken. Sjekk cellene under mikroskopet og sjekk om de har løsnet. Hvis cellene ikke har løsnet, må inkubasjonstiden forlenges.
- Overfør cellene til sentrifugerør og tilsett dyrkningsmedium (2 ml til 25 cm<sup>2</sup> flasker og 5 ml til 75 cm<sup>2</sup> flasker). Bland godt ved å pipettere opp og ned.
- Snetrifuger ved romtemperatur ved 450g i 7 minutter.
- Sug av mediet og resuspender cellene i 1 ml dyrkningsmedium. Tilsett deretter passende mengde medium (12 ml til 75 cm<sup>2</sup> flasker).

- Når disse cellene har nådd en konfluens på 80-90 % skal cellen fryses ned ved -196°C (appendiks II). Disse celle defineres som passasje 1.

## **II. Metode for høsting og nedfrysing av humane myotuber**

### **IIa Materiale**

- Hanks Balanserte saltløsning (HBSS), produkt nr 14175-053, Gibco
- Trypsin/EDTA 0,5 % (bruksløsning 0,05 %), produkt nr 25300-062, Gibco
- ECM-gel, produkt nr E1270, Sigma
- DMEM, produkt nr D6046, Sigma
- Føtalt kalveserum (FCS), produkt nr 10108-165, Gibco
- skjelettmuskelcelle vekstmedium (SkGM Bullet Kit), produkt nr BW-3160, Lonza
- Fungizone (250 µg/ml amfotericin), produkt nr 15290-026, Gibco
- L-Glutamine, 200 mM, produkt nr 25030-024, Gibco
- DMSO (dimetyl sylfoksid), produkt nr D2650, Sigma

### **IIb Utstyr**

- Celleinkubator (37°C)
- Sentrifugerør
- Sentrifuge
- Kryorør

### **IIc Metode**

- Sug av mediet og vask cellene med HBSS to ganger (75 cm<sup>2</sup> flasker).
- Tilsett 5 ml trypsin/EDTA (37 °C) og inkuber i 5 minutter ved 37°C.
- Dunk i bunden av flasken. Sjekk i mikroskopet om cellene har løsnet.
- Overfør cellesuspensjonen til et sentrifugerør. Skyll flasken med 5 ml SkGM-medium og overfør til sentrifugerøret.
- Sentrifuger ved 450g i 7 minutter.
- Løs cellepelletten i 1 ml SkGM medium (37 °C).
- Tilsett 1ml FCS (37°C) og 2 ml 20 % DMSO (fortynnes til 20 % i dyrkningsmedium, må være nylaget). Bland raskt.
- 1 ml av cellesuspensjonen overføres til kryorør.
- Frys cellene ned først ved -20°C i 30 minutter. Overfør dem deretter til -80 °C natten over før de overføres til nitrogentank (-196°C).

### III. Metode for dyrking av celler

#### IIIa Materiale

- Ekstracellulær matriksgel (ECM-gel), produkt nr. E1270, Sigma
- DMEM, produkt nr. D6046, Sigma
- M1-medium:
  - 500 ml DMEM-Glutamax low glucose, produkt nr 21885-108, Gibco
  - 50 ml Føtalt kalveserum (FCS), produkt nr 10108-165, Gibco
  - 2,5 ml Penicilin/Streptomycin, produkt nr P4333
  - 2,5 ml Fungizone (250 µg/ml amfotericin), produkt nr 15290-026, Gibco
- Skjelettmuskelcelle vekstmedium (SkGMBullet Kit), produkt nr BW-3169, Lonza
- M3-medium:
  - 500 ml DMEM-Glutamax low glucose, produkt nr 21885-108, Gibco
  - 10 ml FCS (føtalt kalveserum), produkt nr 10108-165, Gibco
  - 2,5 ml Penicilin/Streptomycin, produkt nr P4333
  - 2,5 ml Fungizone (250 µg/ml amfotericin), produkt nr 15290-026, Gibco
  - 25 pmol insulin, Insulin Actrapid, Novo Nordisk, (0,6mM)

#### IIIb Utstyr

- Celledyrkningsflasker (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>) og 6-brønners dyrkningsbrett
- LAF-benk
- Mikroskop
- CO<sub>2</sub>-inkubator
- Vannbad (37°C)

#### IIIc Metode

##### IIIc-i Coating med ECM

- Dyrkningsflasker og brett dekkes først med en ECM-gel for å bedre dyrkingsbetingelsene for adherente muskelceller.
- 1 ml ECM-forynning (1:14 fortytning med DMEM) tines og tilsettes ytterligere 4 ml DMEM.
- Blandingen tilsettes flasker og/eller brett. Sørg for at hele flaten dekkes.

- Pippeter av all væske og sette til tørk i LAF-benk. ECM-fortynningen kan brukes om igjen og har en holdbarhet på 72 timer i kjøleskap.

### **IIIc-ii Dyrking av celler**

- Ta opp ønsket kryorør fra nitrogentanken.
- Tin det raskt i vannbad ved 37°C.
- Overfør celsesuspensjonen til et 15-ml sentrifugerør og fortynn forsiktig med 5 ml M1-medium.
- Sentrifuger ved 450g i 7 minutter.
- Sug av supernatanten og resuspender i 2 ml SkGM-medium. Tilsett deretter SkGM-medium til ønsket volum.
- Overfør celsesuspensjonen til ønsket dyrkingsflaske eller brett med ECM-gel og inkuber i en CO<sub>2</sub>-inkubator (37°C).
- Skift mediet på cellene hver 3.dag.
- Når cellene har nådd en konfluens på ca. 80 %, byttes mediet til differensieringsmedium (M3-medium).
- M3-medium byttes hver 2. dag.
- Cellene høstes på den 8. differensieringsdagen.

## **IV. Metode for isolering av RNA fra muskelceller i kultur**

### **IVa Reagens**

- Absolutely RNA Mini Prep Kit, produkt nr 4008000, Agilent/Stratagene
- RNase fritt vann

### **IVb Utstyr**

- Eppendorfsentrifuge
- Eppendorfrør (2 ml)
- NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometer

### **IVc Metode**

#### **IVc-i Lysering**

- 4,2 µl β-merkaptoetanol tilsettes til 600 µl lyseringsbuffer (nok til 1-2 brønner på et 6-brønners brett).
- Alt medium i brønnen fjernes, og lyseringsbuffer med β-merkaptoetanol tilsettes.

- "Skrap" frem og tilbake med pipettespissen. Unngå for mye bobler. Bland ved å pipettere gjentatte ganger opp og ned. Overfør lysatet til et eppendorfrør (2 ml).
- Vortex lysatet for å homogenisere. Viktig at viskositeten på homogenisatet er lavt. Viskositeten kan senkes ved å vortexe gjentatte ganger. Tilsett mer lysesingsbuffer eller sug opp og ned i en sprøyte med spiss 18-21 G hvis viskositeten er høy.

## IVc-ii Isolering av RNA

- Overfør homogenisatet til en prefilter-spinnkolonne (blå) satt på et oppsamlingsrør.
- Spinn ved maksimum hastighet ( $\geq 8000g$ ) i 5 minutter.
- Fjern og kast prefilterkolonnen. Ta vare på **filtratet**.
- Tilsett likt volum av 70% etanol til filtratet ( $\sim 600 \mu l$ ) og vortex 5 sekunder.
- Tilsett  $700 \mu l$  av denne blandingen til en spinnkolonne.
- Spinn ved maks hastighet i 30-60 sekunder.
- Fjern kolonnen og kast filtratet. Sett kolonnen tilbake på oppsamlingsrøret.
- Gjenta de fire siste trinnene for resten av homogenisatet/etanol-blanding.
- DNase behandling:
- Tilsett  $600 \mu l$  1x Low-Salt Wash Buffer og spinn ved maks fart i 30-60 sekunder.
- Kast filtratet og spinn ved maks fart i 2 minutter.
- Preparer DNase løsningen ved å forsiktig blande  $50 \mu l$  DNase Digestion Buffer med  $5 \mu l$  RNase-Free DNase I. Bland forsiktig.
- Overfør DNase-blanding til spinnkolonnen.
- Inkuber ved  $37^{\circ}C$  i en luftinkubator i 15 minutter.
- Tilsett  $600 \mu l$  High-Salt Wash buffer til kolonnen. Spinn ved maks fart i 30-60 sekunder.
- Fjern filtratet og tilsett  $600 \mu l$  Low-Salt Wash Buffer. Spinn ved maks fart i 30-60 sekunder.
- Tilsett  $300 \mu l$  Low-Salt Wash buffer og spinn ved maks fart i 2 minutter.
- Overfør kolonnen til et  $1,5 ml$  eppendorfrør. Tilsett  $30-100 \mu l$  elueringsbuffer direkte på matrix i kolonnen. Inkuber i 2 minutter ved romtemperatur. Spinn ved maks fart i 1 minutt. Elueringen kan gjentas enten med nye  $\mu l$  elueringsbuffer eller med eluatet. Utbytte kan økes ved å varme elueringsbufferen opp til  $60^{\circ}C$ .
- Mål konsentrasjon og renhet ved NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometer (appendiks VI).

## V. Metode for isolering av RNA fra humane muskelbiopsier

### Va Materiale

- Muskelbiopsier 50-100 mg
- TRIzol® Reagent, produkt nr 15596-026, Invitrogen
- Kloroform, produkt nr 8221, Sigma
- RNeasy Fibrous Tissue Mini kit, produkt nr 74704, Qiagen
- Rør med kuler: CK28 Hard Tissues Homogenizing, produkt nr 03961-1-002, Precellys

### Vb Utstyr

Homogenisator: Precellys 24, Precellys

NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometer (NanoDrop Technologies)

Sentrifuge

Eppendorfsentrifuge

Is

### Vc Metode

#### Vc-i Isolering av RNA med TRIzol

- Vei inn biopsmateriale i rør med kuler og tilsett 1 ml TRIzol (avtrekk).
- Homogeniser i Precellys 24 2x30 min ved 6500 rpm.
- Avkjøl på is til ca romtemperatur og inkuber på benk i 5 min.
- Sentrifuger ved 12000g (4°C) i 10 min.
- Overfør supernatanten til nye rør.
- Tilsett 200 µl kloroform og bland i 15 sekunder (avtrekk).
- Inkuber 2-3 min på benk.
- Sentrifuger ved 12000g (4°C) i 15 min.
- Overfør den klare vannfasen til nye rør (inneholder RNA).
- Tilsett 500µl isopropanol.
- Bland og inkuber på benk i 10 min.
- Sentrifuger ved 12000g (4°C) i 10 min.
- Pipetter forsiktig av supernatanten (kastes) og tilsett 1 ml 75 % etanol til pelleten (vask).
- Bland og sentrifuger ved 7500g i 5 min.
- Pipetter av etanolen og lufttørk pelleten i 5-10 minutter. Må ikke tørke helt.
- Løs opp pelleten i 88 µl RNasefritt vann og inkuber ved 55°C i 10 min.

### **Vc-ii DNase behandling (RNeasy Fibrous Tissue Mini kit)**

- Tilsett 10 µl DNase-buffer (RDD buffer) og 2,5 µl DNase I stockløsning.
- Inkuber ved romtemperatur i 10 min.

### **Vc-iii RNA Cleanup med RNeasy kolonne (RNeasy Fibrous Tissue Mini kit)**

- Tilsett 350µl Guanidin thiocynatholdig lyseringsbuffer (RLT) og 250 µl etanol (100%) til RNA supernatanten og bland.
- Overfør blandingen til en kolonne med oppsamlingsrør.
- Sentrifuger i 15 sekunder ved 8000g (romtemperatur).
- Tilsett 500 µl RPE, sentrifuger i 15 sekunder ved 8000g (romtemperatur).
- Tilsett 500 µl RPE, sentrifuger i 2 minutt ved 8000g (romtemperatur).
- Bytt ut oppsamlingsrøret til et nytt rør og sentrifuger ved maks fart i 1 min (romtemperatur).
- Eluer med 30 µl RNase-fritt vann og sentrifuger i 1 minutt ved 8000g. Gjenta med nye 30 µl eller eluer med de samme 30 µl (avhengig av hvilken sluttkonsentrasjon man ønsker).
- Mål konsentrasjon og renhet med NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometer (appendiks VI).

## **VI. Metode for måling av RNA konsentrasjon med NanoDrop**

### **VIa Reagens**

- RNase-fritt vann
- elueringsbuffer hvis dette er benyttet ved eluering av RNA

### **VIb Utstyr**

- NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometer NanoDrop ND 1000 (figur 1)
- Is

### **VIc Metode**

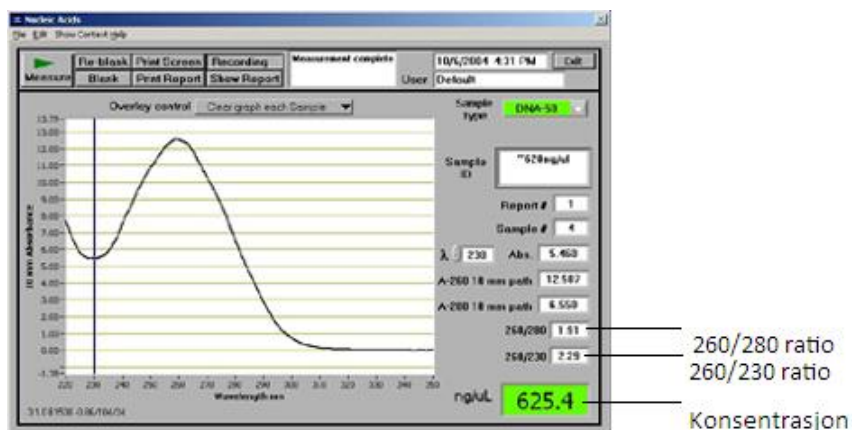
- Ta ut 6 µl fra hver prøve som skal måles og sett på is.
- Slå på PC og sørg for at NanoDrop-enheten er koblet til PC'en.
- Gå inn i programvaren.
- Ta opp pendelen tilhørende NanoDropen og appliser en dråpe med RNasefritt opp og nede. Ta ned pendelen og normaliser.
- Sørg for at instrumentet er stilt inn på RNA måling.



- Tørk av vannet med lofritt papir og tilsett 2  $\mu$ l RNasefritt vann eller elueringsbuffer (avhengig av hva RNA'et er eluert med). Ta ned pendelen forsiktig og trykk på BLANK i programmet.
- Tørk av vannet/elueringsbufferen og appliser på 2  $\mu$ l av prøven. Ta forsiktig ned pendelen og trykk på MEASURE i programmet.
- Se på kurven og registrer konsentrasjon på RNA, 260/280-ratioen og 260/230-ratioen (figur 2).
- Mål samme prøve en gang til.



**Figur 1: NanoDrop ND 1000 spektrofotometer**



**Figur 2: Kurver og informasjon etter måling**

## VII. Metode for RT Real-Time PCR

### VIIa Reagens

- High-Capacity cDNA Revers Transcription Kits, produkt nr 4374966, Applied Biosystems

- Primere (GAPDH, 36B4, CD36, CPT-1B, TIP47, ADFP, PDK4, MHC1, MHCIIa, ATGL), Primerexpress, Invitrogen
- LightCycler® fastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I, produkt nr 03 515 885 001, Roche
- H<sub>2</sub>O, PCR-grad

## VIIb Utstyr

- Varmeblokk (37°C, 99 °C)
- LightCycler 480, Roche
- Mikrorør: Biosphere safe seal micro tubes, produkt nr 72.706.200. Sarstedt
- 96-brønners brett: LC480 Multiwell Plate White 96 m/folie, produkt nr 04729 692 001
- Sentrifuge for 96-brønnersbrett, Sigma 2-6, Sigma

## VIIc Metode

### VIIc-i cDNA-syntese

- Ta ut 1 µg RNA fra hver prøve og tilsett H<sub>2</sub>O (PCR-grad) til et totalvolum på 13,2 µl. Bruk 1,5 ml mikrorør.
- Lag cDNA mastermiks i følge pakningsvedlegget til High-Capacity cDNA Revers Transcription Kits.
- 6,8 µl av mastermiksen tilsettes hvert rør med RNA slik at det totale volumet blir 20 µl. Bland ved å pipettere opp og ned.
- Lag i tillegg et rør uten RNA til stede, kun 13,2 µl H<sub>2</sub>O. Denne prøven vil bli definert som NTC1 (Non Template Control 1) i Real-time PCR oppsettet senere.
- Inkuber ved 24-25 °C i 10 minutter.
- Overfør rørene til varmeblokk oppvarmet til 37 °C. Inkuber i 1 time.
- Overfør rørene til en varmeblokk oppvarmet til 99°C. Inkuber i 5 minutter.
- Sette rørene med cDNA ved -70°C i påvente av real-time PCR.

### VIIc-ii Real-time PCR

- Lag fortynninger (1:25) av cDNA med H<sub>2</sub>O (PCR grad).
  - Fortynningsrekke: Lag en pool av alle cDNA prøvene (1-2 µl av hver prøve blandes). Denne blandingen fortynnes først 1:25 og defineres som Fortynning-1000. Fortynne deretter 2 ganger. Disse defineres fortynning-500, fortynning-250 og fortynning-125.
  - Fortynn hver enkelt cDNA prøve 1:25.

- Lag primermiks av forward og revers primer. Miksen skal være 10 ganger mer konsentrert enn ønsket brukskonsentrasjon.
- Lag mastermiks i henhold til bruksanvisningen. Beregn alltid litt ekstra ved tillaging.

Reagens	Volum ( $\mu$ l)/reaksjon	Total volum
H <sub>2</sub> O	9	
Primer miks (F+R) 10xkons.	2	
Mastermiks 5xkons.	4	
Total volum	15	

- Skriv opp fortynningsrekken og prøver i et PCR-analyseskjema (96-brønners brett inntegnet på et A4-ark). Sett opp 3 paralleller av standarder og to paralleller av prøvene. De fire siste brønnene i oppsettet brukes til NTC1 (fra cDNA syntesen) og NTC2 (H<sub>2</sub>O).
- Pippetter 15  $\mu$ l mastermiks/brønn (96-brønners brett).
- Tilsett deretter 5  $\mu$ l fortynning/prøver i hver brønn. Merk av med tusj etter hver tilsetning for å ha kontroll på pipetteringen.
- Forsegl brønnene med en plastfilm. Sørg for at det er helt tett.
- Sentrifuger brettet og sett det i LightCycler 480 for analysering.
- Reaksjonsbetingelser for PCR-reaksjonen, 42 sykler:

Analyse modus	Temperatur	Tid
Preinkubering	95°C	10 minutter
Denaturering av DNA	95°C	10 sekunder
Annealing	60°C	10 sekunder
Extention	72°C	20 sekunder

## VIII. Metode for analysering av PCR-produkt på angarosegel

### VIIIa Reagens

- NuSieve 3:1 agarose , produkt nr 50090, NuSieve
- 50xTAE-buffer:
  - 242g Tris base-Tris hydroksymetyl aminometan, produktnr 648310 (VWR), Merck
  - 57,1 ml iseddik (konsentrert eddiksyre; CH<sub>3</sub>COOH), produktnr 18755 (VWR), Merck
  - Fyll opp med dH<sub>2</sub>O til 1000 ml
- GelGreen Nucleic-Acid Gel Stain, produkt nr 730-2959
- DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 bp ladder (inneholder molekylvektstandard og 6xloading dye), produkt nr 11 721933001, Roche

### VIIIb Utstyr

- Støpeform
- Støpekam
- Autoklavetape
- Erlenmeyerkolbe, målesylinder
- Mikrobølgeovn (MW)
- Strømapparat
- Elektroforesekar
- G-box (SynGene)

### VIIIc Metode

- En støpeform tapes i begge ender med autoklavetape.
- 2 g agarose veies inn og tilsetter 50 ml 1xTAE-buffer (1xTAE-buffer: 10 ml 50xTAE-buffer + 490 ml dH<sub>2</sub>O). Inkuber i 10 minutter ved romtemperatur.
- Varm opp forsiktig i mikrobølgeovn. Las stå i 5 min ved romtemperatur.
- Tilsett 2 µl GelGreen. Bland og avkjøl blandingen noe.
- Hell gelen i støpeformen og la den stivne (ca 30 min).
- Ta forsiktig ut kammen og fjern tapen i begge ender.
- Sett gelen i elektroforesekaret og hell på 1xTAE buffer til den akkurat dekker gelen.
- 8µl av PCR-produktet blandes med 1,5 µl 6xloading dye.

- 2 µl stige appliseres i brønn nr 1, deretter tilsettes PCR-produkt (8 µl) i de respektive brønnene (plass til 7 prøver).
- Start elektroforesen. Spenning 72 V. Stopp elektroforesen når det gule fargebåndet er ca. 1 cm fra gelkanten.
- Slå av strømmen og ta gelen ut av elektroforesekaret.
- Gelen leses av i en G-BOX (SynGene) med programmet GeneSnap (SynGene).

## **IX. Glukoseoksidasjon i dyrkede myotuber**

### **IXa Materiale**

- D-[<sup>14</sup>C (U)]glukose (0,1 mCi/mmol), Perkin Elmer
- DMEM, produkt nr D6046, Sigma
- HEPES, produkt nr H4034, Sigma
- Tellevæske, Optiphase supermix, produkt nr 1200-439, Perkin Elmer
- Fenyletylamin, produkt nr 8.07334.0005 (VWR), Merck
- Metanol, produkt nr 1.06009.1000 (VWR), Merck
- Perklorsyre (PCA), produkt nr 1.00517.0250 (VWR), Merck
- NaOH, produkt nr 1.06498.1000 (VWR), Merck
- Bio-Rad Proteinassay reagent concentrate, produkt nr 500-006, Bio-Rad
- BSA, produkt nr 441554Y (VWR), Prolabo
- PBS, produkt nr PBS1 (231-791-2), Sigma

### **IXb Utstyr**

- 25 cm<sup>2</sup> dyrkingsflasker
- Gummikorker
- Center Well PK/144, produkt nr 882320-0000, Kible & Chase
- Filterpapir, 589<sup>2</sup>, product nr 300108, Schleicher & Schuell
- Celleinkubator, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
- 1ml sprøyte med kanyle
- Celleskraper
- Tri-Carb, 1900 TR væske scintilasjonsanalysator, Packard
- Mikrotiterplateleser (Victor<sup>3</sup>), Wallac 1420, Multibel Counter, Perkin Elmer

### **IXc Metode**

#### **IXIc-i Oksidasjonstest**

- Sug av mediet i 2 av brønnene på et 6-brønners Brett.

- Lag en løsning bestående av 2  $\mu\text{Ci/ml}$  D-[ $^{14}\text{C}$  (U)]glukose og 10 mM HEPES i DMEM og tilsett 1 ml av denne løsningen til hver brønn. Inkuber i  $\text{CO}_2$ -inkubator i 2 timer.
- Overfør 500  $\mu\text{l}$  av mediet til en 25  $\text{cm}^2$  dyrkningsflaske. Sette celledyrkningsbrettet på is.
- Monter kurver (Center Well PK/144) med filterpapir og sett disse ned i dyrkningsflaskene. Påse at korken sitter tett.
- Bland fenyletylamin og metanol 1:1. Tilsett 300  $\mu\text{l}$  av denne blandingen oppi kurven med filterpapir ved å stikke en sprøytespiss gjennom korken.
- Tilsett 300  $\mu\text{l}$  1M perklorsyre til bunnen av dyrkningsflasken ved å stikke en sprøytespiss gjennom korken. Bland forsiktig og la stå i romtemperatur i 2 timer.
- Overfør filterpapiret til tellerør og tilsett 300  $\mu\text{l}$  tellevæske. Kan oppbevares ved romtemperatur før telling
- Vask cellene som står på is 2-3 ganger med 2 ml iskald PBS.
- Tilsett deretter 500  $\mu\text{l}$  0,05M NaOH og skrap cellene av bunnen med en celleskrape. Overfør cellelysate til nye rør og frys ned ved  $-20^\circ\text{C}$  før telleing avradioaktivitet.

### **IXc-ii Måling av radioaktivitet**

- Tell radioaktiviteten i bruksløsningen med D-[ $^{14}\text{C}$  (U)]glukose (utgangspunkt), lyserte celler i NaOH (glukose tatt opp, men ikke oksidert) og i filteret (oksidert glukose).
- Cellelysate må sonikeres (10 sekunder) før uttak for å sikre homogenisering av materialet. 300  $\mu\text{l}$  av cellelysate og 50  $\mu\text{l}$  av bruksløsningen overføres til tellerør og 3 ml tellevæske tilsettes.
- Tell alle prøvene i 5 minutter i scintillasjonstelleren.

### **IXc-iii Måling av proteinkonsentrasjon for korreksjon av antall celler**

- Lag fortyninger av BSA til standardkurve (eks 0,025, 0,05, 0,15, 0,2 og 0,3 mg/ml) i 0,05 M NaOH.
- Ta ut 10  $\mu\text{l}$  av homogenisert cellelysate, standard og NaOH 0,05M (blank) og overfør til en 96-brønners mikrotiterplate.
- Tilsett 200  $\mu\text{l}$  fargereagens (Bio-Rad protein assay concentrate, fortynt 1:5 med destilert vann).
- Mål absorbans ved 595 nm i en mikrotiterplateleser (Victor<sup>3</sup>).