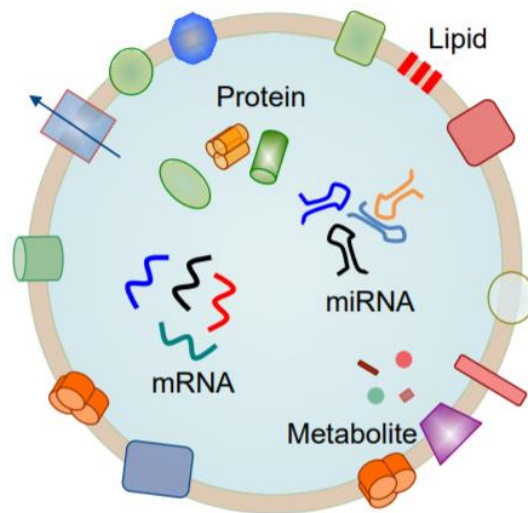


MASTEROPPGAVE

Master i Biomedisin

Mai 2019

Karakterisering av ekstracellulære vesikler fra
humane skjelettmuskelceller - effekt av elektrisk pulsstimulering



Saba Qureshi

OSLOMET

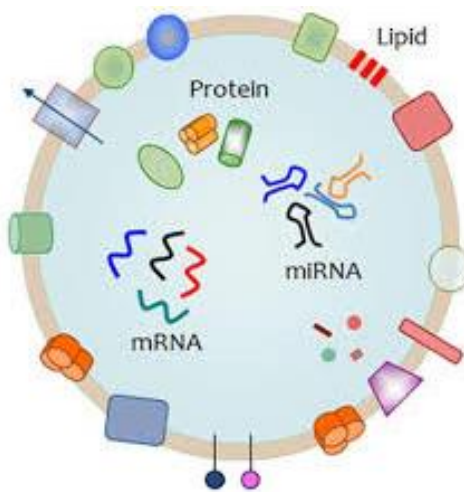
OsloMet – storbyuniversitetet

Fakultet for helsevitenskap

Institutt for naturvitenskapelige helsefag

Karakterisering av ekstracellulære vesikler fra humane skjelettmuskelceller - effekt av elektrisk pulsstimulering

Saba Qureshi



Masterstudium i Biomedisin, Masteroppgave, 60 sp
Fakultet for helsevitenskap, Institutt for naturvitenskapelige helsefag
OsloMet – storbyuniversitetet

Mai 2019

Veiledere:

Vigdis Aas

Reidun Øvstebø

Kari Bente Foss Haug

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for naturvitenskapelige helsefag, OsloMet – storbyuniversitetet, Oslo og Enhet for Blodcelleforskning, Seksjon for forskning, Avdeling for medisinsk biokjemi, OUS i perioden august 2018 til mai 2019.

Jeg ønsker å takke veilederne mine Vigdis Aas, Reidun Øvstebø og Kari Bente Foss Haug for god veiledningen, oppfølging, råd og nyttig hjelp og tips under hele masteroppgaveperioden. Takk for et fint år med mye lærdom, denne perioden hadde ikke vært det samme uten deres veiledning. Tusen takk til alle som jobber på avdeling for medisinsk biokjemi, spesielt Anne-Marie Siebke Trøseid for god opplæring og hjelp til å bruke ulike analysemetoder og dataverktøy. Tusen takk til Hans Christian D. Aass for hjelp med analysering av resultater fra flowcytometer. Takker "Muskelbunt" for lærerike møter og tips. Spesielt takk til Tuula Anneli Nyman for gjennomgang av proteomikk-data og -analyse. Det har vært en lang reise med både opp og nedturer for å fullføre denne oppgaven på grunn av helsen, men jeg mistet ikke håpet. Jeg er veldig fornøyd med at jeg har klart å fullføre den på en best mulig måte. Stor takk til Misbah for alle samtaler, støtten, oppmuntringen og samarbeid gjennom denne perioden. Denne studietiden hadde ikke vært det samme uten deg.

Jeg ønsker å takke hele familien min, spesielt min far for all støtten og oppmuntringen jeg har fått gjennom dette året. Sist, men ikke minst takker jeg min kjære mann og jentene mine som har motivert meg og alltid hatt troen på at jeg skulle klare dette. Uten dere hadde jeg aldri klart å fullføre denne oppgaven. Jeg takker og er takknemlig for at dere alltid stiller opp for meg.

Oslo,
Saba Qureshi
Mai 2019

Sammendrag

Bakgrunn og formål: Ekstracellulære vesikler (EV) er en heterogen gruppe membranomsluttede celleblærer i nanostørrelse. Vesiklene skilles ut fra de fleste celler og er påvist i mange biologiske væsker. EV inndeles i eksosomer, mikrovesikler (MV) og apoptotiske legemer. Vesiklene gjenspeiler modercellens fysiologiske tilstand og inneholder proteiner, lipider og nukleinsyrer som kan være viktige mediatorer ved celle-celle-kommunikasjon. Antall vesikler og deres innhold kan være endret ved ulike sykdoms-tilstander, noe som gjør dem interessante som biomarkører.

Det er en stigende fedmeepidemi i verden som har ført til økt forekomst av type 2-diabetes (T2DM). Regelmessig trening er vist å være forebyggende og behandlende på begge tilstander. Skjelettmuskulatur er et viktig sekretorisk organ som også skiller ut EV. Det har blitt utviklet en *in vitro* treningsmodell med elektrisk pulsstimulering (EPS), som induserer muskelkontraksjon på dyrkede skjelettmuskelceller. Målet med denne studien var å benytte treningsmodellen til å studere sekresjon og innhold i EV fra humane skjelettmuskelceller hos personer med ekstrem overvekt og T2DM for å lete etter potensielle, sirkulerende EV-biomarkører.

Materiale og metoder: Humane skjelettmuskelceller (myoblaster) ble differensiert *in vitro* til modne myotuber. Halvparten av myotubene fikk kronisk lavfrekvent EPS-behandling i 24 timer, før alle celler ble dyrket videre i 24 timer med serumfritt medium og høstet. IL-6 ble målt i cellemediene for å se på effekt av EPS-behandling og total proteinkonsentrasjon ble analysert i cellelysaten som indirekte mål på antall celler i dyrkningsbrønnene ved høsting. EV ble isolert fra cellemediene med en kombinasjon av sentrifugerings- og ultrafiltrerings-teknikker slik at eksosomer og MV ble adskilt. Eksosomer og MV ble så karakterisert med hensyn på konsentrasjon, størrelse, overflatemarkører, proteininnhold og miRNA-mengde før og etter elektrisk pulsstimulering. Nanoparticle tracking analysis (NTA) ble benyttet for å bestemme konsentrasjon og størrelse av eksosomer og MV. Flowcytometri ble brukt til å detektere overflatemarkører som CD9, CD81 og CD63, og proteomikk ble utført for å studere proteininnholdet. Tilstedeværelse av utvalgte muskelspesifikke miR (myomiR); miR1-3p, miR-133a og miR-206, og en ikke muskelspesifikk miR-223, ble analysert ved hjelp av kvantitativ revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR), og eksosomer og MV ble sendt til transmisjon elektron mikroskopi (TEM) for å studere morfologien til vesiklene.

Resultater: IL-6 konsentrasjon i cellemediet var signifikant økt etter elektrisk pulsstimulering av cellene som et tegn på at cellene hadde respondert på treningen. Det var ingen signifikant forskjell i konsentrasjon, størrelse, overflatemarkørene CD81 og CD63 eller miRNA-mengde verken i eksosomer eller MV etter EPS behandling. CD9 ble ikke påvist. Proteomikkanalyse viste at 75 proteiner i eksosomene og 57 proteiner i MV var til stede i signifikant forskjellig mengder etter EPS-behandling av cellene.

Konklusjon: *In vitro*-dyrking av myotuber produserte EV i en mengde som lot seg kvantifisere og karakterisere. Elektrisk pulsstimulering på humane modne myotuber hadde ingen påvirkning på EV-konsentrasjon, størrelse, overflatemarkører eller miRNA-mengden i EV i forhold til kontrollceller. Proteomikkanalyse av EV-proteiner viste derimot signifikante forskjeller både i kvalitet og kvantitet. *In vitro*-modellen kan benyttes videre til å identifisere nye EV-komponenter fra skjelettmuskelceller med potensiale som nye, sirkulerende biomarkører hos personer med ekstrem overvekt og T2DM.

Abstract

Background and aim: Extracellular vesicles (EV) is a heterogeneous group of nano-sized membrane enclosed vesicles. The vesicles are excreted from most cells and are detected in many biological fluids. EV are divided into exosomes, microvesicles (MV) and apoptotic bodies. The vesicles reflect the physiological state of the parent cell and contain proteins, lipids and nucleic acids which may be important mediators in cell-cell communication. The number of vesicles and their contents may be altered by various disease states, which makes them interesting as biomarkers.

There is an increasing obesity epidemic in the world which has led to an increased incidence of type 2 diabetes (T2DM). Regular exercise has been shown to be preventative and treating in both conditions. An *in vitro* electric pulse stimulation (EPS) exercise model has been developed which induces muscle contraction on cultured skeletal muscle cells. The aim of this study was to use the *in vitro* exercise model to study the secretion and content of EV from human skeletal muscle cells in people with extreme obesity and T2DM to search for potential circulating EV biomarkers.

Materials and Methods: Human skeletal muscle cells (myoblasts) were differentiated *in vitro* into mature myotubes. Half of the myotubes received chronic low-frequency EPS treatment for 24 hours before all cells were further cultured for 24 hours with serum-free medium and harvested. IL-6 was measured in the cell media to look at the effect of EPS treatment and total protein concentration was analyzed in the cell lysates as an indirect measure of the number of cells in the culture wells at harvest. EV was isolated from the cell media by a combination of centrifugation and ultrafiltration techniques to separate exosomes and MV. Exosomes and MV were then characterized with regard to concentration, size, surface markers, protein content and miRNA amount before and after electrical pulse stimulation. Nanoparticle tracking analysis (NTA) was used to determine the concentration and size of exosomes and MV. Flow cytometry was used to detect surface markers such as CD9, CD81 and CD63, and proteomics was performed to study the protein content. Presence of selected muscle-specific miR (myomiR); miR-1-3p, miR-133a and miR-206, and a non-muscle specific miR-223, were analyzed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR), and exosomes and MV were sent to transmission electron microscopy (TEM) for to study the morphology of the vesicles.

Results: The IL-6 concentration in the cell medium was significantly increased after electrical pulse stimulation of the cells as a sign that the cells had responded to the exercise. There was no significant difference in concentration, size, surface markers CD81 and CD63 or miRNA levels either in exosomes or MV after EPS treatment. CD9 was not detected. Proteomics analysis showed that 75 proteins in the exosomes and 57 proteins in MV were present in significantly different amounts after EPS treatment of the cells.

Conclusion: *In vitro* culture of myotubes produced EV in an amount that could be quantified and characterized. Electrical pulse stimulation on human mature myotubes had no effect on EV concentration, size, surface markers or miRNA levels in EV over control cells. Proteomics analysis of EV proteins, on the other hand, showed significant differences in both quality and quantity. The *in vitro* model can be further used to identify new EV components from skeletal muscle cells with potential as new circulating biomarkers in people with extreme obesity and T2DM.

Forkortelser og ordforklaringer

AMP - Adenosinmonofosfat

AMPK - AMP-aktivert proteinkinase

BSA - Bovint serumalbumin

Ca²⁺ - Kalsium ion

°C - Celsius

Ct - Treshold cycle (no.: terskelsyklus)

CO₂ - karbondioksid

DNA - Deoksyribonukleinsyre

ECM - Ekstracellulær matriks gel

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPS - Elektrisk pulsstimulering

ERK - Ekstracellulær signalregulert kinase

EV - Ekstracellulære vesikler

g - gravitasjonskraft

GLUT4 - Glukosetransportør type 4

HbA1c - Hemoglobin A1c

HDL - High-density lipoproteins

IL-6 - Interleukin-6

ILV - Intraluminal vesikkel

IPA - Interunity pathway analysis

ISEV - International Society for Extracellular Vesicles

kDa - kilo dalton

KMI - Kroppsmasseindeks

LAF - Laminær luftstrøm

LDL - Low-density lipoproteins

mRNA - messengerRNA

miRNA - mikroRNA

MFI - Median fluorescensintensitet

min - Minutter

mg - Milligram

ml - Milliliter

µl - Mikroliter

µm - Mikrometer
M - Mol
MV - Mikrovesikler
MVBs - Multivesicular Bodies (no.: Multivesikulære legemer)
NTA - Nanoparticle Tracking Analysis
NaOH - Natriumhydroksid
nm - nanometer
PBS - Phosphate Buffered Saline (no.: fosfatbufret saltvann)
PE - Fykoerytin
REK - Regional etisk komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RNA - Ribonukleinsyre
RNase - Ribonuklease
ROCK - Rho-assosiert kinase
ROS - Reaktiv oksygen
rpm - rotasjoner per minutt
RT-qPCR - Revers transkriptase kvantitativ polymerase kjedereaksjon
sCMOS - scalable complementary metal-oxide semiconductor
SD - standardavvik
T2DM - Type 2-diabetes mellitus
TEM - Transmisjons elektronmikroskop
TMB - 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine
WHO - Verdens helseorganisasjon

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	IV
Forkortelser og ordforklaringer	VI
1 Innledning	1
1.1 Overvekt og fedme.....	1
1.2 Type 2-diabetes	2
1.2.1 Sammenheng mellom fedme og type 2-diabetes	2
1.3 Skjelettmuskelceller	3
1.3.1 <i>In vitro</i> -modell av skjelettmuskelceller	4
1.4 Trening	5
1.4.1 Elektrisk puls-stimulering	6
1.4.2 Interleukin-6	6
1.5 Ekstracellulære vesikler.....	7
1.5.1 Eksosomer	9
1.5.1.1 Biogenese og utskillelse av eksosomer	9
1.5.1.2 Eksosominnhold	10
1.5.2 Mikrovesikler	11
1.5.2.1 Biogenese og utskillelse av mikrovesikler	11
1.5.2.2 Mikrovesikkelinnhold.....	12
1.5.3 Apoptotiske legemer.....	12
1.5.4 Ekstracellulære vesikler, overvekt og type 2-diabetes	13
1.5.5 Ekstracellulære vesikler og skjelettmuskel.....	13
1.5.6 Ekstracellulære vesikler og trening	14
1.5.7 Isolering og karakterisering av ekstracellulære vesikler	14
1.6 Formål med oppgaven.....	15
2 Materialer og Metoder	16
2.1 Materiale og etikk.....	16

2.2 Studiedesign	16
2.3 Dyrking av celler	17
2.3.1 Påføring av ekstracellulær matriks (ECM)-gel.....	17
2.3.2 Utsåing av myoblaster	18
2.3.3 Proliferasjon av myoblaster og differensiering til modne myotuber	18
2.4 Elektrisk pulsstimulering (EPS)	19
2.5 Høsting av medier til EV-isolering	20
2.6 Høsting av muskelceller (modne myotuber)	21
2.7 Måling av proteinkonsentrasjon i cellelysater	21
2.8 Analyse av interleukin-6 (IL-6)	22
2.9 Isolering av ekstracellulære vesikler	24
2.9.1 Mikrovesikkelisolering.....	24
2.9.2 Eksosomisolering	25
2.10 Karakterisering av ekstracellulære vesikler	25
2.10.1 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	25
2.10.2 Flowcytometri.....	27
2.10.3 Proteinmåling i ekstracellulære vesikler.....	29
2.10.4 Proteomikk	30
2.10.5 Kvantitativ revers transkriptase polymerase kjedereaksjon	31
2.10.5.1 Isolering av total-RNA fra eksosomer.....	31
2.10.5.2 cDNA-syntese fra mikroRNA	33
2.10.5.3 Kvantitativ sanntids(real-time)-PCR	35
2.10.5.4 Kvantitativ PCR (qPCR)	36
2.10.6 Transmisjon elektronmikroskop (TEM).....	37
2.11 Statistikk	37
3 Resultater	38
3.1 IL-6-konsentrasjon i cellemedier fra myotuber	38
3.2 Konsentrasjon av ekstracellulære vesikler	39

3.3 Størrelse av ekstracellulære vesikler	40
3.4 Overflatemarkører i ekstracellulære vesikler.....	41
3.4.1 Overflatemarkør CD81 i ekstracellulære vesikler	41
3.4.2 Overflatemarkør CD63 i ekstracellulære vesikler	42
3.5 Proteomikkanalyse av ekstracellulære vesikler	42
3.5.1 Proteiner tilstede i ekstracellulære vesikler – kvalitativ analyse	43
3.5.2 Proteiner tilstede i EV fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller – kvantitativ analyse	44
3.5.2.1 Proteiner med høyeste nivåforskjeller i mikrovesikler	44
3.5.2.2 Proteiner med høyeste nivåforskjeller i eksosomer	46
3.5.3 Ingenuity pathway analysis (IPA)	48
3.6 Relativ kvantifisering av mikroRNA i eksosomer	48
3.7 Morfologi av ekstracellulære vesikler via Transmisjon elektronmikroskop (TEM)	51
4 Diskusjon.....	52
4.1 Treningseffekt på skjelettmuskelcellene.....	52
4.2 Konsentrasjon og størrelse av ekstracellulære vesikler	54
4.3 Mengde overflatemarkører på ekstracellulære vesikler	55
4.4 Proteomikk-analyse av ekstracellulære vesikler	56
4.5 miRNA i ekstracellulære vesikler fra skjelettmuskelceller	58
4.6 Vurdering av metodikkene	59
4.6.1 Celledyrkning.....	59
4.6.2 Isolering av ekstracellulære vesikler	60
4.6.3 Karakterisering av ekstracellulære vesikler	60
4.7 Veien videre.....	61
5 Konklusjon.....	63
Litteraturliste.....	64
Vedlegg

1 Innledning

1.1 Overvekt og fedme

Overvekt og fedme er et stadig økende problem på verdensbasis. Den globale prevalensen av fedme er tredobbelt siden 1975. I følge Verdens helseorganisasjon (WHO) var det over 1,9 milliarder overvektige personer (> 18 år) i 2016, hvorav 650 millioner led av fedme (1). I 2017 var det cirka 1 av 4 middelaldrende menn og 1 av 5 kvinner som hadde utviklet fedme (kroppsmasseindeks > 30kg/m²) i Norge (2).

WHO har definert overvekt og fedme som unormal eller overdrevet fettoppbygging som kan skade helsen. De har satt grenseverdier for kroppsmasseindeks (KMI) som brukes til å klassifisere overvekt og fedme hos voksne (tabell 1.1). KMI er definert med formelen: kilogram/meter² (personvekt delt på kvadratet av høyden). WHO har definert overvekt som $KMI \geq 25\text{kg/m}^2$ og fedme som $KMI \geq 30\text{kg/m}^2$ (1).

Tabell 1.1: Kroppsmasseindeks (KMI) for voksne (> 20 år) er klassifisert av Verdens helseorganisasjon (WHO). Modifisert fra (3).

Klassifisering	KMI (kg/m ²)
Undervekt	< 18,5
Normalvekt	18,5-24,9
Overvekt	25,0-29,9
Fedme grad 1	30,0-34,9
Fedme grad 2	35,0-39,9
Fedme grad 3 (ekstrem overvekt)	$\geq 40,0$

KMI=kroppsmasseindeks, kg= kilogram, m=meter.

Hovedårsaken til overvekt og fedme er en ubalanse mellom inntak og forbruk av energi. Det er flere faktorer som kan bidra til forstyrrelser i energibalansen, som for eksempel miljø, levevaner (fysisk inaktivitet og usunt kosthold), psykososiale forhold (stress og depresjon) og medikamenter. Overvekt og fedme kan føre til alvorlige utfordringer som for eksempel redusert trivsel, helse og livskvalitet (4). Fedme er også en risikofaktor for utvikling av kroniske sykdommer som type 2-diabetes, kardiovaskulær sykdom, kronisk nyresykdom, flere kreftformer og muskel- og skjelettlidelser (5).

1.2 Type 2-diabetes

Diabetes mellitus er en stadig voksende sykdom, cirka 1 av 11 voksne over hele verden har diabetes mellitus, hvorav 90% har type 2-diabetes mellitus (T2DM) (6). På verdensbasis var det i 2018 406 millioner voksne personer som hadde type 2-diabetes. Den globale økningen i fedme, fysisk inaktivitet og energirikt kosthold resulterer i økt forekomst av type 2-diabetes (7).

Diabetes mellitus er en kronisk sykdom som skyldes mangel på insulin og/eller nedsatt virkning av insulin. Det er en tilstand hvor glukosekonsentrasjonen i blodet er forhøyet, såkalt hyperglykemi (8). Diabetes mellitus inndeles i to hovedgrupper: type 1-diabetes og type 2-diabetes.

Type 1-diabetes skyldes ødelagte insulinproduserende celler (β -celler) i bukspyttkjertelen (9). Type 2-diabetes skyldes kombinasjon av redusert β -cellefunksjon og redusert insulinvirksomhet (insulinresistens). Risikofaktorer for T2DM er overvekt, fysisk inaktivitet, dårlig kosthold og genetiske faktorer (10). Ved insulinresistens virker insulin som produseres i β -celler i bukspyttkjertelen dårligere enn normalt i vev som lever, fettvev og muskulatur (11). Ved insulinresistenstilstand hos individer med T2DM er insulinstimulert glukoseopptak i skjelettmuskulaturen svekket (12;13). Individer med type 2-diabetes har høyere risiko for å utvikle hjerte-karsykdommer (8).

1.2.1 Sammenheng mellom fedme og type 2-diabetes

Fedme er spesielt assosiert med økt risiko for å utvikle insulinresistens, som fører til nedsatt glukosetoleranse og utvikling av T2DM (14;15), men likevel er det kun 25% av individer med $KMI > 40 \text{ kg/m}^2$ som har type 2-diabetes (16). Når insulinresistens induseres øker β -cellene insulin-sekresjonen i bukspyttkjertelen tilstrekkelig for å kompensere for den reduserte effekten av insulin og opprettholder dermed normal glukosetoleranse (17). Ved type T2DM klarer ikke β -cellene å kompensere for redusert insulinfølsomhet (18). Hos overvektige individer frigjør fettvevet økt mengde hormoner, fettsyrer, glyserol, proinflammatoriske substanser, cytokiner og andre faktorer som er involvert i utviklingen av insulinresistens (19;20). Abdominal fedme spiller en særlig viktig rolle i utvikling av type 2-diabetes, siden frigjorte fettsyrer fra abdominalt fettvev kan lagres i organer som skjelettmuskulatur og lever og føre til insulinresistens (21).

Fysisk inaktivitet kan føre til redusert insulinfølsomhet, og er derfor en risikofaktor for T2DM. Flere studier har vist at fysisk trening kan forebygge utvikling av T2DM og forbedre blodsukkerkontrollen (8). Regelmessig fysisk aktivitet er gunstig for pasienter med type 2-diabetes. Det øker insulin-stimulert glukoseopptak, og forbedrer insulinfølsomheten i skjelettmuskler (22).

Vektreduksjon gjennom kostendring og økt fysisk aktivitet er en viktig behandling av T2DM ved fedme (23). I tillegg til livsstilsendring kan pasienter ha behov for medikamentell behandling (21). Det er viktig å velge medikamenter som ikke gir vektøkning (11). I enkelte tilfeller kan fedmekirurgi være et godt behandlingsalternativ for pasienter med ekstrem overvekt ($KMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$) og T2DM (24).

1.3 Skjelettmuskelceller

Kroppen består av tre typer muskulatur; skjelettmuskulatur, hjertemuskulatur og glatt muskulatur (25). Skjelettmuskulaturen er det største organet i menneskekroppen og består av flerkjernede myofibre omsluttet av basal lamina (26). Skjelettmuskulatur er et viktig organ for bevegelse og energimetabolisme (27). Omtrent 42% av kroppsvekten hos menn og 36% hos kvinner består av skjelettmuskelmasse. Skjelettmuskulaturen har evnen til å kontrahere og strekke og dermed frembringe skjelettbevegelser (28). Muskel består hovedsakelig av vann, proteiner, uorganiske salter, mineraler, fett og karbohydrater (29). Skjelettmuskulatur er også et sekretorisk organ som skiller ut et utvalg av komponenter, som proteiner (myokiner), metabolitter, mikroRNA (miRNA) og ekstracellulære vesikler. Mange av disse sekreerte stoffene reguleres av trening og muskelkontraksjon og spiller en viktig rolle i endokrin signalering (30;31), og kommunikasjon mellom muskel og andre vev som lever, fettvev og hjernen (32).

Skjelettmuskulaturen er det største insulinfølsomme organet hos mennesker (33). Hos friske mennesker står skjelettmuskulaturen for 70-80% av insulinstimulert glukoseopptak (34). Både insulin og kontraksjon øker translokasjon av glukosetransportøren GLUT4 til cellemembranen og øker derved glukoseopptaket. Mekanismen ved kontraksjonsstimulert glukoseopptak i skjelettmuskulatur involverer AMP-aktivert proteinkinase (AMPK), reaktiv oksygen (ROS) og Ca^{2+} (35). I skjelettmuskel hos pasienter med insulinresistens og T2DM, har flere defekter blitt beskrevet i litteraturen som for eksempel svekket insulinsignaloverføring, redusert

insulinstimulert glukoseopptak og defekter i GLUT4 (36).

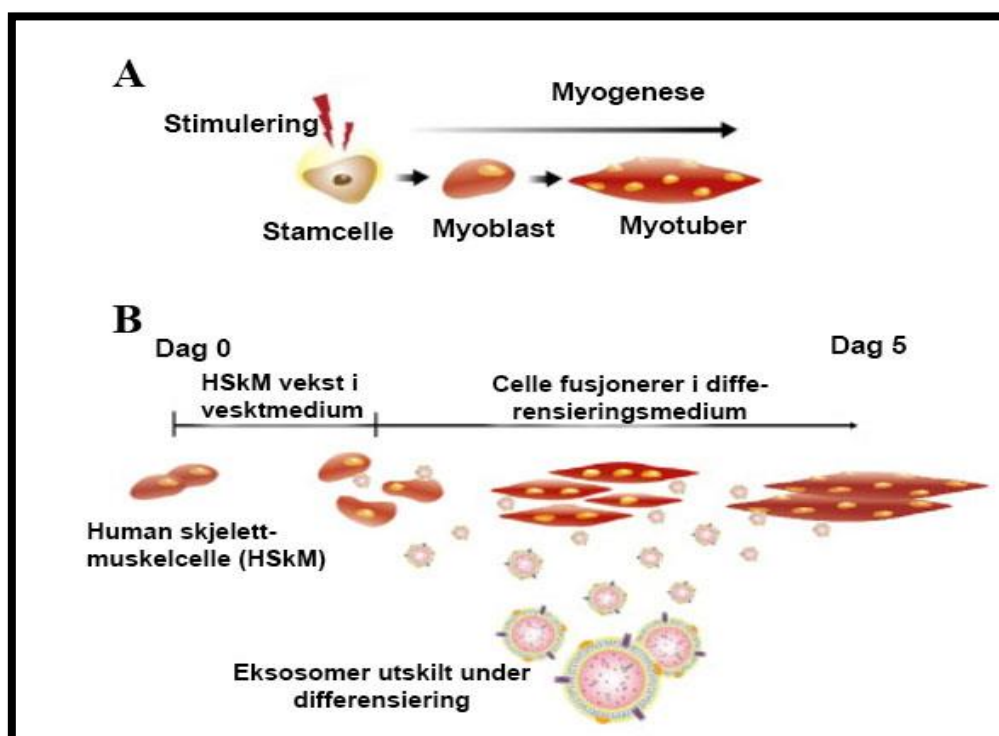
1.3.1 *In vitro*-modell av skjelettmuskelceller

In vitro humane skjelettmuskelceller er et verdifullt verktøy for studier av menneskets muskulatur, dens utvikling, fysiologi, muskelrelaterte sykdommer og metabolisme (34).

Blau og Webster har etablert en *in vitro*-modell for å studere humane muskelceller i cellekultur (37), som videre ble utviklet av blant andre Gaster et al. for å oppnå en effektiv og stabil protokoll for differensiering av humane satellittceller (38). Primære humane cellekulturer av skjelettmuskler opprettes fra humane muskelbiopsier. Satellittceller ser ut til å beholde visse egenskaper fra donorene, og de deler seg, vokser robust og differensierer til modne myotuber under riktige betingelser *in vitro* (figur 1.1.A) (39).

Satellittceller er stamceller i skjelettmuskulaturen som aktiveres som respons på muskelvekst eller skade. Disse cellene er lokalisert mellom muskelcellemembran og basal lamina (29). Satellittceller aktiveres til prolifererende myoblaster og differensieres videre til flerkjernede myotuber *in vitro*. Prolifererte myoblaster fusjonerer enten med eksisterende muskelfibre eller med andre myoblaster og danner flerkjernede myotuber (figur 1.1.B) (40).

Myotuber i kultur viser morfologiske, metabolske og biokjemiske likheter med skjelettmuskelfibre *in vivo*. Myotuber er derfor en foretrukket forsøksmodell for human skjelettmuskulatur (40). Muskelcellene har stabil fenotype, og de kan lagres i flytende nitrogen for langsiktig bruk uten at de mister prolifererende eller differensierende evne. Muskelceller isolert fra personer med forskjellig alder har vist å variere i differensierende egenskaper når de dyrkes *in vitro* (37). Tidligere studier har vist at myotuber fra pasienter med type 2-diabetes bevarer visse fenotypiske egenskaper i cellekultur (39). Begrensninger ved bruk av skjelettmuskelcellemodellen *in vitro* er flere, for eksempel begrenset levetid *in vitro* (37), manglende blodforsyning, nervefibre og fravær av mikromiljø for cellekommunikasjon. I tillegg er effekten av insulin lavere i myotuber enn i intakt skjelettmuskulatur. Uansett er denne cellemodellen mer aktuell for studier av menneskelige sykdommer enn celler fra gnagere som for eksempel mus eller rotte (40;41).



Figur 1.1: Vekstfase hos humane skjelettmuskelceller. A: Aktive satellittceller deler seg til myoblaster og differensierer videre til myotuber. B: Skjematisk fremstilling av muskelcellers vekst *in vitro*. Humane myoblaster kan dyrkes i kultur, hvor de prolifererer og differensierer til myotuber under riktige betingelser (eksempel riktig cellemedium under dyrking og oppbevaring). Prolifererte myoblaster fusjonerer enten med eksisterende muskelfibre eller med andre myoblaster og danner flerkjernede myotuber. Muskelcellene skiller ut eksosomer under differensieringen og som modne myotuber. Dette bilde er gjengitt med tillatelse fra produsenten (26). Forfatterens egen oversettelse.

1.4 Trening

Fysisk inaktivitet er et globalt helseproblem, og nylige data tyder på at omkring 1/3 av voksne på verdensbasis er fysisk inaktive (31). Det betyr at voksne individer ikke utfører minimum 150 minutter med fysisk aktivitet i uken, slik det er anbefalt av Verdens helseorganisasjon (42). Fysisk aktivitet spiller en viktig rolle i både forebygging og behandling av mange kroniske metabolske sykdommer som fedme, T2DM, samt kardiovaskulær sykdom og kreft (43). Det er mange fysiologiske fordeler med trening, og man ser gunstige effekter i en rekke celler, vev og organer utenfor den kontraherende skjelettmuskulaturen (44). Trening forbedrer kroppens glukosetoleranse, øker insulinfølsomheten og den generelle oksidative kapasiteten i skjelettmuskler (33). I tillegg har regelmessig trening en gunstig effekt på reduksjon av abdominal fedme, kroppsvekt, triglyseridnivå og blodtrykk samt bidrar til økt hjertefunksjon (31). Fysisk trening stimulerer organer, hovedsakelig skjelettmusklene til å frigjøre ulike proteiner (myokiner) som interleukin (IL) IL-6, IL-10 og IL-1-reseptoragonist (IL-1ra). Det er

særlig godt dokumentert at IL-6 (avsnitt 1.4.2) utskilles fra skjelettmuskelceller ved kontraksjon forårsaket av trening (43;45).

Trenings-stimulert signaloverføring kan gjenopprette glukosemetabolismen i insulinresistent muskel gjennom akutt aktivering av glukosetransport og forbedret insulinfølsomhet i opptil 48 timer etter trening (22). Intensitet og treningsvarighet er viktige faktorer for glukoseopptak i skjelettmuskulatur (22). Trenings-stimulert glukoseopptak i skjelettmuskel er regulert via AMP-aktivert proteinkinase (AMPK) (46).

1.4.1 Elektrisk puls-stimulering

Nikolić et al. (41) har etablert en *in vitro*-treningsmodell for humane skjelettmuskelceller (myotuber) i kultur ved bruk av elektrisk pulsstimulering (EPS). Dette er en modell for trening av muskelceller som skal gi lignende effekter som trening og muskelcellekontaksjon *in vivo* (41). Humane myotuber blir tilført elektrisk pulsstimulering for å kontrahere muskelcellene (47). *In vitro*-modellen kan være egnet til å studere signaleringshendelser og metabolske tilpasninger i kontraherende muskler. EPS har også vært et viktig verktøy for å identifisere myokiner og andre molekyler forbindelser som skilles ut fra kontraherende muskler og som kanskje kan bidra til å forklare helsefremmende effekter av regelmessig trening (48). Den første rapporten på en *in vitro*-treningsmodell med EPS av skjelettmuskelceller var med C2C12, skjelettmuskelcellelinje fra mus (49). Studier har vist at EPS kan føre til uttrykk av flere myokiner, som er kjent for å bli utskilt fra kontraherende skjelettmuskler *in vivo*, som for eksempel interleukin-6 (IL-6) (50).

Modellen har utviklet seg videre de siste ti årene. Det finnes forskjellige modeller med EPS, blant annet akutt høyfrekvent stimulering og kronisk lavfrekvent stimulering (41). Det er vist at EPS har lignende effekter på glukoseopptaket i humane myotuber i kultur som *in vivo* muskel-kontraksjoner (36). Kronisk lavfrekvent EPS forbedret insulinfølsomhet, økte insulin-stimulert glukoseopptak og oksidasjon etter 24-timers behandling (50). I samsvar med *in vivo*-forsøk aktiverte EPS AMPK, økte sekresjon av IL-6 og viste antiinflammatorisk effekt (36).

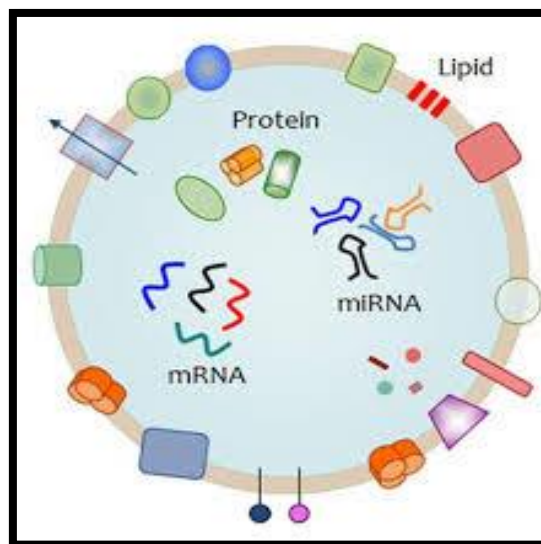
1.4.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) er klassifisert som både et pro- og antiinflammatorisk cytokin. Den nåværende oppfatningen er at IL-6 har primært antiinflammatoriske effekter (51). Den

antiinflammatoriske effekten av trening er godt etablert, og muskulær IL-6 antas å spille en nøkkelrolle i denne prosessen (50). Cytokiner og peptider som produseres og frigjøres av muskelfibre under kontraksjon kalles myokiner (52). IL-6 er et cytokin som produseres og skilles ut fra kontraherende muskelceller under trening (45). IL-6 genet er ikke aktivt i hvilende muskel, men aktiveres raskt ved sammentrekninger (53). Muskelkontraksjon forårsaket av fysisk trening resulterer dermed i økt genuttrykk og sekresjon av IL-6 fra skjelettmuskler (31). Plasmakonsentrasjonen av IL-6 er også vist å øke med trening og kan økes opptil 100 ganger (54). Kombinasjonen av intensitet og treningsvarighet avgjør økningen av IL-6 i plasma (55).

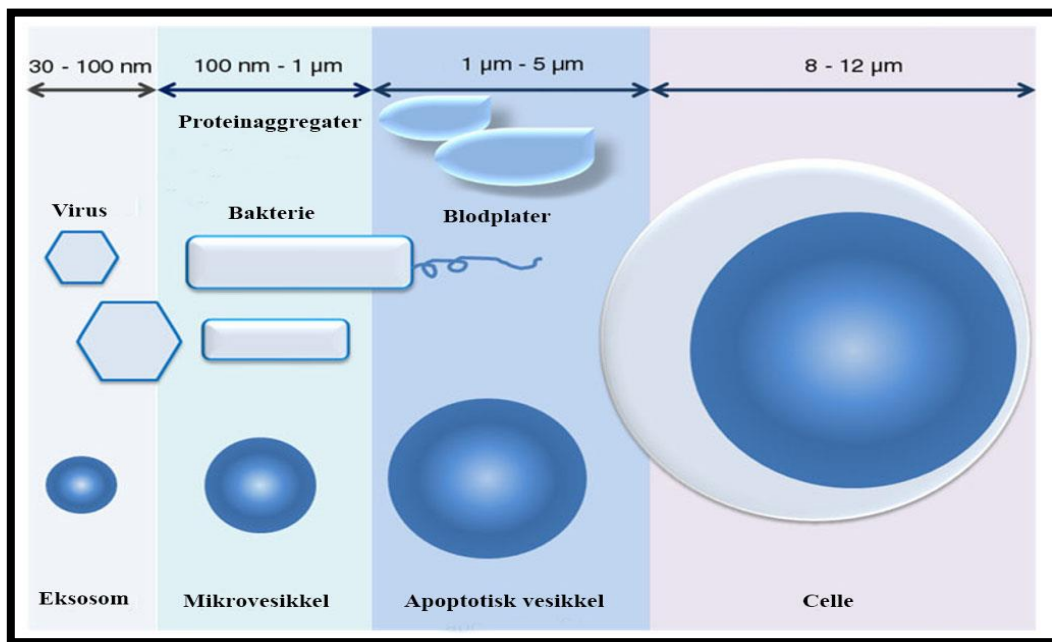
1.5 Ekstracellulære vesikler

Ekstracellulære vesikler (EV) er små, runde vesikler som er omsluttet av en dobbel fosfolipidmembran, og som utskilles fra de fleste eukaryote og prokaryote celler (56). Vesiklene er tilstede i alle kroppsvæsker som serum, blod, urin, brystmelk, spytt og i medier fra cellekulturer (57). Konsentrasjonen av EV i kroppsvæsker kan overstige 10^{10} / ml under normale fysiologiske forhold (58;59). EV er en heterogen samling av budbringere som inneholder hormoner, vekstfaktorer, proteiner, lipider og nukleinsyrer (figur 1.2) (56;60;61).



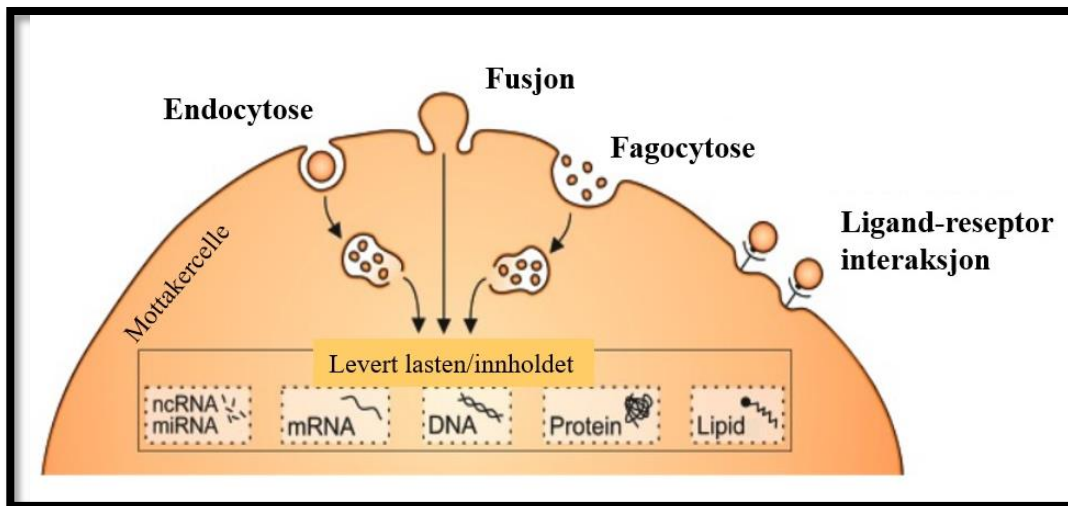
Figur 1.2: Ekstracellulær vesikkel (EV) med innhold. EV er omgitt av en dobbel fosfolipidmembran og inneholder proteiner, lipider og nukleinsyrer (61).

Celler frigjør vesikler av varierende størrelse både gjennom endosomal signalvei og ved avsnøring (budding) fra plasmamembranen (62). Lipidmembranen i EV beskytter og stabiliserer EV-innholdet når de skilles ut i det ekstracellulære miljøet (63). EV inndeles i tre grupper; eksosomer, mikrovesikler (MV) og apoptotiske legemer (figur 1.3). Forskjellen mellom disse er biogenese og størrelse, som varierer fra 30 nm til 5µm (64). Det er ikke et klart skille mellom vesikkel-grupper, slik at de kan overlappe hverandre, spesielt eksosomer og mikrovesikler (65). Eksosomer og mikrovesikler har fått mye oppmerksomhet de siste tiårene og er hittil de mest studerte vesiklene (66;67).



Figur 1.3: Ekstracellulær vesikkel størrelse. Eksosom: 30-100 nm, mikrovesikkel: 100 nm-1 µm og apoptotiske legemer: fra 1 µm til 5 µm. Dette bildet er gjengitt med tillatelse fra produsenten (64). Forfatterens egen oversettelse.

Ulike celletyper utveksler kontinuerlig ekstracellulære vesikler over korte og lange avstander *in vivo* som en mekanisme for celle-celle-kommunikasjon (intercellulær/inter-organ kommunikasjon) (63). EV kan tas opp av flere celletyper og påvirker målceller gjennom signalering eller overføring av last inkludert proteiner, lipider og ulike RNA (eksempel mikroRNA og mRNA) (68). EV-opptak i målcellen kan utføres på forskjellige måter; proteiner i vesikkelmembran binder seg til reseptorer på plasmamembranen i målcellen, fusjon av EV-membranen med plasmamembran, fagocytose og ulike former for endocytose (figur1.4) (69;70).



Figur 1.4: EV-opptak i målcellen. Vesiklene kan tas opp i mottakercellen på ulike måter; proteiner i vesikkelmembranen binder seg til reseptorer på plasmamembranen i målcellen, fagocytose, fusjon av EV-membranen med plasmamembran og endocytose. Deretter kan de gi fra seg innholdet (lasten) sitt i mottakercellen. EV=Ekstracellulære vesikler. Dette bilde er gjengitt med tillatelse fra produsenten (70). Forfatterens egen oversettelse.

EV kan også utnyttes som biomarkører. Deres antall, innhold og opprinnelse kan bidra til å gi nyttig informasjon som reflekterer cellulære funksjoner eller helsetilstand og dermed avsløre fysiologiske og patofysiologiske tilstander (71). Stabile EV i sirkulasjonen er attraktive kandidater for utvikling av nye biomarkører (72).

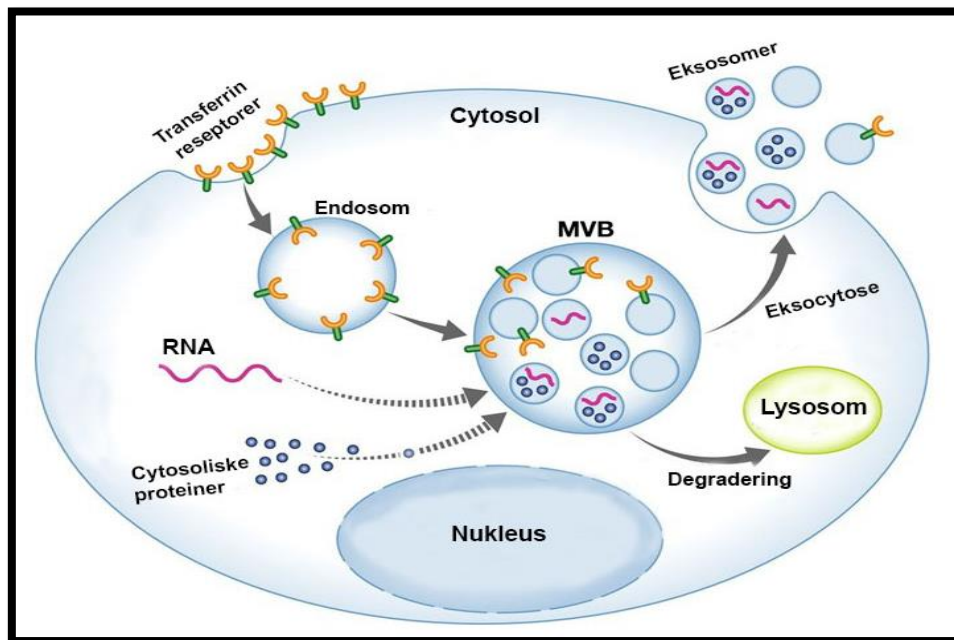
1.5.1 Eksosomer

Eksosomer ble først oppdaget på midten av 1980 tallet av Johnstone et al. (73), og er de vesiklene som har fått mest oppmerksomhet de siste årene. Eksosomer har en størrelse som kan variere fra 30 til 150 nm i diameter (60;74). De fleste kroppsvæsker inneholder betydelig mengder eksosomer (75). Morfologien til eksosomer beskrives ofte som "skålformet" under visualisering med transmisjons elektronmikroskop (TEM) (58). Hvert eksosom gjenspeiler modercellens fysiologiske tilstand og kan sies å være et «øyeblikksbilde» av cellens fenotypiske uttrykk. Eksosomer er vist å være involvert i regenerering av skjelettmuskel (76).

1.5.1.1 Biogenese og utskillelse av eksosomer

Eksosomer dannes via den endosomale signalveien. De produseres ved at en liten del av plasmamembranen invaginerer og danner en endocytotisk vesikkel. Denne vesikkelen modnes til en tidlig endosom. Tidlig endosom kan enten transporteres tilbake til plasmamembranen eller fusjonere med intraluminal vesikler (ILV) til multivesikulære legemer (MVB) og

danner sene (late) endosomer. Basert på biokjemiske egenskaper kan MVB enten gå til lysosomer og nedbrytes, eller fusjonere med plasmamembranen og frigjøre ILV, kalt eksosomer, til det ekstracellulære miljøet (figur 1.5) (68;77).



Figur 1.5: Biogenese av eksosomer. Eksosomer dannes via endosomal signalvei. En del av plasmamembranen invaginerer og danner en tidlig endosom, som kan gå to retninger, enten tilbake til plasmamembran eller modnes til multivesikulære legemer (MVB). Deretter kan MVB fusjonere med plasmamembranen og frigjøre eksosomer, eller de kan de gå til lysosomene og degraderes. Dette bildet er gjengitt med etter tillatelse fra produsenten (77). Forfatterens egen oversettelse.

1.5.1.2 Eksosominnhold

Eksosommembranen inneholder høye nivåer av kolesterol, sfingolipider, ceramider og fosfolipider (78). Eksosomer bærer med seg en rekke proteiner, lipider og nukleinsyrer i sitt indre som kan være generelle eller spesifikke for opprinnelsecellen (74). Nesten alle eksosomer inneholder proteiner som har endosomal opprinnelse uavhengig av hvilken celletype eksosomene kommer fra (75). Noen av proteinene som er identifisert i eksosomer er membrantransportører, fusjonsproteiner (f.eks. GTPaser, annexiner, og flotillin), multivesikulært legeme (MVB), biogeneseprotein (f.eks. Alix og TSG101), tetraspaniner (f.eks. CD9, CD,81,CD63 og CD82), integriner og varmesjokkproteiner ((heat shock proteins f.eks. HSC70) (79).

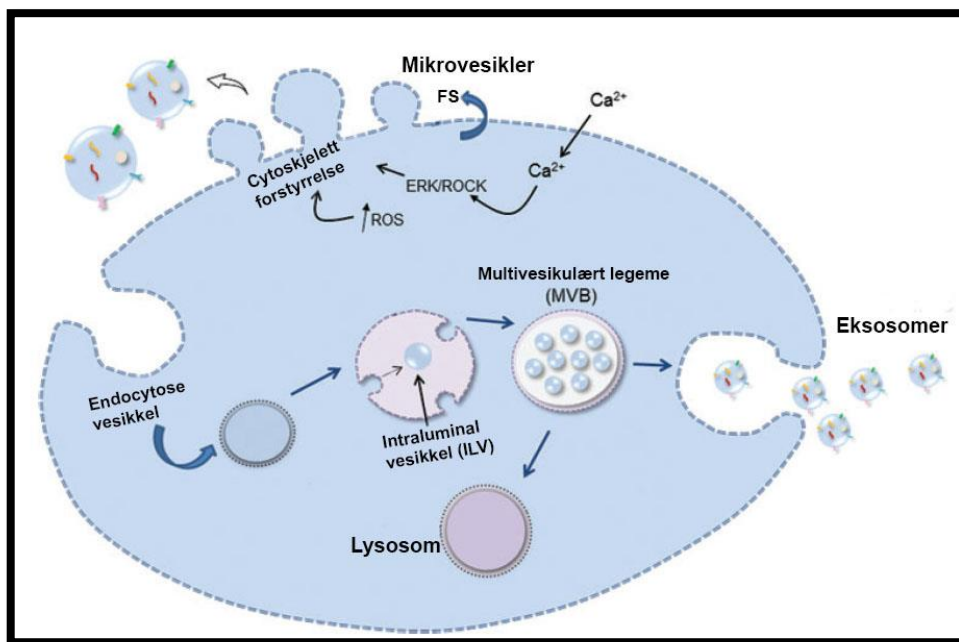
Eksosomer inneholder proteiner, lipider, proteinkodende RNA (mRNA) og ulike ikke-kodende RNA (mikroRNA, lage ikke-kodendeRNA), som kan tas opp av målcellen og deretter bidra til å modulere mottakercellen (78).

1.5.2 Mikrovesikler

Mikrovesikler (MV) ble identifisert av Peter Wolf i 1967 (80) og har en størrelse mellom 100-1000nm i diameter (65). Mikrovesikler blir også omtalt som mikropartikler i litteraturen, spesielt innenfor koagulasjonsmiljøet. Funksjonen til mikrovesikler er avhengig av både innholdet de bærer og celletypen de kommer fra (81).

1.5.2.1 Biogenese og utskillelse av mikrovesikler

MV dannes ved avsnøring fra plasmamembranen etter celleaktivering (figur 1.6). MV er rike på negativt ladede fosfolipider (fosfatidylserin) på overflaten. Celleaktivering induserer Ca^{2+} -innstrømming i celler fra det ekstracellulære miljøet, noe som fører til at fosfolipider danner en buktning/utposing på yttersiden av plasmamembranen. Ca^{2+} -økning er knyttet til ekstracellulær signalregulert kinase/Rho-assosiert kinase (ERK/ROCK)-aktivering og forstyrrelse i cytoskjelettet som igjen resulterer i mikrovesikkeldannelse. En økning av ROS er også assosiert med MV-frigjøring (65).



Figur 1.6: Biogenese av mikrovesikler. Celleaktivering fører til økt Ca^{2+} -nivå inne i cellen, som igjen fører til buktning i plasmamembranen. Ca^{2+} -økning aktiverer ERK/ROCK og gir forstyrrelser i cytoskjelettet som igjen resulterer i mikrovesikkeldannelse. Økning av ROS er også assosiert med MV-frigjøring. Ca^{2+} = kalsium, FS= fosfatidylserin, ERK= ekstracellulær signalregulert kinase, ROCK= Rho-assosiert kinase, ROS= reaktive oksygenforbindelser, MV= mikrovesikler. Dette bildet er gjengitt med etter tillatelse fra produsenten (65). Forfatterens egen oversettelse.

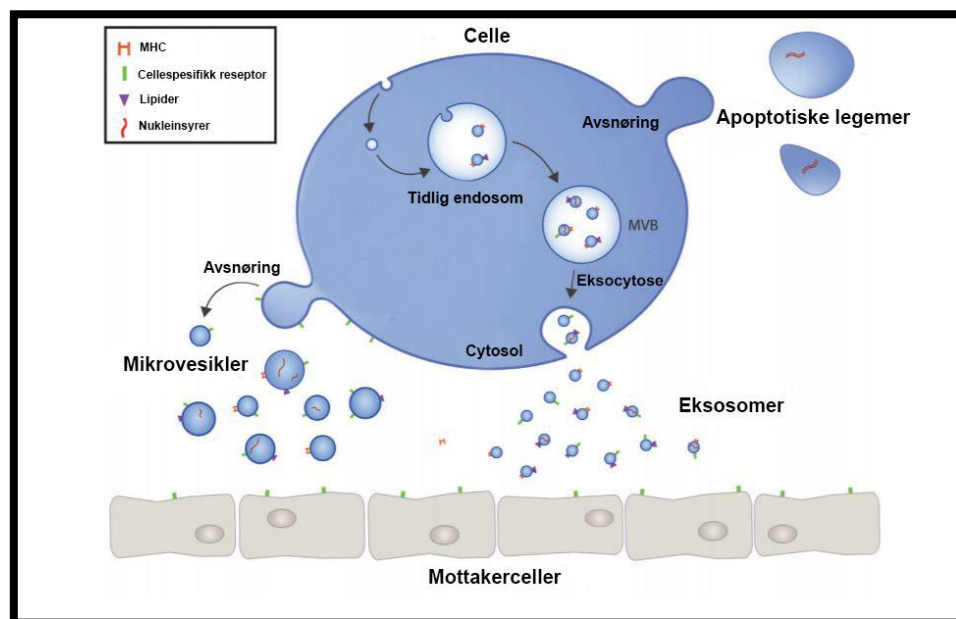
1.5.2.2 Mikrovesikkelinnhold

I likhet med eksosomene inneholder mikrovesikler en rekke proteiner, lipider og nukleinsyrer som er av generell karakter eller spesifikke for opprinnelsecellen. De kan også inneholde et utvalg av små ikke-kodende RNA (mikroRNA) og kodende messenger RNA (mRNA).

Mikrovesikler som dannes ved avsnøring fra plasmamembranen inneholder markører som integriner (molekyl som er bindeledd mellom cellens indre og ytre miljø) og spesifikke membranproteiner (74). Andre markører som er tilstede i mikrovesikler er anneksin, fosfatidylserin, vevs-faktorer og cellespesifikke markører (64).

1.5.3 Apoptotiske legemer

Celler som gjennomgår apoptose frigjør apoptotiske legemer eller apoptotiske vesikler (figur 1.7). Diameteren varierer mellom 1-5 μm (64), derfor er de enkle å skille fra eksosomer og mikrovesikler, men ikke fra små celler som blodplater. Morfologien til apoptotiske legemer er mer heterogen enn eksosomers og mikrovesiklers (58). I denne oppgaven ble ikke apoptotiske legemer studert.



Figur 1.7: Biogenese av apoptotiske legemer. Utskillelse av apoptotiske legemer skjer via avsnøring (budding). Dette bildet er gjengitt med etter tillatelse fra produsenten (64). Forfatterens egen oversettelse.

1.5.4 Ekstracellulære vesikler, overvekt og type 2-diabetes

Overvektige pasienter har høyere nivå av ekstracellulære vesikler i plasma sammenlignet med normalvektige (82). Det er ikke kjent om økning i plasma EV skyldes en økning i eksosomer, MV eller begge deler. Behandling av overvektige pasienter med diett, trening og vektreduksjon er vist å føre til redusert EV-nivå i plasma (83). Analyse av EV utskilt fra fettvev viser at fedme endrer innholdet av deres mRNA, miRNA og proteiner. En slik endring i EV-innholdet antyder at fedmeassosierte endringer i mikrovesikkel-sammensetning kan være involvert i insulinresistens (83). Sirkulerende eksosomer fra overvektige pasienter kan inneholde miR-197, miR-23a og miR-509-5p som igjen er korrelert med KMI (65).

I en tversnittstudie utført av Freeman et al. (84) ble det vist at pasienter med type 2-diabetes hadde høyere EV-konsentrasjon i plasma enn ikke-diabetikere. De fant at insulinresistens utløser EV-sekresjonen (84). EV kan vise seg å være en viktig mediator i T2DM. I tillegg ble det observert endringer i proteinnivået i EV fra personer med insulinresistens og β -celle dysfunksjon, som også kan være en biomarkør for denne sykdommen (84). Tidligere studier har vist at antall eksosomer i plasma er korrelert med sykdommens alvorlighetsgrad (85). Nivået av sirkulerende miR-1 og miR-133a (miRNA) er funnet signifikant forhøyet hos type 2-diabetes pasienter sammenlignet med friske (65).

1.5.5 Ekstracellulære vesikler og skjelettmuskel

Både skjelettmuskel (*in vivo*) og dyrkede myotuber (*in vitro*) skiller ut ekstracellulære vesikler (26). Disse vesiklene inneholder myokiner, proteiner, RNA (mRNA og miRNA) og DNA (26). EV blir også aktivt utskilt ved differensiering av myoblaster. *In vitro*-studier har vist økt sekresjon av EV under muskelcelledifferensiering hos murine C2C12-celler (86) og primære humane myoblaster (87).

En rekke studier har vist at miRNA spiller en viktig rolle i regulering av biologiske prosesser. Flere miRNA har blitt identifisert som biomarkører for myogenese, muskelmasse og næringsstoff-metabolisme i fysiologiske og patologiske tilstander (88). Muskelspesifikke miRNA betegnes som myomiRer og inkluderer miR-1, miR-133a/b, miR-206, miR-208b, miR-499 og miR-486, som alle er blitt identifisert i skjelettmuskulatur (89). Ekstracellulære vesikler utskilt fra skjelettmuskel er rike på disse nevnte miRNA og transporterer dem ut i det ekstracellulære miljøet (90). Muskelspesifikk miR-1 og miR-206 er relatert til proliferasjon og differensiering. miR-1 er tilstede i skjelett- og hjertemuskel, og miR-206 er spesifikk for

skjelettmuskulatur. Begge fremmer differensiering av myoblaster til myotuber. miR-133 derimot fremmer/aktiverer proliferasjon av myoblaster, og hemmer deres differensiering (91).

1.5.6 Ekstracellulære vesikler og trening

Fysisk aktivitet er assosiert med frigjøring av EV til det ekstracellulære miljøet. EV-sekresjon kan variere med ulike treningsaktiviteter som løping eller sykling (92). Utskillelse av EV varierer også ved akutt fysisk trening og regelmessig trening (93). Trening reduserer sirkulerende lipider, glukose og cytokiner, og endrer EV-nivåer og funksjon. I tillegg kan trening forandre frigjøring av inflammatoriske cytokiner og mikroRNA (miRNA), samt redusere oksidativt stress (93). Baggish et al. rapporterte nylig i en studie unike og dynamiske endringer i nivåene av sirkulerende miRNA før og etter aerobic trening (94).

1.5.7 Isolering og karakterisering av ekstracellulære vesikler

Det er en utfordring å isolere helt rene EV-fraksjoner, frie for ikke-vesikulære komponenter. Det er etablert retningslinjer for isolering og karakterisering av EV. Forskere tilknyttet International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) har publisert en rekke minimumskrav for hvordan man eksperimentelt skal definere ekstracellulære vesikler og deres funksjon (95). Et av de første kriteriene for å definere EV er å isolere dem fra cellekulturmedier eller biologiske væsker som blod og urin. Det finnes ulike metoder for å isolere ekstracellulære vesikler som ultrasentrifugering, differensialsentrifugering, størrelses-basert sentrifugering og filtrering og ultrafiltrering. Den mest vanlige metoden for EV-isolering er ultrasentrifugering (96;97). Neste trinn etter isolering er karakterisering av EV. Ulike metoder benyttes for å karakterisere EV; Nanoparticle tracking analyses (NTA) for å analysere konsentrasjon og størrelse, transmisjons-elektronmikroskopi (TEM) for å studere morfologien til EV, massespektrometri for å studere proteininnhold, Western blotting (WB) for å detektere EV-protein komponenter, flowcytometri for å studere overflatemarkører på EV og kvantitativ polymerase kjedereaksjon (q-PCR) for å studere DNA- eller RT-qPCR for å se på RNA-innhold (98;99).

1.6 Formål med oppgaven

Overvekt og fedme er et stadig økende problem på verdensbasis (100). Fedme er assosiert med økt risiko for å utvikle insulinresistens og type 2-diabetes (21). Det er kjent at fysisk aktivitet spiller en viktig rolle i både forebygging og behandling av fedme og type 2-diabetes. Det øker insulin-stimulert glukoseopptak, forbedrer insulinfølsomheten i skjelettmuskler, samt at det har en rekke gunstige effekter på andre organer som fettvev, hjerne, skjelett og sirkulasjonssystem. Skjelettmuskulatur er et sekretorisk organ som blant annet skiller ut ekstracellulære vesikler (både eksosomer og mikrovesikler) og kan overføre funksjonelle proteiner og RNA mellom celler, noe som kan resultere i regulering av spesifikke signalveier i mottakerceller. Flere studier har vist at kontraherende muskulatur sender ut signaler til resten av kroppen, og sirkulerende myokiner som interleukin-6 (IL-6) er et eksempel på det. Det har blitt etablert en *in vitro*-modell for trening av dyrkede primære humane skjelettmuskelceller (myotuber) som stimuleres med lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (EPS) (41).

Innhold og konsentrasjon i sirkulerende EV kan være endret ved flere sykdommer, noe som gjør dem interessante som sirkulerende biomarkører. Det antas at EV bidrar aktivt ved utvikling i ulike sykdommer, som for eksempel diabetes.

Målet med dette prosjektet var å karakterisere og studere hvordan elektrisk pulsstimulering påvirket utskillelsen av og innholdet i ekstracellulære vesikler fra humane skjelettmuskelceller isolert fra pasienter med type 2-diabetes. For å besvare denne problemstillingen ble det satt opp følgende delspørsmål:

- Er det forskjell på antall/mengde og størrelse av eksosomer og mikrovesikler i cellemedier fra myotuber som har fått elektrisk pulsstimulering eller ikke?
- Er det ulike mengder av overflatemarkørene CD9, CD81 og CD63 på eksosomer og mikrovesikler i cellemedier fra myotuber som har fått elektrisk pulsstimulering eller ikke?
- Er det forskjell på hvilke komponenter de ekstracellulære vesikler frakter, som for eksempel miRNA og proteiner, med og uten elektrisk pulsstimulering?

2 Materialer og Metoder

2.1 Materiale og etikk

I denne studien ble det benyttet cellekulturer av primære humane skjelettmuskelceller (humane myoblaster), isolert fra bukmuskelbiopsier fra den skrå magemuskelen (m. obliquus internus abdominis). Prøvematerialet ble oppbevart i en cellebank (Biobank S-09078d).

Cellene ble isolert fra muskelbiopsier tatt under fedmekirurgi (gastric by-pass) på donorer med ekstrem overvekt diagnostisert med type 2-diabetes (T2DM). Donorene i denne studien bestod av seks kvinner i alderen 34-66 år (tabell 2.1).

Studien er godkjent av regional etisk komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) (referanse 2009/166), se vedlegg 1. Informert skriftlig samtykke ble innhentet fra alle donorene. Hver donor har sin unike ID-kode tilknyttet cellene. På denne måten forblir deres personopplysninger aidentifisert og personvern er ivaretatt i henhold til gitte retningslinjer.

Tabell 2.1: Donorkarakteristika.

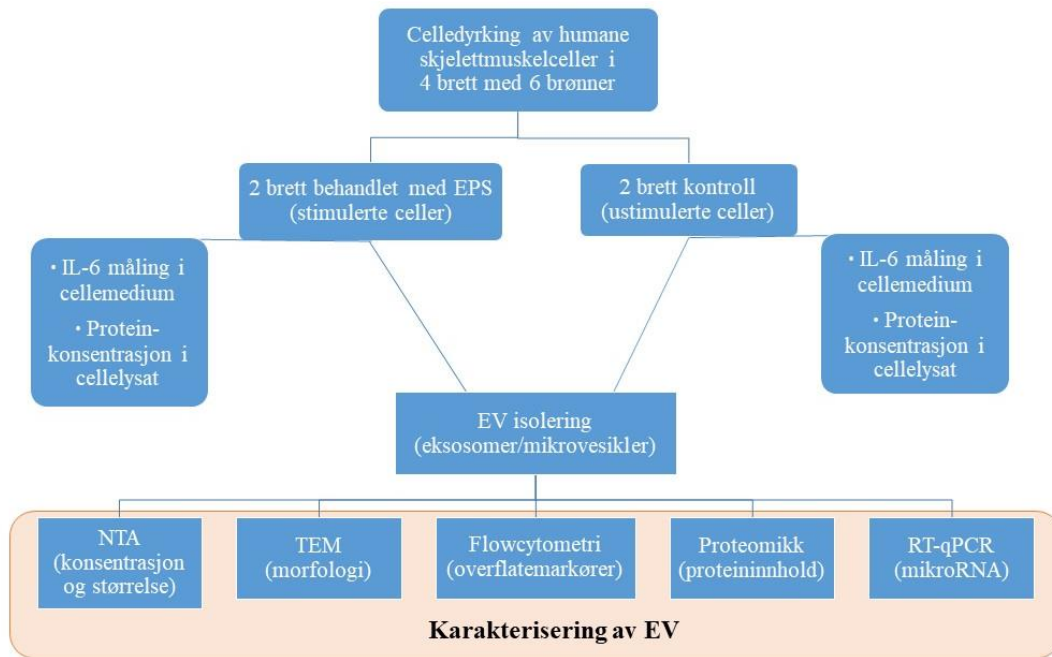
Donor	Alder (år)	KMI (kg/m ²)	HbA _{1c} (%)	Total-kolesterol (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)	Triglyserider (mmol/l)
6/0 (kvinner/menn)	49 (±11)	45 (±5)	7,0 (±0,8)	5,0 (±0,7)	1,2 (±0,3)	2,9 (±0,6)	2,0 (±0,7)

Dataene er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik (SD). KMI= Kroppsmasseindeks, HbA_{1c}= glykert hemoglobin A_{1c}, HDL= High-density lipoproteiner, LDL= Low-density lipoproteiner.

Detaljert sammensetning og informasjon angående reagenser/ kjemikaler og utstyr benyttet i studien er beskrevet og dokumentert i vedlegg 2-11.

2.2 Studiedesign

For å besvare problemstillingen på best mulig måte ble ulike metoder benyttet i denne studien. Kriteriene nevnt av Jan Lötvald et al. i Journal of Extracellular Vesicles (95) ble benyttet som veiledende for EV-analysene i denne oppgaven, siden det ikke er en standard retningslinje for isolering og karakterisering av ekstracellulære vesikler. Minimumskrav til definisjon av ekstracellulære vesikler og deres funksjon ble satt av International Society for Extracellular Vesicles (ISEV). Figur 2.1 viser en oversikt over hvordan studien ble designet og gjennomført fra celledyrking til karakterisering av ekstracellulære vesikler (EV).



Figur 2.1: Fremstilling av studien fra celledyrking til karakterisering av ekstracellulære vesikler (EV) for hver enkel donor. Det ble dyrket 4 brett fra hver donor, hvorav to brett ble behandlet med EPS (stimulert) og 2 brett ble brukt som kontroll (ustimulert). Det ble målt IL-6 og totalproteinkonsentrasjon før isolering av EV. Etter 24 timer serumfritt ble cellemedium for EPS og kontroll oppsamlet hver for seg. Ekstracellulære vesikler (eksosomer og mikrovesikler) ble isolert fra EPS/kontroll-medium før de ble karakterisert. EPS= Elektrisk pulsstimulering, NTA= Nanoparticle Tracking Analysis, TEM= Transmisjon elektronmikroskopi, IL-6= Interleukin-6 og RT-qPCR= Kvantitativ revers transkriptase polymerase kjede reaksjon.

2.3 Dyrking av celler

Fra bukmuskelbiopsier ble satellittceller isolert og dyrket til myoblaster før de ble nedfryst i ampuller i flytende nitrogen. Det var disse nedfryste myoblaster som ble brukt i denne oppgaven. Prosedyren benyttet til celledyrking var basert på metoden til Gaster et al. (38).

2.3.1 Påføring av ekstracellulær matriks (ECM)-gel

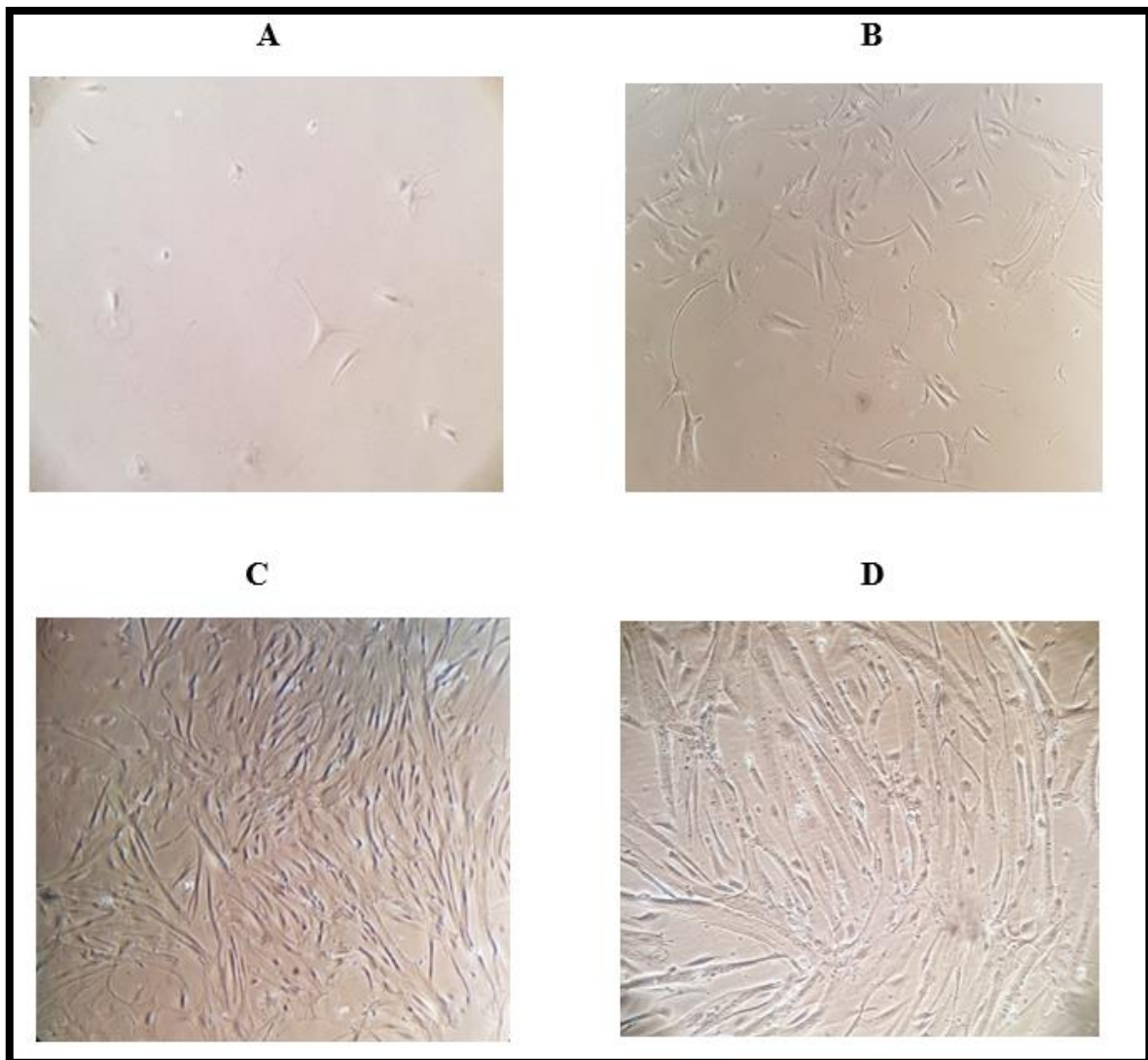
Costar® (Corning) 6 brønners dyrkningsbrett benyttet i denne oppgaven var ikke belagt (coated) på forhånd. Alle brønnene ble manuelt belagt med ekstracellulær matriks(ECM)-gel (vedlegg 3), slik at cellene bedre festet seg til bunnen. Frossent ECM-gel ble tint på vannbad, og fortynnet i DMEM i forholdet 1:4. Fortynnet ECM-løsningen (1 ml) ble påført på bunnen i en brønn, fordelt over hele bunnen og sugd av. Samme løsning ble tilsatt i neste brønn, fordelt på bunnen og sugd av, osv. Alle brønnene ble belagt med ECM-løsning på lik måte og lufttørket godt, før celledyrkingen ble tilsatt i brønnene.

2.3.2 Utsåing av myoblaster

Utsåing av muskelceller ble utført aseptisk i en LAF-benk. Humane myoblaster hentet fra nitrogentanken ble raskt opptint på vannbad og overført til et 50 ml sentrifugerør (Corning). Det ble tilsatt 5 ml utsåingsmedium (M1-medium, vedlegg 2 og 3). Det var viktig at mediet hadde romtemperatur for å unngå temperatursjokk for cellene. Rørene ble sentrifugert i 7 minutter ved 1400 rotasjoner per minutt (rpm) i en Hettich ROTOFIX 32 sentrifuge (Hettich LAB Technology, vedlegg 3). Supernatanten ble fjernet fra røret, cellepelletten i bunnen av røret ble resuspendert i 5 ml M1-medium og deretter tilsatt passende volum av M1-medium for utsåing. Det ble overført 1 ml celleduspensjon til hver brønn i et 6-brønners celledyrkningsbrett belagt med ECM (avsnitt 2.3.1). Cellene ble dyrket i fire brett og inkubert i inkubatorskap ved 37°C med 5% CO₂.

2.3.3 Proliferasjon av myoblaster og differensiering til modne myotuber

Utsåingsmediet ble fjernet etter 24 timer og erstattet med proliferasjonsmedium (M2-medium, vedlegg 2 og 3), 1 ml per brønn. Proliferasjonsmediet ble byttet to ganger i uken (hver 2.-3. dag) frem til 80-90% konfluens, da M2-medium ble byttet med differensieringsmedium (M3-medium, vedlegg 2 og 3), 1 ml per brønn. I dette mediet differensierte myoblaster til flerkjernede myotuber. Differensieringsmediet ble skiftet hver 2.-3. dag, frem til 7. dag av differensieringen. Fra dag 6 til dag 7 i differensieringsperioden ble det gitt elektrisk pulsstimulering (EPS)-behandling til to av dyrkningsbrettene. På dag 7 ble det tilsatt serumfritt M3 (S-fritt M3, vedlegg 2) i alle dyrkningsbrett i 24 timer før cellene ble høstet på dag 8 av differensieringen. Gjennom hele dyrkningsprosessen ble det anvendt lysmikroskop for å studere cellenes vekst og morfologi. Muskelcellens vekstperiode fra utsåing til differensiering varierte fra 14 dager til 36 dager for ulike donorer. Figur 2.2 viser utviklingen av muskelcellene fra en representativ donator.



Figur 2.2: Humane skjelettmuskelcellers vekst fra myoblaster til modne myotuber. Cellene er fra en representativ donor. A: 24 timer etter utsåing i utsåingsmedium. B: Etter 7 dager i proliferasjonsmedium. C: 16 dager etter utsåing, medium ble byttet til differensieringsmedium. D: 7 dager etter tilsatt differensieringsmedium. Foto: Mobilkamera Samsung Galaxy 8.

2.4 Elektrisk pulsstimulering (EPS)

Det ble benyttet en *in vitro*-treningsmodell for humane skjelettmuskelceller i kultur utviklet av Nikolić et al. (41). I denne studien ble kronisk lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (EPS) i 24 timer som brukt.

Prosedyre

På dag 6 av differensieringen ble det tilsatt 2,2 ml M3-medium i alle brønner i alle fire brett med myotuber. To brett ble behandlet med elektrisk pulsstimulering (EPS) (stimulert), mens to brett ble brukt som kontroll (ustimulert). Myotubene ble tilført elektriske pulser via

karbonelektroder som var satt ned i M3-mediet i brønnene og koblet til en stimulator (pulsgenerator bygget ved Elektronikklaboratoriet ved Universitetet i Oslo, vedlegg 3). Karbonelektroder var festet på undersiden av C-dish™ lokk (kjøpt fra Ionoptix LLC, vedlegg 3). Stimulatoren var tilkoblet og styrt av en datamaskin ved hjelp av egenutviklet programvare (figur 2.3). Parametre som ble benyttet i denne oppgaven var: spenning 11 Volt (V), bipolare pulser a 2 millisekund (ms) og 1 Hertz (Hz) kontinuerlig i 24 timer. Alle brett ble inkubert i inkubatorskap ved 37°C med 5 % CO₂ i 24 timer. Cellemediene fra alle brønnene med EPS og kontroll ble samlet i hver sitt rør for å måle interleukin-6 (IL-6). Begge rørene med medium ble fryst ved - 20°C for senere analyse (avsnitt 2.8). Det ble tilsatt 1 ml serumfritt M3 i hver brønn i alle fire brett den 7. dag av differensieringsperioden. Cellene ble inkubert i 24 timer i dette serumfrie mediet før høsting, for å samle opp ekstracellulære vesikler sektrert fra myotubene.



Figur 2.3: Apparaturl til elektrisk pulsstimulering (EPS) av muskelceller. To 6-brønnersbrett dekket med C-dish lokk (Ionoptix) som har karbonelektroder stikkende ned i differensieringsmediet. Elektrodene er koblet til en stimulator som justeres fra en PC med egenutviklet programvare. Foto: Mobilkamera Samsung Galaxy 8.

2.5 Høsting av medier til EV-isolering

På dag åtte av differensieringen ble medium og celler høstet. Medium fra alle brønnene (to brett) behandlet med EPS ble samlet opp i ett rør for hver donor. I tillegg ble medium fra alle

brønnene (to brett) med kontroll samlet opp i et annet rør for hver donor. Begge rørene ble sentrifugert i 7 minutter ved 1400 rpm (vedlegg 3), for å få bort eventuelle løse celler og cellerester. Supernatanten ble overført til to nye 15 ml rør og fryst ved -20°C , før prøvene ble fraktet til Ullevål og fryst ved -80°C . Disse supernatantene ble videre brukt til isolering av ekstracellulære vesikler (eksosomer og mikrovesikler, avsnitt 2.9). For hver enkel donor var det to rør, ett behandlet med EPS og ett med kontroll.

2.6 Høsting av muskelceller (modne myotuber)

Alle brønnene i fire dyrkningsbrett ble vasket 1 gang med PBS for å fjerne rester av medium. Det ble tilsatt 0,5 ml NaOH (0,1 M, vedlegg 3) i hver brønn i ett brett med kontroll og ett brett med EPS-behandlede celler, for å lysere cellene. Cellene ble inkubert i NaOH løsningen i 30 minutter før cellelysat fra hvert brett ble samlet opp og overført til to ulike Falcon rør og fryst ved -20°C . Dette lysatet ble benyttet til å måle proteinkonsentrasjon (avsnitt 2.7).

Til alle brønnene i de to resterende brettene ble det tilsatt 150 μl RNeasy Plus lysesbuffer (vedlegg 3). Cellene ble lysert i 15 min på is. Det ble benyttet skraper for å få med mest mulig av væsken. Cellelysatet ble samlet og overført til to ulike Falcon-rør (ett med kontroll og ett med EPS) og fryst ved -20°C . Disse prøvene ble ikke analysert videre i denne oppgaven på grunn av tidsbegrensing.

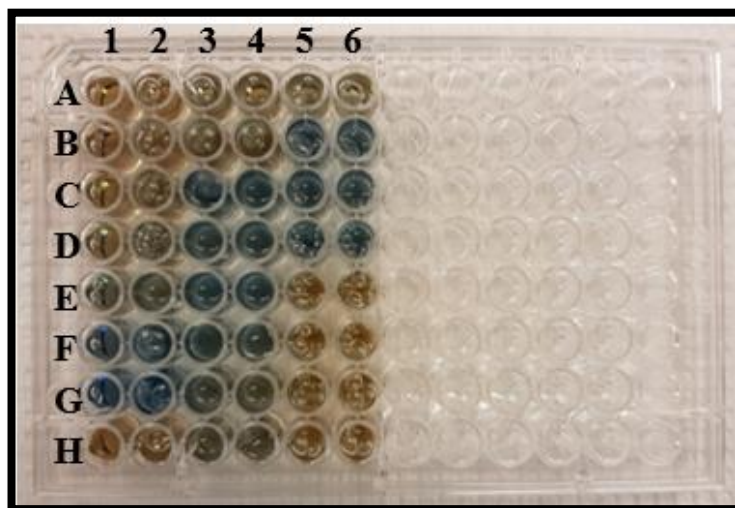
2.7 Måling av proteinkonsentrasjon i cellelysater

Bradfords metode er en metode som måler total proteinkonsentrasjon i en prøve, utviklet av Marion Bradford i 1976 (101). Fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 forandrer farge fra rødbrunt til blått ved binding til protein under sure betingelser. Absorpsjonsmaksimum for prøveløsningen forandrer seg fra 465 nm til 595 nm. Høyere konsentrasjon av protein i prøveløsningen jo sterkere blåfarge. Proteinkonsentrasjonen i cellelysaterne ble målt for å gjenspeile mengde celler fra hver donor som ble behandlet med og uten EPS. Prøvene med ukjent proteinmengde ble sammenlignet med en standardkurve med kjente proteinkonsentrasjoner, for å få et kvantitativt mål på proteinmengde.

Prosedyre

Det ble målt proteinkonsentrasjon i celler lysert med NaOH (avsnitt 2.6). En stokkløsning med bovint serumalbumin (BSA) løst opp i 0,1 M NaOH ble laget. Konsentrasjon på

stokkløsningen var 5 mg/ml. Det ble utarbeidet en standardkurve av denne løsningen på 0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 og 0,3 mg/ml i 0,1 M NaOH. Proteinverdiene i denne standardkurven skulle være dekkende konsentrasjonsområde og gi et estimat for ukjent proteinmengde i cellelysaten. Konsentrert Bio-Rad proteinreagens (vedlegg 4) ble fortynnet i destillert vann i forholdet 1:4, og filtrert gjennom et 0,22 µm-filter for å fjerne partikler. Det ble tilsatt 10 µl av hver standard i to parallelle brønner (kolonne 1 og 2 A-G) og 10 µl av hver prøve ble tilsatt i to parallelle brønner (kolonne 1,2 H og kolonne 3-6 A-H) i et 96 brønners brett med flat bunn (figur 2.4). Det ble tilsatt 200 µl fortynnet Bio-Rad proteinreagens i alle brønnene. Etter et par minutter ble absorbans ved 595 nm målt i et spektrofotometer, Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor™ 3 plateleser (vedlegg 4). Proteinkonsentrasjon for prøvene og standarder ble avlest i en programvare tilkoblet Victor™ 3.



Figur 2.4: Proteinkonsentrasjonsbestemmelse. Kolonne 1 og 2 (A-G); protein-standarder, kolonne 1 og 2 (H) og kolonne 3-6 (A-H); cellelysate fra prøvemateriale. Foto: Mobilkamera Samsung Galaxy 8.

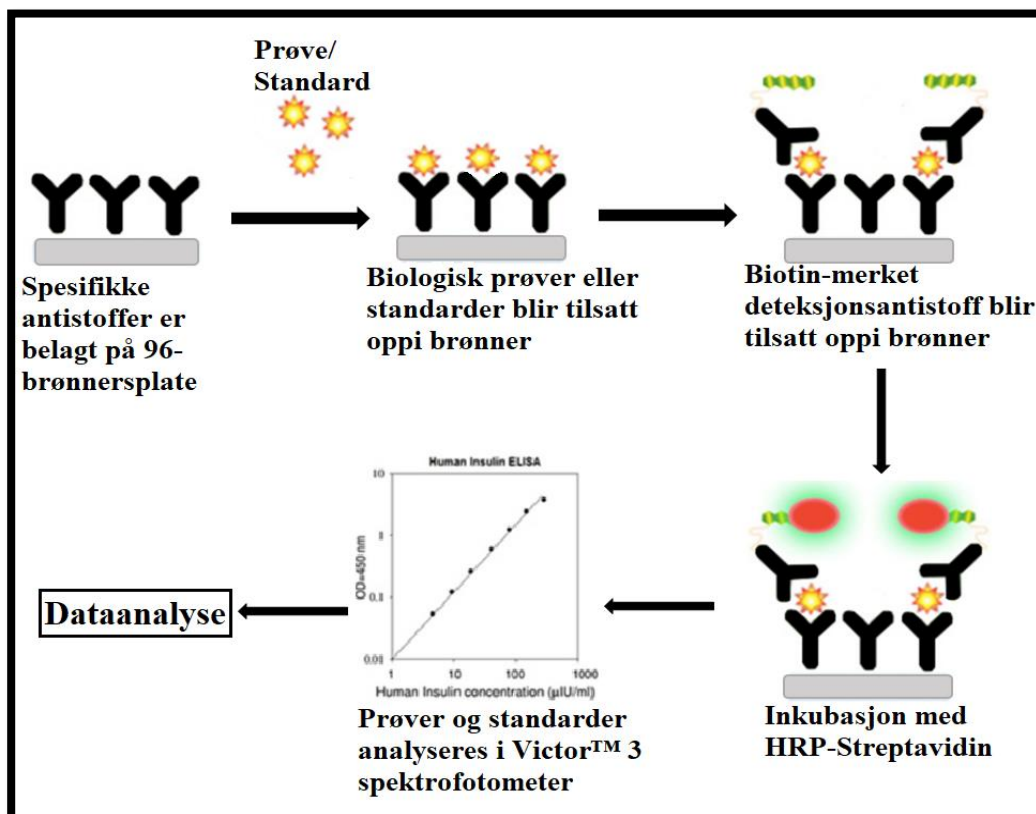
2.8 Analyse av interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) er tidligere brukt som en markør for "trening" i flere studier, siden IL-6-konsentrasjonen er vist å øke ved muskelkontraksjon forårsaket av trening (51). IL-6 ble derfor valgt som en positiv kontroll for vellykket EPS-behandling i skjelettmuskelcellene.

Prosedyre

Frosne cellemedier (M3-medium) fra kontroll og EPS-behandlede celler (avsnitt 2.4) ble tint til romtemperatur. Mengde IL-6 i cellemedier ble målt etter prosedyren som var vedlagt Human IL-6 ELISA kit (Sigma-Aldrich™, se vedlegg 4). Det ble benyttet en 96 brønners-

plate for denne analysen. Standarder ble utarbeidet fra en kjent løsning som var med i kittet (vedlegg 4), og de ble applisert som duplikater i de to første kolonnene i brønnplaten. Deretter ble 100 µl av cellemediumprøvene tilsatt i duplikater. Prøvene ble inkubert over natt på ristepate med svak risting ved 4°C. Dette trinnet ble utført slik at antigenet i cellemediene (IL-6) kunne binde seg til antistoffet som brønnene var belagt med. Cellemediene ble forsiktig sugd av, og brønnene ble vasket 4 ganger med vaskeløsning. Deretter ble 100 µl biotinmerket antistoff tilsatt i hver brønn. Platen ble inkubert ved svak risting på ristepate i 1 time ved romtemperatur. Vasketrinnet ble repetert. Det ble så tilsatt 100 µl streptavidin-løsning til hver brønn (figur 2.5). Platen ble inkubert på ristepate i 45 min med forsiktig risting, og vasketrinnet ble repetert igjen. Videre ble det tilsatt 100 µl TMB (tetrametylbenzidine) One-Step substratreagens til hver brønn. Brønnene ble dekket med aluminiumsfolie og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur ved svak risting. Til slutt ble det tilsatt 50 µl stoppløsning til hver brønn. Brønnplaten ble umiddelbart analysert i Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor™ 3 spektrofotometer (vedlegg 4). Fargeintensiteten ble målt som absorbans ved 450 nm.



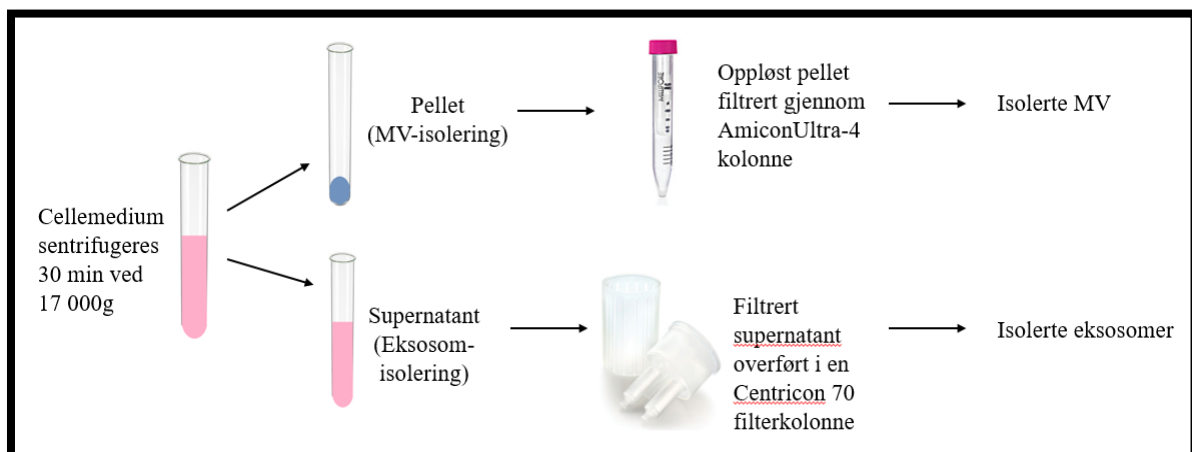
Figur 2.5: Prinsipp for analyse av interleukin-6 (IL-6). Konsentrasjonsbestemmelse i cellemediene fra kontroll og EPS-behandlede celler utført med humant IL-6 ELISA kit (Sigma-Aldrich™). Figur utarbeidet av forfatter.

2.9 Isolering av ekstracellulære vesikler

Det finnes ulike metoder for isolering av ekstracellulære vesikler (EV). Metoden som ble benyttet i denne oppgaven var en kombinasjon av sentrifugering og filtrering gjennom kolonner. Protokollen benyttet for isolering var basert på omtalen fra Konoshenko, MY et al. (96).

Prosedyre

Cellemediene (avsnitt 2.5) ble tint ved 37°C på vannbad, og fordelt i to sorvallrør, ett rør med kontroll og ett rør med medium fra EPS-behandlede celler. Begge rørene ble veid for å ha likevekt og sentrifugert i 30 min, 17 000g ved romtemperatur i en Sorvall RC 5C Plus sentrifuge (vedlegg 5). Denne sentrifugeringen skilte mikrovesikler (MV) og eksosomer fra hverandre (figur 2.6). Mikrovesikler er større og tyngre enn eksosomer, derfor blir de sentrifugert ned i røret (pellet), mens eksosomene forblir i supernatanten.



Figur 2.6: Separering av mikrovesikler (MV) og eksosomer ved sentrifugering. Cellemediene sentrifugeres i sorvallrør. Etter sentrifugeringen blir pelleten og supernatanten overført til hvert sitt rør, for videre isolering. Figur utarbeidet av forfatter.

2.9.1 Mikrovesikkelisolering

Etter første sentrifugering (figur 2.6) ble 1 ml av supernatanten igjen i sorvallrøret, og brukt til å løse opp pelleten til mikrovesikkel (MV)-isolering. Resuspendert pellet ble overført til 4 ml Amicon®Ultra-4 filter (100 kDa) Kit (Merck Millipore Ltd, vedlegg 5). Partikler mindre enn 100 kDa ble ikke fanget opp i filteret, det vil si AmiconUltra-4 sentrifugalkolonnen bandt mikrovesikler. Kolonnen ble sentrifugert i 10 min, 4000g ved romtemperatur i en Hettich® ROTINA 420R sentrifuge (vedlegg 5), vasket 1 gang med PBS og sentrifugert i 10 minutter, 4000g ved romtemperatur. Mikrovesiklene som var samlet i filteret, ble ved hjelp av en

pipette overført til et nytt eppendorfrør. For å få med alle mikrovesikler ble filteret skylt med 70 µl PBS langs veggene, og væsken overført til eppendorfrør. Totalvolum for oppsamlet mikrovesikler og PBS var 70 µl, hvorav 22 µl ble fordelt i tre eppendorfrør og fryst ved -80°C til videre forsøk.

2.9.2 Eksosomisolering

Supernatanten etter første sentrifugering (figur 2.6) ble overført til et 50 ml Falcon-rør til eksosomisolering. Supernatanten ble filtrert gjennom et 0,22 µm-filter (vedlegg 5) rett over i en Centricon® Plus-70 filterkolonne med 100 kDa Kit (Merck Millipore Ltd., vedlegg 5) ved hjelp av en sprøyte. Partikler mindre enn 100 kDa ble ikke fanget opp i filteret. Kolonnen ble sentrifugert i 15 min, 3500g ved RT i en Hettich® ROTINA 420R sentrifuge (vedlegg 5). Eksosomene ble samlet opp i filteret. Kolonnen ble vasket 1 gang med PBS og sentrifugert i 10 min, 3500g ved RT. Deretter ble kolonnen plassert opp ned i oppsamlingsrøret og sentrifugert i 2 min, 1000g ved RT. Dette kalles en «revers spinn», hvor eksosomene samlet seg i bunnen av oppsamlingsrøret. Totalvolumet av oppsamlede eksosomer var 180 µl, hvorav 22 µl ble fordelt i åtte eppendorfrør og fryst ved -80°C til videre forsøk.

2.10 Karakterisering av ekstracellulære vesikler

For å verifisere at det var ekstracellulære vesikler (EV) som ble isolert fra differensierte humane myotuber, ble ulike metoder benyttet for å karakterisere EV (95). I denne oppgaven ble det bestemt å benytte Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), flowcytometri, proteomikk, kvantitativ revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR) og transmisjon elektronmikroskopi (TEM).

2.10.1 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) er en karakteriseringsteknikk som kombinerer både laserlyssprednings-mikroskopi og Brownske bevegelse til å beregne størrelsesfordeling og konsentrasjon av partikler i en flytende væskestrøm. NTA ble utført på et NanoSight NS500 instrument (Malvern Instruments, vedlegg 6), som gir anledning til karakterisering av partikler fra 10-2000 nm. Prøven suges inn i instrumentet hvor partiklene registreres når de sprer laserlys de blir utsatt for, samtidig som deres Brownske bevegelser i væskeløsning følges (102).

Prosedyre

NanoSight NS500 instrumentet var utstyrt med en 488 nm laser, et følsomt «scalable complementary metal-oxide semiconductor» (sCMOS) kamera og en injeksjonspumpe. Kameranivået (synliggjøring av partikler i lysnivå) ble innstilt til 14, på en skala fra 12 til 15. Deteksjonsgrense (grense for å detektere partikler) ble satt til 3, på en skala fra 1 til 5. Innstillingene var like for alle prøvene som ble analysert. Instrumentet var koblet til en PC med NTA-programvare (versjon 3.2) som målte partikkelkonsentrasjon (antall partikler/ ml) i prøven, og regnet ut gjennomsnitt partikkelstørrelse (nanometer) av alle partiklene som var tilstede i prøven.

Før analysering av prøvene ble NanoSight SN500 instrumentet kalibrert, ved bruk av Polystyrene Latex Microspheres 100 nm kuler (vedlegg 6). Det ble tatt et videoopptak á 60 sekunder for å innstille fokus, slik at alle partikler ble best mulig synlige.

Isolerte eksosomer og mikrovesikler ble tint og fortynnet 1:100 med filtrert PBS (0,02 μm , se vedlegg 6) for å oppnå en optimal konsentrasjon i området 1-10 $\times 10^8$ partikler/ml.

Prøveblandingen ble overført til en 1 ml sprøyte som ble koblet til injeksjonspumpa via et tynt rør. Det ble tatt 3 videoopptak á 60 sekunder per prøve med en injeksjonspumpehastighet på 20 (figur 2.7). Videoene ble analysert med NTA-programvare (versjon 3.2).

Analyseresultatene for konsentrasjon (partikler/ml) og størrelse av partiklene ble utregnet som gjennomsnitt av tre videoopptak.



Figur 2.7: NanoSight NS500 instrumentet er koblet til en injeksjonspumpe med prøveløsning og videre koblet til en PC med NTA-programvare (versjon 3.2). Foto: Mobilkamera Samsung Galaxy 8.

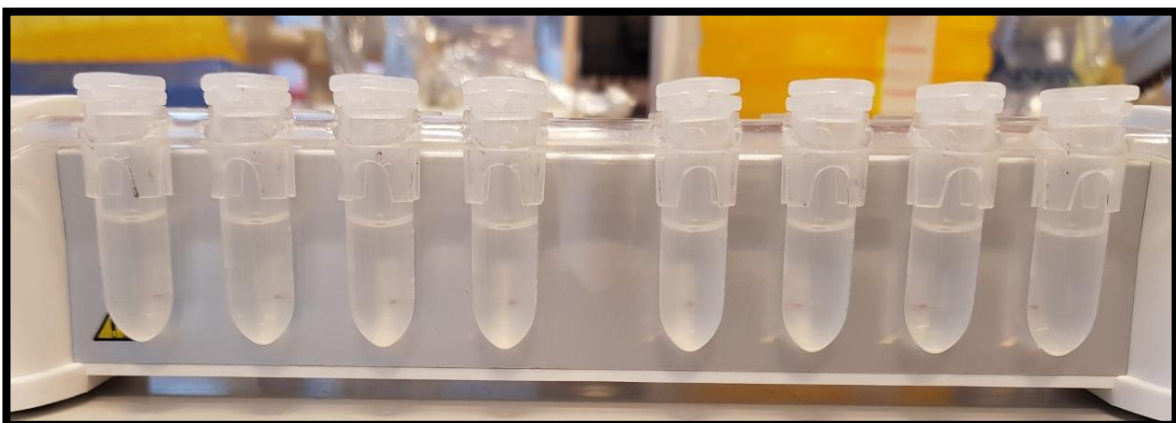
2.10.2 Flowcytometri

Flowcytometri er en teknologi som kan anvendes til å analysere ekstracellulære vesikler (EV) i biologiske væsker. I denne analysen føres celler eller partikler i en væskestrøm én og én forbi en laserstråle. Da EV er i nano-størrelse, er de vanskelige å detektere ved bruk av de fleste flowcytometre (98). Denne utfordringen kan løses ved å binde opp ekstracellulære vesikler til antistoff-konjugerte magnetiske kuler. Fordi flere EV er bundet til kulen øker signalet og muliggjør analysering. Flowcytometri gir et semi-kvantitativt mål for EV i prøvene (103). EV som ble karakterisert i denne studien var en CD81-positiv subpopulasjon som videre ble merket med enten PE-konjugert anti-CD81, anti CD9 eller anti-CD63 antistoff og analysert ved hjelp av et BD Accuri C6 flowcytometer (Accuri Cytometers, vedlegg 7).

Prosedyre

Assaybuffer (0,1% BSA-løsning i PBS) som ble laget og filtrert gjennom et 0,1 μm filter, og brukt som vaskebuffer gjennom prosedyren. For å få et prøvemateriale på 100 μl ble 30 μl isolert EV (avsnitt 2.9) blandet med 70 μl assaybuffer i et 1,5 ml eppendorfrør, heretter kalt EV-løsning.

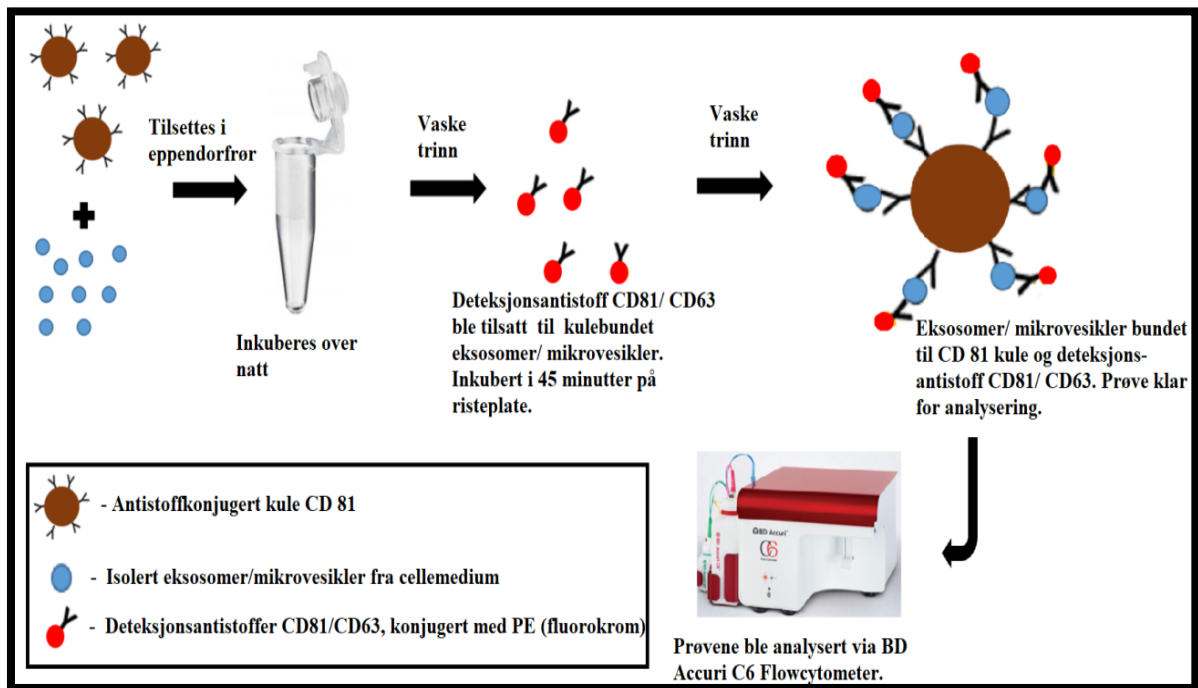
For å vaske kulene før tilsetning av EV-løsning ble 1000 μl assaybuffer tilsatt i hvert eppendorfrør sammen med 20 μl eksosom-humant anti-CD81 flow-deteksjonskuler (Life Technologies AS, vedlegg 7) for å vaske kulene. Eppendorfrørene ble blandet på vortex-mikser i 2-3 sekunder og satt på en magnetplatem, DynaMag 2 (vedlegg 7), i noen minutter slik at kulene kunne feste seg mot magneten (figur 2.8). Assaybuffer-løsningen ble pipettert av forsiktig, og rørene fjernet fra magnetplaten.



Figur 2.8: Magnetplate med CD81 flow-deteksjonskuler i eppendorfrør. Eksosom- humant anti-CD81 flow-deteksjonskuler ble vasket med assaybuffer. Kuler festet mot magnetplaten ses som brune prikkene i rørene. Foto: Forfatter, 2019.

Det ble tilsatt 100 µl EV-løsning i hvert eppendorfrør med kuler. Kulene ble resuspendert ved å blande opp og ned med pipetten. En positiv kontroll (SW480) og en negativ kontroll (assaybuffer) ble inkludert og preparert parallelt på samme måte. Alle rørene ble plassert i en HulaMixer (roterende blander) og inkubert ved 4 °C over natten. EV med CD81 på overflaten ble bundet til anti-CD81 merkede kuler. Rør med kulebundet EV-løsning ble sentrifugert i 2-3 sekunder, tilsatt vaskeløsning og plassert på en magnetplate og deretter vasket tre ganger med 300 µl assaybuffer.

I et nytt sett med rør som var dekket med aluminiumsfolie ble det tilsatt 20 µl PE (phycoerythrin, organisk fluorokrom) konjugert til mus anti-humant CD81 antistoff (vedlegg 7). I disse rørene ble det tilsatt 100 µl kulebundet EV-løsning fra hver donor. I tillegg ble det inkludert en kontroll for å avdekke uspesifikk farging som inneholdt 100 µl prøvematerialet og 20 µl PE-mus IgG ISO-typekontroll i ett rør. Alle rørene ble inkubert i 45 minutter ved romtemperatur på en ristepate instrument (vedlegg 7). Prøvene ble vasket to ganger med 300 µl assaybuffer. Etter vasking ble det tilsatt 200 µl assaybuffer i hvert eppendorfrør. Prøvene ble blandet på vorteksmikser i 2-3 sekunder før de videre ble analysert på BD Accuri C6 flowcytometer med CFlow Plus- programvare (figur 2.9). Programmet ble innstilt til å måle totalt 3000 kuler. Etter prøvekjøringen ble et spesifikt området avgrenset ("gated"), og median-verdiene av fluorescenceintensitet (FI) notert (MFI) for hver prøve. Samme CD81-positiv EV-subpopulasjon ble i tillegg detektert med enten PE-konjugert anti-human CD63 antistoff eller til anti-human CD9 antistoff (vedlegg 7) på tilsvarende måte som mus anti-humant CD81 antistoff.



Figur 2.9: Prinsipp for analyse av ekstracellulære vesikler (EV) med flowcytometri. Analyse av overflatemarkørene CD81 og CD63 på EV. Magnetiske kuler med anti-CD81-antistoffer ble blandet med EV, kulebundet EV ble tilsatt deteksjonsantistoffer (anti-CD81 eller anti-CD63) og analysert på et BD Accuri C6 Flowcytometer. Figuren er utarbeidet av forfatter.

2.10.3 Proteinmåling i ekstracellulære vesikler

Konsentrasjon av nukleinsyrer eller proteiner i en prøve kan måles ved å benytte fluorescerende fargestoffer. Metoden bruker et spektrofotometer til å måle fluorescens. Grunnlaget for hver QubitTM-analyse er at fargestoff sender bare fluorescerende signaler når det er bundet til bestemte målmolekyler, selv når molekylene er tilstede i lave konsentrasjoner (104).

Prosedyre

Analysen ble utført ved bruk av QubitTM Protein Assay kit (Invitrogen by Life Technologies Corporation, vedlegg 8) og analysert via Qubit[®] 2.0 Fluorometer. Prosedyreprotokollen som var vedlagt kittet ble fulgt trinn for trinn. Fluorescerende fargestoffreagens fra kittet ble fortynnet i QubitTM proteinbuffer i forholdet 1:200, og blandet godt i et 50 ml Falcon-rør, kalt arbeidsløsning. Kittet inneholdt tre standarder med kjent proteinkonsentrasjon på 0 ng/μl, 200 ng/μl og 400 ng/μl. I tre ulike eppendorfrør ble 10 μl standardløsning blandet med 190 μl arbeidsløsning. I et nytt eppendorfrør ble det tilsatt 5 μl isolert EV-løsning (avsnitt 2.9) og 195 μl arbeidsløsning. Alle løsningene ble blandet i 2-3 sekunder på vorteksmikser, før de ble

dekket med aluminiumsfolie for å beskyttes mot lys og inkubert i 15 minutter ved romtemperatur. Alle tre standardløsninger ble analysert for å danne en standardkurve, deretter ble prøvene analysert på Qubit[®] 2.0 Fluorometer (vedlegg 8).

2.10.4 Proteomikk

Proteomikk-analyse er en metode hvor et stort antall proteiner i en prøve studeres samtidig. Proteiner i ekstracellulære vesikler utskilt fra ulike celletyper, biologiske væsker og i cellemedium kan identifiseres og kvantifiseres via proteomikk-analyse (105). I denne oppgaven ble væskestrøms kromatografi-massespektrometri (LC-MS-MS) benyttet, ved Kjernefasiliteten for proteomikk ved Oslo Universitetssykehus (OUS), Rikshospitalet. De har spesialkompetanse på proteomikk.

Prosedyre

Isolerte EV (avsnitt 2.9) ble sendt til analysering. Det ble i utgangspunktet bestemt å benytte mengde EV målt utifra lik proteinmengde (20 µg) fra hver donor for analysering. På grunn av lite materiale ble proteinmengden for eksosomer redusert til 10 µg, og proteinmengde for mikrovesikler til 6 µg. I tillegg var det for lite materiale til å utføre analysen på alle prøvene, derfor ble det sendt eksosomprøver fra alle seks donorene og mikrovesikler fra kun tre donorer.

Rådatasettet fra LC-MS-MS ble lagt inn i MaxQuant programvare versjon 1.6.2.10 for kvantitativ analyse av proteinene tilstede. I denne analysen ble ikke prøvene merket med antistoffer/prober. Det ble benyttet merkingsfri kvantifisering (LFQ =Label free quantification). Datasett analysert med MaxQuant gir både normaliserte intensiteter (LFQ) og ikke-normaliserte intensiteter. Normaliserte data gir mer nøyaktig kvantifisering mellom prøvene og er det foretrukne alternativet, og ble derfor valgt i denne oppgaven. I tillegg til kvantifisering utfører den proteinidentifikasjon. For statistisk analyse av MaxQuant-datasett ble Perseus programvare brukt. Biologiske funksjoner til noen av de signifikant forskjellig uttrykte proteiner i begge gruppene ble studert via proteinidentifikasjonsdatabase Universal Protein Resource (Uniprot).

2.10.5 Kvantitativ revers transkriptase polymerase kjedereaksjon

Kvantitativ revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR) er en metode for å måle RNA-nivå. I denne oppgaven ble RT-qPCR brukt for å studere om det var forskjell i miRNA-mengde i eksosomer fra celler med og uten elektrisk pulsstimulering (EPS). Analysen bestod av flere hovedtrinn: isolering av total-RNA, cDNA syntese fra modne miRNA og til slutt kvantitativ måling av miRNA-mengde via sanntids (real-time) qPCR. Det ble kun benyttet eksosomer i denne analysen, siden det ikke var nok materiale fra mikrovesikler.

2.10.5.1 Isolering av total-RNA fra eksosomer

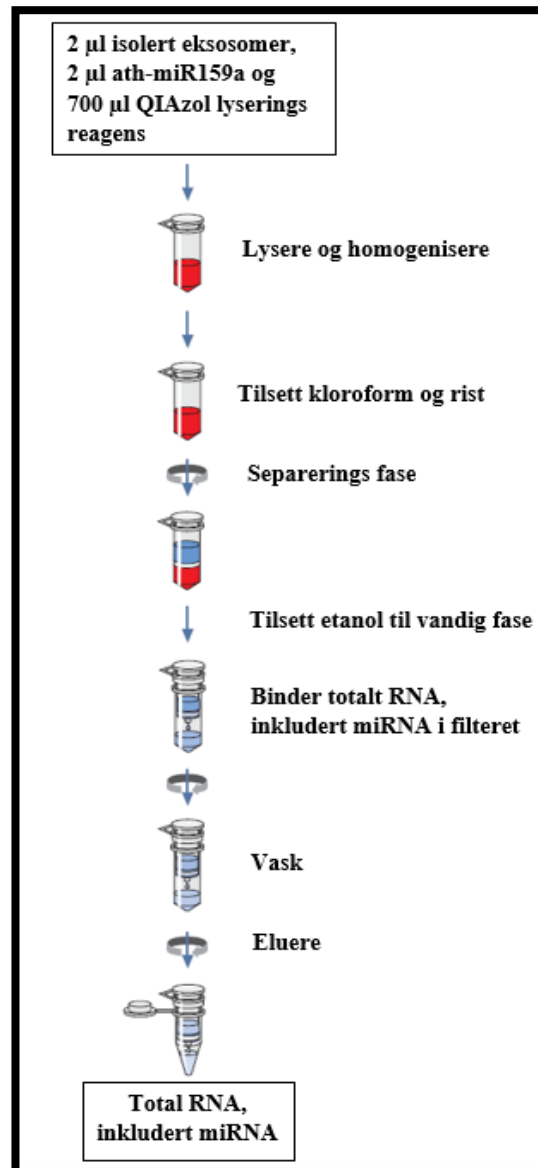
Interessen for studier av miRNA-nivået i eksosomer har økt i de siste årene. Det finnes en rekke metoder på markedet som er designet for isolering av miRNA fra små mengder kroppsvæsker, dyrkede celler og vev. miRNeasy Mikro kit kombinerer fenol/guanidin-basert lysing av prøven og silikamembranbasert rensing av total-RNA som også inneholder miRNA (106). Total-RNA ble isolert fra eksosomer.

Prosedyre

Det ble benyttet miRNeasy Mikro kit (QIAGEN, se vedlegg 9) til isolering av total-RNA. Denne analysen ble utført i avtrekkskap og prosedyreprotokollen som var vedlagt ble fulgt trinn for trinn (figur 2.10).

Isolerte eksosomer (avsnitt 2.9.2) oppbevart ved -80°C ble tint, 2 μl av eksosomer ble overført til et eppendorfrør med 700 μl QIAzol (fenol og guanidin tiocyanat) lyseringsreagens og tilsatt 2 μl ath-miR159a (eksogent referansegen). Prøveløsningen ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Det ble tilsatt 140 μl kloroform i eppendorfrørene, røret ristet kraftig i 15 sekunder, inkubert i 2-3 minutter ved romtemperatur og sentrifugert i 15 minutter ved 12 000g ved 4°C i en Eppendorf Sentrifuge 5430 R (vedlegg 9). Prøveløsningen ble skilt i tre lag; klar løsning øverst, hvitt i midten og rosa løsning på bunnen. Den øvre, klare væsken inneholdt RNA og ble overført til et nytt eppendorfrør, 525 μl 100% etanol ble tilsatt og blandet godt. Løsningen ble overført til RNeasy MinElute spinnkolonne og sentrifugert ved 10 000g i 15 sekunder ved romtemperatur (21°C). Eluatet ble kastet, og trinnet ble gjentatt med gjenstående væske. Det ble tilsatt 700 μl Buffer RWT til RNeasy MinElute spinnkolonne og sentrifugert ved 10 000g i 15 sekunder ved romtemperatur. Deretter ble 500 μl Buffer RPE overført til spinnkolonnen og sentrifugert ved 10 000g i 15 sekunder ved romtemperatur. Så

ble 500 μ l 80 % etanol tilsatt til kolonnen og sentrifugert ved 10 000 g i 2 minutter ved romtemperatur. For å tørke membranen ble RNeasy MinElute spinnkolonne plassert i nye oppsamlingsrør med åpent lokk og sentrifugert ved 13 000g i 5 minutter ved romtemperatur. Til slutt ble spinnkolonnen overført til et nytt eppendorfrør, tilsatt 14 μ l nukleasefritt vann og RNA ble eluert fra kolonnen etter sentrifugering ved 13 000g i 1 minutt ved romtemperatur. Eluatet inneholdt total-RNA fra eksosomer. Isolert RNA ble fryst ved -80°C og brukt videre til cDNA-syntese.



Figur 2.10: Prosedyre for isolering av total-RNA fra isolerte eksosomer. Modifisert fra (106).

2.10.5.2 cDNA-syntese fra mikroRNA

For å omdanne miRNA til kopi DNA (cDNA) ble TaqMan[®] Advances miRNA Kit fra Thermo Fisher Scientific (vedlegg 10) benyttet. Syntesen ble utført i fire trinn (figur 2.11): Første trinn var å modifisere modent miRNA ved å syntetisere poly(A)-hale i 3' ende ved bruk av poly(A)-polymerase. Deretter ble miRNA forlenget ved 5'enden med liggering av adapter. Adapteren fungerte som et bindingssete for forward-primer. Alle modifiserte miRNA som var tilstede gjennomgikk en universal revers transkripsjon (RT) etterfulgt av en amplifisering for å øke mengden cDNA (mir-Amp). Utvalgte cDNA ble deretter brukt som templat for spesifikk q-PCR, ved bruk av sekvensspesifikke miR-primere og -prober (107).

Prosedyre

Syntese av poly(A)-hale

RNA-prøver (avsnitt 2.10.5.1) ble tint, blandet på vorteksmikser og sentrifugert i 2-3 sekunder før de ble plassert på is. I et 1,5 ml sentrifugerør ble reaksjonsmiks for poly(A)hale-syntesen (vedlegg 11) laget for alle prøvene. Miksen ble blandet på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder. I hvert rør ble det tilsatt 3 µl reaksjonsmiks og 2 µl isolert total-RNA prøveløsning. Sentrifugerørene ble ristet på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder før prøvene ble plassert i en Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (PCR maskin, se vedlegg 10) og innstilt med følgende betingelser:

Steg	Temperatur	Tid
Polyadenylering	37 °C	45 minutter
Stoppreaksjon	65 °C	10 minutter
Oppbevare	4 °C	∞

Ligering av adapter

I et 1,5 ml sentrifugerør ble reaksjonsmiks for liggering av adapter (vedlegg 11) laget, deretter mikset godt på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder. Det ble overført 10 µl reaksjonsmiks for liggering av adapter til hvert rør med poly(A)-hale-reaksjonsprodukt. Rørene ble lukket godt, ristet på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder før prøvene ble plassert i en Veriti[®] PCR instrument og innstilt med følgende betingelser:

Steg	Temperatur	Tid
Ligering	16 °C	60 minutter
Oppbevare	4 °C	∞

Revers transkripsjons(RT)-reaksjon

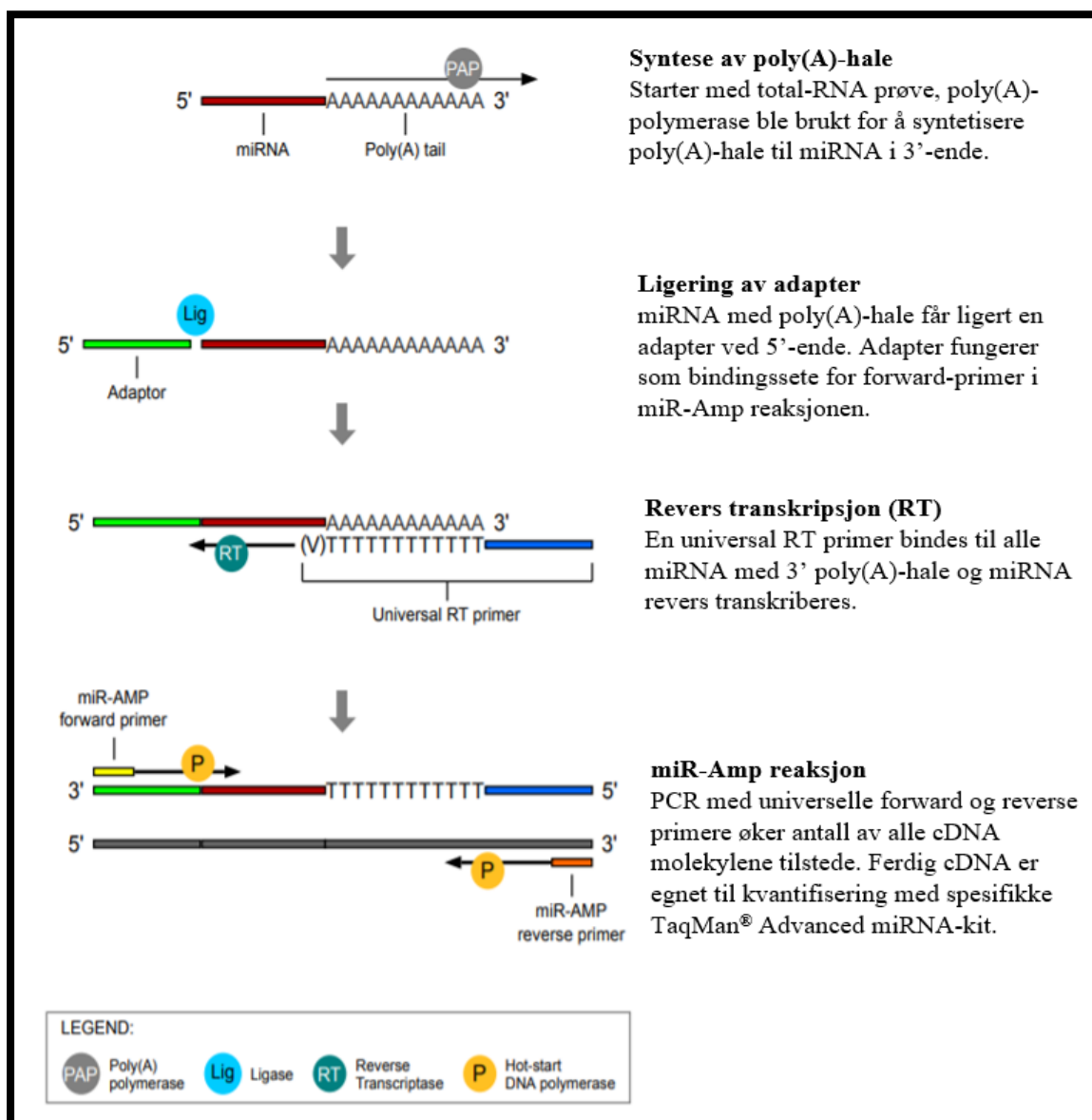
Det ble laget reaksjonsmiks for revers transkripsjon (RT) (vedlegg 11) i et 1,5 ml sentrifugerør, mikset godt på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder. Det ble tilsatt 15 µl reaksjonsmiks i alle rørene med adapterligeringsprodukt. Rørene ble lukket godt, ristet på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder før prøvene ble plassert i PCR-instrument og innstilt med følgende betingelser:

Steg	Temperatur	Tid
Revers transkripsjon (RT)	42 °C	15 minutter
Stoppreaksjon	85°C	5 minutter
Oppbevare	4 °C	∞

miR-Amplifisering

Den siste reaksjonsmiksen for miR-Amp (vedlegg 11) ble laget i et 1,5 ml sentrifugerør, mikset godt på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder. Det ble tilsatt 45 µl miR-Amp-reaksjonsmiks til nye rør og blandet med 5 µl RT-reaksjonsprodukt. Rørene ble lukket godt, ristet på vorteksmikser og sentrifugert i et par sekunder før prøvene ble plassert i PCR-instrument med følgende betingelser:

Steg	Temperatur	Tid	Syklus
Enzymaktivering	95 °C	5 minutter	1
Denaturering	95 °C	3 sekunder	14
Annealing	60 °C	30 sekunder	
Stoppreaksjon	99 °C	10 minutter	1
Oppbevare	4 °C	∞	1



Figur 2.11: Prosedyre for cDNA-syntese fra mikroRNA. Modifisert fra (107).

2.10.5.3 Kvantitativ sanntids(real-time)-PCR

Muskelspesifikke myomiR'er, som miR-1-3p, miR-133a-3p og miR-206 ble studert i alle prøver. I tillegg ble en ikke-muskelspesifikk miR-223 studert i noen utvalgte donorer for å avdekke om den var tilstede i muskelceller. Gensekvensen for alle miRNA er oppgitt i vedlegg 11.

En kjent mengde eksogent, syntetisk ath miR-159a (internkontroll, kalt "spike in") ble tilsatt til hver prøve og var med i alle trinn fra og med total-RNA-isolering (avsnitt 2.10.5.1), cDNA-syntese og sanntids(real-time)-qPCR-analyse. Denne miR'en ble brukt som en prosesskontroll og til å kompensere for mulige ulikheter mellom prøvene under isoleringen.

Prosedyre

Røret med miR-Amp-produkt ble blandet på vorteksmikser, sentrifugert for å samle opp all væske i bunnen før det ble plassert på is. Deretter ble miR-Amp-produkt fortynnet med TE (Tris-EDTA) buffer i forhold 1:10. Fem spesifikke PCR-reaksjonsmikser for de valgte miRNA (vedlegg 11) ble utarbeidet i forskjellige 1,5 ml sentrifugerør, blandet godt på vorteksmikser og sentrifugert for å eliminere luftbobler. PCR-reaksjonsmikserne inneholdt forskjellige revers primere og prober, avhengig av hvilket miRNA som skulle analyseres. Forward primer var lik for alle reaksjonsmikser siden adapteren fungerte som bindingssete for forward-primer. Det ble overført 15 µl PCR-reaksjonsmikser og 5 µl fortynnet cDNA-templat i hver brønn i en 96 brønns PCR-reaksjonsplate. Det ble analysert duplikater for hvert miRNA. Platen ble forseglet og sentrifugert for å spinne ned prøveløsningen før den ble analysert i en ViiA™ 7- Real-Time PCR-maskin, innstilt med følgende betingelser:

Steg	Temperatur	Tid	Syklus
Enzymaktiverting	95 °C	20 sekunder	1
Denaturering	95 °C	1 sekund	40
Annealing	60°C	20 sekunder	

2.10.5.4 Kvantitativ PCR (qPCR)

Mengde mikroRNA tilstede i prøvene etter avsluttet PCR-analyse ble avlest som "Crossing point" (Ct) som representerte resultatet for hver enkelt prøve. Ct betegnes som en deteksjonsgrense hvor fluorescensen overskred bakgrunn/støy og ga en målbar forskjell. Det ble totalt amplifisert 40 sykler. Jo lavere Ct desto høyere mikroRNA-nivå i utgangsløsningen. miRNA-mengden i kontrollceller og EPS-behandlede celler ble sammenlignet. Et dataprogram var koblet til q-PCR-maskinen og beregnet relative verdier (Δ -verdier) mellom de utvalgte miR'ene og referanse-miR. Δ Ct ble regnet ut ved å trekke ath-miR-159a fra prøven, for å normalisere hvert prøveresultat. $\Delta\Delta$ Ct ble utregnet ved å trekke kontrollceller fra EPS-behandlede celler for hver donor og tilsvarende for gjennomsnittet av alle donorer ble regnet. Til slutt ble relativ kvantitet (RQ-verdi) regnet ut for ulike miR'er med formelen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ for hver enkelt donor og tilsvarende for gjennomsnittet mellom EPS-behandlede celler og kontrollceller.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{prøve}} - Ct_{\text{"spike in"}}$$

$$\Delta\Delta Ct \text{ (individuell for hver donor)} = Ct_{\text{EPS}} - Ct_{\text{Kontroll}}$$

$$\Delta\Delta Ct \text{ (gruppe)} = Ct_{\text{gjennomsnitt EPS}} - Ct_{\text{gjennomsnitt kontroll}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.10.6 Transmisjon elektronmikroskop (TEM)

Transmisjon elektronmikroskop er en metode for å se på morfologien til EV. TEM er det mest brukte instrumentet for å undersøke kvaliteten og renheten til EV-holdige prøver, fordi TEM kan skille enkelte EV fra ikke-EV-partikler av lik størrelse (108).

Prosedyre

Isolerte mikrovesikler og eksosomer (avsnitt 2.9) fra en representativdonor ble sendt til Kjernefasilitet for avansert elektronmikroskopi ved OUS, Radiumhospitalet for å se på morfologien til vesiklene.

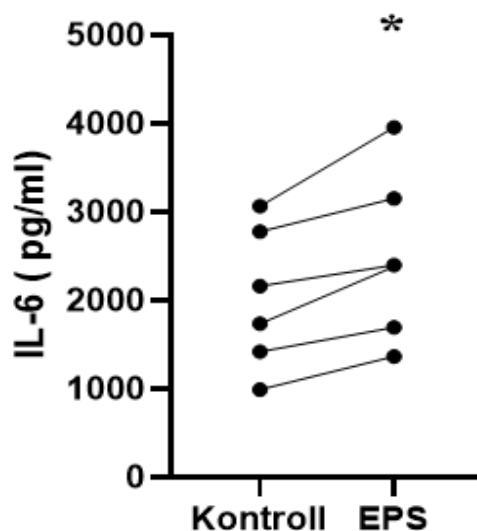
2.11 Statistikk

I dette prosjektet ble det benyttet parvise data, da celler fra hver enkelt celledonor ble brukt som sin egen kontroll. Utvalget i denne studien var celler fra 6 ulike muskelbiopsigivere (n=6). Students paret t-test (parsammenligningstest) ble brukt siden dataene var normalfordelte. Signifikansnivået ble satt til $\alpha=0,05$, og $p<0,05$ ble ansett som statistisk signifikant, i vurdering av om det var forskjell på EV fra celler med og uten EPS-behandling. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik (SD) dersom ikke annet er oppgitt. Den statistiske analysen ble utført på GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Perseus programvare versjon 1.6.1.3 ble benyttet til statistisk analyse av proteomikk-resultater.

3 Resultater

3.1 IL-6-konsentrasjon i cellemedier fra myotuber

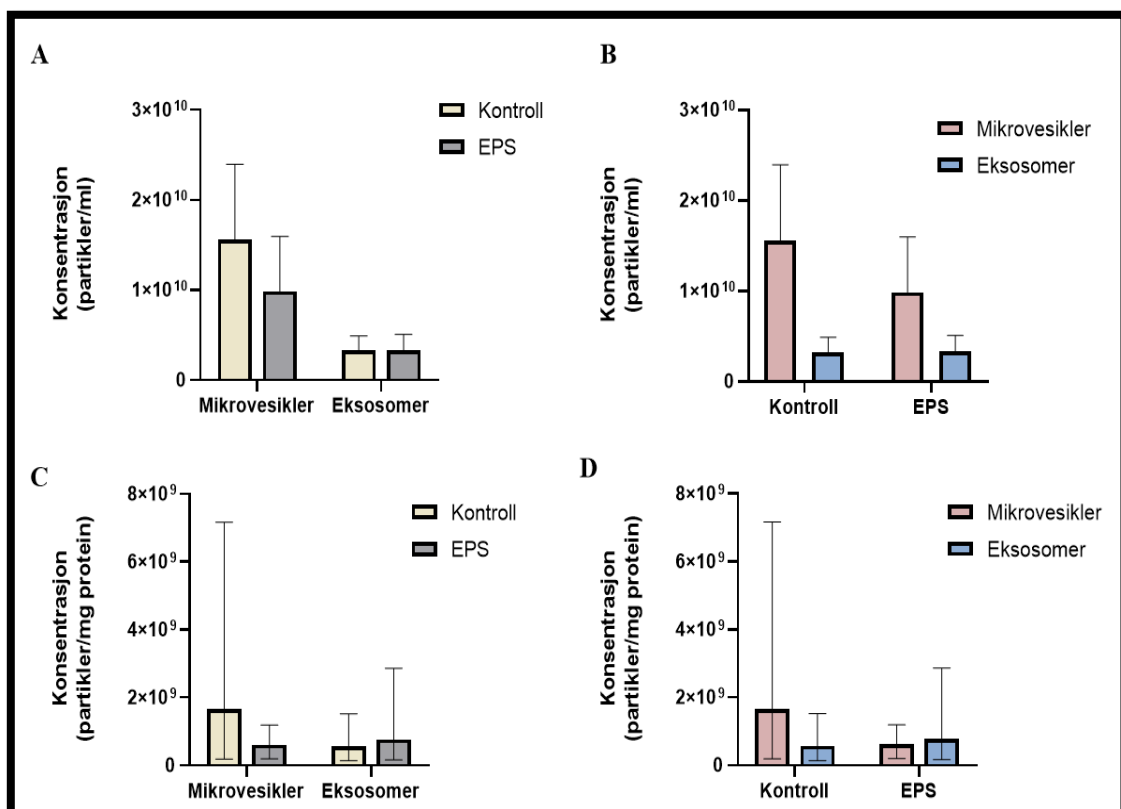
Interleukin-6 (IL-6) er vist å bli produsert og utskilt fra muskelceller ved kontraksjon (55), og kan derfor brukes som positiv kontroll for elektrisk pulsstimulering. IL-6-konsentrasjonen ble målt i cellemediene fra humane skjelettmuskelceller fra ustimulerte kontrollceller og elektrisk puls-stimulerte (EPS-behandlede) celler (avsnitt 2.5) ved hjelp av en ELISA-metode. For å beregne og sammenligne myokinkonsentrasjonene, ble gjennomsnittet av duplikate målinger av hver cellemediumprøve fra hver enkelt donor benyttet. En cellemediumprøve bestod av medium fra to dyrkningsbrett, hvert med 12 cellebrønner. Figur 3.1 viser IL-6-konsentrasjonen med og uten 24 timers behandling med EPS. Konsentrasjon av IL-6 var 23 % (± 3 %) høyere i mediene fra celler behandlet med EPS (stimulert) sammenlignet med cellemedier fra kontrollen (ustimulert). Det var en statistisk signifikant forskjell mellom kontroll og EPS, $p=0,0063$.



Figur 3.1: IL-6-konsentrasjon i cellemedier fra kontroll (ustimulert) og EPS-behandlede celler målt med ELISA-Kit (Sigma-Aldrich™). Konsentrasjonen av IL-6 ble målt i cellemediene etter 24 timers EPS-behandling. Hvert punkt representerer gjennomsnittskonsentrasjon av duplikate målinger i medium slått sammen fra 12 cellebrønner for hver enkelt donor. * Statistisk signifikant forskjellig fra kontroll (ustimulert celler), $p=0,0063$ (Students paret t-test). EPS= Elektrisk pulsstimulering, IL-6 = interleukin-6.

3.2 Konsentrasjon av ekstracellulære vesikler

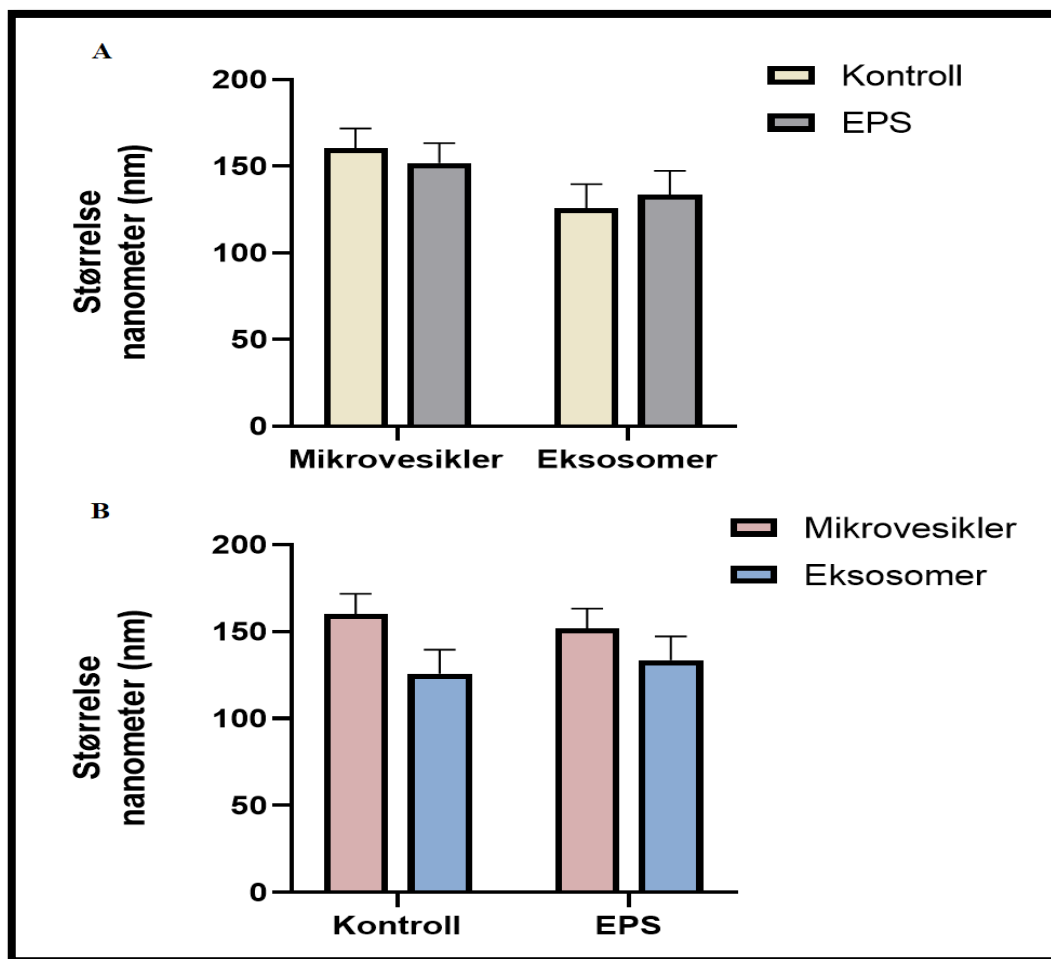
Konsentrasjon av mikrovesikler og eksosomer som ble utskilt fra myotuber ble målt med Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (figur 3.2 A, B). Konsentrasjonen (partikler/ml) for alle prøvene ble målt som gjennomsnitt av 3 videoopptak á 60 sekunder. Serumfritt M3 som ikke var i kontakt med celler ble isolert på samme måte som EV og ble brukt som kontroll i denne analysen. Serumfritt M3-konsentrasjon for MV var $1,60 \cdot 10^9$ og eksosomer $1,62 \cdot 10^9$. For å få et estimat på hvor mange ekstracellulære vesikler som totalt ble dannet i forhold til antall celler tilstede ved dyrkningsslutt, ble proteinkonsentrasjonen i totalt cellelysat målt med Bradford-metoden (avsnitt 2.7) (data fra proteinkonsentrasjonsmåling, vedlegg 12). MV- og eksosomkonsentrasjon fra NTA ble deretter relatert til mengde celler tilstede i dyrkningsbrettet ut ifra partikler per milligram celleprotein (figur 3.2.C, D). Det var ingen signifikant effekt av EPS på konsentrasjonen av verken MV eller eksosomer (Fig. 3.2 A, C). Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom MV- og eksosomkonsentrasjon verken i kontrollceller eller i EPS-behandlede celler (Fig. 3.2 B, D).



Figur 3.2: Konsentrasjon av ekstracellulære vesikler (mikrovesikler og eksosomer) i cellemedium fra kontroll- og EPS-behandlede celler. Humane myotuber ble behandlet med EPS i 24 timer før EV ble oppsamlet i serumfritt medium i 24 timer. A-B: Effekt av EPS på mikrovesikkel- og eksosomkonsentrasjon i cellemedier (partikler/ml medium). C-D: Effekt av EPS på mikrovesikkel- og eksosomkonsentrasjon i cellemedier relatert til totalmengde celleprotein (mg). Dataene for A og B er presentert med gjennomsnitt ± standardavvik og dataene for C og D er presentert som gjennomsnitt med maksimums- og minimumsverdi. n=6 i hver gruppe. EPS=elektrisk pulsstimulering.

3.3 Størrelse av ekstracellulære vesikler

Størrelsen av mikrovesikler og eksosomer ble målt med NTA. Resultatene ble beregnet som gjennomsnitt av tre analyser. Det var ingen signifikant forskjell i størrelse mellom EV fra kontroll- og EPS-behandlede celler (figur 3.3.A og B), verken for mikrovesikler (fig. 3.3.A) eller eksosomer (fig. 3.3.A). I cellemediene fra både kontroll- og EPS-behandlede celler ble det observert en tendens til at mikrovesiklene var større enn eksosomer (fig. 3.3.B), noe som samsvarer med litteraturen (74).



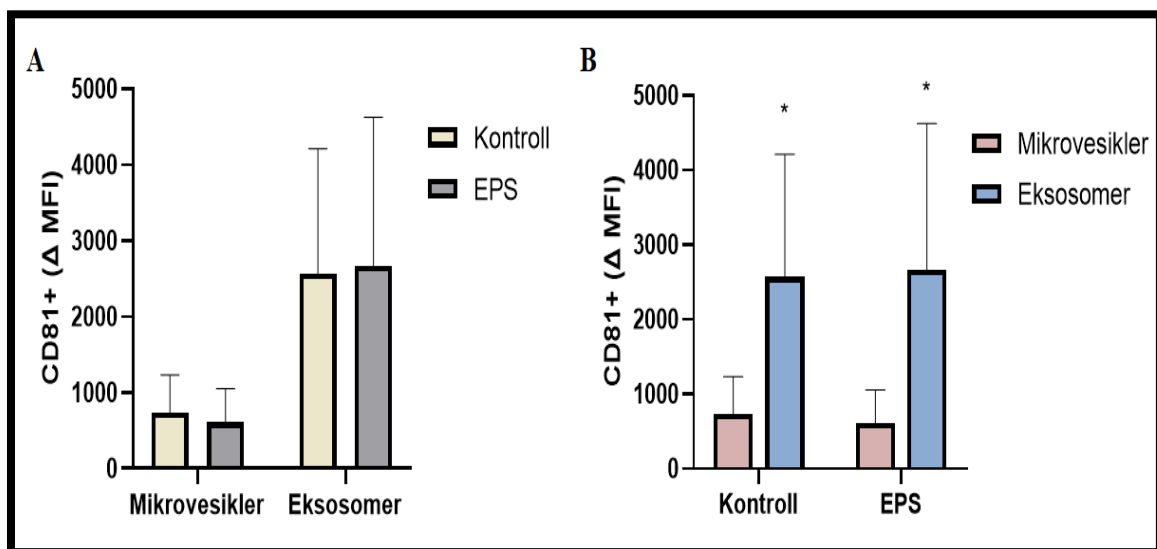
Figur 3.3: Størrelse av mikrovesikler og eksosomer målt med NanoSight. A: Mikrovesikkel- og eksosomstørrelse fra kontroll og EPS-behandlede celler. B: Størrelse av mikrovesikler og eksosomer innen kontrollceller og EPS-behandlede celler. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik (SD), n=6 i hver gruppe. EPS=elektrisk pulsstimulering.

3.4 Overflatemarkører i ekstracellulære vesikler

Tetraspaninene CD9, CD81 og CD63 er kjente overflatemarkører som er påvist på overflaten av mikrovesikler og eksosomer fra ulike celletyper (109). Overflatemarkørene ble detektert ved hjelp av flowcytometri. Subpopulasjoner av EV, mikrovesikler og eksosomer, ble karakterisert i denne studien. En CD81-positive subpopulasjon av EV ble isolert ved bruk av anti-CD81 konjugerte magnetiske kuler. Ekstracellulære vesikler som var positive for CD81 bandt seg til de konjugerte kuler og ble videre merket med enten anti-CD81-, anti-CD9- eller anti-CD63- antistoffer. Et pilotforsøk med to tilfeldige donorer ble utført med CD9-markøren, men begge donorene viste seg å ha veldig lave mengder CD9.

3.4.1 Overflatemarkør CD81 i ekstracellulære vesikler

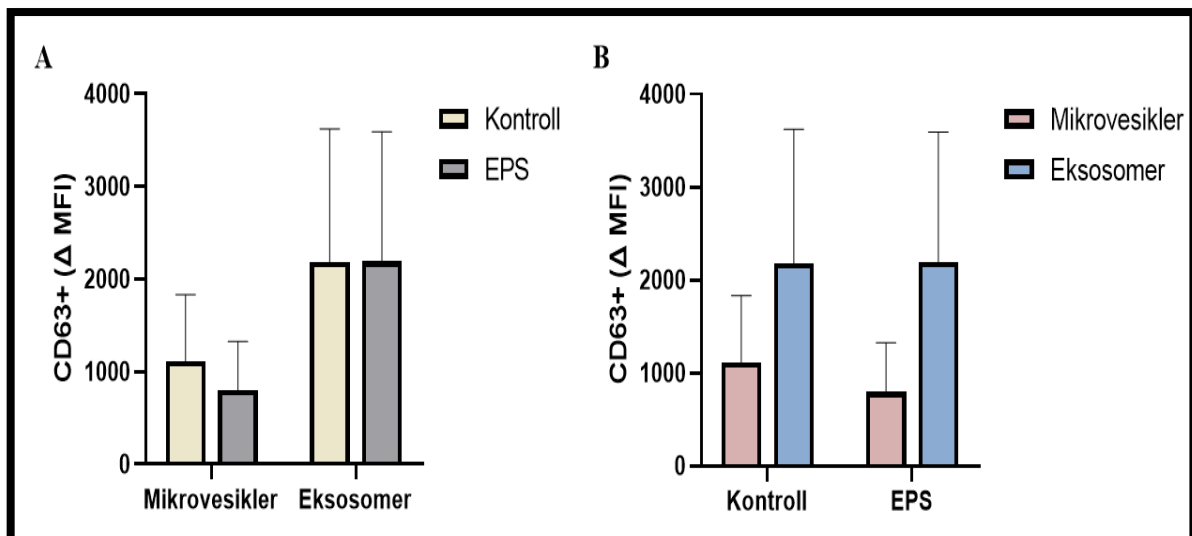
Overflatemarkøren CD81 var tilstede i både mikrovesikler og eksosomer fra skjelettmuskelceller (figur 3.4). Det var ingen signifikante forskjeller mellom kontroll- og EPS-behandlede celler verken med hensyn til mikrovesikler eller eksosomer (figur 3.4.A). Eksosomer hadde mer CD81 på overflaten enn mikrovesikler (figur 3.4.B). Det var statistiske signifikante forskjeller mellom MV og eksosomer både i kontroll- ($p=0,046$) og EPS-behandlede celler ($p=0,045$).



Figur 3.4: Overflatemarkøren CD81 på ekstracellulære vesikler. Tilstedeværelse av CD81 på mikrovesikler og eksosomer målt med flowcytometri. A: Effekt av EPS på CD81-positive mikrovesikler og eksosomer. B: CD81-positive mikrovesikler sammenlignet med eksosomer fra kontroll- og EPS-behandlede celler. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik (SD), $n=6$ i hver gruppe. * Statistisk signifikant forskjellig fra mikrovesikler, $p=0,046$ (kontroll celler) og $p=0,045$ (EPS-behandlede celler) (Students parret t-test). EPS=elektrisk pulsstimulering, MFI= Median fluorescensintensitet.

3.4.2 Overflatemarkør CD63 i ekstracellulære vesikler

En subpopulasjon av ekstracellulære vesikler som var CD81-positive ble trukket ut med CD81 kuler, ble detektert videre med antistoff mot CD63. Overflatemarkøren CD63 var tilstede i både mikrovesikler og eksosomer fra skjelettmuskelceller (figur 3.5). Det var ingen signifikant forskjell på CD63-mengde mellom kontroll- og EPS-behandlede celler verken i mikrovesikler eller eksosomer (figur 3.5 A). Det så ut til å være økt mengde CD63 i eksosomer i forhold til mikrovesikler (figur 3.5 B) både i kontroll- og EPS-behandlede celler, men forskjellen var ikke statistisk signifikant.



Figur 3.5: Mengde av overflatemarkøren CD63 på ekstracellulære vesikler. CD63-mengde i vesikler fra myotuber målt med flowcytometri. A: CD63-positive mikrovesikler og eksosomer fra kontroll- og EPS-behandlede celler. B: CD63-positive mikrovesikler sammenlignet med eksosomer fra kontroll- og EPS-behandlede celler. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik (SD), n=6 i hver gruppe. EPS=elektrisk pulsstimulering, MFI= Median fluorescensintensitet.

3.5 Proteomikkanalyse av ekstracellulære vesikler

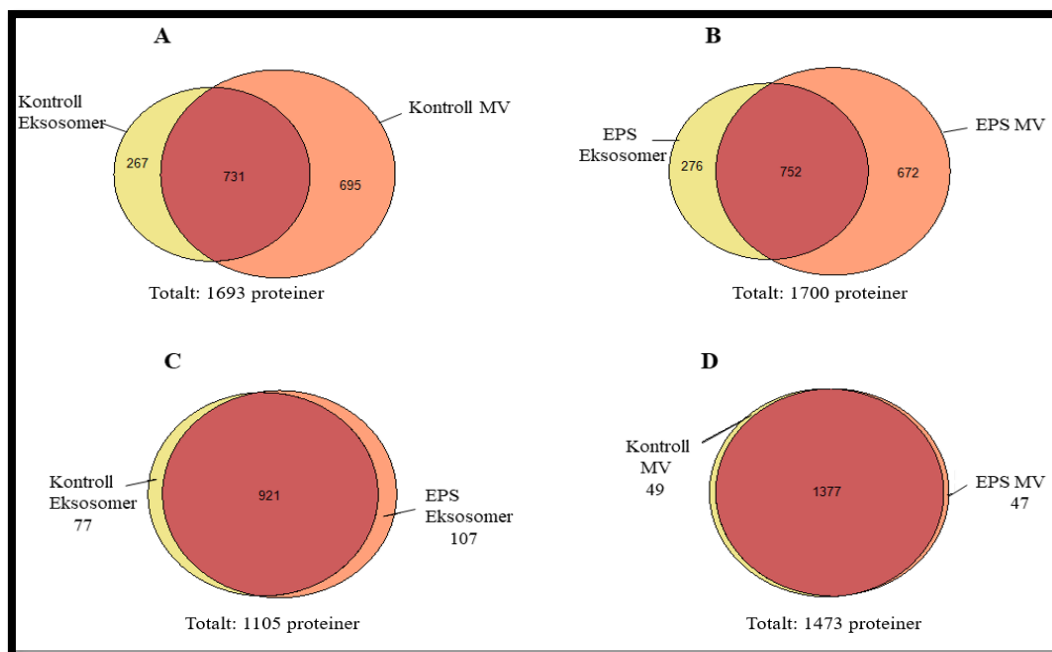
Proteomikkanalysene ble utført ved Kjernefasiliteten for proteomikk ved Oslo Universitetssykehus (OUS), Rikshospitalet. Analysen sammenlignet proteininnhold i både mikrovesikler og eksosomer mellom/innen kontroll- og EPS-behandlede celler. Dataanalysen ble utført i to trinn. Det første trinnet var en kvalitativ analyse, og det andre trinnet var en kvantitativ analyse for kvantifisering og identifisering av proteiner via MaxQuant programvare. For statistisk analyse av MaxQuant-data ble Perseus programvare brukt. Kriterier for proteinidentifisering var at minst 3 av de 6 donorene skulle ha tilstedeværelse av aktuelt protein.

3.5.1 Proteiner tilstede i ekstracellulære vesikler – kvalitativ analyse

Kvalitativ LC-MS-MS-analyse ble utført for å studere hvilke proteiner som var tilstede i eksosomer og mikrovesikler. Antall proteiner tilstede i ekstracellulære vesikler ble illustrert med venndiagram (figur 3.6).

Totalt var det 1 693 proteiner tilstede i både eksosomer og mikrovesikler fra kontrollgruppen, hvorav 731 proteiner var felles, 267 proteiner var tilstede i eksosomer og 695 proteiner var tilstede kun i mikrovesikler (fig.3.6 A). Fra EPS-behandlede cellene var det totalt 1 700 proteiner tilstede i MV og eksosomer, hvorav 752 proteiner var felles, 276 proteiner var kun i eksosomer og 672 proteiner var tilstede kun i mikrovesikler (fig.3.6 B).

Ved sammenligning av eksosomer fra kontroll og EPS-behandlede celler var det totalt 1 105 proteiner tilstede, hvorav 921 proteiner var felles, 77 proteiner var kun i kontrollceller og 107 proteiner var kun tilstede i EPS-behandlede celler (fig. 3.6 C). Proteiner tilstede i mikrovesikler fra kontroll og EPS-behandlede celler var totalt 1473, hvorav 1377 proteiner var felles, 49 proteiner var tilstede kun i kontrollceller og 47 proteiner var tilstede kun i EPS-behandlede celler (figur 3.6 D). Fullstendig liste over hvilke proteiner som var tilstede i eksosomer og mikrovesikler med og uten EPS-behandling (figur 3.6.C og D, vedlegg 13 og 14).



Figur 3.6: Kvalitativ proteomikkanalyse (LC-MS-MS) av eksosomer og mikrovesikler (MV).

A: Antall proteiner identifisert i eksosomer og mikrovesikler fra kontrollceller, felles og separate. B: Antall felles og separate proteiner identifisert i eksosomer og mikrovesikler fra EPS-stimulerte celler. C: Antall proteiner identifisert i eksosomer fra kontrollceller og EPS-behandlede celler, felles og separate. D: Antall felles og separate proteiner identifisert i mikrovesikler fra kontroll og EPS-stimulerte celler. n= 6 i hver gruppe for eksosomer, n= 3 i hver gruppe for MV. EPS=elektrisk pulsstimulering, MV= mikrovesikler.

3.5.2 Proteiner tilstede i EV fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller – kvantitativ analyse

Kvantitativ analyse ble utført ved å benytte normalisert intensitet(LFQ)-verdier fra MaxQuant programvare. Normaliserte data gir en mer nøyaktig kvantifisering mellom prøvene. Perseus programvare ble brukt for å beregne statistisk signifikante forskjeller i proteininnholdet i MV og eksosomer fra EPS-behandlede celler og kontrollceller. Totalt 57 proteiner i mikrovesikler og 75 proteiner i eksosomer var tilstede i statistisk signifikant forskjellig mengde i EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

3.5.2.1 Proteiner med høyeste nivåforskjeller i mikrovesikler

Av 57 proteiner som var tilstede i signifikant forskjellige nivåer i mikrovesikler fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller, var 41 proteiner signifikant økt (fullstendig liste i vedlegg 15). De 10 proteinene som var mest økt i mikrovesikler etter behandling med EPS er presentert i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Oversikt over de 10 mest økte proteinene i mikrovesikler fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Protein id	Proteinnavn*	Biologisk funksjon*	Økning (fold change)
Q8IZP0	Abl interactor 1	Kan spille en rolle i regulering av EGF-indusert ERK-signalveiaktivering.	6,89
Q9P2P6	StAR-relatert lipidoverførings protein 9	Mikrotubuliavhengig motorprotein som kreves for montering av spindelpole under mitose.	3,84
Q16531	DNA-skadebindende protein 1	Kreves for DNA-reparasjon.	2,59
Q13151	Heterogent nukleært ribonukleoprotein A0	mRNA-bindende komponent av ribonukleosomer. Involvert i post-transkripsjonell regulering av cytokin mRNA.	2,40
Q9B XK5	Bcl-2-lignende protein 13	Kan fremme aktivering av caspase-3 og apoptose.	1,63
P23381	Tryptofan-tRNA ligase	Regulerer ERK, Akt og eNOS aktiveringsveier som er forbundet med angiogenese, cytoskjeletteorganisering og shear stress-responsivt genuttrykk.	1,36
Q15233	Ikke-POU domeneholdig oktamerbindende protein	DNA- og RNA-bindende protein, involvert i flere kjerneprosesser	1,35

P20042	Eukaryot initieringsfaktor 2 (eIF-2)	Funksjon i de tidlige trinnene av proteinsyntese	1,32
Q13185	Chromobox protein homolog 3	Involvert i transkripsjon silencing i heterokromatin-lignende komplekser	1,31

*Proteinnavn og biologiske funksjoner presentert i denne tabellen er hentet fra Universal Protein Resource (110).

Av de 57 proteinene som var tilstede i signifikant forskjellige nivåer i mikrovesiklene fra EPS-behandlede celler og kontrollceller, var 16 proteiner signifikant nedregulert (fullstendig liste i vedlegg 15). De 10 proteinene med lavest nivå er presentert i tabell 3.2.

Tabell 3.2: Oversikt over de 10 proteinene med lavest nivå i mikrovesikler fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Protein id	Proteinnavn*	Biologisk funksjon*	Økning (fold change)
P27144	Adenylat kinase 4, mitokondriell	Opprettholde homeostasen av cellulære nukleotider.	0,37
Q9NRG7	Epimerase familie protein SDR39U1	Putativ NADP-avhengig oksidoreduktase	0,56
Q9UDR5	Alfa-aminoadipisk semialdehyd syntase, mitokondriell	Bifunksjonelt enzym som katalyserer de to første trinnene i lysin nedbrytning.	0,63
P02649	Apolipoprotein E	Lipoproteinmediert lipidtransport mellom organer via plasma interstitialvæsken.	0,69
Q7L0Y3	tRNA metyltransferase 10 homolog C	Mitokondriell tRNA-modning.	0,70
P04439	HLA klasse I histokompatibilitetsantigen, A-3 alfakjede	Involvert i presentasjonen av fremmede antigener til immunsystemet.	0,70
Q14393	Vekst arrest-spesifikk protein 6	Ligand for tyrosin-proteinkinase reseptorer AXL, TYR03 og flere hvis signalering er implisert i cellevekst og overlevelse.	0,76
Q9UBS4	DnaJ homolog subfamilie B medlem 11	Co-chaperone for HSPA5.	0,78
Q9P2B2	Prostaglandin F2 reseptor negativ regulator	Inhiberer binding av prostaglandin F2-alfa til sin spesifikke FP-reseptor.	0,85
O43264	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	Komponent i mitotisk kontrollpunkt.	0,86

*Proteinnavn og biologiske funksjoner presentert i denne tabellen er hentet fra Universal Protein Resource (110).

3.5.2.2 Proteiner med høyeste nivåforskjeller i eksosomer

I eksosomer fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller var det 75 proteiner som var tilstede i signifikant forskjellig mengde, hvorav 51 proteiner var økt (fullstendig liste i vedlegg 16). De 10 proteinene som var mest økt i eksosomer etter behandling med EPS er presentert i tabell 3.3.

Tabell 3.3: Oversikt over de 10 mest økte proteinene i eksosomer fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Protein id	Proteinnavn*	Biologisk funksjon*	Økning (fold change)
O95816	BAG familie molekylær chaperon regulator 2	Fungerer som en nukleotidutvekslingsfaktor (NEF) som fremmer frigjøring av AdP fra HSP70- og HSC70-protein	3,99
Q14697	Nøytral alfa-glukosidase AB	Spalter de 2 innerste alfa-1,3 koblede glukoseenheter fra oligosakkaridforløpere av umodne glykoproteiner	3,15
O75369	Filamin-B	Binder cellemembranbestanddelene til aktin cytoskjelett	2,63
P46821	Mikrotubuli-assosiert protein 1B	Tyrosinering alfa-tubulin i nevron-mikrotubuli	2,43
Q92598	Varmesjokkprotein 105 kDa (Heat shock protein 105 kDa)	Fungerer som en nukleotidbyttefaktor for chaperonprotein HSPA1a og HSPA1B	2,31
P49588	Alanin-tRNA ligase, cytoplasmatisk	Alanin aktiveres først av ATP for å danne Ala-AMP og overføres deretter til akseptorenden av tRNA (Ala)	2,31
Q99584	Protein S100-A13	Spiller en rolle i eksport av proteiner som mangler et signalpeptid og utskilles av en alternativ vei.	2,27
O94979	Proteintransportprotein Sec31A	Komponent av belagt proteinkompleks II (COPII) som fremmer dannelsen av transportvesikler fra endoplasmatisk retikulum (ER)	2,18
Q02218	2-oksoglutarat dehydrogenase, Mitokondriell	Komponenten er aktiv i mitokondrium	2,17
Q7KZF4	Staphylococcal nuklease domene-holdig protein 1	Endonuklease som medierer miRNA-forfall av både proteinfire og AGO2-ladete miRNAer	2,16

*Proteinnavn og biologiske funksjoner presentert i denne tabellen er hentet fra Universal Protein Resource (110).

I eksosomer fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller ble det påvist 75 proteiner som var tilstede i signifikant forskjellig mengde, hvorav 24 proteiner av disse var i lavere mengde (fullstendig liste i vedlegg 16). De 10 proteinene med lavest nivå er presentert i tabell 3.4.

Tabell 3.4: Oversikt over de 10 proteinene med lavest nivå i eksosomer fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Protein id	Proteinnavn*	Biologisk funksjon*	Økning (fold change)
P05109	Protein S100-A8	Kalsium- og sinkbindende protein som spiller en fremtredende rolle i regulering av inflammatoriske prosesser og immunrespons.	0,33
O95498	Vaskulært ikke-inflammatorisk molekyl 2	Amidohydrolase som hydrolyserer spesifikt en av karbamidbindingene i D-pantetin, og dermed resirkulerer pantotensyre (Vitamin B5) og frigjør cysteamin.	0,57
O95965	Integrin beta-lignende protein 1	Integrin binding	0,63
P13591	Nevralt celleadhesjonsmolekyl 1	Celleadhesjonsmolekyl involvert i nevron-nevronadhesjon	0,64
O43827	Angiopietin-relatert protein 7	Respons til oksidativ stress	0,64
P02649	Apolipoprotein E	Lipoproteinmediert lipidtransport mellom organer via plasma interstitielle væsker.	0,65
P13497	Benmorfogenetisk protein 1	Spalter C-terminale propeptider av prokollagen I, II og III.	0,66
Q02952	A-kinaseankerprotein 12	Forankringsprotein som medierer subcellulær lokalisering av proteinkinase A og proteinkinase C	0,66
Q16270	Insulinlignende vekstfaktor bindende protein 7	Binder IGF-I og IGF-II med en relativt lav affinitet	0,67
P02462	Kollagen alfa-1(IV) kjede	Danner nettverk sammen med lamininer	0,68

*Proteinnavn og biologiske funksjoner presentert i denne tabellen er hentet fra Universal Protein Resource (Uniprot) (110).

3.5.3 Ingenuity pathway analysis (IPA)

Ingenuty Pathway Analysis (IPA) er en nettbasert programvare som analyserer proteomikk-dataene og finner hvilke biologiske funksjoner de ulike proteinene er involvert i. IPA predikerer hvilke signalveier, oppstrøms regulatorer og sykdomsnettverk som kan være påvirket i datasettet, i en studie.

Proteomikk dataene fra EPS behandlede ble analysert via IPA for å finne signifikante forskjeller fra kontrollcellene. De mest påvirkede signalveier oppstrøms regulatorer er vist i tabell 3.5 og 3.6.

Tabell 3.5: Hovedprosesser som er regulert forskjellig i EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Hovedprosesser (pathway)	p-verdi
EIF2 signalering	$1,05 \times 10^{-10}$
Regulering av eIF4 og p70S6K signalering	$1,91 \times 10^{-8}$
ILK signalering	$1,06 \times 10^{-7}$
RhoA signalering	$8,62 \times 10^{-6}$
tRNA (ladning)	$1,59 \times 10^{-5}$

Tabell 3.6: Topp oppstrøms regulatorer regulert forskjellig i EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Topp oppstrøms regulatorer	p-verdi
TP53	$7,07 \times 10^{-11}$
TGFB1	$7,29 \times 10^{-10}$
IL4	$6,64 \times 10^{-9}$
MYC	$3,81 \times 10^{-7}$
APP	$4,33 \times 10^{-7}$

3.6 Relativ kvantifisering av mikroRNA i eksosomer

Det ble studert om mengden av utvalgte mikroRNA i eksosomer ble påvirket av elektrisk pulsstimulering (EPS).

Mengde mikroRNA (miR) tilstede i prøvene ble påvist etter isolering av RNA fra EV og RT-qPCR-prosedyre. miR-mengde ble avlest som "Crossing point (Ct)" etter 40 qPCR-sykler (tabell 3.7 og 3.8). Nivået av utvalgte muskelspesifikke miR (myomiR); miR-1-3p, miR-133a og miR-206, ble undersøkt i eksosomer fra alle seks donorer. I tillegg ble en ikke-muskelspesifikk miR-223 undersøkt i eksosomer fra fire tilfeldige donorer. For å normalisere resultatene ble det benyttet et referansegen (ath-miR-159a prøven) i en kjent konsentrasjon fra en annen art (*Arabidopsis thaliana*), slik at Δ Ct-vediene kunne beregnes. Alle eksosomer

hadde innhold av de 3 myomiR'ene som ble analysert, og det var liten forskjell på Ct mellom kontroll- og EPS-gruppe (Ct: 22,80-33,28). miR-223 viste heller ingen forskjell mellom gruppene og hadde en stabil Ct-range på 31,54-34,86. Spike in ath-miR-159 viste en Ct-range på 22,50-28,32 (tabell 3.7 og 3.8).

Tabell 3.7: Ct-verdier for miRNA i eksosomer fra kontrollceller.

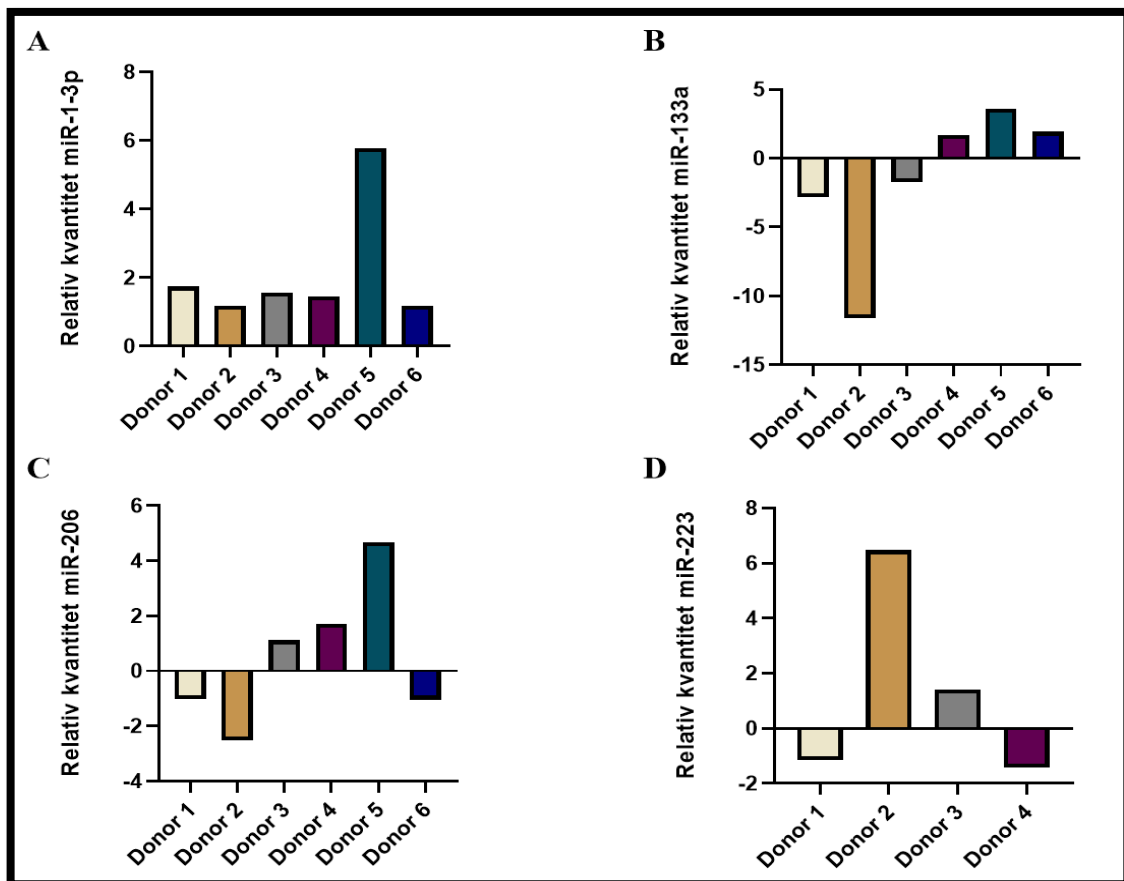
Donor	Referansegen	miR-1-3-p	miR-133a	miR-206	miR-223
	Ct spike-in	Ct prøve	Ct prøve	Ct prøve	Ct prøve
1	24,19	24,71	22,77	24,32	32,98
2	23,62	26,86	25,04	27,16	32,86
3	24,59	27,67	26,49	28,30	33,20
4	23,23	27,30	27,21	27,02	31,54
5	23,98	30,50	29,83	30,17	
6	22,50	23,31	23,73	23,95	

Tabell 3.8: Ct-verdier for miRNA i eksosmer fra EPS-behandlede celler.

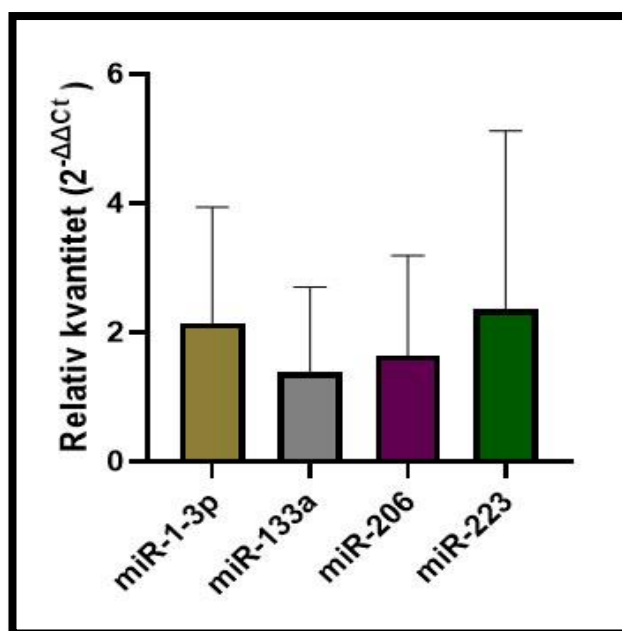
Donor	Referansegen	miR-1-3-p	miR-133a	miR-206	miR-223
	Ct spike-in	Ct prøve	Ct prøve	Ct prøve	Ct prøve
1	23,07	22,80	23,15	23,23	32,07
2	28,32	31,31	33,28	33,19	34,86
3	23,71	26,15	26,40	27,26	31,83
4	23,91	27,44	27,12	26,93	32,74
5	25,08	29,07	29,08	29,04	
6	24,34	24,91	24,34	25,85	

Rådata ble behandlet med et dataprogram koblet til q-PCR-maskinen og relative verdier (ΔCt og $\Delta\Delta Ct$ -verdier) ble beregnet ved å sammenligne RNA-nivået mellom kontroll- og EPS-behandlede celler. Relativ kvantitet, RQ-verdi, av de ulike miR-ene ble beregnet utifra

$2^{-\Delta\Delta C_t}$, for hver enkelt donor (figur 3.7) og som gjennomsnitt i kontroll- og EPS-behandlede celler (figur 3.8). Denne verdien representerte miR-forskjellene som respons på EPS-behandling. For modellen som ble benyttet i denne studien, var det ingen statistisk signifikant forskjell i mikroRNA-nivå mellom kontroll- og EPS-behandlede celler (figur.3.8). Derimot var den inter-individuelle variasjonen stor (figur 3.7).



Figur 3.7: Relativ kvantitet (RQ) ved RT-qPCR av mikroRNA-nivå i eksosomer fra muskelceller etter EPS-behandling i forhold til kontrollceller hos hver enkelt donor. A: Muskelspesifikk miR-1-3p. B: Muskelspesifikk miR-133a. C: Muskelspesifikk miR-206. D: Ikke-muskelspesifikk miR-223. EPS=elektrisk pulsstimulering, miR= mikroRNA. RQ= $2^{-\Delta\Delta C_t}$.



Figur 3.8: Relativ kvantitet (RQ) ved RT-qPCR av mikroRNA-nivå i eksosomer fra muskelceller etter EPS-behandling i forhold til kontrollceller. Muskelspesifikke myomiR; miR-1-3p, miR-133a, miR-206 og ikke-muskelspesifikk miR-223. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik (SD), n=6 i hver gruppe for miR-1-3p, miR-133a og miR-206 og n=4 i hver gruppe for miR-223. EPS=elektrisk pulsstimulering, miR= mikroRNA, RQ= $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.7 Morfologi av ekstracellulære vesikler via Transmisjon elektronmikroskop (TEM)

Det ble levert prøver av MV og eksosomer til Kjernefasilitet for avansert elektronmikroskopi for å se på hvordan vesiklene så ut. Dessverre ble ikke analysene ferdige før frist av innlevering av masteroppgave.

4 Diskusjon

Ekstracellulære vesikler (EV) utskilt fra humane skjelettmuskelceller fra donorer med ekstrem overvekt diagnostisert med T2DM ble studert i denne oppgaven. EV inneholder proteiner, lipider og nukleinsyrer som gjenspeiler modercellens fysiologiske tilstand og kan bidra som viktige mediatorer for celle-celle-kommunikasjon. Antall vesikler og deres innhold kan være endret ved ulike sykdomstilstander, derfor er de interessante som sirkulerende biomarkører. EV har tidligere blitt studert i plasma/serum og cellemedium fra C2C12-cellerkultur. Lite er kjent om EV utskilt fra humane skjelettmuskelceller *in vitro*. Dette er den første studien på EV fra humane skjelettmuskelcellekulturer så vidt vi er kjent med. Myoblaster ble dyrket *in vitro* og differensierte til flerkjernede modne myotuber. Etter differensiering ble halvparten av cellene behandlet med elektrisk pulsstimulering (EPS), og resten av cellen ble brukt som kontrollceller. Etter 24 timer med kontinuerlig kronisk lavfrekvent EPS-behandling, ble cellene tilsatt serumfritt medium i 24 timer. EV ble utskilt fra myotubene til cellemediet. Interleukin-6 (IL-6) ble målt i cellemediene som en positiv kontroll på EPS-behandling. For å dokumentere at det var EV som ble isolert fra cellemediene ble ISEV sine kriterier for karakterisering fulgt (95). EV fra kontrollceller og EPS-behandlede celler ble sammenlignet ved å studere størrelse, konsentrasjon og overflatemarkører, samt proteininnhold og nivå av utvalgte miRNA.

4.1 Treningseffekt på skjelettmuskelcellene

Dyrkede humane skjelettmuskelceller (myotuber) representerer en unik, fysiologisk relevant *in vitro*-modell, som kan brukes til å studere ulike cellemekanismer og signalveier ved bruk av varierende stimulering. Fysisk trening spiller en sentral rolle i en sunn livsstil og er både forebyggende og behandlende for flere sykdommer. Treningseffekten i en muskel *in vivo* er avhengig av både varighet, intensitet og treningstype. Nikolić et al. (41) har utviklet en *in vitro*-treningsmodell med elektrisk pulsstimulering av dyrkede humane myotuber. EPS-behandling er vist å gi lignende effekt i muskelceller som trening *in vivo*, og ulike modeller er utarbeidet som høy- og lavfrekvent stimulering (41). De ulike modellene har vist å aktivere forskjellige signalveier (36). I denne studien ble det benyttet lavfrekvent EPS-behandling. Denne treningstypen er tenkt å etterligne trening med lav intensitet eller regelmessig aktivitet. Litteraturen viser at denne treningsmodellen har utviklet seg gjennom årene. De første EPS-forsøkene på myotuber startet på cellelinjer fra mus (C2C12) (111) og rotte (L6 celler) (112).

Flere studier har vist at EPS gir synlige muskelkontrasjon som gir treningslignende effekter (47). I likhet med trening *in vivo*, er EPS-induserte effekter også avhengig av variable som varighet, spenning, frekvens og pulsmønster. Forskjellige variable tilsvarer muligens ulike treningstyper. Skjelettmuskelcellene frigjør myokiner som interleukin-6 (IL-6) under muskelkontraksjon *in vivo* (54). Myotuber i kultur ligger i hviletilstand i brønnene og kontraherer ikke før de blir tilført EPS. I denne studien ble myotubene stimulert med 24 timer kontinuerlig, lavfrekvent EPS-behandling og deretter ble IL-6-nivå målt i cellemediene fra EPS-stimulerte celler og sammenlignet med ustimulerte kontrollceller. Behandlingen gav en signifikant økning på 23% av IL-6-nivået i EPS-behandlede i forhold til kontrollcellene, et resultat som samsvarer med tidligere studier (50) hvor tilsvarende ELISA-analyse var benyttet. Studier utført av Nedachi et al. (49) på C2C12-celler og Lambernd et al. (50) på humane myotuber viste også at EPS-behandling ga signifikante forskjeller på IL-6-konsentrasjon etter EPS-behandling. Resultater fra EPS-behandling i denne oppgaven representerer celler fra ekstremt overvektige donorer diagnostisert med T2DM. En studie utført av Feng et al. (33) har observert at myotuber fra tynne og ekstremt overvektige med og uten T2DM, kan respondere forskjellig på EPS-behandling.

En begrensning ved denne «treningsmodellen» er at myotubene ligger i hviletilstand helt til de mottar EPS og starter kontrahering. Hvor stor «trenings effekt» myotubene får etter EPS-behandling er vanskelig å si med sikkerhet. Derfor er det viktig med en positiv kontroll som skal gjenspeile «trenings effekten», slik IL-6 ble benyttet i denne oppgaven. I tillegg kreves det flere studier for å finne ut hvilken type trening EPS-induserte kontraksjoner kan gjenspeile. Andre begrensninger i EPS-modellen er at den ikke kan etterligne *in vivo* egenskaper som blodstrøm og nerveimpulser, mekanismer som er viktige ved regulering av muskler som arbeider.

Det finnes mange variable innstillinger for elektrisk stimulering av myotuber. Det var viktig å velge et program som myotubene tålte. For sterk stimulering kan føre til at cellene løsner fra brønnen, eller at cellene dør. De variablene som ble benyttet i denne oppgaven vist seg å være effektive på skjelettmuskelcellene. Det samsvarte med resultatene fra totalprotein-konsentrasjon-måling, der det var lik konsentrasjon i begge gruppene med og uten EPS. Disse resultatene samstemte også med tidligere studier (36).

Muskelkontraksjonen kan også visualiseres ved hjelp av lysmikroskop. I denne studien ble det ikke observert kontraksjon, men siden IL-6-nivået var økt antas det at cellene har utført kontraktile aktiviteter. For å unngå kontaminering i cellemediene ble karbonelektrodeene vasket

godt etter hver behandling med destillert vann, deretter 70% etanol og tørket godt. Nikolić et al. observerte at elektrodene ikke hadde toksisk effekt på myotubene (41).

Andre faktorer som kunne påvirke resultatene var at de ulike donorene kan reagere forskjellig på EPS. Dette kunne observeres ved å studere IL-6-nivået, alle donorer hadde ulik økning i IL-6 nivået i denne studien.

4.2 Konsentrasjon og størrelse av ekstracellulære vesikler

Et av kriteriene for karakterisering av eksosomer og mikrovesikler var å studere størrelse og konsentrasjon med partikkeltelleren Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Resultater fra analysen viste at gjennomsnitt-størrelsen for eksosomer var på <150 nm og på mikrovesikler >150 nm i begge cellegruppene. Det var ingen signifikant forskjell på størrelse mellom kontrollceller og EPS-behandlede celler. Basert på litteratur så kan EV karakteriseres i ulike sub-populasjon avhengig av størrelse (57). Litteraturen har vist at eksosomer har en størrelse innenfor 30-150 nm, mens MV-størrelse er mellom 100-1000 nm (60;74). Resultater fra NTA viste at størrelsen på partiklene fra muskelcellene i denne studien var innenfor størrelsesområdene for de respektive sub-typerne av EV. Det antas å være ulike populasjoner av EV, men en kan ikke med sikkerhet skille mellom eksosomer og mikrovesikler kun basert på størrelse siden eksosomer og mikrovesikler kan overlapse hverandre (65;113). EPS-behandling påvirket ikke EV-størrelsen i denne oppgaven. Dette stemte med studier utført av Oliveria et al. (43) og Bei et al. (114) på EV henholdsvis fra rotte- og museserum. Det var ingen signifikante forskjeller på EV-størrelse i serum før og etter trening, mens konsentrasjonen av EV var økt i disse studiene.

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom konsentrasjonen av eksosomer eller MV i kulturmediene fra kontrollceller og EPS-behandlede skjelettmuskelceller. Serumfritt M3-medium uten celler fulgte samme EV-isoleringsprosedyre og ble brukt som kontrollmedium. Resultater fra NTA viste at vesikkelkonsentrasjonen i mediet fra kontrollcellene var cirka 10 ganger høyere for MV og 5 ganger høyere for eksosomer i forhold til serumfritt M3-medium uten celler. Våre resultater viser dermed at også kontrollmedium har EV tilstede, men i et betydelig lavere tall sammenlignet med MV- og eksosomløsninger isolert fra cellene. Dette verifiserer at skjelettmuskelcellene produserer og utskiller EV.

Vesikkelstørrelse og -konsentrasjon kan også være assosiert med isoleringsmetode og oppbevaring av EV. Maroto et. al (115) fant at lagring av ekstracellulære vesikler ved -80 °C

eller +4 °C kan resultere i en økning av gjennomsnittlig diameter sammenlignet med ferskt isolerte vesikler (115). I denne oppgaven ble ikke størrelse og konsentrasjon målt på ferskt isolert EV, det ble målt etter nedfrysning. Prøvematerialet ble fryst og tint hver gang en prøve ble hentet fra fryseren noe som kan være med på å påvirke resultatene.

NTA kvantiterer alle partikler i prøveløsningen (102). Den klarer ikke å skille skarpt mellom EV og eventuelle andre partikler. Dersom det er partikler i løsningene som benyttes i celledyrkning, kan de bidra til for høye tall. For å ha kontroll på dette ble serumfritt M3 kontrollmedium uten celler tatt med som egen prøve og ble et mål på hvor stor bakgrunn det var i prøvene.

Programvareinnstillinger på NanoSight instrumentet for kameranivå og deteksjonsgrenser kan også føre til variasjoner i prøvesvarene (102), men alle prøvene i dette arbeidet ble målt med de samme innstillingene. Deteksjonsgrensen ble satt på 3 (på en skala 1-5), for å detektere mest mulig EV, og skille dem fra bakgrunnsstøy. Det kan ikke utelukkes at noen EV, som var mindre enn deteksjonsgrensen, ikke ble detektert. Instrumentale utfordringer som luftbobler, temperaturendringer eller feiljustering av laserdetektoren kan også oppstå under bruk. I tillegg hadde instrumentet tekniske utfordringer, da den ikke fungerte optimalt hver gang, noe som kunne kreve ny oppstart av instrumentet og økt analysetid.

4.3 Mengde overflatemarkører på ekstracellulære vesikler

Videre karakterisering av EV ble gjort med flowcytometri, som er en analyseringsmetode som blant annet kan benyttes for å karakterisere overflatemarkører på EV-overflaten. I denne studien ble tetraspaninene CD9, CD63 og CD81 analysert. CD81 og CD63, men ikke CD9, ble detektert på overflaten av eksosomer og mikrovesikler. CD81-positive eksosomer og mikrovesikler ble trukket ut og studert, og resultatene viste at det ikke var signifikante forskjeller på markørene CD81 og CD63 med og uten elektrisk pulsstimulering. Påvisning av tetraspaninene viste at EV var tilstede i prøveløsningene og at «trening» ikke påvirket mengden av CD81- eller CD63-positive EV. Stigning i median fluorescensintensitet (MFI) i flowcytometri-analysen for en overflatemarkør, skiller ikke mellom økt antall overflatemarkører eller økt antall vesikler, da dette er en semi-kvantitativ analyse. Både eksosomer og mikrovesikler inneholder tetraspaniner (109;116). Ulike celler har forskjellige tetraspaniner fordelt i plasmamembranen, derfor kan de gjenfinnes i andre vesikkelpopulasjoner enn kun eksosomer (109). Det finnes flere typer tetraspaniner, men CD9, CD63 og CD81 er mest kjente og veletablerte markører av EV (117), derfor ble de studert i denne

oppgaven.

Det ble observert høyere nivåer av CD81 og CD63 på eksosomer i forhold til mikrovesikler. Faktorer som kan bidra til dette kan derfor være at eksosomer faktisk har mer CD81 og CD63 på overflaten enn mikrovesikler eller at det er flere eksosomer med CD81 enn tilsvarende for MV. Litteraturen har også beskrevet at CD81 og CD63 finnes i høyere mengder på eksosomer enn mikrovesikler (118). Flere studier beskriver at CD63 og CD81 ofte er identifisert i eksosomer og dermed er klassiske markører for eksosomer (119). Dette kan stemme med resultatene i oppgaven at de er mer beriket i eksosomer enn mikrovesikler.

Kronisk lavfrekvent stimulering av cellene viste å ikke ha effekt på nivået av CD81 eller CD63 i EV fra skjelettmuskelceller. En grunn kan være at intensitet og varighet av EPS spiller en viktig rolle for tetraspanin-mengde i vesikler. Det finnes ikke mye litteratur som sier noe om regulering av tetraspaniner og treningseffekt i skjelettmuskulaturen. En studie utført av Whitham et al. har vist at CD81 på eksosomer i sirkulasjonen økte signifikant etter akutt trening (60 minutter med sykling) (120). Det kan ikke utelukkes at eksosomer fra andre kilder enn skjelettmuskel bidro til denne økningen, selv om man vet at skjelettmuskel har en viktig rolle under trening. I en review-artikkel av Eichner et al. (93) ble det omtalt at regelmessig (kronisk) trening ikke påvirker nivåene av CD81 og CD63 i sirkulerende EV.

CD9 er også en EV-markør. Det ble utført et pilotforsøk for å detektere CD9 i de isolerte vesiklene. Tilstedeværelse av CD9 detektert på CD81-positive EV fra to tilfeldige valgte donorer ble studert. Det viste seg at CD9-mengden var veldig lav, på lik linje med negativ kontroll. Derfor ble ikke alle donorer analysert for CD9. Årsaken til dette kan være at analysen ble utført på en bestemt subpopulasjon av EV (CD81-positive). CD9 ble heller ikke observert i proteomikk-listene for identifiserte proteiner i vesiklene utskilt fra myotuber.

4.4 Proteomikk-analyse av ekstracellulære vesikler

Karakterisering av proteiner i EV ble gjort med proteomikk-analyse. Proteomikk-analyse av EV fra humane skjelettmuskulatur hadde ikke blitt utført tidligere, så det måtte gjøres et pilotforsøk for å finne ut hvor mye prøvemateriale som måtte til for å få utført en tilfredsstillende analyse. Ut fra dette forsøket ble det funnet at 6 µg totalprotein var tilstrekkelig for å kunne gjøre en analysen.

Resultatene fra den kvalitative analysen viste at det var et stort antall proteiner tilstede i alle EV som ble undersøkt, med nærmest likt antall proteiner i kontroll- og EPS-behandlede celler. Det ble observert at eksosomer og mikrovesikler fra kontrollcellene inneholdt totalt 1693

proteiner, hvorav 731 proteiner var felles. EPS-behandlede celler hadde totalt 1700 proteiner, hvorav 752 proteiner var felles for eksosomer og mikrovesikler. Det var altså klare forskjeller mellom eksosom- og mikrovesikkel-proteomet innen cellegruppene noe som kan skyldes deres ulike biogener, noe tidligere studier har vist (85;121).

Forskjellene var mindre når en sammenligner proteinene innen eksosomer eller MV fra ustimulerte med EPS-stimulerte celler. Eksosomer med og uten EPS-behandling hadde totalt 1105 proteiner, hvorav 921 proteiner var felles for kontrollceller og EPS-behandlede celler og 107 proteiner som var kun tilstede i EPS-behandlede celler. Blant disse proteinene var det blant annet en del proteiner knyttet til metabolske prosesser og mitokondrier, for eksempel ATP-syntase, stress-70 protein og acetylkoenzym A (fullstendig liste, vedlegg 13).

I mikrovesikler var det totalt 1473 proteiner tilstede med og uten EPS behandling, hvorav så mange som 1377 proteiner var felles og 47 proteiner som var tilstede kun i EPS-behandlede celler. Disse proteinene var blant annet forbundet med signalering som ulike fosfataser og kinaser, for eksempel kalsium/kalmodulin-avhengig protein kinase type II gamma og serin/treonin-protein fosfatase PP1 gamma (fullstendig liste, vedlegg 14). En av de første proteomikk analysene på myotuber ble utført av Forterre et al. (122) for å studere proteiner i EV utskilt fra skjelettmuskulatur fra muse-C2C12 celler. Proteomikk-analysen identifiserte forskjellige proteiner i EV fra myoblaste i forhold til myotuber. Studien antyder at innholdet i EV fra muskelceller vil variere gjennom differensieringen av cellene og under ulike forhold. En faktor som kunne bidra til at variasjonen var liten mellom kontroll og EPS-behandlede celler, var at EV-innhold ble målt i vesikler som ble oppsamlet i løpet av 24 timer etter kontinuerlig EPS-behandling og ikke samtidig. Proteinmengdene kan variere rett etter trening og etter 24 timer. Whithams et al. har studert EV i sirkulasjonen før og etter trening, og det viste seg at det var signifikant forskjell mellom proteinene tilstede i sirkulasjonen rett etter trening i forhold til 4 timer etter trening (120).

I proteomikk-analysen ble det observert 57 proteiner i mikrovesikler og 75 proteiner i eksosomer som var tilstede i signifikant forskjellig mengde i EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller (fullstendig liste, vedlegg 15 og 16). Av de 57 proteinene i mikrovesikler, var 6 av de 10 mest økte proteinene involvert i blant annet i cellevekst, transkripsjon og translasjon. Det kunne tyde på at EPS har stimulert til cellevekst. Det var imidlertid ikke mulig å måle dette ved proteinkonsentrasjonsmåling i cellelysater, siden det ikke var forskjell på proteinkonsentrasjonen i celler med og uten EPS-behandling. Proteiner med lavest nivå i

mikrovesikler var proteiner involvert i blant annet metabolisme og signalering. Av de 75 proteinene som var signifikant forskjellig i eksosomer etter EPS-behandling, ble det observert at blant de 10 mest økte proteinene var det proteiner assosiert med cytoskjelett og transport, nukleotidutveksling, chaperoner, translasjon og post-translasjonell modifisering, samt ulike enzymer. De 10 proteinene med lavest nivå var blant annet knyttet til bindevev, adhesjon, matriks og signalering. Whitham et al. har også observert en signifikant økning i proteiner som er assosiert med transport, cytoskjelett, chaperoner og signalering (120) i sirkulerende EV.

Proteomikk-datasettet ble i tillegg analysert via IPA (Ingenuity pathway analyse). De cellulære prosessene som var mest påvirket av EPS, var blant annet knyttet til signalveier som styrer vekst, adhesjon, mikrotubuli-stabilitet, cellyklusregulering, vesikkeltransport og aktivering for proteinsyntese. p70S6K1 signalveien var en av de prosessene som var signifikant forskjellig mellom EPS-behandlede og kontrollceller. Dette passer med en studie utført av Scheler et al. som observerte at høyfrekvent EPS-behandling i 4 timer økte fosforylering av p70S6K1 (123). EV-proteinene som var mest forskjellige mellom EPS-behandlede celler og kontrollceller, var knyttet til regulering av celledeling, vekstfaktor og cytokiner.

I denne studien har vi observert at det er forskjeller i EV-proteiner fra kontrollceller og EPS-behandlede celler. Det ble kun sett på de 10 mest regulerte proteiner i denne oppgaven, men det kan være mange andre og viktige proteiner som er signifikant forskjellig mellom EPS-behandlede celler og kontrollceller som må studeres videre. Proteomikk-resultatene kan derfor bearbeides videre, for å få frem mer informasjon om proteinmønsteret etter EPS-behandling.

4.5 miRNA i ekstracellulære vesikler fra skjelettmuskelceller

Karakterisering av miRNA i eksosomer ble gjort med RT-qPCR for å undersøke miRNA-mengde i eksosomer fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller. Det ble valgt tre muskelspesifikke miRNA (myomiR); miR-1-3p, miR-133a-3p og miR-206. I tillegg ble det studert en ikke muskelspesifikk miR-223. Resultatet fra RT-qPCR påviste jevnt høyt nivå i alle de valgte myomiRene i eksosomene fra skjelettmuskelcellene, mens det var lavere nivå av miR-223. Det var ingen signifikante forskjeller av myomiRene i eksosomer fra EPS-behandlede celler og kontrollceller. Resultatene viste store inter-individuelle variasjoner mellom donorene og liten forskjell mellom kontrollcellene og EPS-behandlede celler for de

utvalgte miRNA-ene. «Trening» hadde altså ingen effekt på myomiRene som var valgt til denne studien.

Trening påvirker skjelett-muskulaturen og det er nylig vist at trening kan modifisere uttrykket av miRNA fra skjelettmuskel (124). miR-1, miR-133 og miR-206 er tilstede i skjelettmuskulatur og hjertemuskel (88). I en studie utført av Mooren et al. ble det observert at disse miRNAene i skjelettmuskulaturen var forandret etter fysisk trening, spesielt etter akutt trening (125). miR kan være "innpakket" i eksosomer, mikrovesikler eller proteinkomplekser, derfor er de stabile utenfor cellen og kan være aktuelle som sirkulerende biomarkører for aerob trening. En studie viste endringer av sirkulerende miRer som respons på fysisk aktivitet (125). Baggish et al. (94) viste også endret mønster for spesifikke sirkulerende miRNA som respons på både akutt og kronisk treningsintervensjon, mens miR-133a viste ingen endring på akutt trening. Safdar et al. (126) har også omtalt at akutt kondisjonstrening er assosiert med økte nivåer av miR-1 og miR-133a, mens utholdenhetstrening reduserte miR-1, men ikke miR-133a nivåer.

Disse studiene antyder at miRNA-mengder for ulike myomiR fra skjelettmuskelceller er avhengig av både treningsvarighet, intensitet og treningstype. Det samme gjelder antageligvis også EPS-indusert aktivitet. Effekt av EPS er avhengig av variabler som varighet, spenning, frekvens og pulslengde. Den lavfrekvente elektrisk pulsstimulering som ble benyttet i denne oppgaven var kanskje ikke optimal for å studere endringer i miR-mengde i eksosomer mellom kontroll og EPS-behandlede celler.

Ikke muskelspesifikk miR-223 er et mikroRNA som er mest uttrykt i beinmarg (127). En studie utført av Nielsen et al. rapporterte en økning i miR-223 nivå umiddelbart etter trening i sirkulasjonen (128). Det ble ikke observert endringer i miR-233 i eksosomer etter EPS-behandling i denne oppgaven.

4.6 Vurdering av metodikkene

4.6.1 Celledyrkning

I denne oppgaven ble humane myoblaster som differensierte til flerkjernede myotuber benyttet. Dyrkningsbetingelser utarbeidet av Gaster et al. (38) ble fulgt for alle donorene, men celleveksten varierte. Årsaken til variasjonen kan skyldes flere faktorer som for eksempel donorvariasjon og forskjell på antall celler i ampullen som var oppbevart i nitrogen tanke. Det er forsøkt å fryse ned lik mengde celler per ampulle, men det kan være litt variasjon siden cellene ikke kan telles før nedfrysning. Donors alder kan også være en årsak til

donorvariasjon, noe som er omtalt av Blau et. al (37). I denne studien var donors alder 49 (± 11) år. Ved utsåing av skjelettmuskelceller fra de ulike donorene ble det observert forskjeller på antall celler som festet seg i brønnene. Enkelte donorer hadde flere myoblaster enn andre. I tillegg var det forskjell på differensiering til myotuber, der noen donorer hadde fine myotuber spredt over hele brønnen, mens enkelte myotuber lå i klynger ispedd flere udifferensierte myoblaster. Hastigheten på celleveksten til donorene varierte fra 14 dager til 36 dager til oppnådd konfluens. Disse faktorene var med på å gi forskjellig utbytte i cellemengde. En annen ting som kan være med på å påvirke celledyrkning var passasje-nummeret til myoblastene. I denne oppgaven hadde alle donorer lavt passasjenummer, mellom passasje 1-3. Nehlin et al. har nevnt i studien sin at proliferasjonsevnen til myoblasters reduseres med høyere passasjenummer (129).

4.6.2 Isolering av ekstracellulære vesikler

For å karakterisere EV må de isoleres fra kroppsvæske eller cellemediet. I denne oppgaven ble sentrifugering og ultrafiltrering benyttet for å isolere ekstracellulære vesikler fra serumfritt M3 cellemedium. Den hittil mest brukte metoden for EV-isolering er differensial- og ultrasentrifugering, men det krever spesialsentrifuge (98). Isolering av eksosomer og mikrovesikler med sentrifugering og ultrafiltrering er en metode med mange trinn, som kan være kilder til variasjon. Andre faktorer som kan påvirke resultatet kan være at etter første sentrifugering ble ca. 1 ml av supernatanten igjen i sentrifugerøret for å resuspendere pelleten. Denne mengden kan variere siden det blir gjort på øyemål og i tillegg kan man få med noen eksosomer fra supernatanten til MV-fraksjonen. Det brukes også filtre til å oppkonsentrere MV, og her kan vesikler bli hengende igjen i filteret. Disse forhold kan påvirke mengden og renheten av MV som blir isolert.

4.6.3 Karakterisering av ekstracellulære vesikler

Det er mange manuelle trinn i de ulike karakteriseringsmetodene, derfor er det viktig med nøyaktig pipetteringsteknikk. Små endringer i pipettering kan føre til store forskjeller i resultatene. Oppbevaring av prøvematerialet ved riktig temperatur kan også påvirke resultatet. For proteomikk-analyse var det ønskelig med 20 μg proteiner fra EV-prøvene, men på grunn av lite materiale ble det bestemt å prøve med 10 μg fra eksosomer og 6 μg for mikrovesikler. Det viste seg at selv med så små mengder protein gav tilfredsstillende proteomikk-data. Prosedyren som ble fulgt for dyrking hadde ikke inkludert vaske av cellene med PBS, verken

etter fjerning av differensieringsmedium fra dyrkningsbrønn eller før tilsetning av serumfritt M3-medium til myotuber. Proteomikkresultatene viste at føtalt kalveserum var tilstede i isolerte ekstracellulære vesikler. I flere studier har det blitt nevnt at det er viktig å vaske cellene med PBS for å få bort rester av partikler og ikke minst serumkomponenter som er igjen fra tidligere medium i dyrkningsbrønnen (130).

For utføring av RT-qPCR for miRNA kvantifisering, ble total-RNA isolert fra EV.

Konsentrasjonene av RNA var så lave at de ikke lot seg å kvantitere ved hjelp av spektrofotometer. Det ble derfor tilsatt en kjent mengde eksogent referanseggen (ath-miR159a) til EV-lysatet. Den fungerte som en prosesskontroll gjennom hele analysen fra RNA isolering til kvantifisering via sanntids PCR og skal etter isolering og RT-qPCR teoretisk gi samme Ct. Den ble også brukt til å normalisere prøvesvarene etter sanntids(real-time) PCR. Ct-range for ath-miR159a lå mellom 22,5-28,32. Resultatene viste at en enkelt prøve hadde stort avvik i Ct-verdi i forhold til de andre prøvene. Denne variasjonen kan skyldes variasjon i total-RNA isoleringen, eller at væskemengde fra fasene varierte. Det kan også være pipetteringsfeil av ath-miR-159a til brønnen som gir en slenger. Pipettering spiller ofte en viktig rolle i variasjon, spesielt når det er mange trinn og små volumer som inngår.

4.7 Veien videre

Analysene som er benyttet i denne studien produserer masse data, hvor kun enkelte av dem er utnyttet og presentert i oppgaven. Fremdeles ligger mange ubrukte resultater som kan gi verdifull informasjon om EV i skjelettmuskelceller med og uten EPS-behandling. Dette gjelder spesielt innen proteomikk, men også fra RT-qPCR hvor cDNA ligger lagret klart til å undersøke flere aktuelle miRNA. Denne modellen kan også forskes videre på ved å ta i bruk og studere ubrukte cellelysater av myotuber (lysert med RNeasy) som kan benyttes til å analysere RNA-ekspresjon i muskelcellene. Dette muliggjør å studere regulering av genekspresjon ved +/- EPS og ikke minst sammenligne modercellens RNA mønster med RNA mønster i EV ved +/- EPS. Proteomikk-analysene ga informasjon om tusenvis av proteiner som det kan forskes videre på for å se på forskjeller mellom proteiner med og uten EPS.

Ved fremtidige studier bør man øke antall forsøkspersoner for å se på biologiske variasjoner mellom individene. Man bør bruke likt antall celler fra hver donor, vaske cellene med PBS mellom hvert skifte av cellemedium og filtrere cellemediene før man tilsetter det til

dyrkningsbrett for å unngå partikler fra serum eller andre løsninger. Dyrker man flere brett får man mer materiale, slik at man har nok for all analyser. For å få et mål på variasjonen i celleoppsettet, kan man dyrke celler fra en donor flere ganger for å bruke det som kontroll gjennom hele studien. I denne studien differensierte vi cellene i medium med serum som inneholder mye vesikler. Det må undersøkes om cellene vil differensiere i serumfritt M3 kontroll for de ulike donorene. Vi har kun studert EV fra myotuber fra ekstremt overvektige personer. Hva vil EPS-effekten være hos tynne donorer?

EPS-behandlingen kan økes til mer enn 24 timer. Man kan også prøve å gi EPS-behandling i intervaller og bytte cellemedium underveis, for å gi større treningseffekt. Da er det alltid viktig å ha med kontroller for å se om cellene tålte EPS-behandlingen og at cellene ikke dør. SerumfrittM3 kontroll uten celler bør være med for alle donor, i tillegg bør man gi EPS-behandling til serumfritt M3 uten celler og analysere i NTA analysen for å se om oppsettet er forurenset med partikler/vesikler. Kanskje bør man samle opp EV tidligere enn 24 timer etter EPS-behandling, da effekten av stimulering kan komme før bytte til serumfritt medium.

Ved EV-isoleringen av MV kan man forbedre prosedyren ved å gå inn med lik mengde volum for å løse opp pelleten. Videre bør EV testes om de kan fryses før karakterisering. Det kan være veldig arbeidskrevende å få sikkert svar på dette. Ved nedfrysing av isolert EV er det viktig å oppbevare EV i alikvoter slik at man unngår opptining og nedfrysing av prøvemateriale mange ganger. I studier av overflatemarkører med flowcytometri bør man måle proteinkonsentrasjonen i isolert EV, og bruke lik mengde protein inn i protokollen istedenfor likt volum. Det vil gi bedre sammenligningsgrunnlag dersom startmengden er lik for alle donorer. For proteomikk-analyser bør man teste ut om mengden EV-materiale som ble brukt var optimal.

5 Konklusjon

Humane skjelettmuskelceller (myotuber) som ble behandlet med elektrisk pulsstimulering (EPS) viste seg å ha en signifikant konsentrasjonsøkning av interleukin-6 i cellemediet på 23% i forhold til kontrollceller. Dette indikerer at cellene hadde fått en effekt av EPS-behandling.

Karakterisering av ekstracellulære vesikler (EV) utskilt fra kontrollceller og EPS-behandlede celler viste at EPS ikke førte til signifikante forskjeller i konsentrasjon og størrelse av EV. Alle analyserte EV hadde CD63 og CD81 i sine overflatemembraner, men det ble ikke observert noen effekt av EPS-behandling på nivået av disse overflatemarkørene. Mengden av de muskelspesifikke mikroRNAene, miR-1-3p, miR-133a og miR-206, i eksosomer ble heller ikke påvirket av EPS-behandling. Kvalitativ proteomikkanalyse (av eksosomer) detekterte et stort antall proteiner i EV fra både kontroll- og EPS-behandlede celler. Det var stor forskjell i proteiner mellom eksosomer og mikrovesikler innad i kontroll- og EPS-behandlede celler. Resultatene viste at det var relativt liten forskjell på proteiner med og uten EPS-behandling, både for eksosomer og mikrovesikler. I tillegg viste proteomikk-dataene at det var totalt 57 proteiner i mikrovesikler og 75 proteiner i eksosomer som var tilstede i statistisk signifikant forskjellig mengde i EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller. Ingenuity pathway-analyse (IPA) viste at vekst, adhesjon, mikrotubuli-stabilitet, cellyklusregulering, vesikkeltransport og aktivering av aminosyrer for proteinsyntese var prosesser som var mest påvirket av EPS.

Dataene i denne studien viser at humane skjelettmuskelceller i kultur produserer EV, både eksosomer og mikrovesikler. EPS påvirker ikke EV-størrelse, konsentrasjon eller nivå av de studerte overflatemarkørene og utvalgte myomiRer, men proteininnhold i vesiklene viser en tydelig forskjell med og uten EPS-behandling. Betydningen av disse endringene i proteininnhold må studeres videre.

Litteraturliste

1. Organization WHO. Obesity and overweight: World Health Organization [lest 14.03.2019]. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Folkehelseinstituttet. Overvekt og fedme i Noreg. Folkehelseinstituttet [lest 14.03.2019]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/levevaner/overvekt-og-fedme/>
3. Organization WHO. Body mass index - BMI: World Health Organization [lest 14.03.2019]. Tilgjengelig fra: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>
4. Helsedirektoratet. Forebygging, utredning og behandling av overvekt og fedme hos voksne [lest 14.03.2019]. Tilgjengelig fra: <https://helsedirektoratet.no/Lists/Publikasjoner/Attachments/390/nasjonal-faglig-retningslinje-for-forebygging-utredning-og-behandling-av-overvekt-og-fedme-hos-voksne.pdf>
5. Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *The New England Journal of Medicine* 2017;377:13-27.
6. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology* 2017;14:88.
7. Basu S, Yudkin JS, Kehlenbrink S, Davies JI, Wild SH, Lipska KJ, et al. Estimation of global insulin use for type 2 diabetes, 2018–30: a microsimulation analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2019;7:25-33.
8. Karlsson J, Bahr R, Norge H. Aktivitetshåndboken : fysisk aktivitet i forebygging og behandling. Helsedirektoratet; 2008.
9. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014;383:69-82.
10. Berg TJ. Kan type 2-diabetes forebygges? *Tidsskrift for Den Norske Legeforening* 2000;120:2430-2433.
11. Indremedisineren. Type 2 diabetes ved fedme: Norsk Indremedisinsk Forening [lest 14.03.2019]. Tilgjengelig fra: <https://indremedisineren.no/2018/02/type-2-diabetes-ved-fedme/>
12. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:1-19.
13. Aas V, Torblå S, Andersen MH, Jensen J, Rustan AC. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;967:506-515.
14. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise and type 2 diabetes: Molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Advances in Physiology Education* 2014;38:308-314.
15. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Schwartz MW, Smith SR, Goldfine AB, et al. Obesity and type 2 diabetes: What can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care* 2011;34:1654-1663.
16. Bays HE, Chapman RH, Grandy S, Group SI. The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys. *International Journal of Clinical Practice* 2007;61:737-747.
17. Methi T, Thorsby PM. Insulinresistens – kroppens forsvar mot kaloriforgiftning? *Tidsskrift for Den Norske Legeforening* 2016;136:1015-1017.

18. Steven EK, Rebecca LH, Kristina MU. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-846.
19. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine* 2013;7:14-24.
20. Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : targets and therapy* 2014;7:587-591.
21. Aas V, Lund J, Kase ET, Feng YZ, Rustan AC, Thoresen H. Blodglukosesenkende -legemidler ved type 2-diabetes. *Norsk Farmaceutisk Tidsskrift* 2015;5:20-24.
22. Sylow L, Kleinert M, Richter EA, Jensen TE. Exercise-stimulated glucose uptake - regulation and implications for glycaemic control. *Nature Reviews Endocrinology* 2017;13:133-48.
23. Sheard NF. Moderate changes in weight and physical activity can prevent or delay the development of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *Nutrition Reviews* 2003;61:76-79.
24. Hofsø D, Jenssen T, Hager H, Røislien J, Hjelmæsæth J. Fasting plasma glucose in the screening for type 2 diabetes in morbidly obese subjects. *The Journal of Metabolic Surgery and Allied Care* 2010;20:302-307.
25. Holck P. Muskelne: Store Medisinske Leksikon [lest 28.04.2019]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/musklene>
26. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim I-S, et al. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *Journal of Controlled Release* 2016;222:107-115.
27. Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011;12:349-361.
28. Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology* 2016;410:1-13.
29. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A brief review of structure and function. *Calcified Tissue International* 2015;96:183-195.
30. Barlow JP, Solomon TP. Do skeletal muscle-secreted factors influence the function of pancreatic β -cells? *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2018;314:E297-E307.
31. Leal LG, Lopes MA, Batista ML. Physical exercise-induced myokines and muscle-adipose tissue crosstalk: A review of current knowledge and the implications for health and metabolic diseases. *Frontiers in Physiology* 2018, fphys.2018.01307.
32. Eckardt K, Gorgens SW, Raschke S, Eckel J. Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2014;57:1087-1099.
33. Feng YZ, Nikolić N, Bakke SS, Kase ET, Guderud K, Hjelmæsæth J, et al. Myotubes from lean and severely obese subjects with and without type 2 diabetes respond differently to an in vitro model of exercise. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 2015;308:C548-C556.
34. Venables MC, Jeukendrup AE. Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2009;25:S18-S23.
35. Merry TL, McConell GK. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: a focus on reactive oxygen species and nitric oxide signaling. *IUBMB Life* 2009;61:479-484.

36. Nikolić N, Görgens SW, Thoresen GH, Aas V, Eckel J, Eckardt K. Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise – possibilities and limitations. *Acat Physiologica* 2017;220:310-331.
37. Blau HM, Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981;78:5623-5627.
38. Gaster M, Kristensen SR, Beck-Nielsen H, Schröder HD. A cellular model system of differentiated human myotubes. *APMIS* 2001;109:735-744.
39. Berggren RJ, Tanner JC, Houmard AJ. Primary cell cultures in the study of human muscle metabolism. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2007;35:56-61.
40. Aas V, Bakke S, Feng Y, Kase E, Jensen J, Bajpeyi S, et al. Are cultured human myotubes far from home? *Cell and Tissue Research* 2013;354:671-682.
41. Nikolić N, Moran M, Skaret Bakke S, Tranheim Kase E, Rudberg I, Flo Halle I, et al. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise. *PLoS One* 2012:e33203.
42. Organization WHO. Physical activity: World Health Organization [lest 14.03.2019]. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>
43. Oliveira GP, Porto WF, Palu CC, Pereira LM, Petriz B, Almeida JA, et al. Effects of acute aerobic exercise on rats serum extracellular vesicles diameter, concentration and small RNAs content. *Frontiers in Physiology*, 2018, fphys.2018.00532.
44. Neuffer PD, Bamman MM, Muoio DM, Bouchard C, Cooper DM, Goodpaster BH, et al. Understanding the cellular and molecular mechanisms of physical activity-induced health benefits. *Cell Metabolism* 2015;22:4-11.
45. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American journal of physiology Endocrinology and Metabolism* 2003;285:E433-E437.
46. Koh H-J. Regulation of exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 2016;21:61-65.
47. Carter S, Solomon T. In vitro experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise: the possibilities, challenges and future developments. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2019;471:413-429.
48. Gorgens SW, Eckardt K, Jensen J, Drevon CA, Eckel J. Exercise and regulation of adipokine and myokine production. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2015;135:313-36.
49. Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2008;295:E1191-E1204.
50. Lambernd S, Taube A, Schober A, Platzbecker B, Görgens S, Schlich R, et al. Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism* 2012;55:1128-1139.
51. Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *The Journal of Physiology* 2001;536:329-337.
52. Pedersen BK, Akerstrom TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology* 2007;103:1093-1098.
53. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proceedings of the Nutrition Society* 2004;63:263-267.
54. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the

- exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *The Journal of Physiology* 2000;529:237-242.
55. Macdonald C, Wojtaszewski JFP, Pedersen BK, Kiens B, Richter EA. Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity. *Journal of Applied Physiology* 2003;95:2273-2277.
 56. Shpacovitch V, Hergenroder R. Optical and surface plasmonic approaches to characterize extracellular vesicles. A review. *Analytica Chimica Acta* 2018;1005:1-15.
 57. Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Reviews* 2013;27:31-39.
 58. Harrison P, Gardiner C, Sargent IL. Overview extracellular vesicles in health and disease: Extracellular vesicles in health and disease: Singapore: Pan Stanford; 2014:1-21.
 59. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Andresen TL, Simonsen JB. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 2019;1871:109-116.
 60. Abels E, Breakefield X. Introduction to extracellular vesicles: Biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2016;36:301-312.
 61. EVpedia. EVpedia Extracellular vesicles. Sør-Korea: EVpedia [opdatert 2018; lest 26.04.2019]. Tilgjengelig fra: http://student4.postech.ac.kr/evpedia2_xe/xe/
 62. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015;4:27066.
 63. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular vesicles: Unique intercellular delivery vehicles. *Trends in Cell Biology* 2017;27:172-188.
 64. György B, Szabó T, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011;68:2667-2688.
 65. Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martinez MC. Extracellular vesicles: Mechanisms in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 2019;30:813-856.
 66. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 2012;1820:940-948.
 67. Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *The Journal of Endocrinology* 2016;228:R57-71.
 68. Gustafson D, Veitch S, Fish JE. Extracellular vesicles as protagonists of diabetic cardiovascular pathology. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2017;4:71.
 69. Huang-Doran I, Zhang C-Y, Vidal-Puig A. Extracellular vesicles: Novel mediators of cell communication in metabolic disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2017;28:3-18.
 70. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular vesicles: Composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience* 2015;65:783-797.
 71. Dickhout A, Koenen RR. Extracellular vesicles as biomarkers in cardiovascular disease; Chances and Risks. 2018;5:113.

72. Akers J, Gonda D, Kim R, Carter B, Chen C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology* 2013;113:1-11.
73. Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood* 1989;74:1844-1851.
74. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating extracellular vesicles in human disease. *The New England Journal of Medicine* 2018;379:958-966.
75. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21:575-581.
76. Park K. Exosome-based therapeutic approach for muscle regeneration. *Journal of Controlled Release* 2016;222:176.
77. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports* 2015;16:24-43.
78. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 2015;13:17-24.
79. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen X-M, et al. Exosomes: Novel biomarkers for clinical diagnosis. *The Scientific World Journal* 2015;657086.
80. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology* 1967;13:269-288.
81. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science* 2010;123:1603-1611.
82. Kim A, Shah A, Nakamura T. Extracellular vesicles: A potential novel regulator of obesity and its associated complications. *Children* 2018;5:11.
83. Pardo F, Villalobos-Labra R, Sobrevia B, Toledo F, Sobrevia L. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Molecular Aspects of Medicine* 2018;60:81-91.
84. Freeman DW, Noren Hooten N, Eitan E, Green J, Mode NA, Bodogai M, et al. Altered extracellular vesicle concentration, cargo, and function in diabetes. *Diabetes* 2018;67:2377-2388.
85. Dai YD, Dias P. Exosomes or microvesicles, a secreted subcellular organelle contributing to inflammation and diabetes. *Diabetes* 2018;67:2154-2156.
86. Guescini M, Maggio S, Ceccaroli P, Battistelli M, Annibalini G, Piccoli G, et al. Extracellular vesicles released by oxidatively injured or intact C2C12 myotubes promote distinct responses converging toward myogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18:11 .
87. Murphy C, Withrow J, Hunter M, Liu Y, Tang YL, Fulzele S, et al. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 2018;60:123-128.
88. Wang H, Wang B. Extracellular vesicle microRNAs mediate skeletal muscle myogenesis and disease. *Biomedical Reports* 2016;5:296-300.
89. Keisuke E, Kunihiro E. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Frontiers in Physiology* 2014; fphys.2013.00408.
90. Aoi W, Sakuma K. Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Frontiers in Physiology* 2014; fphys.2014.00039.
91. Townley-Tilson WHD, Callis TE, Wang D. MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2010;42:1252-1255.

92. Frühbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P, Krämer-Albers E-M. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *Journal of Extracellular Vesicles* 2015;4:28239.
93. Eichner NZM, Erdbrügger U, Malin SK. Extracellular vesicles: A novel target for exercise-mediated reductions in type 2 diabetes and cardiovascular disease risk. *Journal of Diabetes Research* 2018;7807245.
94. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *Journal of Physiology* 2011;589:3983-3994.
95. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 2014;3:26913.
96. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *BioMed Research International* 2018;8545347.
97. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics* 2017;7:789-804.
98. Coumans AWF, Brisson RA, Buzas IE, Dignat-George EEF, Drees FE, El-Andalousi GS, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circulation Research* 2017;120:1632-1648.
99. Guerreiro EM, Vestad B, Steffensen LA, Aass HCD, Saeed M, Ovstebo R, et al. Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PloS one* 2018;13:e0204276.
100. Gregg EW, Shaw JE. Global health effects of overweight and obesity. *The New England Journal of Medicine* 2017;377:80-81.
101. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.
102. Vestad B, Llorente A, Neurauder A, Phuyal S, Kierulf B, Kierulf P, et al. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *Journal of Extracellular Vesicles* 2017;6:1344087.
103. Suárez H, Gámez-Valero A, Reyes R, López-Martín S, Rodríguez M, Carrascosa J, et al. A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports* 2017;7:11271.
104. Scientific TF. Protein quantitation in solution—section 9.2: Thermo Fisher Scientific [lest 01.05.2019]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/protein-detection-and-proteomics-technology/quantitation-and-selective-purification-of-proteins-in-solution.html>
105. Rosa-Fernandes L, Rocha VB, Carregari VC, Urbani A, Palmisano G. A perspective on extracellular vesicles proteomics. *Frontiers in Chemistry* 2017;5:102.
106. QIAGEN. miRNeasy micro handbook. QIAGEN; 2012. s.1-50.
107. Scientific T. TaqMan® Advanced miRNA assays user guide. ThermoFisher Scientific; 2019. s.1-30.
108. Rikkert LG, Nieuwland R, Terstappen L, Coumans FAW. Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent. *Journal of Extracellular Vesicles* 2019;8:1555419.
109. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology* 2014;5:442.

110. UniProt. UniProtKB results: UniProt [lest 30.04.2019]. Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/uniprot/>
111. Park H, Bhalla R, Saigal R, Radisic M, Watson N, Langer R, et al. Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2008;2:279-287.
112. Kawahara Y, Yamaoka K, Iwata M, Fujimura M, Kajiume T, Magaki T, et al. Novel electrical stimulation sets the cultured myoblast contractile function to 'on'. *Pathobiology* 2007;73:288-294.
113. Yin M, Loyer X, Boulanger CM. Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology* 2015;763:90-103.
114. Bei Y, Xu T, Lv D, Yu P, Xu J, Che L, et al. Exercise-induced circulating extracellular vesicles protect against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology* 2017;112:38.
115. Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, Popov VL, Wang H, Kalubowilage M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *Journal of Extracellular Vesicles* 2017;6:1359478.
116. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016;113:E968-E77.
117. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24641.
118. Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KEM, Sadik M, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports* 2016;6:22519.
119. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research* 2009;315:1584-1592.
120. Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M, Hingst JR, Hjorth M, Hughes WE, et al. Extracellular vesicles provide a means for tissue crosstalk during exercise. *Cell Metabolism* 2018;27:237-251.
121. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* 2013;200:373-383.
122. Forterre A, Jalabert A, Berger E, Baudet M, Chikh K, Errazuriz E, et al. Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: A new paradigm for myoblast-myotube cross talk? *PloS One* 2014;9:e84153.
123. Scheler M, Irmeler M, Lehr S, Hartwig S, Staiger H, Al-Hasani H, et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 2013;305:C877-886.
124. Ultimo S, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, McCubrey JA, Capitani S, et al. Influence of physical exercise on microRNAs in skeletal muscle regeneration, aging and diseases. *Oncotarget* 2018;9:17220-17237.
125. Mooren FC, Viereck J, Kruger K, Thum T. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2014;306:H557-563.
126. Safdar A, Saleem A, Tarnopolsky MA. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology* 2016;12:504-517.
127. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83-86.

128. Nielsen S, Åkerström T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen B, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PloS One* 2014;9:e87308.
129. Nehlin J, Just M, Rustan A, Gaster M. Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism. *Biogerontology* 2011;12:349-365.
130. Kornilov R, Puhka M, Mannerström B, Hiidenmaa H, Peltoniemi H, Siljander P, et al. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles* 2018;7:1422674.

Vedlegg 1

REK-Godkjenning



UNIVERSITETET I OSLO DET MEDISINSKE FAKULTET

Førsteamanuensis Vigdis Aas
Høgskolen i Oslo
Postboks 4 St. Olavs Plass
0130 Oslo

**Regional komité for medisinsk og helsefaglig
forskningsetikk Sør-Øst D (REK Sør-Øst D)**
Postboks 1130 Blindern
NO-0318 Oslo

Telefon: 22 85 05 93

Telefaks: 22 85 05 90

E-post: i.m.middelthon@medisin.uio.no

Nettadresse: www.etikkom.no

Dato: 14.04.09

Deres ref.:

Vår ref.: S-09078d, 2009/166

Vedr. svar på merknader for studien "Sammenheng mellom sykkelig overvekt og insulinresistens i skjelettmuskulatur"

Vi viser til svar på merknader av 01.04.09 med følgende vedlegg: Revidert informasjonsskriv

Komiteen behandlet svar på merknader 14.04.09. Prosjektet er vurdert etter lov om behandling av etikk og redelighet i forskning av 30. juni 2006, jfr. Kunnskapsdepartementets forskrift av 8. juni 2007 og retningslinjer av 27. juni 2007 for de regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk.


Komiteen konstaterer at våre merknader er tilfredsstillende besvart.

Vedtak:

Prosjektet godkjennes slik det nå foreligger.

Med vennlig hilsen

Stein A. Evensen (sign.)
Professor dr.med.
leder


Ingrid Middelthon
komitésekretær

Kopi:

- Farmasøytisk institutt, v/Arild Chr. Rustan, Pb 1068 Blindern, 0316 Oslo,

Vedlegg 2

Celledyrkningsmedier:

Utsåingsmedium (M1)

Ingredienser
500 ml DMEM m/Glutamax lav glukose
50 ml FCS (Føtalt kalveserum)
2,5 ml Amfotericin B 250 µg/ml
0,5 ml Gentamicin 50 mg/ml

Proliferasjonsmedium (M2)

Ingredienser
500 ml DMEM m/Glutamax lav glukose
10 ml FCS (Føtalt kalveserum)
10 ml Ultrosor G
2,5 ml Amfotericin B 250 µg/ml
0,5 ml Gentamicin 50 mg/ml

Differensieringsmedium (M3)

Ingredienser
500 ml DMEM m/Glutamax lav glukose
10 ml FCS (Føtalt kalveserum)
2,5 ml Amfotericin B 250 µg/ml
0,5 ml Gentamicin 50 mg/ml
25 pmol Insulin 100IE/ml

Serumfritt differensieringsmedium (S-fritt M3)

Ingredienser
500 ml DMEM m/Glutamax lav glukose
2,5 ml Amfotericin B 250 µg/ml
0,5 ml Gentamicin 50 mg/ml
25 pmol Insulin 100 IE/ml

Vedlegg 3

Reagenser/kjemikaler og utstyr benyttet for dyrking av celler.

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) (1X) + GlutaMAX™-I 1g/L D-glukose, Pyruvate Ref: 21885-025	Gibco® by life technologies™, Paisley, Skottland, Storbritannia
FCS (Føtalt kalveserum)	Sigma-Aldrich™, St.Louis, MO, USA
Amphotericin B 250 µg/ml	
Gentamicin 50 mg/ml	
ECM (Extracellular Matrix) gel Ref: 082M4058	
PBS (Phosphate Buffered Saline)	
Novorapid Penfill 100IE/ml	Novo Nordisk A/S Bagsværd, Danmark
Ultroser™G	Pall Life Sciences Cergy-Saint-Christophe, Frankrike
Buffer RLT Plus RNeasy Plus lysering buffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Tyskland
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

Utstyr	Leverandør
LAF-benk	Ivftech, Stenløse, Danmark
CO ₂ Inkubator skap, Model: MCO-18AIC	Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japan
Hettich ROTOFIX 32 Sentrifuge	Hettich LAB Technology North America, Massachusetts, USA
Sab Aqua Pro Vannbad	Grant Instruments Ltd, Cambridge, Storbritannia
Motic AE31 Mikroskop	Motic®, Kowloon, Hong Kong
C-Dish™ Lokkene med elektroder	IonOptix LLC, MA, USA
Costar® 6 brønners Brett med lokk	Corning Incorporated, NY, USA
Corning 15 ml/50ml Sentrifuge rør	Corning Science Mexico S.A. de C.V, Tamaulipas, Mexico
Elektrisk pulsstimulator	Elektronikklaboratoriet, Kjemisk institutt, Universitetet i Oslo

Vedlegg 4

Reagenser/kjemikaler og utstyr benyttet for proteinkonsentrasjons-måling med Bradfords metode og IL-6-måling med ELISA-kit.

Proteinkonsentrasjon måling

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich™, St.Louis, MO, USA
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Bio-Rad protein Assay Fargereagens konsentrat	BioRad Laboratories Inc-, CA, USA

Utstyr	Leverandør
Costar® 96-brønnersplate med flat bunn	Corning Incorporated, USA
Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor™ 3	PerkinElmer, Inc., Waltham, MA 02451 USA

IL-6-måling

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
Human IL-6 ELISA Kit Ref.: RAB0306-1KT Innehold: Humant IL-6 antistoff-belagt ELISA plate ELISA 1X Fortynningsbuffer A ELISA 5X Fortynningsbuffer B HRP- Streptavidin Biotinylert Humant IL-6 deteksjonsantistoff Lyophilized Humant IL-6 Proteinstandard ELISA stoppløsning ELISA Kolorimetrik TMB reagens (HRP substrat) 20X Vaske buffer	Sigma-Aldrich™, St.Louis, MO, USA

Utstyr	Leverandør
Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor™ 3	PerkinElmer, Inc., Waltham, MA 02451 USA
IKA-VIBRAX-VXR riste plate	Janke & Kunkel GmbH & -Co., Tyskland

Vedlegg 5

Reagenser /kjemikaler og utstyr brukt for isolering av ekstracellulære vesikler.

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
PBS (Phosphate Buffered Saline) Ref: 10010-015	Gibco® by life technologies™, Paisley, Skottland, Storbritannia

Utstyr	Leverandør
Sorvallrør	Beckman Coulter Inc., CA, USA
Sorvall RC 5C Plus Sentrifuge	Kendro Laboratory Products, Newtown, USA
Falcon 15/50 ml rør	Corning Science Mexico S.A. de C.V, Tamaulipas, Mexico
Amicon® Ultra 4, filter, Ultracel® 100K Ref: UFC810024	Merck Millipore Ltd., County Cork, Ireland
Centricon® Plus-70, Ultracel® PL-100 Ref: UFC710008	
Millex®GV Filter Unit 0,22 µm Ref: SLGU033RS	
Steril Sprøyte 10 ml/20 ml Ref: 4617100V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Tyskland
Hettich® ROTINA 420R Sentrifuge	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

Vedlegg 6

Reagenser/kjemikaler og utstyr brukt for analysering med NanoSight.

NanoSight

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
PBS (Phosphate Buffered Saline) Ref: 10010-015	Gibco® by life technologies™, Paisley, Skottland, Storbritannia
Polystyrene Latex Microspheres 100nm kuler	Life technologies™ Thermo Fisher Scientific, USA

Utstyr	Leverandør
NanoSight NS500	Malvern Instruments, Amesbury, Storbritannia
Inorganic membrane filter Anttop™ 25, 0,02 µm	GE Healthcare Life Sciences, Bukinghamshire, Storbritannia
Biosphere® SafeSeal rør 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co., Numbrecht, Tyskland
Terumo® Sprøyte 1 ml	TERUMO CORPORATION, Laguna, Filipinene
MS2 Minishaker IKA® (Vorteksmikser)	IKA® Works. Inc., Wilmington, NC, USA

Vedlegg 7

Reagenser/kjemikaler og utstyr brukt for analysering på flowcytometri.

Flowcytometri

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
PBS (Phosphate Buffered Saline) Ref: 10010-015	Gibco® by life technologies™, Paisley, Skottland, Storbritannia
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich™, St.Louis, MO, USA
Exosome- Human CD81 Flow Detection Ref: 10622D	Life Technologies AS, Oslo, Norge
BD Pharmingen™ PE MouseIgG1 k Isotype Control Cat: 559320	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD81 Cat: 555676	
Invitrogen Anti-Hu CD63, eBioscience™ Ref: 12-0639-42	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA

Utstyr	Leverandør
BD Accuri C6 Flowcytometer	Accuri Cytometers, Inc., Ann arbor, MI
HulaMixer® versjon: V.2A01.	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Oslo, Norge
Magnetplaten – DynaMag 2	Life technologies AS, Oslo, Norge
IKA® MTS 2/4 digital (Risteapparat)	IKA® Werke, Staufen im Breisgau, Tyskland
MS2 Minishaker IKA® (Vorteksmikser)	IKA® Works. Inc., Wilmington, NC, USA
Eppendorfrør 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland

Vedlegg 8

Reagenser/kjemikaler og utstyr brukt for proteinmåling fra EV.

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
Qubit TM Protein Assay Kit Ref:Q33211 Innehold: - Protein Reagens 200X konsentrert i 1,2-propanediol - Protein Buffer - Proteinstandard 1, konsentrasjon 0 ng/μl - Proteinstandard 2, konsentrasjon 200 ng/μl - Proteinstandard 3, konsentrasjon 400 ng/μl	Invitrogen by Life Technologies Corporation, Oregon, USA

Utstyr	Leverandør
Qubit [®] 2.0 Fluorometer	Invitrogen by Life Technologies Corporation, Oregon, USA
Eppendorfrør 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
MS2 Minishaker IKA [®] (Vorteksmikser)	IKA [®] Works. Inc., Wilmington, NC, USA

Vedlegg 9

Reagenser/kjemikaler og utstyr brukt for miRNA-isolering av EV.

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
miRNeasy Mikro Kit Katalog nr.: 217084 Innehold: - QIAzol Lyserings reagens - RNeasy [®] MinElute [®] Spinn Kolonne (pakket med 2 ml oppsamlingstube) - Buffer RWT - Buffer PRE - RNase-fri vann - Oppsamlingstube 1,5 ml og 2 ml	QIAGEN [®] , Hilden, Tyskland
Kloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Etanol absolutt	VWR Internasjonl S.A.S, Briare, Frankrike

Utstyr	Leverandør
Eppendorf Sentrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Eppendorfrør 0,5 ml	
MS2 Minishaker IKA [®] (Vorteksmikser)	IKA [®] Works. Inc., Wilmington, NC, USA

Vedlegg 10

Reagenser/kjemikaler og utstyr brukt for cDNA-syntese og real-time PCR

cDNA syntese

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
TaqMan [®] Advances miRNA Katalog nr. : A28007 Kittet innehold alle reagenser for cDNA syntese, se vedlegg 11	Thermo Fisher Scientific, CA, USA
RNase-fri vann	

real-time PCR

Reagenser / kjemikaler	Leverandør
TaqMan [®] Fast Advanced Master Mix(2X) Katalog nr.: 4444557	Thermo Fisher Scientific, CA, USA
TaqMan [®] Advanced miRNA Assay (20X) Se vedlegg 11 for mer informasjon om miRNA	
TE buffer pH 8.0 Katalog nr.: AM9849	
RNase-fri vann Katalog nr.: AM9932	

Utstyr	Leverandør
MS2 Minishaker IKA [®] (Vorteksmikser)	IKA [®] Works. Inc., Wilmington, NC, USA
VWR [®] Galaxy mini Sentrifuge	VWR Internasjonal, South Korea
Veriti [®] 96- Well Thermal Cycler (PCR maskin) Modell nr: 9902	Life Technologies Holdings Pte Ltd. Singapore
ViiA 7- Real-Time PCR maskin	

Vedlegg 11

Poly(A)-hale reaksjonsmiks.

Det ble benyttet 3 µl av poly(A) hale reaksjonsmiks i hver prøve.

Komponenter	Volum for 1 prøveløsning
10X Poly(A) Buffer	0,5 µl
ATP	0,5 µl
Poly(A) Enzym	0,3 µl
RNase-fri vann	1,7 µl
Total Poly(A) reaksjonsmiksvolum	3,0 µl

Adapter ligeringsreaksjonsmiks.

Det ble benyttet 10 µl av ligerings-reaksjonsmiks i hver prøve.

Komponenter	Volum for 1 prøveløsning
5X DNA Ligase Buffer	3 µl
50% PEG 8000	4,5 µl
25X Ligerings adapter	0,6 µl
RNA Ligase	1,5 µl
RNase-fri vann	0,4 µl
Total Ligerings reaksjonsmiksvolum	10 µl

Reverstranskripsjons (RT) reaksjonsmiks.

Det ble benyttet 15 µl av RT-reaksjonsmiks i hver prøve.

Komponenter	Volum for 1 prøveløsning
5X RT Buffer	6 µl
dNTP Miks (25mM hver)	1,2 µl
20X Universal RT Primere	1,5 µl
10X RT Enzyme Miks	3 µl
RNase-fri vann	3,3 µl
Total RT reaksjonsmiksvolum	15 µl

miR-Amp reaksjonsmiks.

Det ble benyttet 45 µl av miR-Amp reaksjonsmiks i hver prøve

Komponenter	Volum for 1 prøveløsning
2X miR-Amp Master miks	25 µl
20 miR-Amp Primer miks	2,5 µl
RNase-fri vann	17,5 µl
Total miR-Amp reaksjonsmiksvolum	45 µl

Real-time PCR reaksjonsmiks.

Det ble benyttet 15 µl av reaksjonsmiks i hver prøve.

Komponenter	Volum for 1 prøveløsning
TaqMan® Fast Advanced Master Mix(2X)	10 µl
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)* - miR-1-3p - miR-133a-3p - miR-206 - ath miR-159a - miR-223	1 µl
RNase-fri vann	4 µl
Total PCR reaksjonsmiksvolum	15 µl

* Det ble utarbeidet fem ulike PCR reaksjonsmiks for de fem ulike miRene.

Oversikt over mål-gener benyttet i kvantitativ PCR-analyse.

Mål gen	Arter	miR-sekvens
Ath miR-159a	Arabidopsis thaliana	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
miR-1-3p	Humant	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
miR-133a-3p	Humant	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
miR-206	Humant	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
miR-223	Humant	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA

Vedlegg 12

Resultater fra Bradford analysen i cellelysat fra 12 cellebrønn.

Totalproteinmengde i prøvene		
Donor	Kontroll (mg/ml)	EPS (mg/ml)
1	1,635	1,639
2	1,187	0,964
3	1,872	1,830
4	0,261	0,239
5	1,705	1,663
6	1,756	1,554
Gjennomsnitt (\pmSD)	1,4 (\pm 0,5)	1,3 (\pm 0,5)

Vedlegg 13

Liste over 77 proteiner tilstede i eksosomer isolert fra kontrollceller.

Myosin-2 OS=Homo sapiens GN=MYH2 PE=1 SV=1
Myosin-8 OS=Homo sapiens GN=MYH8 PE=1 SV=3
Myosin-1 OS=Homo sapiens GN=MYH1 PE=1 SV=3
Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens GN=MYO1C PE=1 SV=4
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=1 SV=1
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SHMT2 PE=1 SV=3
60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens GN=EEF1A2 PE=1 SV=1
Glycogen [starch] synthase, muscle OS=Homo sapiens GN=GYS1 PE=1 SV=2
Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens GN=EEF1D PE=1 SV=5
60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens GN=RPL5 PE=1 SV=3
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta OS=Homo sapiens GN=CAMK2D PE=1 SV=3
60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=3
[F-actin]-methionine sulfoxide oxidase MICAL1 OS=Homo sapiens GN=MICAL1 PE=1 SV=2
Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles OS=Homo sapiens GN=TNNC1 PE=1 SV=1
Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type OS=Homo sapiens GN=PFKL PE=1 SV=6
SWISS-PROT:Q15323 Keratin, type I cuticular HA1 (Hair keratin, type I HA1)
Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALDH7A1 PE=1 SV=5
SWISS-PROT:Q14525 Keratin, type I cuticular HA3-II (Hair keratin, type I HA3-II)
60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens GN=RPL13 PE=1 SV=4
ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X PE=1 SV=3
5'-nucleotidase OS=Homo sapiens GN=NT5E PE=1 SV=1
RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1
SWISS-PROT:P78386 Keratin, type II cuticular Hb5 (Hair keratin, type II Hb5) - Homo sapiens (Human).
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Homo sapiens GN=EIF3F PE=1 SV=1
60S ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4 OS=Homo sapiens GN=ATP1A4 PE=1 SV=3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Homo sapiens GN=PSMD6 PE=1 SV=1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Homo sapiens GN=PSMD13 PE=1 SV=2
Glypican-2 OS=Homo sapiens GN=GPC2 PE=2 SV=1
Calcyclin-binding protein OS=Homo sapiens GN=CACYBP PE=1 SV=2
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4
DnaJ homolog subfamily B member 4 OS=Homo sapiens GN=DNAJB4 PE=1 SV=1
TREMBL:Q8IUT8 Type I hair keratin 4 - Homo sapiens (Human).
Anthrax toxin receptor 1 OS=Homo sapiens GN=ANTXR1 PE=1 SV=2
Immunoglobulin heavy constant alpha 2 OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=4

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5
Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform OS=Homo sapiens GN=MYL1 PE=2 SV=3
Syndecan-2 OS=Homo sapiens GN=SDC2 PE=1 SV=2
Receptor expression-enhancing protein 5 OS=Homo sapiens GN=REEP5 PE=1 SV=3
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Homo sapiens GN=EIF3L PE=1 SV=1
N-acetyl-D-glucosamine kinase OS=Homo sapiens GN=NAGK PE=1 SV=4
Integrin beta-1-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=ITGB1BP2 PE=1 SV=1
Vesicle-associated membrane protein 5 OS=Homo sapiens GN=VAMP5 PE=1 SV=1
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Homo sapiens GN=IMPDH2 PE=1 SV=2
RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 PE=1 SV=3
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=UAP1L1 PE=1 SV=2
Myotrophin OS=Homo sapiens GN=MTPN PE=1 SV=2
Immunoglobulin gamma-1 heavy chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
Fermitin family homolog 3 OS=Homo sapiens GN=FERMT3 PE=1 SV=1
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha OS=Homo sapiens GN=SGTA PE=1 SV=1
LIM domain only protein 7 OS=Homo sapiens GN=LMO7 PE=1 SV=3
ADP-ribosylation factor 6 OS=Homo sapiens GN=ARF6 PE=1 SV=2
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type OS=Homo sapiens GN=PFKM PE=1 SV=2
Protein FAM3C OS=Homo sapiens GN=FAM3C PE=1 SV=1
Histone-binding protein RBBP4 OS=Homo sapiens GN=RBBP4 PE=1 SV=3
Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] OS=Homo sapiens GN=AKR1A1 PE=1 SV=3
Pro-cathepsin H OS=Homo sapiens GN=CTSH PE=1 SV=4
Ethylmalonyl-CoA decarboxylase OS=Homo sapiens GN=ECHDC1 PE=1 SV=2
Mannan-binding lectin serine protease 1 OS=Homo sapiens GN=MASP1 PE=1 SV=3
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PIIB PE=1 SV=2
Protein PML OS=Homo sapiens GN=PML PE=1 SV=3
Cullin-4B OS=Homo sapiens GN=CUL4B PE=1 SV=4
Alcohol dehydrogenase class-3 OS=Homo sapiens GN=ADH5 PE=1 SV=4
Serine/threonine-protein kinase PAK 2 OS=Homo sapiens GN=PAK2 PE=1 SV=3
WASH complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=WASHC4 PE=1 SV=2
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta OS=Homo sapiens GN=PFAFH1B2 PE=1 SV=1
Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACSF2 PE=1 SV=2
Immunoglobulin kappa variable 3D-20 OS=Homo sapiens GN=IGKV3D-20 PE=3 SV=1
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CLPX PE=1 SV=2
Unconventional myosin-1d OS=Homo sapiens GN=MYO1D PE=1 SV=2
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2
5'-nucleotidase domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=NT5DC3 PE=1 SV=1

Liste over 107 proteiner tilstede i eksosomer isolert fra EPS-behandlede celler.

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2
SWISS-PROT:P02535-1 Tax_Id=10090 Gene_Symbol=Krt10 Isoform 1 of Keratin, type I cytoskeletal 10
SWISS-PROT:O95678 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT75 Keratin, type II cytoskeletal 75
Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACO2 PE=1 SV=2
Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B10 PE=1 SV=3
Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=3
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHB PE=1 SV=3
SWISS-PROT:P12035 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT3 Keratin, type II cytoskeletal 3
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1
General vesicular transport factor p115 OS=Homo sapiens GN=USO1 PE=1 SV=2
SWISS-PROT:P07744 Tax_Id=10090 Gene_Symbol=Krt4 Keratin, type II cytoskeletal 4
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=OGDH PE=1 SV=3
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=P4HA2 PE=1 SV=1
Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=2
Transcriptional activator protein Pur-beta OS=Homo sapiens GN=PURB PE=1 SV=3
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens GN=EIF3B PE=1 SV=3
Serine/threonine-protein kinase DCLK1 OS=Homo sapiens GN=DCLK1 PE=1 SV=2
Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PABPC1 PE=1 SV=2
60S acidic ribosomal protein P1 OS=Homo sapiens GN=RPLP1 PE=1 SV=1
Protein unc-45 homolog B OS=Homo sapiens GN=UNC45B PE=1 SV=1
Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens GN=TFRC PE=1 SV=2
Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3 OS=Homo sapiens GN=ALDH1A3 PE=1 SV=2
Caldesmon OS=Homo sapiens GN=CALD1 PE=1 SV=3
Ras-related protein Rab-14 OS=Homo sapiens GN=RAB14 PE=1 SV=4
Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3
Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Homo sapiens GN=VPS35 PE=1 SV=2
Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2
Integrin alpha-3 OS=Homo sapiens GN=ITGA3 PE=1 SV=5

Polyadenylate-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=PABPC4 PE=1 SV=1
B-cell receptor-associated protein 31 OS=Homo sapiens GN=BCAP31 PE=1 SV=3
Dynamin-1-like protein OS=Homo sapiens GN=DNM1L PE=1 SV=2
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2 OS=Homo sapiens GN=SIRT2 PE=1 SV=2
Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1
Myosin regulatory light polypeptide 9 OS=Homo sapiens GN=MYL9 PE=1 SV=4
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens GN=EIF3M PE=1 SV=1
40S ribosomal protein S17 OS=Homo sapiens GN=RPS17 PE=1 SV=2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMD7 PE=1 SV=2
S-formylglutathione hydrolase OS=Homo sapiens GN=ESD PE=1 SV=2
Coronin-7 OS=Homo sapiens GN=CORO7 PE=1 SV=2
Stanniocalcin-2 OS=Homo sapiens GN=STC2 PE=1 SV=1
Vesicular integral-membrane protein VIP36 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1
Importin-9 OS=Homo sapiens GN=IPO9 PE=1 SV=3
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACOT9 PE=1 SV=2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 OS=Homo sapiens GN=PSMD5 PE=1 SV=3
TREMBL:Q61726 Tax_Id=10090 Gene_Symbol=5430421N21Rik Keratin type II
Hemoglobin subunit zeta OS=Homo sapiens GN=HBZ PE=1 SV=2
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=G6PD PE=1 SV=4
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HIBADH PE=1 SV=2
Sushi repeat-containing protein SRPX OS=Homo sapiens GN=SRPX PE=1 SV=1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Homo sapiens GN=PSMD14 PE=1 SV=1
AP-2 complex subunit beta OS=Homo sapiens GN=AP2B1 PE=1 SV=1
Mitogen-activated protein kinase 3 OS=Homo sapiens GN=MAPK3 PE=1 SV=4
Immunoglobulin lambda constant 2 OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
Calponin-3 OS=Homo sapiens GN=CNN3 PE=1 SV=1
Nebulin OS=Homo sapiens GN=NEB PE=1 SV=5
Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens GN=CHMP4B PE=1 SV=1
Kinectin OS=Homo sapiens GN=KTN1 PE=1 SV=1
COP9 signalosome complex subunit 7a OS=Homo sapiens GN=COPS7A PE=1 SV=1
Glucosylceramidase OS=Homo sapiens GN=GBA PE=1 SV=3
V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Homo sapiens GN=ATP6V1A PE=1 SV=2
Coronin-6 OS=Homo sapiens GN=CORO6 PE=1 SV=2

Choline transporter-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLC44A2 PE=1 SV=3
Protein S100-A16 OS=Homo sapiens GN=S100A16 PE=1 SV=1
Aldo-keto reductase family 1 member C2 OS=Homo sapiens GN=AKR1C2 PE=1 SV=3
Dynamin-2 OS=Homo sapiens GN=DNM2 PE=1 SV=2
Proteasome activator complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PSME2 PE=1 SV=4
Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=RRBP1 PE=1 SV=4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS=Homo sapiens GN=HNRNPH3 PE=1 SV=2
Vigilin OS=Homo sapiens GN=HDLBP PE=1 SV=2
60S ribosomal protein L29 OS=Homo sapiens GN=RPL29 PE=1 SV=2
Utrophin OS=Homo sapiens GN=UTRN PE=1 SV=2
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens GN=EIF3I PE=1 SV=1
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha OS=Homo sapiens GN=PMPCA PE=1 SV=2
Sorcin OS=Homo sapiens GN=SRI PE=1 SV=1
Pyridoxal kinase OS=Homo sapiens GN=PDXK PE=1 SV=1
Serine/arginine-rich splicing factor 10 OS=Homo sapiens GN=SRSF10 PE=1 SV=1
GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AK3 PE=1 SV=4
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog OS=Homo sapiens GN=VTA1 PE=1 SV=1
Growth/differentiation factor 15 OS=Homo sapiens GN=GDF15 PE=1 SV=3
Caprin-1 OS=Homo sapiens GN=CAPRIN1 PE=1 SV=2
Sepiapterin reductase OS=Homo sapiens GN=SPR PE=1 SV=1
Synaptophysin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=SYPL1 PE=1 SV=1
Serine--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SARS2 PE=1 SV=1
Ataxin-10 OS=Homo sapiens GN=ATXN10 PE=1 SV=1
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit OS=Homo sapiens GN=FARSB PE=1 SV=3
Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform OS=Homo sapiens GN=PPP3CB PE=1 SV=2
Enhancer of rudimentary homolog OS=Homo sapiens GN=ERH PE=1 SV=1
Dynactin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=DCTN2 PE=1 SV=4
Lysosomal alpha-glucosidase OS=Homo sapiens GN=GAA PE=1 SV=4
Prolyl endopeptidase OS=Homo sapiens GN=PREP PE=1 SV=2
40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=1 SV=1
Phosphoacetylglucosamine mutase OS=Homo sapiens GN=PGM3 PE=1 SV=1
Nucleobindin-2 OS=Homo sapiens GN=NUCB2 PE=1 SV=2

Zyxin OS=Homo sapiens GN=ZYX PE=1 SV=1
Platelet-derived growth factor receptor beta OS=Homo sapiens GN=PDGFRB PE=1 SV=1
Thimet oligopeptidase OS=Homo sapiens GN=THOP1 PE=1 SV=2
GDP-L-fucose synthase OS=Homo sapiens GN=TSTA3 PE=1 SV=1
Follistatin OS=Homo sapiens GN=FST PE=1 SV=2
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=NMT1 PE=1 SV=2
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 OS=Homo sapiens GN=EIF2S2 PE=1 SV=2
Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens GN=DDX21 PE=1 SV=5
Ubiquitin thioesterase OTUB1 OS=Homo sapiens GN=OTUB1 PE=1 SV=2
CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens GN=CD59 PE=1 SV=1
Spermatid perinuclear RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=STRBP PE=1 SV=1
Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform OS=Homo sapiens GN=MYL2 PE=1 SV=3

Vedlegg 14

Liste over 49 proteiner tilstede i MV isolert fra kontrollceller.

SWISS-PROT:Q9TTE1 (Bos taurus) Endopin-1 precursor
SWISS-PROT:P02538 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT6A Keratin, type II cytoskeletal 6A
SWISS-PROT:P08779 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT16 Keratin, type I cytoskeletal 16
(Bos taurus) 44 kDa protein
Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1
Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 PE=1 SV=2
Extracellular matrix protein FRAS1 OS=Homo sapiens GN=FRAS1 PE=1 SV=2
Reticulocalbin-3 OS=Homo sapiens GN=RCN3 PE=1 SV=1
Metalloproteinase inhibitor 2 OS=Homo sapiens GN=TIMP2 PE=1 SV=2
Plexin domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=PLXDC2 PE=1 SV=1
Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Homo sapiens GN=HEXB PE=1 SV=3
Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2AFZ PE=1 SV=2
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 OS=Homo sapiens GN=PLOD3 PE=1 SV=1
Transforming growth factor beta-2 OS=Homo sapiens GN=TGFB2 PE=1 SV=1
Collagen alpha-2(IV) chain OS=Homo sapiens GN=COL4A2 PE=1 SV=4
Glycogen phosphorylase, muscle form OS=Homo sapiens GN=PYGM PE=1 SV=6
Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2
Metallothionein-2 OS=Homo sapiens GN=MT2A PE=1 SV=1
Low-density lipoprotein receptor OS=Homo sapiens GN=LDLR PE=1 SV=1
Ras-related protein Rab-8B OS=Homo sapiens GN=RAB8B PE=1 SV=2
ATPase family AAA domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens GN=ATAD3B PE=1 SV=1
CD63 antigen OS=Homo sapiens GN=CD63 PE=1 SV=2
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2 OS=Homo sapiens GN=POLR3B PE=1 SV=2
Septin-8 OS=Homo sapiens GN=SEPT8 PE=1 SV=4
Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1
ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens GN=ARF5 PE=1 SV=2
Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
Growth/differentiation factor 15 OS=Homo sapiens GN=GDF15 PE=1 SV=3
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Homo sapiens GN=CNP PE=1 SV=2
Pleckstrin homology domain-containing family A member 4 OS=Homo sapiens GN=PLEKHA4 PE=1 SV=2
Serine--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SARS2 PE=1 SV=1
28S ribosomal protein S31, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS31 PE=1 SV=3
Putative phospholipase B-like 2 OS=Homo sapiens GN=PLBD2 PE=1 SV=2
Gamma-tubulin complex component 2 OS=Homo sapiens GN=TUBGCP2 PE=1 SV=2
Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] OS=Homo sapiens GN=QPRT PE=1 SV=3
DnaJ homolog subfamily C member 3 OS=Homo sapiens GN=DNAJC3 PE=1 SV=1
Matrix Gla protein OS=Homo sapiens GN=MGP PE=1 SV=2
Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACSF2 PE=1 SV=2
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 OS=Homo sapiens GN=PACSIN2 PE=1 SV=2
SURP and G-patch domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=SUGP2 PE=1 SV=2
AFG3-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=AFG3L2 PE=1 SV=2

Endoglin OS=Homo sapiens GN=ENG PE=1 SV=2
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=GDAP2 PE=1 SV=1
Protein NipSnap homolog 3A OS=Homo sapiens GN=NIPSNAP3A PE=1 SV=2
Cysteine desulfurase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NFS1 PE=1 SV=3
Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GCDH PE=1 SV=1
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=CISD1 PE=1 SV=1
5'-nucleotidase domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=NT5DC3 PE=1 SV=1
Amine oxidase [flavin-containing] A OS=Homo sapiens GN=MAOA PE=1 SV=1

Liste 47 over proteiner tilstede i MV isolert fra EPS-behandlede celler.

SWISS-PROT:P02768-1 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=ALB Isoform 1 of Serum albumin precursor
SWISS-PROT:P01045-1 (Bos taurus) Isoform HMW of Kininogen-2 precursor
Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=ECM1 PE=1 SV=2
Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3
Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=2
Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=CARS PE=1 SV=3
Thrombospondin-4 OS=Homo sapiens GN=THBS4 PE=1 SV=2
DNA damage-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=DDB1 PE=1 SV=1
Aggrecan core protein OS=Homo sapiens GN=ACAN PE=1 SV=2
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 OS=Homo sapiens GN=ATP2B4 PE=1 SV=2
Kinesin light chain 2 OS=Homo sapiens GN=KLC2 PE=1 SV=1
Glycogen debranching enzyme OS=Homo sapiens GN=AGL PE=1 SV=3
HLA class I histocompatibility antigen, B-55 alpha chain OS=Homo sapiens GN=HLA-B PE=1 SV=1
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17 PE=1 SV=2
Lysine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=KARS PE=1 SV=3
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CAMK2G PE=1 SV=3
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PPP1CC PE=1 SV=1
Thymosin beta-10 OS=Homo sapiens GN=TMSB10 PE=1 SV=2
HLA class I histocompatibility antigen, A-33 alpha chain OS=Homo sapiens GN=HLA-A PE=1 SV=3
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform OS=Homo sapiens GN=MYL1 PE=2 SV=3
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=FXR1 PE=1 SV=3
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=FXR2 PE=1 SV=2
Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=1 SV=2

PDZ and LIM domain protein 3 OS=Homo sapiens GN=PDLIM3 PE=1 SV=1
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2 OS=Homo sapiens GN=MAP2K2 PE=1 SV=1
UV excision repair protein RAD23 homolog B OS=Homo sapiens GN=RAD23B PE=1 SV=1
Glutathione S-transferase omega-1 OS=Homo sapiens GN=GSTO1 PE=1 SV=2
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 OS=Homo sapiens GN=MAP2K1 PE=1 SV=2
Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=RRBP1 PE=1 SV=4
Vigilin OS=Homo sapiens GN=HDLBP PE=1 SV=2
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens GN=ACSL4 PE=1 SV=2
Chromobox protein homolog 1 OS=Homo sapiens GN=CBX1 PE=1 SV=1
Ankyrin repeat domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ANKRD2 PE=1 SV=3
ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCE1 PE=1 SV=1
Serine/arginine-rich splicing factor 7 OS=Homo sapiens GN=SRSF7 PE=1 SV=1
LIM and SH3 domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=LASP1 PE=1 SV=2
Ataxin-10 OS=Homo sapiens GN=ATXN10 PE=1 SV=1
Calponin-2 OS=Homo sapiens GN=CNN2 PE=1 SV=4
Caspase-6 OS=Homo sapiens GN=CASP6 PE=1 SV=2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB PE=1 SV=2
Striatin-3 OS=Homo sapiens GN=STRN3 PE=1 SV=3
ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2 OS=Homo sapiens GN=BST1 PE=1 SV=2
Protein TFG OS=Homo sapiens GN=TFG PE=1 SV=2
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=NMT1 PE=1 SV=2
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 OS=Homo sapiens GN=PRPS2 PE=1 SV=2
SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2 OS=Homo sapiens GN=SRGAP2 PE=1 SV=2
Peflin OS=Homo sapiens GN=PEF1 PE=1 SV=1

Vedlegg 15

Liste over 57 proteiner som var signifikant forskjellige i mikrovesikler fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Student's N	Stude N	Protein IDs	Majority protein IDs	antilog
0,8384	18,6	sp Q8IZP0 ABI1_HUMAN	sp Q8IZP0 ABI1_HUMAN	6,89
0,5838	8,62	sp Q9P2P6 STAR9_HUMAN	sp Q9P2P6 STAR9_HUMAN	3,84
0,4136	7,44	sp Q16531 DDB1_HUMAN	sp Q16531 DDB1_HUMAN	2,59
0,3807	4,99	sp Q13151 ROA0_HUMAN	sp Q13151 ROA0_HUMAN	2,40
0,2131	6,07	sp Q9BXK5 B2L13_HUMAN	sp Q9BXK5 B2L13_HUMAN	1,63
0,1342	37,1	sp P23381 SYWC_HUMAN	sp P23381 SYWC_HUMAN	1,36
0,1303	6,21	sp Q15233 NONO_HUMAN	sp Q15233 NONO_HUMAN	1,35
0,1202	4,52	sp P20042 IF2B_HUMAN	sp P20042 IF2B_HUMAN	1,32
0,1173	5	sp Q13185 CBX3_HUMAN	sp Q13185 CBX3_HUMAN	1,31
0,1063	4,42	sp Q8WWI1 LMO7_HUMAN	sp Q8WWI1 LMO7_HUMAN	1,28
0,1059	5,36	sp O00505 IMA4_HUMAN	sp O00505 IMA4_HUMAN	1,28
0,1044	5,3	sp O60716 CTND1_HUMAN	sp O60716 CTND1_HUMAN	1,27
0,0994	4,37	sp Q04446 GLGB_HUMAN	sp Q04446 GLGB_HUMAN	1,26
0,0959	4,62	sp Q6NZI2 CAVN1_HUMAN	sp Q6NZI2 CAVN1_HUMAN	1,25
0,0913	4,82	sp O94979 SC31A_HUMAN	sp O94979 SC31A_HUMAN	1,23
0,0912	6,98	sp Q9Y285 SYFA_HUMAN	sp Q9Y285 SYFA_HUMAN	1,23
0,0836	17,5	sp P31942 HNRH3_HUMAN	sp P31942 HNRH3_HUMAN	1,21
0,0761	12	sp P31948 STIP1_HUMAN	sp P31948 STIP1_HUMAN	1,19
0,0747	4,36	sp Q9HBL0 TENS1_HUMAN;sp Q63	sp Q9HBL0 TENS1_HUMAN	1,19
0,0708	10,1	sp Q15365 PCBP1_HUMAN;sp P57	sp Q15365 PCBP1_HUMAN	1,18
0,0696	10,7	sp Q99832 TCPH_HUMAN	sp Q99832 TCPH_HUMAN	1,17
0,0667	5,62	sp P63261 ACTG_HUMAN	sp P63261 ACTG_HUMAN	1,17
0,0656	4,45	sp P11940 PABP1_HUMAN;sp Q4V	sp P11940 PABP1_HUMAN	1,16
0,0634	4,38	sp P31943 HNRH1_HUMAN	sp P31943 HNRH1_HUMAN	1,16
0,0618	8,15	sp Q08211 DHX9_HUMAN	sp Q08211 DHX9_HUMAN	1,15
0,0568	6,64	sp Q00341 VIGLN_HUMAN	sp Q00341 VIGLN_HUMAN	1,14
0,0516	4,84	sp Q96AC1 FERM2_HUMAN;sp Q9	sp Q96AC1 FERM2_HUMAN	1,13
0,0491	9,17	sp P49327 FAS_HUMAN	sp P49327 FAS_HUMAN	1,12
0,0465	7,03	sp O60506 HNRPQ_HUMAN	sp O60506 HNRPQ_HUMAN	1,11
0,0437	10,2	sp Q8WUM4 PDC6I_HUMAN	sp Q8WUM4 PDC6I_HUMAN	1,11
0,0433	4,49	sp P62191 PRS4_HUMAN	sp P62191 PRS4_HUMAN	1,10
0,0432	5,44	sp Q9NVA2 SEP11_HUMAN;sp Q14	sp Q9NVA2 SEP11_HUMAN	1,10
0,0427	4,55	sp P11055 MYH3_HUMAN;sp A7E2	sp P11055 MYH3_HUMAN	1,10
0,0403	5,52	sp Q13509 TBB3_HUMAN	sp Q13509 TBB3_HUMAN	1,10
0,0366	4,69	sp P62140 PP1B_HUMAN	sp P62140 PP1B_HUMAN	1,09
0,0344	16,6	sp P78527 PRKDC_HUMAN	sp P78527 PRKDC_HUMAN	1,08
0,0321	4,63	sp Q99627 CSN8_HUMAN	sp Q99627 CSN8_HUMAN	1,08
0,03	4,38	sp Q9UKX2 MYH2_HUMAN	sp Q9UKX2 MYH2_HUMAN	1,07
0,0224	4,99	sp Q03169 TNAP2_HUMAN	sp Q03169 TNAP2_HUMAN	1,05
0,0223	6,78	sp O15075 DCLK1_HUMAN;sp O43	sp O15075 DCLK1_HUMAN	1,05
0,0217	4,71	sp Q04637 IF4G1_HUMAN	sp Q04637 IF4G1_HUMAN	1,05
-0,0253	-9,1	sp P36957 ODO2_HUMAN	sp P36957 ODO2_HUMAN	0,94
-0,0458	-6,6	sp Q99733 NP1L4_HUMAN	sp Q99733 NP1L4_HUMAN	0,90
-0,0478	-8,1	sp P22392 NDKB_HUMAN;sp O603	sp P22392 NDKB_HUMAN;sp O60361 NDK8_H	0,90
-0,0547	-7,7	sp O96005 CLPT1_HUMAN	sp O96005 CLPT1_HUMAN	0,88
-0,0643	-11	sp P78417 GSTO1_HUMAN	sp P78417 GSTO1_HUMAN	0,86
-0,0669	-7	sp Q9NRX5 SERC1_HUMAN	sp Q9NRX5 SERC1_HUMAN	0,86
-0,0679	-23	sp O43264 ZW10_HUMAN	sp O43264 ZW10_HUMAN	0,86
-0,069	-7,4	sp Q9P2B2 FPRP_HUMAN	sp Q9P2B2 FPRP_HUMAN	0,85
-0,1054	-7	sp Q9UBS4 DJB11_HUMAN	sp Q9UBS4 DJB11_HUMAN	0,78
-0,1204	-5,5	sp Q14393 GAS6_HUMAN	sp Q14393 GAS6_HUMAN	0,76
-0,1541	-6,4	sp P04439 1A03_HUMAN;sp P3045	sp P04439 1A03_HUMAN;sp P30455 1A36_HU	0,70
-0,1571	-5,5	sp Q7L0Y3 TM10C_HUMAN	sp Q7L0Y3 TM10C_HUMAN	0,70
-0,1608	-4,5	sp P02649 APOE_HUMAN	sp P02649 APOE_HUMAN	0,69
-0,2017	-5,2	sp Q9UDR5 AASS_HUMAN	sp Q9UDR5 AASS_HUMAN	0,63
-0,2525	-17	sp Q9NRG7 D39U1_HUMAN	sp Q9NRG7 D39U1_HUMAN	0,56
-0,4348	-5,6	sp P27144 KAD4_HUMAN	sp P27144 KAD4_HUMAN	0,37

Vedlegg 16

Liste over 75 proteiner som var signifikant forskjellige i eksosomer fra EPS-behandlede celler i forhold til kontrollceller.

Studer N	Studer N	Protein IDs T	Majority protein IDs T	antilog
0,6	3,44	sp O95816 BAG2_HUMAN	sp O95816 BAG2_HUMAN	3,99
0,5	2,89	sp Q14697 GANAB_HUMAN	sp Q14697 GANAB_HUMAN	3,15
0,42	3,74	sp O75369 FLNB_HUMAN	sp O75369 FLNB_HUMAN	2,63
0,39	3,07	sp P46821 MAP1B_HUMAN	sp P46821 MAP1B_HUMAN	2,43
0,36	3,37	sp Q92598 HS105_HUMAN	sp Q92598 HS105_HUMAN	2,31
0,36	3,13	sp P49588 SYAC_HUMAN	sp P49588 SYAC_HUMAN	2,31
0,36	2,72	sp Q99584 S10AD_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	2,27
0,34	4,91	sp O94979 SC31A_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	2,18
0,34	3,26	sp Q02218 ODO1_HUMAN;sp Q99584 S10AD_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	2,17
0,33	2,72	sp Q7KZF4 SND1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	2,16
0,3	2,99	sp Q15942 ZYG_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	2,01
0,3	3,52	sp P11940 PABP1_HUMAN;sp Q99584 S10AD_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	2,00
0,3	3	sp P48147 PPCE_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,99
0,28	2,62	sp Q96TA1 NIBL1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,91
0,28	2,75	sp O95302 FKBP9_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,91
0,27	3,18	sp P61978 HNRPK_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,87
0,27	4,11	sp Q01518 CAP1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,86
0,26	3,64	sp Q9Y3F4 STRAP_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,82
0,25	3,17	sp P30533 AMRP_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,77
0,25	4,39	sp P13489 RINI_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,76
0,24	5,49	sp P27816 MAP4_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,72
0,22	3,28	sp P23381 SYWC_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,68
0,22	3,72	sp P62244 RS15A_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,65
0,21	2,94	sp Q702N8 XIRP1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,62
0,19	2,68	sp P78417 GSTO1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,56
0,19	5	sp P00488 F13A_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,55
0,18	4,52	sp P06576 ATPB_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,50
0,16	5,02	sp O75083 WDR1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,43
0,14	3,08	sp P14649 MYL6B_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,39
0,14	5,73	sp Q9Y4K0 LOXL2_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,39
0,14	4,3	sp P12081 SYHC_HUMAN;sp P49584 S10AD_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,38
0,14	2,94	sp P22392 NDKB_HUMAN;sp O60284 S10AD_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,37
0,13	6,49	sp P15311 EZRI_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,34
0,12	3,78	sp Q06830 PRDX1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,32
0,11	2,93	sp Q13011 ECH1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,30
0,11	3,48	sp P17931 LEG3_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,29
0,11	2,58	sp Q9NYU2 UGGG1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,29
0,11	2,79	sp P46940 IQGA1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,28
0,11	2,6	sp P13639 EF2_HUMAN;sp Q150284 S10AD_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,28
0,11	2,89	sp Q14315 FLNC_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,28
0,1	3,6	sp P67809 YBOX1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,25
0,1	3,42	sp P07814 SYEP_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,25
0,1	4,48	sp P17661 DESM_HUMAN;sp P07814 S10AD_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,25
0,09	3,24	sp P18206 VINC_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,24
0,09	3,04	sp Q15149 PLEC_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,24
0,09	3,01	sp Q15582 BGH3_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,22
0,08	4,09	sp P78559 MAP1A_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,20
0,06	3,19	sp Q02809 PLOD1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,16
0,06	2,9	sp P21333 FLNA_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,16
0,06	2,61	sp O00469 PLOD2_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,15
0,06	2,58	sp P60660 MYL6_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN	1,15

-0,06	-4,06	sp P12109 CO6A1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,86
-0,07	-2,77	sp O94985 CSTN1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,86
-0,09	-2,6	sp P09603 CSF1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,82
-0,09	-3,74	sp P05155 IC1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,81
-0,09	-4,76	sp P09486 SPRC_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,80
-0,1	-3,9	sp Q13219 PAPP1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,80
-0,1	-3,34	sp Q13867 BLMH_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,80
-0,11	-3,03	sp Q6YHK3 CD109_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,78
-0,12	-2,6	sp O14793 GDF8_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,77
-0,12	-3,55	sp Q16394 EXT1_HUMAN;sp Q92	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,76
-0,12	-2,76	sp P13798 ACPH_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,75
-0,13	-2,71	sp P98095 FBLN2_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,73
-0,16	-3,49	sp O75326 SEM7A_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,70
-0,16	-3,92	sp P01023 A2MG_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,69
-0,17	-4,09	sp P02462 CO4A1_HUMAN;sp P2	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,68
-0,18	-2,97	sp Q16270 IBP7_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,67
-0,18	-2,83	sp Q02952 AKA12_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,66
-0,18	-4,46	sp P13497 BMP1_HUMAN;sp Q9Y	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,66
-0,19	-4,16	sp P02649 APOE_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,65
-0,19	-3	sp O43827 ANGL7_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,64
-0,2	-4,58	sp P13591 NCAM1_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,64
-0,2	-4,23	sp O95965 ITGBL_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,63
-0,25	-6,15	sp O95498 VNN2_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,57
-0,48	-2,96	sp P05109 S10A8_HUMAN	sp Q99584 S10AD_HUMAN		0,33