

Effekter av elektrisk stimulering av humane skjelettmuskelceller

- Utprøving av en *in vitro*-treningsmodell

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Ingeborg Flo Halle

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Effekter av elektrisk stimulering av humane skjelettmuskelceller

- Utprøving av en *in vitro*-treningsmodell

Ingeborg Flo Halle

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Veiledere

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Førsteamanuensis Vigdis Aas

Stipendiat Nataša Nikolić

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2010 til mai 2011. Deler av masteroppgaven ble presentert ved fremvisning av poster på Farmakologisk vintermøte på Beitostølen 27.-30. januar 2011.

Jeg ønsker å rette en stor takk til mine veiledere, professor G. Hege Thoresen, professor Arild C. Rustan, førsteamanuensis Vigdis Aas og Nataša Nikolić for meget god oppfølging, rådgivning, veiledning og støtte gjennom hele masteroppgaven. Stor takk til Nataša Nikolić for å ha besvart store og små spørsmål og for god veiledning og opplæring på lab. En stor takk rettes også til professor G. Hege Thoresen for god hjelp og veiledning under skriveprosessen. En stor takk rettes til Camilla Stensrud og Åse-Karine Fjeldheim for opplæring i metoder og gode råd underveis i det praktiske arbeidet. En stor takk går også til medlemmene av "Muskelbunten" for kunnskapsrike og interessante ukentlige møter. Takk til alle som jobber i 4.etasje for et hyggelig arbeidsmiljø.

En stor takk går til den fantastiske gjengen i hjørnet på lesesalen for å ha gjort dette året uforglemmelig på så mange måter. En spesiell takk går til Lisbeth, Line og Ingveig for godt vennskap, samarbeid, gode samtaler og mye hygge.

Jeg vil takke min familie som gjennom hele studiet har støttet og motivert meg. Sist men ikke minst vil jeg takke Espen for at du er så snill og tålmodig, takk for uvurderlig støtte, omtanke og for at du alltid har stilt opp for meg.

Blindern, mai 2011

Ingeborg Flo Halle

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	7
Summary in English	8
Forkortelser	9
1 Innledning	12
1.1 Trening og livsstilsrelaterte sykdommer	12
1.1.1 Type 2-diabetes og insulinresistens.....	12
1.1.2 Elektrisk pulsstimulering.....	14
1.2 Fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel.....	14
1.2.1 Fettsyremetabolisme.....	14
1.2.2 Glukosemetabolisme	15
1.2.3 Oksidativ fosforylering	16
1.3 Effekter av trening på fettsyremetabolismen.....	18
1.3.1 Transport av fettsyrer inn i mitokondriene.....	18
1.3.2 Muskelfibertype	19
1.3.3 PPAR δ og PGC-1 α	20
1.4 Effekter av trening på glukosemetabolismen	23
1.4.1 Treningsindusert glukoseopptak	23
1.4.2 Mekanismer bak treningsindusert glukoseopptak	24
1.4.3 Pyruvat-dehydrogenasekinase 4 (PDK4)	26
1.5 Interleukin-6 (IL-6).....	27
1.6 Substanser som ble benyttet i forbehandling av cellene.....	28
1.6.1 GW 501516	28
1.6.2 Oljesyre	29
1.7 Formål med oppgaven	30
2 Materialer og metoder	31
2.1 Materialer.....	31
2.2 Donoropplysninger	32
2.3 Celledyrkning	33
2.3.1 Utsåing av satelittceller	33
2.3.2 Vekst av satelittceller og differensiering til myotuber	33
2.3.3 Forbehandling med oljesyre og GW 501516	33

2.4	Elektrisk stimulering av muskelceller	34
2.5	Substrat-oksidasjonsforsøk i 6-brønners brett	34
2.5.1	Substrat-oksidasjonsforsøk med oljesyre	35
2.5.2	Proteinmåling	36
2.6	Revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon	36
2.6.1	Høsting av celler.....	38
2.6.2	RNA-isolering	38
2.6.3	cDNA-syntese	39
2.6.4	Real-time-PCR	39
2.7	Immunoblotting (Westernblotting).....	40
2.7.1	Høsting av celler til Westernblotting	42
2.7.2	Proteinmåling	42
2.7.3	Støping av geler.....	43
2.7.4	Gelelektroforese	43
2.7.5	Blotting.....	43
2.7.6	Deteksjon av immunoblott	44
2.7.7	Fremkalling	44
2.8	Statistiske analyser	45
3	Resultater	46
3.1	Utsåing av celler til elektrisk pulsstimulering (EPS).....	46
3.2	Oksidasjon og opptak av oljesyre	47
3.2.1	Effekter av EPS på oljesyremetabolismen	47
3.2.2	Effekter av EPS og forbehandling med GW 501516 på oljesyremetabolismen	48
3.2.3	Effekter av EPS og forbehandling med oljesyre på oljesyremetabolismen	49
3.3	Effekter av EPS på genekspresjon.....	50
3.3.1	Effekter av EPS på ekspresjonen av gener som påvirker fettsyremetabolismen	50
3.3.2	Effekter av EPS på ekspresjonen av gener som påvirker glukosemetabolismen.....	51
3.3.3	Effekter av EPS på IL-6	53
3.4	Effekter av EPS på ulike proteiner involvert i glukose- og fettsyremetabolismen	54
3.4.1	Oksidativ fosforylering	54
3.4.2	PGC-1 α	55
3.4.3	Effekter av EPS på fosforylert Akt	55
4	Diskusjon.....	56

4.1	<i>In vitro</i> -treningsmodell	56
4.2	Effekter av EPS på oljesyremetabolismen.....	56
4.3	Effekter av EPS på genekspressjon.....	57
4.4	Effekter av EPS på ulike proteiner involvert i glukose- og fettsyremetabolismen ...	59
5	Konklusjon.....	61
	Litteraturliste.....	62
	Appendiks	67

Sammendrag

Bakgrunn/formål: I de senere årene har det vært en kraftig økning i forekomsten av kroniske sykdommer som inkluderer fedme og type 2-diabetes. Hovedårsaken til dette er en stillesittende livsstil kombinert med for høyt næringsinntak. Fysisk aktivitet har en beskyttende funksjon mot disse sykdommene og har vist seg å være en effektiv behandlingsform. De positive effektene av trening på glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskel spiller trolig en rolle, men de cellulære mekanismene bak disse effektene er vanskelig å studere *in vivo*. For å kunne studere direkte effekter av trening på muskel uten påvirkning av systemiske faktorer, har det tidligere blitt utviklet en *in vitro* modell for trening ved bruk av elektrisk pulsstimulering (EPS) av myotuber i kultur. Formålet med denne masteroppgaven var å teste ut denne modellen, ved å undersøke om EPS av humane skjelettmuskelceller i kultur ville vise de samme effektene som er sett etter trening *in vivo*.

Metode: Satelittceller ble isolert fra biopsier fra *M. obliquus internus abdominis*. Etter differensiering til myotuber ble de kontinuerlig stimulert med lav-frekvent EPS (1 Hz, 30 V, 2 ms) de siste 24-48 timene av differensieringen. I forbehandlingsforsøkene ble myotubene kontinuerlig behandlet med PPAR δ agonisten GW 501516 eller oljesyre i henholdsvis de siste 48 eller 24 timene av differensieringen. Fettsyremetabolismen i celler behandlet med EPS ble undersøkt ved bruk av radioaktivt merket [^{14}C]oljesyre. Forandringer i genekspressjon ble undersøkt ved RT-real-time-PCR. Immunoblotting ble brukt for å detektere og kvantifisere proteiner av interesse.

Resultater: Ved å gi en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen, økte kronisk lav-frekvent elektrisk pulsstimulering den oksidative kapasiteten til humane skjelettmuskelceller. Videre ga EPS en signifikant økning i ekspresjonen av CPT1b og en tendens til økt ekspresjon av PDK4 og PGC-1 α som er gener involvert i glukose- og lipidmetabolisme. EPS ga en tendens til økt ekspresjon av IL-6, dette kan indikere at humane skjelettmuskelceller *in vitro* kontraherer under elektrisk stimulering. Forbehandling med GW 501516 eller oljesyre ga ingen økning utover den EPS-stimulerte økningen i oksidasjonen av oljesyre.

Konklusjon: Vår modell for elektrisk stimulering av humane skjelettmuskelceller i kultur viser mange av de samme effektene som er sett etter trening *in vivo*. Vi kan dermed konkludere med at vår modell kan brukes for å studere effekter av trening *in vitro*.

Summary in English

Background/aims: In recent years there has been a strong increase in the prevalence of chronic metabolic disorders including obesity and type 2 diabetes. The main reason for this is a sedentary lifestyle combined with a high nutrient intake. Physical activity offers protection against these diseases and has been proven as an effective treatment. Some of these beneficial effects are mediated through an improved glucose- and lipid metabolism in skeletal muscle. The cellular mechanisms behind these effects of exercise are difficult to study *in vivo*, since exercise induces major systemic responses. To be able to study the effects of exercise on muscle without the influence of systemic factors, our lab has developed an *in vitro* model for exercise by electrical puls stimulation (EPS) of cultured human myotubes. The purpose of this thesis was to test out this model by examining whether EPS of human skeletal muscle cells in culture would induce some of the same effects as seen *in vivo* after exercise.

Methods: Satellite cells were isolated from biopsy samples from *M. obliquus internus abdominis* and differentiated into multinucleated myotubes. Low-frequency (1 Hz, 30 V, 2 ms) EPS was applied continuously for the last 24–48 h of the differentiation period. Lipid metabolism was studied using radio-labeled [¹⁴C]oleic acid. In the pretreatment experiments the cells were continuously treated with the PPAR δ agonist GW 501516 or oleic acid for the last 48 or 24 hours of the differentiation period, respectively. Gene expression was analyzed using RT-real-time-PCR and protein expression was assessed by immunoblotting.

Results: Our model of chronic, low-frequency EPS increased the oxidative capacity of cultured myotubes by increasing fatty acid oxidation, while the fatty acid uptake was unaffected. Pretreatment with GW 501516 or oleic acid did not seem to have any effects on oleic acid oxidation on EPS-treated cells. Further, mRNA-expression level of CPT1b was increased by EPS. mRNA expression levels of PGC-1 α , PDK4 and IL-6 were also increased, but not significantly.

Conclusions: Our model of electrical stimulation of human skeletal muscle cells in culture shows many of the same effects as seen *in vivo* after exercise. Therefore, our results imply that our model of chronic, low-frequent EPS of human myotubes in culture can be used to study effects of exercise *in vitro*.

Forkortelser

36B4	“Human acididic ribosomal phosphoprotein PO”
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
ADP	Adenosindifosfat
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMP	Adenosin monofosfat
AMPK	AMP-afhængig kinase
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert
CaMK	Calmodulin-afhængig proteinkinase
CAT	Acyl-karnitin translokase
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
CoA	Koenzym A
CPT-1	Karnitin palmitoyltransferase-1
CPT1b	Karnitin palmitoyltransferase 1b (muskel)
CREB	cAMP respons element-binding
CT	Cycle Threshold
DMEM	”Dulbecco’s Modified Eagle medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
e ⁻	Elektron
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Ekstracellulær matriks
EPS	Elektrisk pulsstimulering
ERR α	Østrogenreceptor-reseptor- α
ETK	Elektrontransportkæden
FABP	Fettsyrebindende protein
FADH ₂	Flavin-adenin-dinukleotid
FAT/CD36	Fettsyretranslokase
FATP	Fettsyretransportprotein
FCS	Føtal kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GLUT	Glukosetransportør
GW	GW 501516

HDL	Høy-tetthets-lipoproteiner
HRP	Pepperrot-peroksidase
IL-6	Interleukin-6
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
LD	Levende donor
LDL	Lav-tetthets-lipoproteiner
LXR	Lever X reseptorer
Malonyl-CoA	Malonyl-coenzym A
MCD	Malonyl-CoA dekarboksylase
MEF2	Myocyt-forsterkende-faktor-2
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
n	Antall forsøk
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NFAT	Kjernefaktor av aktiverte T-celler
NRF-1	Kjerne-respiratorisk faktor-1
NRF-2 α	Kjerne-respiratorisk faktor-2 α
OA	Oljesyre
OXPHOS	Oksidativ fosforylering
p38 MAPK	p38 mitogen-aktivert protein kinase
PBS	Fosfatbufret salin
PCA	Perklorsyre
PDC	Pyruvate dehydrogenase kompleks
PDK4	Pyruvat dehydrogenasekinase 4
PDK-1	Fosfor 3-fosfoinositid-avhengig kinase-1
PGC-1	Peroksisom-proliferator-aktivert reseptor- γ koaktivator-1
PI3K	Fosfatidylinositol 3'-kinase
PIP2	Fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat
PIP3	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroksisom-proliferatoraktivert-reseptor
PPRE	Peroksisom-proliferator-responsivt-element
RT-real-time-PCR	Revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon
RXR	Retinoid X reseptorer
SDS	Natrium dodekylsulfat
SEM	Standardfeil
SH2	Src-homologi-2

SR	Sarkoplasmisk retikulum
ssDNA	Enkeltstreng av DNA
T1D	Type 1-diabetes
T2D	Type 2-diabetes
Tfam	Mitokondriell transkripsjonsfaktor A
TG	Triglyserider
TG-buffer	Tris/Glycine buffer
TGS-buffer	Tris/Glycine/SDS buffer
TIP47	”Tail-Interacting Protein of 47 kDa”
TMED	Tetramethylethylenediamine
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-TBS	Tween trisbufret saltløsning
WHO	Verdens helseorganisasjon

1 Innledning

1.1 Trening og livsstilsrelaterte sykdommer

I de senere årene har det vært en kraftig økning i forekomsten av kroniske sykdommer som inkluderer fedme og type 2-diabetes. Hovedårsaken til dette er en stillesittende livsstil kombinert med for høyt næringsinntak [1]. Fysisk aktivitet har en beskyttende funksjon mot disse sykdommene og har vist seg å være en effektiv behandlingsform [2]. De positive effektene trening har på glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskel spiller trolig en rolle, og økt glukoseopptak, glykogensyntese og fettsyreoksidasjon er eksempler på slike effekter [3].

Varighet og intensitet av treningsøkter har stor betydning for utbytte av treningen. Ut ifra disse parametrene kan trening deles inn i to hovedkategorier: utholdenhetstrening og styrketrening. Utholdenhetstrening kjennetegnes av trening ved lav intensitet over lang tid, og langdistanseløping og svømming er eksempler på denne treningsformen. Styrketrening, som for eksempel vektløftning, er trening som karakteriseres av høy intensitet over en kort tidsperiode [4, 5]. Utholdenhetstrening gir en økning i den oksidative kapasiteten til muskelcellene, noe som igjen øker utholdenheten [6].

Effekter av trening kan deles inn i akutte og kroniske responser. Akutte responser defineres som cellulære forandringer som oppstår etter en enkelt treningsøkt. Kroniske responser er forandringer i muskelceller som vedvarer over lengre perioder som en respons på regelmessig trening [4]. En økning i glukosetransportør 4 (GLUT4) i cellemembranen er et eksempel på en akutt respons [7]. Eksempel på en kronisk respons er en økning i den oksidative kapasiteten til cellene [8].

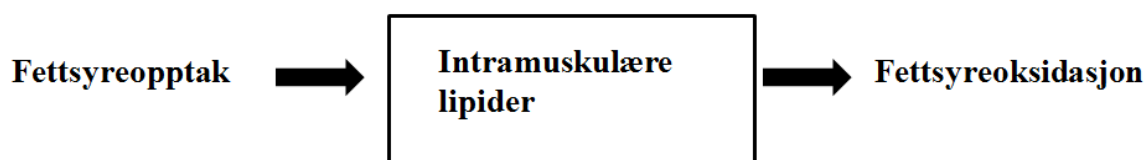
1.1.1 Type 2-diabetes og insulinresistens

Tall fra Verdens helseorganisasjon (WHO) viser at mer enn 220 millioner mennesker verden over har diabetes [9]. Diabetes deles hovedsakelig inn i type 1-diabetes (T1D) og type 2-diabetes (T2D). T1D debuterer oftest før 30 års alder og skyldes insulinmangel, som vanligvis kommer av en autoimmun destruksjon av β -cellene i de langerhanske øyer [10].

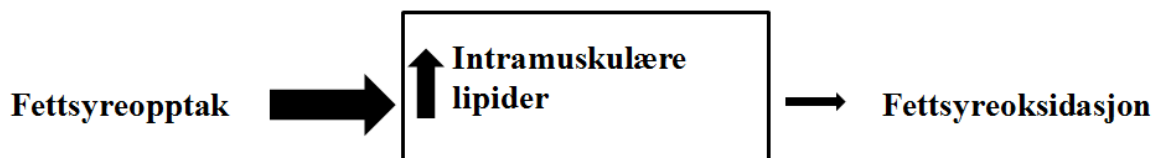
T2D kan debutere i alle aldre og skyldes insulinresistens og utilstrekkelig insulinproduksjon [10]. T2D utgjør 90 % av alle diabetestilfellene og er ofte et resultat av overvekt og fysisk inaktivitet [9]. Faktorer som arv, lav fødselsvekt og høy alder er eksempler på andre risikofaktorer for utvikling av T2D [11].

Insulinresistens forekommer hyppig ved fedme og under utvikling av T2D og defineres som en redusert respons på insulin i muskel, fett og lever. I skjelettmuskel er insulinresistens forbundet med lipidakkumulering og defekter i lipidmetabolismen [3]. Insulinresistens kjennetegnes av nedsatt oksidasjon og økt opptak av fettsyrer, noe som igjen kan føre til ubalanse mellom fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon. Det er trolig dette som er årsaken til lipidakkumuleringen som ses ved insulinresistens. Etter trening øker oksidasjonen av fettsyrer i insulinresistent muskel og dermed utlignes ubalansen mellom opptak og oksidasjon (figur 1.1) [3].

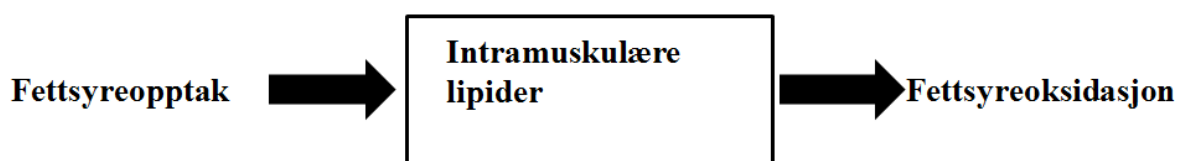
Frisk muskel:



Insulinresistent muskel:



Insulinresistent muskel etter trening:



Figur 1.1: Skjematisk oversikt over forholdet mellom fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon i frisk muskel, ved insulinresistens og ved insulinresistens etter trening. Modifisert fra [3].

Det har lenge vært kjent at regelmessig fysisk aktivitet gir positive effekter både ved forebygging av T2D og i form av forbedret insulinsensitivitet hos pasienter med insulinresistens [7]. Det er vist i studier at risikoen for å utvikle T2D hos kvinner er 33 % lavere for kvinner som trener en gang i uka, sammenlignet med kvinner som ikke trener [12]. Rask gange (150 minutter i uken) og en moderat reduksjon i energiinntak har vist seg å være effektivt i forebygging og behandling av insulinresistens hos overvektige og personer med T2D [3].

1.1.2 Elektrisk pulsstimulering

Kontraksjon av muskelfibre i den motoriske enheten utløses av et aksjonspotensiale. Hele kontraksjonsprosessen starter med at en nerveimpuls ledes langs en motorisk nervefiber til nerveendene som danner synapser med muskelfibrene. Dette utløser en kjede av begivenheter som resulterer i at det dannes et aksjonspotensiale i muskelfibrene som igjen fører til at muskelfiberen kontraherer [13].

Trening gir ikke økning i antall muskelfibre, men forandrer egenskapene til de fibrene som allerede er der. Det er to hovedstimuli som assosieres med trening: elektriske og mekaniske signaler. Aktivitet i motoriske nervefibre er elektriske signaler og strekking av muskelfibre er mekaniske signaler. For myotuber i kultur kan aktivering av muskelfibre gjennom motoriske nervefibre erstattes med elektrisk pulsstimulering (EPS) [13, 14]. I denne oppgaven ble myotubene stimulert ved EPS.

1.2 Fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskulaturen utgjør rundt 55 % av kroppsmassen og spiller en viktig rolle i glukose- og fettsyremetabolismen. Skjelettmuskel står for ca. 80 % av kroppens samlede insulinstimulerte glukoseopptak og er derfor viktig ved utvikling av insulinresistens [1].

1.2.1 Fettsyremetabolisme

Frie fettsyrer (FFA) er en viktig energikilde for skjelettmuskel og transporteres inn i cellene via passiv diffusjon eller ved hjelp av transportproteiner [15]. Det er i dag identifisert tre ulike transportproteiner; plasmamembran-assosiert fettsyrebindende-protein (FABP), fettsyre-translokase (FAT/CD36) og fettsyretransportprotein (FATP) [16]. Studier har vist at FAT/CD36 translokeres fra lagringssteder intracellulært til membranen som en respons på insulin eller trening [17]. Intracellulært blir fettsyrene transportert av fettsyrebindende-proteiner og omdannet til acyl-CoA ved hjelp av enzymet acyl-CoA-syntase. Acyl-Coa-bindende protein (ACBP) frakter acyl-CoA videre til mitokondriene eller peroksisomene for β -oksidasjon. Acyl-CoA kan også fraktes til endoplasmisk retikulum for esterifisering til ulike lipidklasser [18].

Karnitin palmitoyltransferase (CPT)-kompleks bestående av CPTI, acyl-karnitin-translokase (CAT) og CPTII står for transporten av acyl-CoA inn i mitokondriene. Acyl-CoA kan ikke krysse den indre membranen i mitokondriene og må derfor omdannes til acyl-karnitin av CPTI, som er lokalisert på overflaten av den ytre membranen. Acyl-karnitin kan deretter transporteres inn i mitokondrienes matriks via CAT. Her blir acyl-karnitin omdannet tilbake til acyl-CoA av CPTII som er lokalisert i den indre membranen. I matriks blir acyl-CoA oksidert til acetyl-CoA ved hjelp av β -oksidasjon og oksideres deretter videre i Krebszyklus (figur 1.3). CPTI blir sett på som det hastighetsbegrensende trinnet i oksidasjonen av FFA og hemmes reversibelt av malonyl-CoA [16, 19].

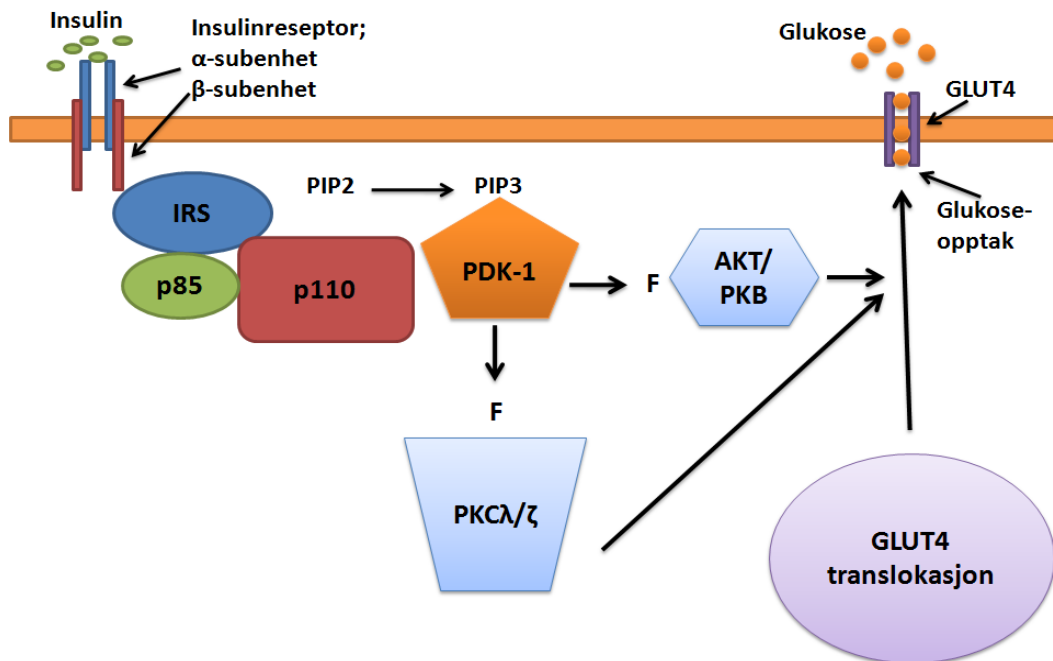
1.2.2 Glukosemetabolisme

Insulin er kroppens viktigste hormon i reguleringen av blodglukose. Etter et måltid stiger blodsukkeret og som en respons på dette strømmer insulin ut i blodet fra betacellene i de langerhanske øyer. Insulin senker blodsukkeret ved å stimulere glukoseopptak i fett og muskel som lagrer sukkeret som intracellulære triglyserider og glykogen. I tillegg hemmer insulin produksjon og frigjøring av glukose fra leveren (glukoneogenesen og glykogenolysen) [20, 21].

Glukosetransport gjennom cellemembranen er det hastighetsbegrensende trinnet i glukosemetabolismen i skjelettmuskel. Det er glukosetransportører (GLUT) som står for transporten og det er så langt identifisert 15 ulike GLUT-proteiner. Minst fem av disse transportørene (GLUT1, 4, 5, 8 og 11) er uttrykt i skjelettmuskel [22]. GLUT4-transportøren står for insulinstimulert glukoseopptak og er den dominerende transportøren i skjelettmuskelceller. GLUT1-transportøren står for basalopptaket av glukose og er uavhengig av insulinstimulering [20, 22].

Insulin øker glukoseopptaket i cellene ved å stimulere translokasjonen av GLUT4 fra lagringssteder intracellulært til cellemembranen. Insulinreseptoren (IR) tilhører reseptor-tyrosinkinasefamilien og består av to α - og to β -subenheter. IR aktiveres ved at insulin binder seg til α -subenheten som igjen fører til at kinaseaktiviteten i β -subenheten aktiveres. Videre vil β -subenheten fosforylere insulinreseptorsubstrat (IRS). Fosforylerte tyrosiner i IRS utgjør bindingssteder for proteiner med Src-homologi-2 (SH2) domener. P85 er et eksempel på et slikt protein og er den viktigste regulatoriske enheten til type-1A fosfatidylinositol 3'-kinase (PI3K). PI3K er en dimer bestående av en regulatorisk p85-enhet og en katalytisk p110-enhet.

Når p85 bindes til IRS fører dette til at p110-enheten fraktes til plasmamembranen hvor den katalyserer fosforyleringen av fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat (PIP3) fra fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat (PIP2). PIP3 aktiverer fosfor-3-fosfoinositid-avhengig-kinase-1 (PDK-1) som igjen fosforylerer og aktiverer både proteinkinase-B (Akt/PKB) og proteinkinase C λ/ζ (PKC λ/ζ). Dette resulterer i at GLUT4 translokeres fra lagringssteder intracellulært til cellemembranen og opptaket av glukose kan begynne (figur 1.2) [20, 22].



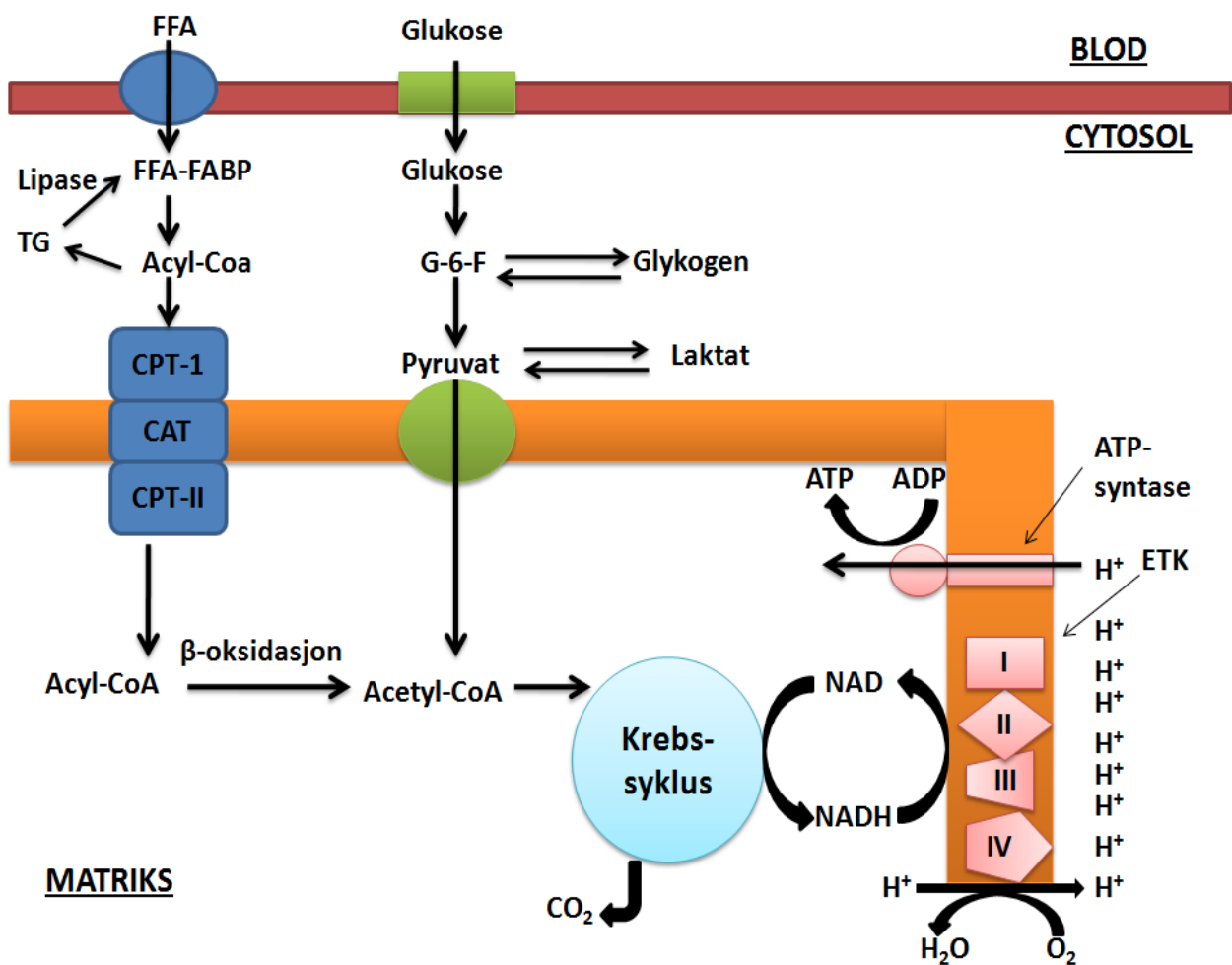
Figur 1.2: Insulinstimulert glukoseopptak. IRS, insulinreseptorsubstrat; PIP2, fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat; PIP3, fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat; PDK-1, fosfor-3-fosfoinositid-avhengig-kinase-1; PKC λ/ζ , proteinkinase C λ/ζ ; Akt/PKB, proteinkinase-B; GLUT4, glukosetransportør; F, fosforylering. Modifisert fra [20].

I cytosol kan glukose brytes ned til pyruvat via glykolysen eller lagres som glykogen. Pyruvat metaboliseres videre i mitokondriene til acetyl-CoA som deretter oksideres videre i Krebszyklus. Under anaerobe forhold reduseres pyruvat til laktat av laktat-dehydrogenase [14, 23].

1.2.3 Oksidativ fosforylering

Oksidativ fosforylering (OXPHOS), som foregår i mitokondriene, er det siste trinnet i metabolismen av glukose og fettsyrer. I mitokondriene konverteres pyruvat og acyl-CoA til acetyl-CoA. Acetyl-CoA oksideres deretter i Krebszyklus. Syklusen produserer avfallsproduktet CO₂ og energirike elektroner som transporteres av transportmolekylene nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) og flavin-adenin-dinukleotid (FADH₂). NADH og

FADH₂ donerer elektronene til elektrontransportkjeden (ETK), som består av fire komplekser (kompleks I-IV) og er lokalisert i den indre membranen i mitokondriene. Elektrontransporten starter når H⁻ fjernes fra NADH og konverteres til et proton (H⁺) og to elektroner (2e⁻). Når et elektron passerer langs ETK frigjøres energi og noe av energien brukes til å pumpe H⁺ ut av matriks og over den indre mitokondrielle membranen. Dette resulterer i dannelsen av en protongradient som fører H⁺ tilbake gjennom det transmembrane proteinkomplekset ATP-syntase. ATP-syntase bruker energien fra H⁺ gjennomstrømmingen til å syntetisere adenosintrifosfat (ATP) fra adenosindifosfat (ADP) og en fosfatgruppe. OXPHOS er en aerob prosess og danner H₂O fra H⁺ og O₂ (figur 1.3) [11, 23].



Figur 1.3: Oversikt over fetttsyre- og glukosemetabolisme. FFA, frie fettstyrer; FABP, fetttsyrebindende protein; CPT, karnitin palmitoyltransferase; CAT, acyl-karnitin-translokase; G6P, glukose-6-fosfat; CO₂, karbondioksid; NADH, nikotinamid-adenin-dinukleotid; ATP, adenosintrifosfat; ADP, adenosindifosfat; H₂O, vann; O₂, oksygen; ETK, elektrontransportkjeden. Modifisert fra [24] og [25].

1.3 Effekter av trening på fettsyremetabolismen

Trening ved mild til moderat intensitet kan føre til ti gangers økning i oksidasjon av fettsyrer i muskel. I tillegg gir trening en økning i opptaket av fettsyrer i muskel. Årsaken til økt opptak skyldes trolig en økning i antall fettsyretransportører i membranen, og det er vist i dyrestudier at innholdet av CD36 i plasmamembranen øker ved muskelkontraksjoner [3]. I tillegg til økt opptak av fettsyrer er faktorer som CPTI-aktivitet og oksidativ kapasitet til mitokondriene kjent for å spille en viktig rolle i reguleringen i oksidasjonen av fettsyrer i muskel [3].

Oksidativ fosforylering, som er det siste trinnet i oksidasjonen av fettsyrer, har vist seg å øke ved trening [26, 27].

1.3.1 Transport av fettsyrer inn i mitokondriene

CPTI står for transporten av acyl-CoA inn i mitokondriene og hemmes av malonyl-coenzym A (malonyl-CoA). Trening senker konsentrasjonen av malonyl-CoA ved å aktivere AMP-avhengig kinase (AMPK) som fosforylerer og hemmer acetyl-CoA karboksylase (ACC). ACC er et enzym som katalyserer dannelsen av malonyl-CoA fra acetyl-CoA og CO₂. Et annet enzym som kan spille en rolle er malonyl-CoA dekarboksylase (MCD). MCD regulerer malonyl-CoA-turnover og aktiveres av AMPK. Nedgangen i malonyl-CoA bidrar til den økte fettsyreoksidasjonen som ses ved trening [28, 29].

En studie fra Roepstorff et al. viste at trening ved moderat intensitet i mennesker ga 13 % nedgang i konsentrasjonen av malonyl-CoA i muskel [29]. I en studie ble effektene av et langtidstreningprogram som inkluderte aerobic og styrketrening undersøkt. 24-36 timer etter den siste treningsøkten var konsentrasjonen av malonyl-CoA signifikant redusert og dette skyldes økt uttrykk av MCD. Nivået av ACC var uforandret noe som kan tyde på at MCD fungerer som en regulator for malonyl-CoA ved trening [28]. Som en koaktivator for PPAR α aktiverer PGC-1 α (se senere) transkripsjonen av MCD i skjelettmuskel. Da trening også gir en økning i PGC-1 α styrker dette teorien om at MCD fungerer som en regulator for malonyl-CoA [28]. I en studie der muse-myotuber (C2C12) ble stimulert i 24 timer ved EPS, ble det funnet en signifikant økning i ekspresjonen (mRNA) og proteinnivået av karnitin palmitoyltransferase 1b i muskel (CPT1b) [14]. En annen studie viste at en times sykling ved moderat intensitet i ni dager ga økt fettsyreoksidasjon, og effekten var ledsaget av en økt

ekspresjon av CPT1b. En enkelt treningsøkt på 60 minutter ga imidlertid ikke en økning i ekspresjonen av CPT1b [8].

Studier viser at FAT/CD36 også er tilstede i mitokondriemembranen og kan spille en rolle i transporten av acyl-CoA inn i mitokondriene [17]. Det er blant annet påvist at mitokondrier isolert fra muskel i menneske etter en to timers treningsøkt hadde økt innhold av CD36 som igjen ga økt fetttsyreoksidasjon [15]. Videre er det vist at overuttrykk av CD36 økte fetttsyreoksidasjonen [15]. I CD36 knockout-mus var den treningsinduserte økningen i fetttsyreoksidasjon fraværende [15]. Dette tyder på at translokasjon av CD36 til mitokondriene er essensielt for å øke fetttsyreoksidasjonen under trening [15].

1.3.2 Muskelfibertype

Skjelettmuskulaturen består av omtrent 600 separate muskler og hver muskel består av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver. En muskelcelle kan også kalles for en muskelfiber. Myofibriller utgjør det indre av muskelfibrene og består av to typer myofilamenter som er bygd opp av proteinene aktin og myosin. Under kontraksjon bindes ATP til myosin. Etter bindingen til myosin spaltes ATP til ADP og fosfat [13].

Fett og karbohydrater er hovedenergikilden for ATP-syntese i skjelettmuskel. Under muskelkontraksjoner er ATP musklens energikilde og når ATP-lagrene tømmes stopper kontraksjonen opp [30]. Når en muskel går fra hvile til kontraksjon fører dette til at nedbrytingen av ATP øker opptil flere hundre ganger. Det er derfor helt nødvendig at ATP nydannes under muskelkontraksjoner. Under kontraksjoner kan muskelceller danne ATP gjennom tre ulike mekanismer; fosforylering av ADP ved kreatinfosfat, oksidativ fosforylering av ADP (aerob prosess) og dannelse av ATP i glykolysen (anaerob prosess) [5, 29].

Skjelettmuskelfibre klassifiseres som type I- (oksidative/ langsomme) eller type II- (glykolytiske/raske) fibre. Denne inndelingen baserer seg på kontraksjonshastigheten for enkeltkontraksjoner som avhenger av hvor fort myosin kan spalte ATP. Type I utøver en langsom kontraksjon. De er rike på mitokondrier, har flere kapillærer som omringer hver fiber, danner hovedsakelig ATP ved oksidativ fosforylering og er svært utholdende [6, 13, 31, 32].

Type II-fibre inneholder glykolytiske enzymer i høye konsentrasjoner slik at de raskt kan danne ATP via glykolysen. Disse fibrene har et lavt innhold av mitokondrier og har dermed en lav kapasitet til å danne ATP via oksidativ fosforylering. De utøver raske kontraksjoner og trettes fort [6, 13, 31, 32]. Type II-fibre deles igjen inn i undergrupper; IIa, IIx og IIb. Type IIb har lavest innhold av mitokondrier og oksidative enzymer og har i hovedsak glykolytisk metabolisme. IIa og IIx ligger et sted mellom type I og IIb når det gjelder oksidative- og kontraksjonsfunksjoner [31]. Type I-fibre er viktige for opprettholdelse av kroppsholdning og utholdenhet, mens type II-fibre kreves for bevegelser som involverer styrke og hurtighet [32].

Skjelettmuskel viser stor plastisitet og kan omforme glykolytiske fibre til oksidative fibre som en respons på utholdenhetstrening [6]. Muse-myotuber ble stimulert i 24 timer ved EPS og RNA ble høstet tre timer etter stimuleringen var slutt. Resultatene viste en signifikant økning i ekspresjonen av type I- og type IIx-fibre, mens ekspresjonen av type IIa og type IIb var uforandret. *In vivo*-forsøk i mus der musene ble trent i seks uker viste de samme resultatene. Akutt trening i mus hadde ingen påvirkning på muskelfibertypen [14].

1.3.3 PPAR δ og PGC-1 α

Peroksisome proliferator-aktivererte reseptorer (PPAR) er ligandavhengige kjernereseptorer som hører til familien av ligand-aktivererte transkripsjonsfaktorer. PPAR-familien inneholder tre medlemmer kjent som PPAR α , PPAR γ og PPAR δ og hver undergruppe har forskjellig vevsdistribusjon og ligandprioritet. PPAR α - og PPAR γ -agonister brukes i dag i behandling av insulinresistens og dyslipidemi. PPAR δ -agonister er lovende legemidler, de kan blant annet redusere kroppsfett og insulinresistens i fete mus ved å øke fetttsyreoksidasjonen i skjelettmuskel og er foreslått brukt i behandling av metabolsk syndrom [33].

PPAR er kjernereseptorer og regulerer transkripsjon av gener ved å dimerisere med retinoid X-reseptorer (RXR). Reseptorkomplekset bindes deretter til peroksisom-proliferator-responsivt element (PPRE), som sitter i promotorområdet på målgenet. PPRE finnes i gener som er involvert i glukose- og lipidmetabolisme. Ligander som aktiverer PPAR er langkjedede fettsyrer eller derivater av disse og syntetiske forbindelser. Det er trolig fettsyretransportører som transporterer ligandene til kjernen. I fravær av ligand undertrykker PPAR-ekspresjon av målgener ved å binde til korepressorer. Ved ligandbinding vil korepressoren fortrenkes og ligand-reseptor komplekset vil bindes til et koaktivatormolekyl. Dette komplekset vil videre bindes til PPRE som resulterer i enten aktivering eller

undertrykking av et spesifikt gen. PPAR γ -koaktivator-1 α (PGC-1 α) er en av de best beskrevne koaktivatorene og binder til og aktiverer PPAR δ [34, 35].

Av de tre PPARene er det PPAR δ som er høyst uttrykt i skjelettmuskel. PPAR δ uttrykker type I-fibre i høyere grad enn type II-fibre og har også vist å spille en nøkkelrolle i utviklingen av type I-fibre [34, 36]. Flere studier tyder på at det er en sammenheng mellom trening og PPAR δ . I en studie ble mus trent ved å svømme i 45 minutter per dag i seks uker, dette resulterte i en 2,6 ganger oppregulering av PPAR δ -protein i muskel [37]. Det er også vist at muskelbiopsier fra elitesyklister har et høyere uttrykk av PPAR δ og PGC-1 α [34]. Hvordan trening aktiverer PPAR δ finnes det flere teorier på. En teori går ut på at trening danner eller øker ligandkonsentrasjonen ved en økt forbrenning av fettsyrer som igjen aktiverer PPAR δ [31]. I en studie ble rotter trent ved lavintensitet-svømming i to timer per dag i tre dager eller mer. Dette ga en økning i ekspresjonen av PGC-1 α i muskel, noe som tyder på at PGC-1 α oppreguleres ved lavintensitetstrening. En annen teori går derfor ut på at trening øker ekspresjonen av PGC-1 α som igjen aktiverer PPAR δ [31, 38].

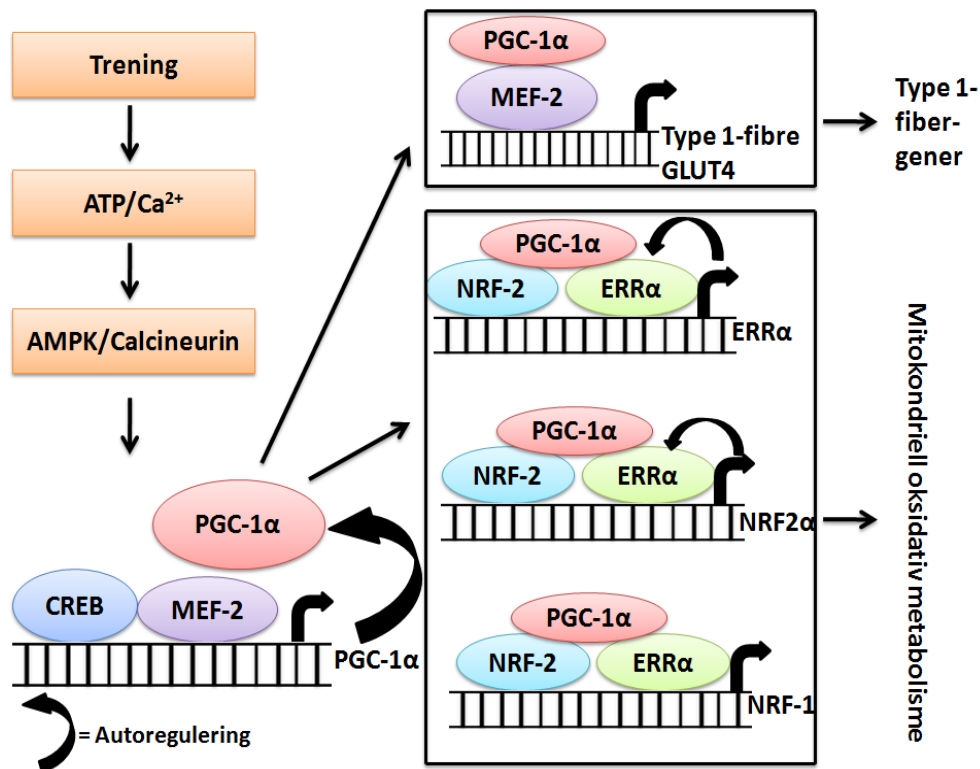
Koaktivatoren PGC-1 α spiller en viktig rolle i mitokondriell biogenese (økningen i mitokondriell masse som oppstår ved regelmessig trening), glukose- og fettsyremetabolisme og fibertype-regulering i skjelettmuskel [39, 40]. En koaktivator bindes ikke direkte til DNA, men utøver sin effekt ved å binde til og aktivere transkripsjonsfaktorer som allerede er bundet til promotorområdet til målgenet. PPAR, retinoid X- og lever X-reseptorer (LXR) er eksempel på transkripsjonsfaktorer som PGC-1 α aktiverer. PGC-1 α aktiverer også transkripsjonsfaktorer som er uavhengig av ligand-binding for å aktiveres, østrogen-relatert-reseptor- α (ERR α) er et slikt eksempel [41, 42].

PGC-1 α er rikelig uttrykt i skjelettmuskel, dette gjelder spesielt i type I-fibre, og flere studier har vist at trening gir en rask økning i PGC-1 α -mRNA og -protein i skjelettmuskel [26]. En studie fra Pilegaard et al. viste at langvarig trening ga en tydelig økning i ekspresjonen av PGC-1 α i skjelettmuskel hos mennesker [43]. I en studie ble muskelceller fra mus stimulert ved EPS. Cellene ble enten stimulert i 90 minutter, 90 minutter daglig i fire dager eller kontinuerlig i 24 timer. Cellene ble høstet tre timer etter EPS og uttrykket av PGC-1 α ble målt ved real-time-PCR. Stimulering i 90 minutter ga ingen forandring i PGC-1 α -mRNA. Stimulering i 90 minutter daglig i fire dager ga en signifikant økning i PGC-1 α -mRNA, mens stimulering i 24 timer resulterte i den kraftigste økningen i PGC-1 α -mRNA [14].

Det er stor usikkerhet rundt mekanismen bak den treningsinduserte økningen i PGC-1 α . Kontraksjon av skjelettmuskel fører til en frigjøring av Ca²⁺ fra sarkoplasmisk retikulum (SR). Dette aktiverer calcineurin og kalsiumavhengige proteinkinaser som igjen aktiverer transkripsjonsfaktorene cAMP respons element-binding (CREB) og myocyt-forsterkende-faktor-2 (MEF-2). Aktivering av CREB og MEF-2 fører til transkripsjon av PGC-1 α . Studier tyder også på at p38 mitogen-aktivert proteinkinase (p38 MAPK) og AMPK er nødvendig for den treningsinduserte økningen i PGC-1 α , men mekanismen er ukjent [42, 44, 45] (figur 1.4).

PGC-1 α utøver sin effekt på oksidativ metabolisme i mitokondriene gjennom koaktivering av kjerne-respiratorisk faktor-1 (NRF-1), kjerne-respiratorisk faktor-2 α (NRF-2 α) og ERR α (figur 1.4). Bindingssetene til NRF-1 og NRF-2 α er lokalisert i promotorområdet til gener som koder for mitokondrielle proteiner, eksempler på slike er cytokrom c, komponenter i kompleksene i elektrotransportkjeden og mitokondriell transkripsjonsfaktor A (Tfam). Tfam er et protein som finnes i mitokondrienes matriks og regulerer replikasjon og transkripsjon av mitokondrielt DNA. PGC-1 α er derfor en viktig regulator av mitokondriell biogenese. Studier i PGC-1 α knockout-mus som viser en reduksjon i mitokondriefunksjon og oksidativ kapasitet og studier der overuttrykk av PGC-1 α øker begge bekrefter dette [32, 40, 46].

Ved koaktivering av MEF-2 regulerer PGC-1 α uttrykk av type I-fibre [1, 42, 44]. En studie viste at overuttrykk av PGC-1 α i mus resulterte i en konversjon av type II- til type I-fibre [34]. PGC-1 α regulerer også ekspresjon av GLUT4 gjennom koaktivering av MEF-2 [47] (figur 1.4).



Figur 1.4: Regulering av PGC-1 α -ekspressjon i skjelettmuskel og mekanismer bak PGC-1 α -regulert ekspressjon av mitokondrielle gener. ATP, adenosintrifosfat; AMPK, AMP-avhengig kinase; PGC-1 α , peroksisom-proliferator-aktivert reseptor- γ koaktivator-1; CREB, cAMP response element-binding; MEF-2, myocyt-forsterkende-faktor-2; GLUT4, glukosetransportør; NRF-2, kjerne-respiratorisk faktor-2; ERR α , østrogen-relatert-reseptor- α ; NRF-1, kjerne-respiratorisk faktor-1. Modifisert fra [44].

1.4 Effekter av trening på glukosemetabolismen

1.4.1 Treningsindusert glukoseopptak

Under trening øker glukoseopptaket i arbeidende muskler 7-20 ganger over basalopptaket og det er intensiteten på treningen som er avgjørende for hvor høyt opptaket blir [48].

Proteinmengden av GLUT4 er en avgjørende faktor for hvor raskt glukose kan transporteres inn i skjelettmuskel [49]. Det er vist i studier i både mennesker og dyr at trening ga en økt ekspressjonen av GLUT4 i skjelettmuskel [7], mens ekspressjonen av GLUT1 ikke økte i en studie med trening av rotter [50]. En studie sammenlignet ekspressjonen av GLUT4 i idrettsutøvere med ikke-aktive personer i samme alder og denne viste at idrettsutøverne hadde høyere ekspressjon av GLUT4 i skjelettmuskel [51]. Prospektive studier har vist at trening økte GLUT4-protein med 80 % i friske menn og 60 % i menn og kvinner med nedsatt glukosetoleranse [52]. En annen studie viste at trening økte GLUT4-protein med 23 % i menn med T2D og med 39 % i friske menn. Disse studiene viser at trening øker proteinnivået av

GLUT4 i både friske personer, personer med nedsatt glukosetoleranse og personer med T2D. Studiene tyder også på at GLUT4 spiller en viktig rolle i reguleringen av glukosetransport under trening [7].

Den treningsinduserte økningen i ekspresjonen av GLUT4 skjer raskt. I en studie i rotter, der rottene svømte i seks timer, viste målingen en dag etter en dobling i ekspresjonen av GLUT4 og en 1,5 gangers økning i proteinnivå sammenlignet med utrente kontroller [53]. En studie utført av Host et al. konkluderte med at GLUT4-proteinet har en halveringstid på 8-10 timer og dermed vil den treningsinduserte økningen i GLUT4 opphøre to dager etter treningsstopp. Ifølge denne studien er det derfor nødvendig å trene annenhver dag for å vedlikeholde den treningsinduserte økningen av GLUT4-protein [54]. Studier utført på høyintensitetstrening over kort tid (14 intervaller på 20 sekunder daglig i åtte dager) og lavintensitetstrening over lengre tid (360 minutter trening per dag i åtte dager) ga en økning i ekspresjonen av GLUT4 og viser dermed at GLUT4 øker som en respons på både høy- og lavintensitetstrening [55].

Resultatene fra en studie i muse-myotuber og mus skiller seg fra studiene som er nevnt ovenfor. Her ble cellene stimulert i 24 timer ved EPS, dette ga en 2,2 gangers oppregulering i GLUT1-mRNA og en 3,2 gangers oppregulering av GLUT4-mRNA. Trening av mus i seks uker ga en signifikant økning i GLUT1-mRNA, mens økningen i GLUT4-mRNA ikke var signifikant. En enkelt treningsøkt i mus ga verken en økning i ekspresjonen av GLUT1 eller GLUT4 [14].

1.4.2 Mekanismer bak treningsindusert glukoseopptak

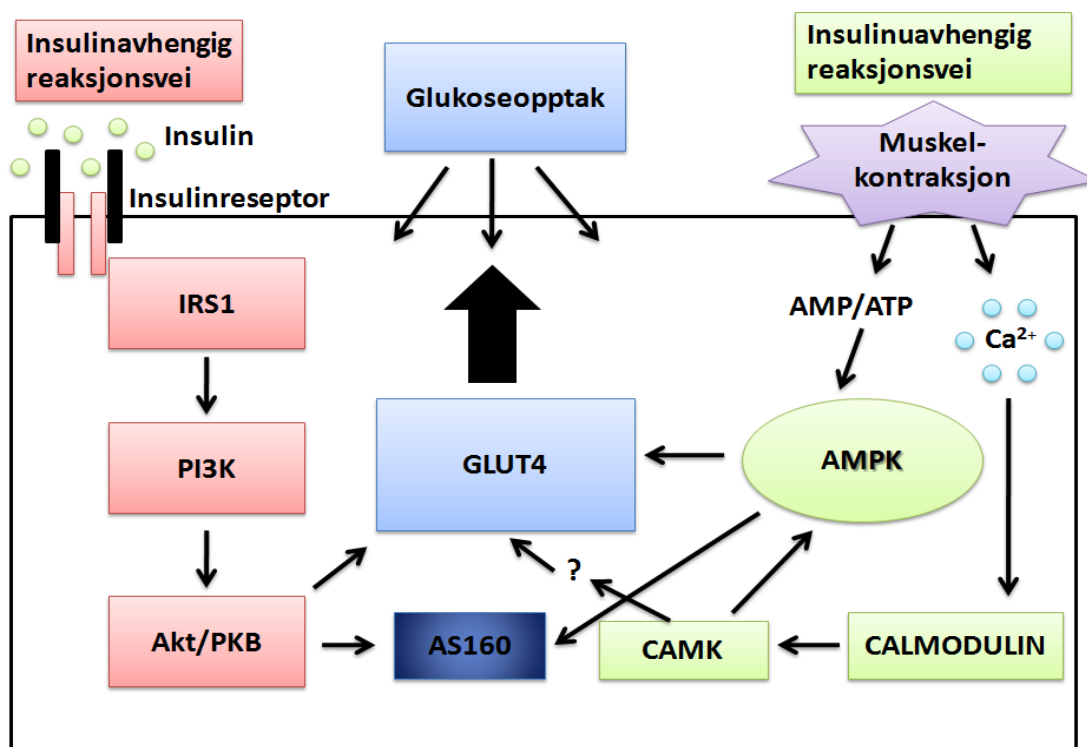
Som nevnt tidligere gir insulin et økt glukoseopptak. Siden blodtilførselen økes under trening er det nærliggende å tro at den treningsinduserte økningen av GLUT4 i plasmamembranen kommer av en økt strøm av insulin til de arbeidende musklene. Muskelkontraksjon-studier der insulin ikke var tilstede viste en tilsvarende økning i GLUT4-translokasjon *in vivo*. Dette tyder på at kontraksjoner kan rekruttere GLUT4 til plasmamembranen uavhengig av insulin [7].

En hypotese går ut på at kontraksjoner og insulin stimulerer glukosetransport gjennom ulike reaksjonsveier [56]. De første trinnene i reaksjonsmekanismen der kontraksjoner stimulerer glukosetransport er identifisert. Kontraksjon av skjelettmuskel fører til en frigjøring av Ca^{2+} fra SR [57]. Men mekanismen der Ca^{2+} regulerer treningsindusert glukosetransport er ukjent.

Kalsiumkonsentrasjonen i cytoplasma er kun forhøyet i en fraksjon av et sekund etter hver muskelkontraksjon, mens økningen i glukosetransport forblir forhøyet en betydelig stund etter at muskelkontraksjonen opphører. Det er derfor lite sannsynlig at Ca^{2+} aktiverer glukosetransport direkte. En teori går ut på at det er kalsiumregulerte intracellulære proteiner som står for translokasjonen av GLUT4, eksempel på slike er calmodulin og calmodulin-avhengig proteinkinase (CaMK) (figur 1.5). Studier har vist at hemming av Ca^{2+} -frigjøring fra SR, eller hemming av CaMK, hemmer den Ca^{2+} -induserte økningen i glukosetransport [56, 57].

En annen foreslått reaksjonsvei involverer AMPK. AMPK aktiveres av en økning i forholdet mellom adenosin monofosfat (AMP) og ATP og mellom kreatin og fosfokreatin.

Kontraksjoner kan gi en betydelig nedgang i både ATP og fosfokreatin og dermed aktiveres AMPK. Treningsintensiteten avgjør hvor kraftig AMPK aktiveres og jo høyere intensitet, desto høyere aktivering av AMPK (figur 1.5). Den Ca^{2+} -aktiverte reaksjonsveien ser ut til å ha en større betydning enn AMPK-reaksjonsveien, fordi den finner sted i både type I- og type II-fibre. AMPK reaksjonsveien finner kun sted i type II-fibre [56-58].



Figur 1.5: Insulinavhengig og insulinuavhengig reaksjonsvei. IRS, insulinreseptorsubstrat; PI3K, type-1A fosfatidylinositol-3'kinase; Akt/PKB, proteinkinase B; GLUT, glukosetransportør; CAMK, calmodulin-avhengig proteinkinase; AMPK, AMP-avhengig kinase; AMP, adenosin monofosfat; ATP, adenosintrifosfat; Ca^{2+} , kalsium. Modifisert fra [57].

Akt er en serin/treonin kinase med tre subtyper (Akt1, Akt2 og Akt3) som alle er uttrykt i skjelettmuskel. Akt aktiveres ved fosforylering i insulinsignalveien. Fosforylert Akt fremmer glukosetransport ved å stimulere translokasjonen av GLUT4 til plasmamembranen. I noen studier er det vist at muskelkontraksjoner øker fosforylering og dermed aktiviteten til Akt, men mekanismen bak dette er ukjent [20, 57]. AS160 er et Akt-substrat. Det er stor usikkerhet rundt effekten av AS160 på glukosetransport, men det spekuleres i om AS160 kan være involvert i både insulin- og kontraksjonsstimulert glukoseopptak [57].

1.4.3 Pyruvat-dehydrogenasekinase 4 (PDK4)

Økt PPAR δ -aktivering gir en økt fettsyreoksidasjon i skjelettmuskel og regulerer flere gener som er involvert i fettsyreoksidasjon. CPT, CD36 og pyruvat-dehydrogenasekinase (PDK) er eksempel på slike proteiner. I skjelettmuskel finnes det to isoformer av PDK; PDK2 og PDK4. PDK4 katalyserer fosforyleringen og inaktiveringen av pyruvat dehydrogenase-kompleks (PDC), dermed hemmes omgjøringen av pyruvat til acetyl-CoA. Dette fører til at glykolytiske produkter ikke kan tas opp i mitokondriene for oksidasjon. En økning i PDK4, som for eksempel oppstår under trening, fører til hemming av PDC og dermed redusert glukoseoksidasjon. Dette fører igjen til at metabolismen i skjelettmuskel skifter fra glukoseoksidasjon til fettsyreoksidasjon. [33, 34, 59, 60].

I tillegg til å øke PDK4, fører PPAR δ aktivering til økt uttrykk av gener som er involvert i opptak og oksidasjon av fettsyrer. Nahle et al. [61] har foreslått et samspill mellom PPAR δ , CD36 og PDK4. Dette går ut på at CD36 tar opp fettsyrer som kreves for aktivering av PPAR δ . Aktivert PPAR δ gir igjen en økning i ekspresjonen av PDK4 og CD36 [61].

En studie fra Hildebrandt et al. [60] viste at intensiteten og varigheten av treningen var avgjørende for økningen i ekspresjonen av PDK4 i rottemuskel. Høyintensitetstrening i 45 minutter førte til en ti gangers økning i ekspresjonen av PDK4, 45 minutter lavintensitetstrening ga en 40-80-gangers økning i ekspresjonen, mens lavintensitetstrening i 180 minutter ga en 200-gangers økning i ekspresjonen av PDK4. Økningen i ekspresjonen av PDK4 returnerte til nivået før trening innen 24 timer etter treningsstans [60].

Utholdenhetstrening gir en økning i konsentrasjonen av sirkulerende fettsyrer i plasma og en teori går ut på at det er denne økningen i FFA som regulerer PDK4. Tunstall et al. [59] testet ut denne teorien og konkluderte med at konsentrasjonen av fettsyrer i plasma ikke hadde noen

sammenheng med den treningsinduserte økningen i PDK4. Flere studier må derfor til for å kartlegge hvordan trening gir en økning i PDK4 i skjelettmuskel [59].

1.5 Interleukin-6 (IL-6)

Skjelettmuskel produserer og frigjør cytokiner, som i denne sammenhengen kalles myokiner. IL-6, IL-8 og IL-5 er eksempler på myokiner som frigjøres fra skjelettmuskel. Trening gir en økning i plasmakonsentrasjonen av IL-6 [62]. Muskelbiopsier fra mennesker før og etter trening viser at trening kan gi en 100-gangers økning i ekspresjonen av IL-6, mens biopsiene fra utrent muskel har et lavt innhold av IL-6-mRNA. Økningen i IL-6 kan detekteres etter 30 minutter med trening og holder seg forhøyet selv etter 24 timer. Intensitet og varighet av treningen er avgjørende for hvor kraftig økningen i IL-6 blir [2, 58, 62, 63].

IL-6 har innvirkning både på glukose- og lipidmetabolisme. En studie viste at IL-6 økte både insulinstimulert og basalt glukoseopptak *in vivo*. Dette kom av økt translokasjon av GLUT4 til plasmamembranen [64]. I studier *in vitro* med celler uten AMPK-uttrykk var effekten av IL-6 på glukosemetabolismen fraværende [64]. Dette kan tyde på at IL-6 utøver sin effekt på glukoseopptak gjennom en mekanisme som involverer AMPK. Aktivisering av AMPK er også foreslått å spille en rolle i påvirkningen av IL-6 på lipidoksidasjon. IL-6 aktiverer AMPK som fører til fosforylering av ACC som igjen hemmer ACC-aktivitet. Dette gir en nedgang i malonyl-CoA og hemmingen av CPT-I opphører som igjen gir en økt lipidoksidasjon. Flere studier må til for å bekrefte eller avkrefte disse teoriene [58, 64].

Trening har også anti-inflammatoriske effekter. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ser ut til å spille en rolle i utviklingen av insulinresistens [2]. *In vitro*-studier og dyrestudier har vist at IL-6 kan hemme TNF- α . En hypotese går derfor ut på at trening via IL-6 kan hemme TNF- α -produksjon. For å teste hypotesen deltok åtte friske menn i et forsøk hvor de hvilte, syklet i tre timer eller fikk infusjon med rekombinant IL-6 i tre timer mens de hvilte. Etter 2,5 timer ble det gitt E.Coli-lipoploysakkarid-endotoksin intravenøst for å indusere en svak inflammasjon. I kontrolleksperimentet, hvor de hvilte, ga dette en signifikant økning i TNF- α . I eksperimentene med trening eller infusjon av rekombinant IL-6 var økningen i TNF- α fraværende. Dette tyder på at trening hemmer den endotoksininduserte økningen i TNF- α og at treningsindusert økning i IL-6 produksjon er med på å forsterke effekten av trening på endotoksinindusert TNF- α -produksjon [2]. I en studie med IL-6-knockout-mus utviklet

musene fedme og insulinresistens, mens administrasjon av IL-6 reverserte begge prosessene. Disse resultatene tyder på at mangel på IL-6 gir insulinresistens og kan være med å forklare de positive effektene trening har på insulinresistens [65].

IL-6 er et klassisk inflammasjonscytokin, og det ble først antatt at økningen av IL-6 hadde en sammenheng med ødeleggelsen av muskler som oppstår under trening [66]. Men andre studier viser at muskelkontraksjoner uten muskelødeleggelse gir en kraftig økning i IL-6 og avkrefter dermed denne teorien [67].

Kontraksjon av skjelettmuskel fører til en frigjøring av Ca^{2+} fra SR. Gjennom en mekanisme som involverer calcineurin aktiverer Ca^{2+} transkripsjonsfaktoren kjernefaktor av aktiverte T-celler (NFAT), som igjen aktiverer genekspresjon av IL-6. Dette ble vist i humane skjelettmuskelceller i kultur og er en av flere teorier bak den treningsinduserte økningen av IL-6, for mer utfyllende informasjon se Pedersen et al. [62].

1.6 Substanser som ble benyttet i forbehandling av cellene

1.6.1 GW 501516

GW 501516 (GW) er en potent og selektiv PPAR δ -agonist [68, 69].

Det er gjort flere studier som bekrefter effektene av GW. I en studie ble mus satt på en fettholdig diett. Musene ble delt i to grupper, der en gruppe fungerte som kontroll og den andre ble behandlet med GW i to måneder. GW ga en økning i gener som koder for type I-fibre. Sammenlignet med kontrollgruppen resulterte dette i en redusert økning i kroppsvekt, redusert fettakkumulering og forbedret glukosetoleranse [31]. Studier i myotuber fra mus viste at GW ga en kraftig økning i ekspresjonen av gener involvert i lipidmetabolisme (CPT1b og PDK4) og økt fettsyreoksidasjon. GW-behandling ga også forbedret glukosemetabolisme og insulinsensitivitet [46]. Fete og insulinresistente aper ble behandlet med GW i fire uker. Behandlingen førte til normalisering av fastende insulin og triglyserider, økning i høy-tetthets-lipoproteiner- (HDL) kolesterol og reduksjon i lav-tetthets-lipoproteiner- (LDL) kolesterol [68].

Det er også gjort studier med GW i mennesker. I en studie ble overvektige menn behandlet med GW i to uker. Dette reverserte flere tilstander som er forbundet med metabolsk syndrom

og det var trolig en økning i fettsyreoksidasjon som sto for denne effekten. Behandlingen av metabolsk syndrom i dag går ut på å behandle hver tilstand hver for seg. Kanskje kan GW bidra til at dyslipidemi, fettakkumulering i lever, fedme og insulinresistens i framtiden kan behandles medikamentelt [70].

1.6.2 Oljesyre

Oljesyre (OA) er en enumettet fettsyre bestående av 18 karbonatomer (C18:1 n-9).

Forbehandling med OA har vist å gi økt akkumulering av intracellulære lipider i humane myotuber [18].

1.7 Formål med oppgaven

Det har tidligere blitt utviklet en *in vitro*-modell for trening ved bruk av elektrisk pulsstimulering (EPS). Formålet med denne masteroppgaven var å teste ut modellen.

Før jeg begynte på oppgaven har studier utført av Nikolić et al. [71] vist at EPS av humane skjelettmuskelceller økte både opptaks- og oksidasjonshastigheten av glukose. Det er videre vist at EPS ga en dobling i mitokondriell masse og en signifikant økning i ekspresjonen av cytokrom C. I tillegg var forholdet mellom ekspresjonen til MHC I og MHCIIa økt i elektrisk stimulerede celler, dette er genmarkører for henholdsvis type I- og type II-fibre. Upubliserte data har vist at EPS i 48 timer ga tendens til økt mengde lipiddråper i cellene. Disse funnene var utgangspunkt for videre studier av modellen.

Formålet med denne masteroppgaven var å teste ut en *in vitro*-modell for trening ved å undersøke om EPS av humane skjelettmuskelceller ville vise de samme effektene som er sett etter trening *in vivo*. Dette ble undersøkt ved å:

- Undersøke effekten av EPS på fettsyreopptak og -oksidasjon
- Undersøke effekten av EPS på ekspresjonen av gener involvert i fettsyre- og glukosemetabolismen
- Undersøke effekter av EPS på ulike proteiner involvert i fettsyre- og glukosemetabolismen

Humane myotuber i kultur har et lavt oksidativt potensiale. Andre del av oppgaven gikk derfor ut på å forbedre det oksidative potensialet til cellene ved

- Kronisk forbehandling av cellene med GW 501516 de siste 48 timene av differensieringen, eller;
- Kronisk forbehandling av cellene med oljesyre de siste 24 timene av differensieringen

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Dulbeccos Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I), føtalt kalveserum, penicillin-streptomycin, fungizone (amfotericin B) og Dulbeccos Phosphate Buffered Salin (DPBS med Ca^{2+} og Mg^{2+}) ble innkjøpt fra Gibco Invitrogen (Gibco, Life Technologies Paisley, UK). Ultrosor G ble innkjøpt fra BioSerpa (Process division of CIPHERGEN Biosystems Inc, Paris Frankrike). Insulin Actrapid® ble innkjøpt fra NovoNordisk, (Bangsværd, Danmark). Glukose, ekstracellulær matriks (ECM) gel, dimetylsulfoksid (DMSO), L-karnitin hydroklorid, bovint serumalbumin (BSA), oljesyre og HEPES ble innkjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). GW 501516 ble fremstilt av Calin C. Ciocoiu (Universitetet i Oslo, Norge). Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate ble innkjøpt fra Biorad Laboratories Inc (København, Danmark). $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$) ble innkjøpt fra NEN Radiochemicals, PerkinElmer (Boston, MA). TopSeal®-A film og OptiPhase Supermix ble innkjøpt fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). Phenethylamine, fra Aldrich chemistry. 6-brønners brett Corning®6 Well Cell Culture Cluster var innkjøpt fra Corning Inc (Corning, NY, USA). Agilent Total RNA isoleringskit ble kjøpt inn fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Quant-iT™ RNA BR Assay kit ble kjøpt inn fra invitrogen (USA). High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, SYBR green master mix og MicroAmp® Optical Reaction Plate ble innkjøpt fra Applied Biosystem (Warrington, UK). Primere (36B4, GAPDH, PGC-1 α , CPT1b, TIP47, GLUT1, GLUT4, PDK4 og IL-6) ble innkjøpt fra Invitrogen (Carlsbad, CA). β -merkaptoetanol ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Pierce BCA™ Protein Assay kit ble innkjøpt fra Boule Nordic AS (Ski, Norge). Goat anti-rabbit IgG-horse raddish peroxidase conjugate, goat anti-mouse IgG-horse raddish peroxidase conjugate, 30 % Acrylamid/Bis løsning, "Tetramethylethylenediamine" (TMED), Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards, 10xTGS (Tris/Glycine/SDS buffer) og 10xTG (Tris/Glycine buffer) ble innkjøpt fra BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS (Levanger, Norge). Enhanced chemiluminescence reagens (ECL) ble innkjøpt fra GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). MitoProfile® Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail ble innkjøpt fra MitoSciences® (Eugene, Oregon, USA). PGC1 alpha antibody (ab77210) ble kjøpt fra Abcam (USA). Akt antibody (#9272) Phospho-Akt (Ser473)

antibody ble kjøpt fra Cell Signaling TechnologyTM (Beverly, MA, USA). Kodak X-Ray fixer og Kodak X-Ray fremkaller ble kjøpt fra Carestream Health, Inc (Rochester, NY, USA).

Alle andre reagenser benyttet i denne oppgaven var av analytisk kvalitet.

2.2 Donoropplysninger

De humane skjelettmuskelcellene brukt i denne oppgaven er isolert fra muskelbiopsier fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrå indre bukmuskel), fra friske frivillige forsøkspersoner.

Tabell 2.1. Oversikt over donorkarakteristika

ID	Alder (år)	Kjønn	Vekt (kg)	Høyde (cm)	KMI	Fastende glukose (mmol/l)
LD 8	43	K	58	163	21,8	4,7
LD 15	55	K	85	171	29,1	6,9
LD 18	52	K	68	175	22,2	5,2
LD 21	68	K	76	160	29,7	5,2
LD 22	40	M	85	172	28,7	5,0
LD 23	61	K	63	170	21,8	4,8
LD 24	70	K	70	170	24,2	5,0
LD 27	44	K	57	162	21,7	5,2
LD 30	36	M	83	178	26,2	5,0
LD 32	34	K	57	160	22,3	5,1
Gj.snitt ± SEM	50,3 ± 2,59		70,2 ± 2,3	168,1 ± 1,28	24,77 ± 0,67	5,21 ± 0,12

Forkortelser: LD, levende donor; K, kvinne; M, mann; SEM, standardfeil; KMI, kroppsmasseindeks.

2.3 Celledyrkning

Metoden som er benyttet under celledyrkingen er i henhold til prosedyrene til Gaster et al. [72, 73].

2.3.1 Utsåing av satelittceller

Nedfrosne satelittceller i ampuller ble tatt ut fra nitrogentanken (-170 °C) og tint til slusj på vannbad ved 37 °C. Cellesuspensjonen ble overført til 50 ml sentrifugeringsrør og 5 ml utsåingsmedium per ampulle ble tilsatt dråpevis. Sentrifugeringsrøret med cellesuspensjonen ble deretter sentrifugert ved 1800 rpm i sju minutter. Supernatanten med toksisk dimetylsulfoksid (DMSO) ble sugd av og cellepelleten ble resuspendert og blandet godt i 2 ml utsåingsmedium (appendiks 1.1). For beregning av celletetthet ble jevn cellesuspensjon og 0,4 % tryptanblått blandet i et eppendorfrør i forholdet 1:1 og antall levende celler ble telt i CountlessTM automated cell counter fra Invitrogen. Tryptanblått penetrerer uinntakte cellemembraner og farger dermed døde celler blå. Etter telling ble riktig volum cellesuspensjon og utsåingsmedium beregnet og blandet godt. Ucoatede 6-brønners brett ble coatet med ekstracellulær matriks (ECM) før utsåing. I 6-brønners brett ble det sådd ut 2 ml per brønn som tilsvarer en celletetthet på 100 000 celler per brønn. Brettene ble deretter inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.3.2 Vekst av satelittceller og differensiering til myotuber

Utsåingsmedium ble byttet ut med proliferasjonsmedium (appendiks 1.2) 24 timer etter utsåing. Proliferasjonsmediet ble skiftet hver 2.-3. dag til cellene nådde 70-80 % konfluens eller begynte å spontandifferensiere. Da ble proliferasjonsmedium byttet ut med differensieringsmedium (appendiks 1.3) og cellene begynte å differensiere til flerkjernede muskelfibre (myotuber). Differensieringsmedium ble skiftet annenhver dag fram til dagen EPS-behandlingen startet.

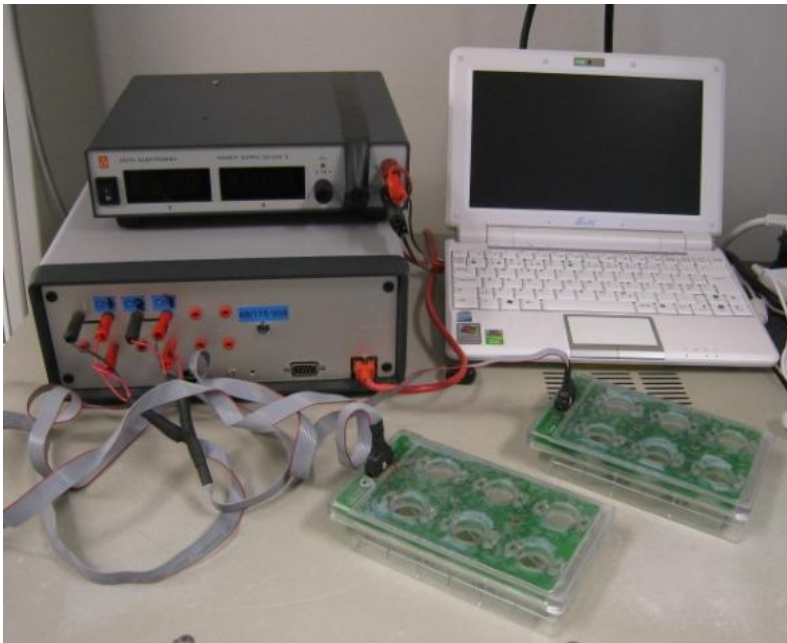
2.3.3 Forbehandling med oljesyre og GW 501516

I forsøkene der cellene ble forbehandlet med 100 µM oljesyre (OA), ble OA tilsatt de siste 24 timene av differensieringen. I GW-forsøkene ble 100 nM GW tilsatt de siste 48 timene av differensieringen.

2.4 Elektrisk stimulering av muskelceller

Myotubene ble stimulert ved bruk av en elektrisk muskelstimulator laget ved Elektronikklaboratoriet, Kjemisk Institutt, Universitetet i Oslo (figur 2.1). Lokk med karbon elektroder ble plassert i cellebrettene og riktige betingelser ble stilt inn. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz.

Myotubene ble kontinuerlig stimulert de siste 24-48 timene av den totalt åtte dagers lange differensieringen. Under stimuleringen ble differensieringsmedium skiftet hver 12 time. 2,2 ml differensieringsmedium ble benyttet for at elektrodene skulle komme i kontakt med mediet under stimuleringen.



Figur 2.1: Elektrisk muskelstimulator. Lokk med karbon elektroder er plassert i 6-brønners brett.

2.5 Substrat-oksidasjonsforsøk i 6-brønners brett

Fremgangsmåten som er benyttet i denne oppgaven er beskrevet av Wensaas et al. [74]. Hensikten med metoden er å måle opptak og oksidasjon av den radiomerkede fettsyren [^{14}C]OA i cellene. I denne oppgaven var formålet å undersøke hvilke effekter elektrisk stimulering hadde på opptak og oksidasjon av OA. Det ble også undersøkt om forbehandling med GW eller OA ga en økt oksidasjon.

Oljesyre og andre fettsyrer spaltes til acetyl-CoA gjennom β -oksidasjon. Den radiomerkede [^{14}C]acetyl-CoA går inn i Krebs sykklus og spaltes av til [^{14}C]CO₂. [^{14}C]CO₂ diffunderer opp til

filterpapiret i filterkoppene og fanges i den basiske væsken som er tilsatt filteret. Produksjonen av CO_2 blir dermed kontinuerlig fanget opp og oksidasjon kan dermed kvantifiseres.

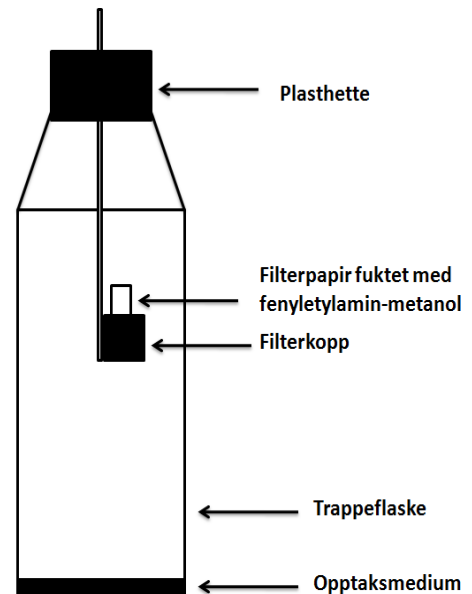
2.5.1 Substrat-oksidasjonsforsøk med oljesyre

På forsøksdagen ble differensieringsmedium byttet ut med opptaksmedium (appendiks 2.1) som blant annet inneholdt den radiomerkede fettsyren [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre ($1\ \mu\text{Ci/ml}$, $18,3\ \mu\text{M}$). Det ble benyttet 1 ml opptaksmedium per brønn. Brettene ble tildekt med plastfolie for å unngå tap av CO_2 og inkubert i varmeskap i to timer. Etter to timer ble 500 μl opptaksmedium fra hver brønn overført til hver sin trappeflaske. Plasthetter ble brukt for å gjøre flaskene lufttette. Filterpapir ble plassert i en filterkopp i trappeflasken (figur 2.2) og fuktet med 300 μl fenyletylamin-metanol i forholdet 1:1. En kanyle ble brukt for å tilsette 100 μl 1 M perklorsyre (PCA) gjennom plasthetten til bunnen av flasken.

Deretter ble flaskene plassert i romtemperatur i to timer for trapping av CO_2 . Tilstutt ble filterkoppene med filteret i overført til tellerør og tilsatt 3 ml Optiphase supermix. Tellerørene ble satt inn i 1900 TR, Liquid Scintillation Analyzer og radioaktiviteten ble målt.

Celleassosiert [^{14}C]OA ble målt ved at akuttmediet ble fjernet fra cellebrettet, og deretter ble cellene vasket tre ganger med 1 ml iskald fosfatbufret salin (PBS). Cellene ble så lysert med 500 μl 0,1 M NaOH. Lysatet ble fryst ned ved -20°C , og tatt opp igjen og tint i varmeskap dagen etter. Cellene ble deretter skrapet løs og 250 μl homogenisert cellelysat fra hver brønn ble overført til hvert sitt tellerør. Tre nye rør ble fylt med 50 μl opptaksmedium og tilslutt ble 3 ml Optiphase supermix tilsatt hvert tellerør. Radioaktiviteten ble målt i 1900 TR, Liquid Scintillation Analyzer.

Ved substrat-oksidasjonsforsøk måles oksidasjon (CO_2) og celleassosiert (CA). Ut i fra disse kan fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/\text{CA}+\text{CO}_2$) og total opptaket ($\text{CA}+\text{CO}_2$) beregnes. Ved fraksjonell oksidasjon måles ratio $\text{CO}_2/\text{CA}+\text{CO}_2$, dette defineres som fraksjonen oksidert [^{14}C]OA i forhold til [^{14}C]OA som har blitt tatt opp i cellen. Celleassosiert [^{14}C]OA er et mål



Figur 2.2: Trappeflaske

på cellenes oljesyreopptak etter endt inkubasjon. CA+CO₂ er et mål på det totale opptaket, her tas det også hensyn til andelen av [¹⁴C]OA som har blitt tatt opp og deretter oksidert.

2.5.2 Proteinmåling

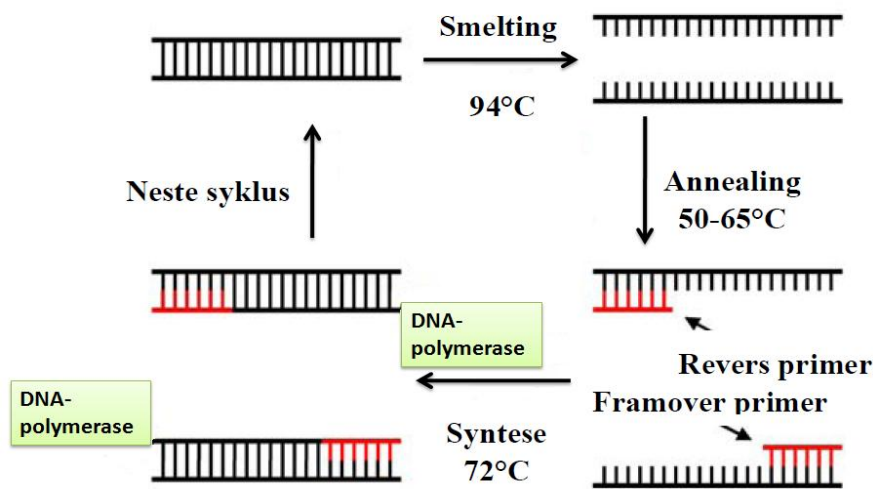
Proteinkonsentrasjonen i cellene ble målt ved at standarder bestående av bovint serumalbumin (BSA) i ulike konsentrasjoner løst i 0,1 M NaOH ble tilsatt de to første radene på en 96-brønners-mikrotiterplate. BSA-konsentrasjonene i standardkurven var 0, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml og 120 µg/ml. Det ble tilsatt 10 µl homogenisert cellelysats til de andre brønnene i platen. Tilslutt ble hver brønn tilsatt 200 µl "Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate" som på forhånd var fortynnet i forholdet 1:5 i destillert vann. Stoffet Coomassie Brilliantblå G-250 i fargereagenset reagerer med basiske og aromatiske aminosyrer i surt miljø og skifter dermed farge fra rødt til blått. Mikrotiterplaten ble hensatt i fem minutter i romtemperatur før den ble satt inn i Wallac VictorTM mikroplateleser. Her ble de ukjente proteinkonsentrasjonene i prøvene estimert basert på de kjente proteinkonsentrasjonene i standardkurven.

2.6 Revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon

Revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR) er en metode som kan benyttes for å nøyaktig kunne undersøke endringer i mRNA-uttrykk. I denne oppgaven ble RT-real-time-PCR brukt for å se på effekten av elektrisk stimulering på gennivå.

Ved real-time-PCR amplifiseres (kopieres) DNA og dette fører til at DNA som finnes i små mengder blir lettere å detektere. PCR er en tretrinnsreaksjon; først skjer det en denatureringsfase (95 °C i 12 sekunder), her vil DNA-trådene separeres og det dannes ssDNA (enkelstreng av DNA). Deretter senkes temperaturen til 60 °C i 60 sekunder og primerne som er komplementære til målgenets DNA vil bindes til ssDNA (annealing). Til slutt økes temperaturen til 72 °C og DNA syntesen skjer ved at de to primerne sammen med enzymet DNA polymerase vil syntetisere ny tråd i hver retning og det lages en ny komplementær DNA tråd på hver av de to DNA trådene. Når denne temperatursyklusen er ferdig startes en ny

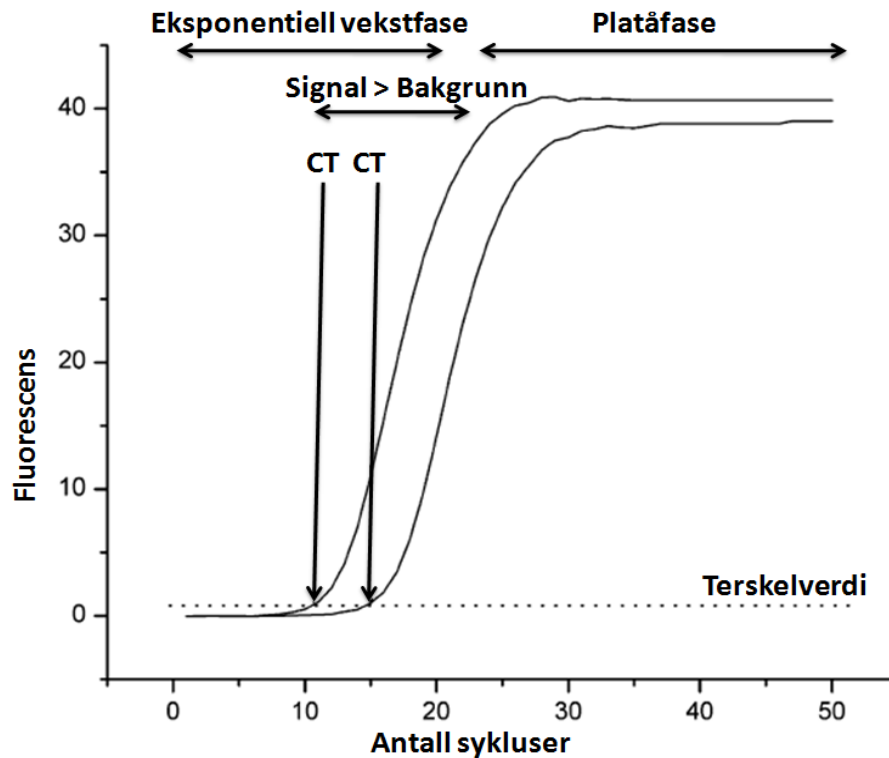
syklus som er identisk til den forrige, det kjøres totalt 40 temperatursykluser og det skjer en dobling av DNA under hver syklus [75] (figur 2.3).



Figur 2.3: Skjematisk fremstilling av DNA-amplifisering ved hjelp av real-time-PCR. Modifisert fra [75].

Ved real-time-PCR benyttes det fluorescerende middelet 2xSYBR Green Master mix som bindes til dobbelttrådet DNA og intensiteten på fluorescensen er proporsjonal med mengde komplementær DNA (cDNA) i prøven. Under de første temperatursyklusene er mengden syntetisert DNA lav og signalet (fluorescens) kan dermed ikke skilles fra bakgrunnsstøyen. Når mengden produkt øker dannes et signal som øker eksponentielt med mengden DNA som amplifiseres. For at DNA skal kunne syntetiseres må reaksjonsblandingen inneholde templat-DNA, de komplementære primerne og de fire deoksyribonukleotidene (A, G, C og T). Når en av disse komponentene brukes opp vil ikke lenger DNA kunne amplifiseres og det vil nås en platåfase [76] (figur 2.4).

Antall sykluser som kreves for å nå terskelverdien kalles CT (cycle threshold), og representerer når fluorescens detekteres (den minste detekterbare grensen). Jo mer av målgenet det er i prøven, desto lavere blir CT-verdien for dette genet [76] (figur 2.4).



Figur 2.4: Real-time-PCR responskurver. Modifisert fra [76].

2.6.1 Høsting av celler

Cellene ble høstet etter åtte dagers differensiering. Dyrkningsmedium ble sugd av og cellene ble vasket to ganger med 1xPBS i DEPC-dH₂O. Deretter ble hver brønn tilsatt 300 µl lysisbuffer fra Agilent. Tilslutt ble cellene skrapet løs og overført til autoklaverte eppendorfrør som ble fryst ved -70 °C.

2.6.2 RNA-isolering

Metoden som ble benyttet er beskrevet av Agilent Technologies. Det ble brukt et kit som inneholdt ulike minikolonner, vaskeløsning (tilsatt etanol) og nukleasefritt vann. Lysatet ble tatt ut av fryseren og tint på varmeblokk. Hele innholdet fra eppendorfrøret (300 µl) ble overført til en mini-prefiltreringskolonne og sentrifugert ved 16000 g i tre minutter. Dette ble gjort for at de større cellefraksjonene skulle bli værende igjen i kolonnen. Deretter ble filtratet tilsatt et like stort volum med 70 % etanol. Dette ble blandet og inkubert i fem minutter før 600 µl av løsningen ble overført til en mini-isolasjonskolonne og sentrifugert ved 16000 g i 30 sekunder. RNA var nå festet i filteret i kolonnen. Kolonnen ble deretter vasket to ganger med 500 µl vaskeløsning og sentrifugert ved 16000 g i 30 sekunder. Etter vaskingen ble

kolonnen sentrifugert ytterligere i to minutter for å fjerne siste rest av vaskeløsningen. Ved tilsetning av 15 µl nukleasefritt vann og sentrifugering i ett minutt ble rensset RNA eluert ut av kolonnen og samlet i ett eppendorfrør.

Mengde RNA i prøven ble bestemt ved bruk av et kit fra Invitrogen bestående av quant-it™ reagent, quant-it™ buffer, to standarder og små eppendorfrør. Det ble først lagd en arbeidsløsning ved å blande quant-it™ reagent og quant-it™ buffer. Deretter ble prøver og standarder fortynnet til riktig konsentrasjon i arbeidsløsningen. 2 µl fra hver prøve ble fortynnet i forholdet 1:100. Prøvene ble tilslutt satt inn i Qubit™ fluorometer og RNA konsentrasjonen ble målt.

2.6.3 cDNA-syntese

For å kunne undersøke endringer i mRNA-uttrykk ved hjelp av real-time-PCR må mRNA i prøven konverteres til cDNA. Dette skjer ved at RNA molekyler transkriberes til DNA ved revers transkriptase.

1-2 µg RNA fra de ulike prøvene ble tilsatt DEPC-dH₂O til 10 µl i et mini-eppendorfrør. Deretter ble 10 µl reaksjonsmedium (appendiks 3.1) for komplementær cDNA-syntese tilsatt. Prøvene ble så satt inn i synteseapparatet Thermal Cycler 2720 Perkin-Elmer for cDNA-syntese. Her ble prøvene først utsatt for 25 °C i ti minutter (hexamer i templat priming), deretter 37 °C i 80 minutter (revers transkriptase) og til slutt 85 °C i fem sekunder (revers transkriptase inaktivering).

2.6.4 Real-time-PCR

Det ble først laget en standardkurve for hvert gen som skulle måles. Dette ble gjort ved at lik mengde av alle cDNA prøvene ble blandet i et eppendorfrør og fortynnet 1:5 i DEPC-dH₂O (standard 1000). Fortynnet standard ble fortynnet 1:5 videre med DEPC-dH₂O til totalt fire ulike konsentrasjoner (1000, 200, 40 og 8). På grunnlag av denne fortynningsrekken ble det lagd en standardkurve som ble brukt til å beregne amplifisert cDNA i de ulike prøvene. Deretter ble hver prøve fortynnet 1:5 i DEPC-dH₂O. Videre ble 2,5 µl av fortynnete prøver, standarder og negativ kontroll overført til hver sin brønn på MicroAmp Optical Reaction Plate. Tre paralleller ble brukt av hver prøve og hver standard. Reaksjonsblanding (appendiks 3.2) bestående av 2xSYBR Green Master mix, framover og revers primer og DEPC-dH₂O ble

deretter tilsatt brønnene. Platen ble tilslutt satt inn i instrumentet ABI PRISM 7000 Sequence Detection system (Applied Biosystem, Warrington, UK).

Tabell 2.2. Primere brukt ved RT-Real-Time-PCR.

Gener	Genbank nummer	Primere
GADPH	J04038/M33197	F: 5`-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3` R: 5`-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3`
36B4	M17885	F: 5`-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3` R: 5`-AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3`
PGC-1 α	NM013261.3	F: 5`-AAAGGATGCGCTCTCGTTCA-3` R: 5`-TCTACTGCCTGGAGACCTTGATC-3`
CPT1b	L39211	F: 5`-GAGGCCTCAATGACCAGAATGT-3` R: 5`-GTGGACTCGCTGGTACAGGAA-3`
TIP47	NM001164189.1	F: 5`-CACTCGCTGGGCAAGCTT-3` R: 5`-CTTGACAGTTCCATCAGGCTTAG-3`
GLUT1	K03195	F: 5`-CAGCAGCCCTAAGGATCTCTCA-3` R: 5`-CCGGCTCGGCTGACATC-3`
GLUT4	M20747	F: 5`-ACCCTGGTCCTTGCTGTGTT-3` R: 5`-ACCCCAATGTTGTACCCAAACT-3`
PDK4	BC040239	F: 5`-TTCCAGACCAACAAATTCACA-3` R: 5`-TGCCCGCATTGCATTCTTA-3`
IL-6	NM 000600.3	F: 5`-CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTAT-3` R: 5`-AGGCGCTTGTGGAGAAGGA-3`

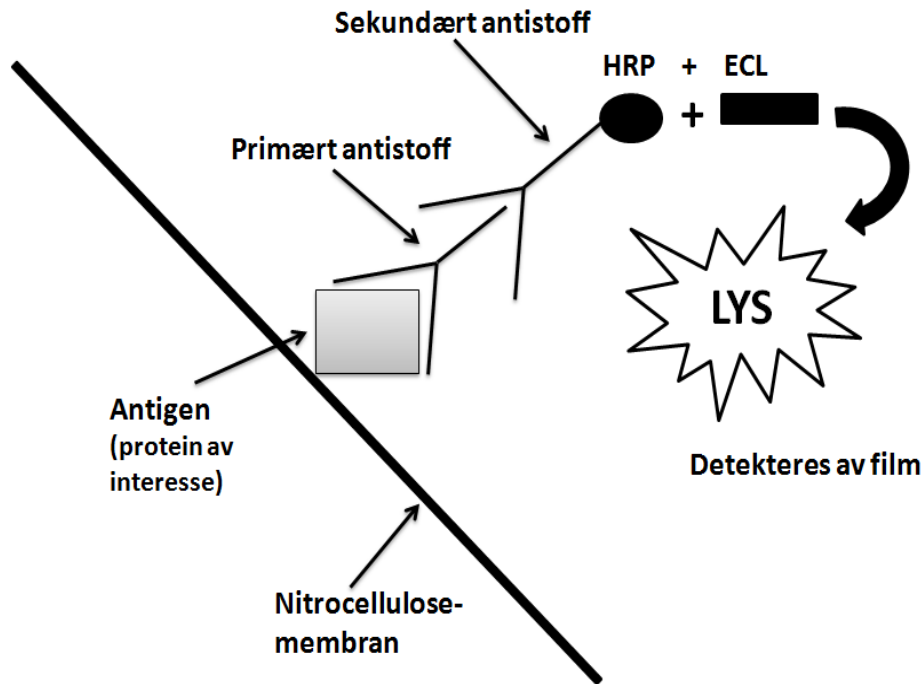
2.7 Immunoblotting (Westernblotting)

Westernblotting er en analytisk teknikk som brukes til å detektere og kvantifisere spesifikke proteiner på en membran ved hjelp av antistoff. Prøvene høstes i sample-buffer (appendiks 4.1) som inneholder Tris-HCL, glyserol og natrium dodekylsulfat (SDS). Kokingen av prøvene og SDS denaturerer proteinene. Dette er nødvendig da antistoffet normalt

gjenkjenner kun en liten del av proteinet som ofte befinner seg inne i 3D-konformasjonen til proteinet. For at antistoffet skal komme i kontakt med disse stedene, er det nødvendig at proteinet denatureres (foldes ut). Glycerol er tilsatt samplebufferen for å øke tettheten av prøvene, slik at de lettere faller til bunnen av brønnen. Under prøveopparbeidelsen tilsettes også beta-merkaptoetanol og bromfenolblått til prøvene. Beta-merkaptoetanol bryter opp disulfidbindingene som er med på å danne proteinenes flerdimensjonale struktur, og hindrer nydannelse av disulfidbroer. Bromfenolblått fungerer som en fargeindikator for å lette påføringen av prøvene og gjør det mulig å se prøvefronten under vandringen i elektroforesen.

Det ble benyttet natriumdodekylsulfat polyakrylamid-gelelektroforese (SDS-PAGE). SDS holder proteinene i en denaturert tilstand, dekker proteinene med en negativ ladning og beveger dem mot en positivt ladet elektrode gjennom gelen. Mengden SDS som bindes til proteinene er relatert til proteinstørrelsen. Proteiner med lav molekylvekt vil dermed gå fortere gjennom gelen enn proteiner med høy molekylvekt, og proteinene blir dermed separert etter størrelse. Separasjonen av proteinene bestemmes av størrelsen på porene i gelen som igjen avhenger av konsentrasjonen til akrylamid. Til høyere konsentrasjon akrylamid, til mindre blir porene. For å få en best mulig separasjon bør man derfor benytte lav akrylamidkonsentrasjon til høymolekulære proteiner.

Etter elektroforesen blir proteinene overført fra gelen til en membran som sterkt og uspesifikt binder proteiner. Membranen blir deretter lagt i tørrmelk og proteiner fra tørrmelken vil feste seg til membranen og dermed blokkere for uspesifikk binding av antistoff. Dette gjør at antistoffet bindes til målproteinene og ikke til andre steder på membranen når dette tilsettes. Membranen inkuberes deretter av et primært antistoff som er rettet mot proteinet av interesse. Det sekundære antistoffet er bundet til pepperrot-peroksidase (HRP) og vil bindes til det primære antistoffet ved tilsetning. Når membranen inkuberes i "enhanced chemiluminescence" (ECL) reagens, skjer det en kjemisk reaksjon mellom HRP og ECL og det sendes ut energi i form av lys. Mengden lys er relatert til proteinmengden og detekteres av en film som er plassert på membranen (figur 2.5) [77].



Figur 2.5: Skjematisk fremstilling av prinsippet bak Westernblotting-metoden. HRP, pepperrotperoksidase; ECL, "enhanced chemiluminescence"-reagens. Modifisert fra [78].

2.7.1 Høsting av celler til Westernblotting

På dag åtte av differensieringen ble cellene høstet. Insulin ble tilsatt i mediet i halvparten av brønnene, og PBS ble tilsatt i de resterende brønnene. Cellene ble inkubert med insulin i totalt 15 minutter. Deretter ble gammelt medium sugd av og cellene ble vasket to ganger med 1 ml PBS per brønn. Så ble cellene lysert i 100 µl sample buffer (appendiks 4.1) per brønn. Cellene ble skrapet løs og alt innhold ble overført til rør som tålte koking og kokt på vannbad i fem minutter. 25 µl av prøven ble tatt av til proteinmåling og fryst ved -20°C . Prøvene ble deretter tilsatt beta-mercaptoetanol (10 %) og bromfenolblått (5 %). Tilslutt ble prøvene kokt på vannbad i fem minutter og fryst ved -20°C .

2.7.2 Proteinmåling

For at det skulle bli satt på lik mengde protein fra hver prøve, ble proteinkonsentrasjonen i prøvene målt ved hjelp av et kit fra Pierce (Pierce BCA protein assay reagent, nr 23225). Kittet bestod av A: "Bicinchoninic acid" og B: 4 % CuSO_4 , og reagenset ble laget ved å blande 50 deler A og 1 del B. 5 µl fra hver prøve ble så tilsatt 30 µl destillert vann og 0,7 ml reagens. Standardkurven ble lagd ut fra 2 mg/ml BSA i samplebuffer og fortynnet videre med destillert vann i forholdet 1:7. 35 µl fra hver standardløsning ble deretter tilsatt 0,7 ml

reagens. Prøvene og standardene ble deretter satt på varmeblokk (60 °C) i 30 minutter før de ble avkjølt. To paralleller med 300 µl fra hver prøve og hver standard ble overført til en mikrotiterplate, satt inn i Wallac Victor™ og absorbansen til prøvene ble målt ved 595 nm. Den ukjente proteinkonsentrasjonen i hver prøve ble beregnet ved hjelp av standardkurven som er basert på de kjente proteinkonsentrasjonene fra standardprøvene.

2.7.3 Støping av geler

Støpeformen ble montert og gelløsningen (appendiks 4.2) ble blandet etter oppskrift. Det var molekylvekten til proteinet som avgjorde hvor konsentrert gel som skulle støpes.

Gelløsningen ble så fylt opp mellom glassplatene i støpeformen med en engangspipette. 200 µl isobutanol ble tilsatt på toppen av gelen for å fjerne luftbobler, for å rette ut gelen og for å unngå uttørking. Deretter polymeriserte gelen i ca. 45 minutter. Isobutanolen ble så tømt ut og tørket vekk med filterpapir. 4 % stacking-gel (appendiks 4.3) ble blandet etter oppskrift og lagt på toppen av separasjonsgelen. En brønnkam ble plassert i hver stacking-gel før den stivnet, dette tok ca. 30 minutter. Tilslutt ble gelene tatt ut av støpeformen, pakket inn i fuktig papir og plast, og lagt i kjøleskap til neste dag.

2.7.4 Gelelektroforese

Brønnkammene ble fjernet fra hver gel og brønnene ble skylt med destillert vann. Gelplatene ble så plassert i et gelkar og elektroforesebuffer (appendiks 4.4) ble helt i midtkammeret mellom gelplatene og i resten av gelkaret (fylt opp til merket antall geler). Deretter ble prøvene tilsatt i brønnene, prøvevolumet korrigerende for proteinkonsentrasjonen i prøven for å få lik konsentrasjon i alle brønnene. 5 µl standard (Bio-Rad precision plus protein dual color standards) ble tilsatt til den første brønnen. Elektroforesen ble kjørt på 200 V i ca 1 t 20 min.

2.7.5 Blotting

Det ble laget en sandwich etter Hoefers metode (semidry-blotting) bestående av seks filterpapir, membran og gelen. På forhånd hadde dette blitt fuktet i 30 minutter i blottebuffer (appendiks 4.5) og stackinggelen hadde blitt fjernet fra runninggelen. Det ble tilført blottebuffer mellom hvert lag i sandwich, og det ble brukt en liten rulle for å fjerne eventuelle luftbobler. Deretter ble det satt på strøm, 32 mA per gel i en time. Etter endt

blotting ble gel og filterpapir fjernet og membranen ble rullet sammen og plassert i et sentrifugerør.

2.7.6 Deteksjon av immunoblott

Uspesifikke bindingssteder i membranen ble blokkert med 5 % tørrmelk i T-TBS (tween trisbufret saltløsning) (appendiks 4.6) per membran i en time ved romtemperatur og vipping. Tørrmelken ble deretter helt av og primært antistoff fortynnet til riktig konsentrasjon i T-TBS og tørrmelk ble tilsatt til membranen. Det ble brukt 4 ml antistoff-løsning per membran, dette ble inkubert over natt på kjølerom med vipping.

Neste dag ble det primære antistoffet helt av og membranen ble vasket 3x10 minutter med 5 ml T-TBS. Sekundært antistoff fortynnet til riktig konsentrasjon i T-TBS og tørrmelk ble tilsatt til membranen. Det ble også her brukt 4 ml antistoff-løsning per membran, dette ble inkubert i 60 minutter ved romtemperatur og vipping. Etter inkuberingen ble membranen igjen vasket 3x10 minutter med 5 ml T-TBS per membran.

Tabell 2.3. Oversikt over primære og sekundære antistoff som ble brukt i oppgaven.

Primært antistoff	Fortynning, primært antistoff	Sekundært antistoff	Fortynning, sekundært antistoff
Fosforylert Akt	1:500	Geit-anti-kanin	1:3000
Total Akt	1:1000	Geit-anti-kanin	1:3000
PGC-1 α	1:500	Geit-anti-mus	1:1500
Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail	1:50	Geit-anti-mus	1:1500

2.7.7 Fremkalling

ECL-reagens fra Amersham ble blandet som beskrevet på pakningen og membranene ble inkubert i ECL-reagenset i ett minutt. Membranene ble deretter pakket mellom to plastark og plassert i eksponeringsboken, på toppen ble det lagt en film. Eksponeringstiden varierte fra fem minutter til en time avhengig av det primære antistoffet som ble brukt. Deretter ble filmen lagt i fremkaller (appendiks 4.7) i ca. 30 sekunder til båndene kom frem på filmen.

Filmen ble så skylt i vann før den ble lagt over i fikseringsvæske (appendiks 4.8) i fem minutter og tilslutt skylt i vann i ett minutt før den ble hengt opp til tørk. Da filmen var tørr ble standardene tegnet på filmen slik de fremsto på membranen. Under hele fremkallingen var lyset slått av.

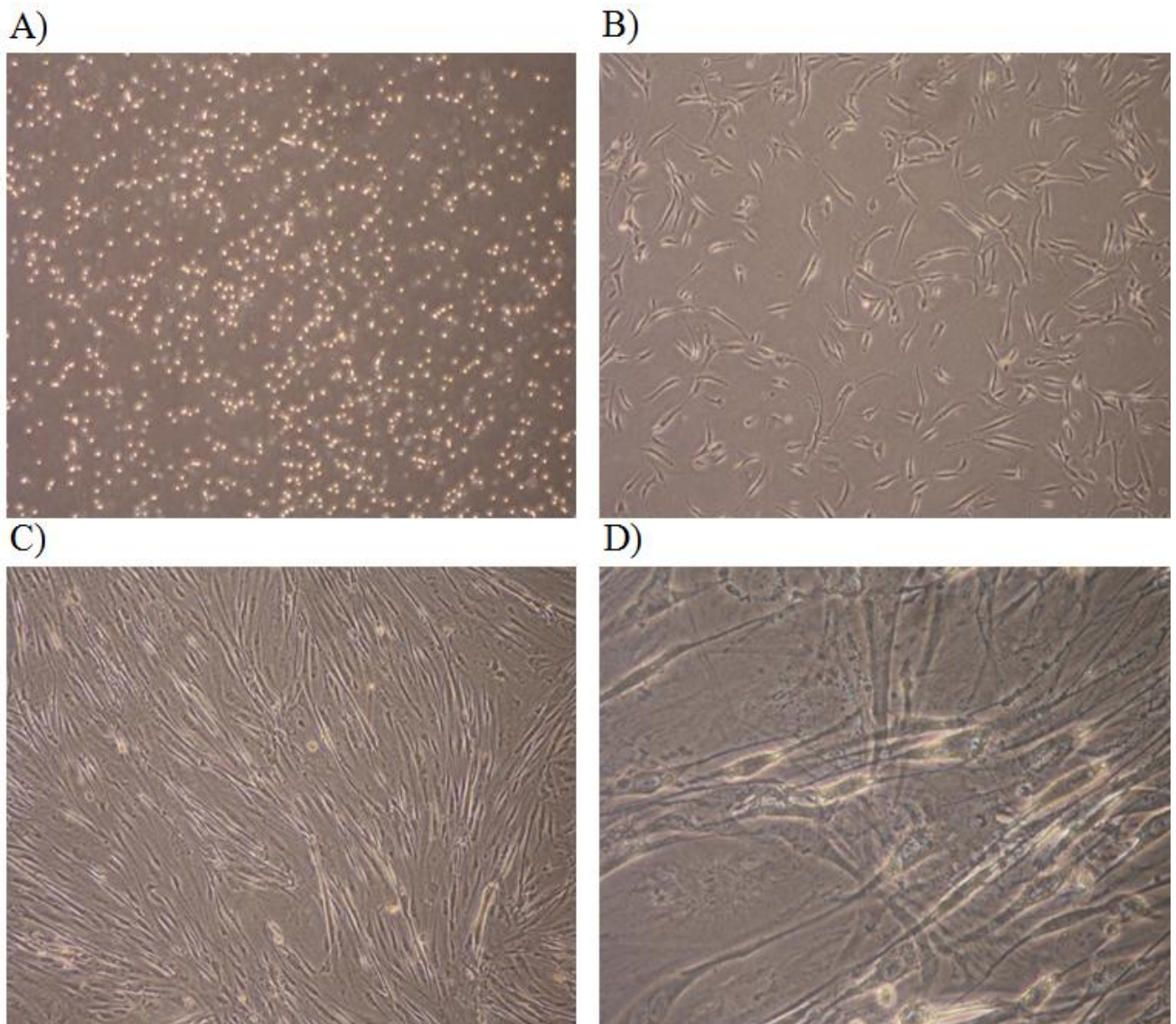
2.8 Statistiske analyser

Dataprogrammet GraphPad Prism 5 for Windows har vært benyttet for å utføre alle de statistiske analysene. I oppgaven er det benyttet en tosidig t-test for å kunne avgjøre effekten av elektrisk stimulering. Samtlige data i denne oppgaven er presentert som gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM). Gjennomsnittsverdien er beregnet fra tre paralleller i hvert forsøk, og antall forsøk (n) i oppgaven varierer fra 3-9. I denne oppgaven ble det benyttet et signifikansnivå på 0,05 ($\alpha=0,05$).

3 Resultater

3.1 Utsåing av celler til elektrisk pulsstimulering (EPS)

For hvert forsøk ble det sådd ut tre 6-brønners brett. Ett brett fungerte som ustimulert kontroll og de to andre brettene ble behandlet med EPS i 24 eller 48 timer. Figur 3.1 viser ubehandlede celler fra dagen de ble sådd ut til den dagen de fikk strøm. Visuelt var det ingen forskjell på cellene før og etter EPS. Den eneste forskjellen en kunne se i brønnene var at cellene hadde løsnet der elektrodene hadde vært plassert.



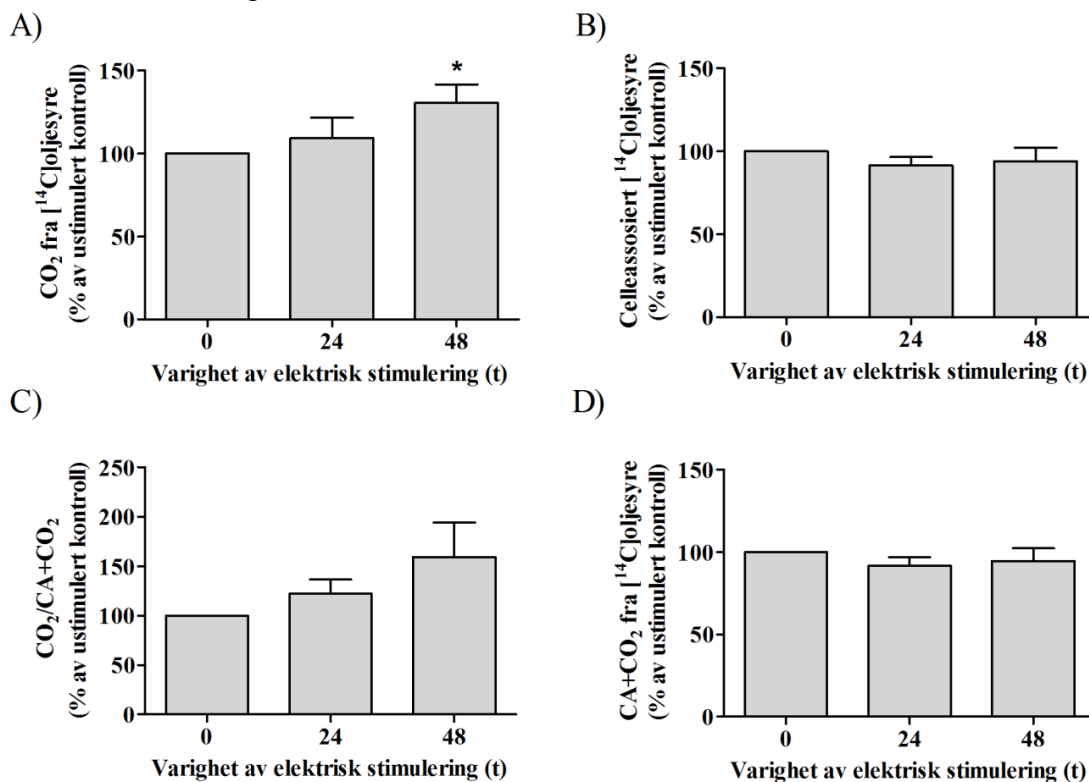
Figur 3.1: Mikroskopibilder av ubehandlede celler. A) Satelittceller på utsåingsdagen med 4 x forstørring. B) Myoblaster dagen etter utsåing med 4 x forstørring. C) og D) Myotuber på differensieringsdag seks like før behandling med EPS med henholdsvis 4 x og 20 x forstørring.

3.2 Oksidasjon og opptak av oljesyre

En kjent effekt av trening er en økning i den oksidative kapasiteten til cellene, noe som igjen fører til en økt oksidasjonshastighet av fettsyrer [3]. Det var derfor ønskelig å undersøke om dette var tilfelle i EPS-behandlede celler.

3.2.1 Effekter av EPS på oljesyremetabolismen

Ved å måle opptak av oljesyre og CO₂-produksjon i elektrisk stimulerte celler ble det undersøkt hvilke effekter kronisk, lavfrekvent EPS hadde på oljesyremetabolismen. Ustimulerte celler ble benyttet som kontroll. Myotuber som var behandlet med EPS i 48 timer hadde en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen (CO₂) (figur 3.2 A). EPS hadde ingen effekt på celleassosiert radioaktivitet (CA) og det totale oljesyreopptaket (CA+CO₂) (figur 3.2 B og D). Det var en tendens, men ikke signifikant effekt av EPS på fraksjonell oksidasjon (CO₂/CA+CO₂) (figur 3.2 C).

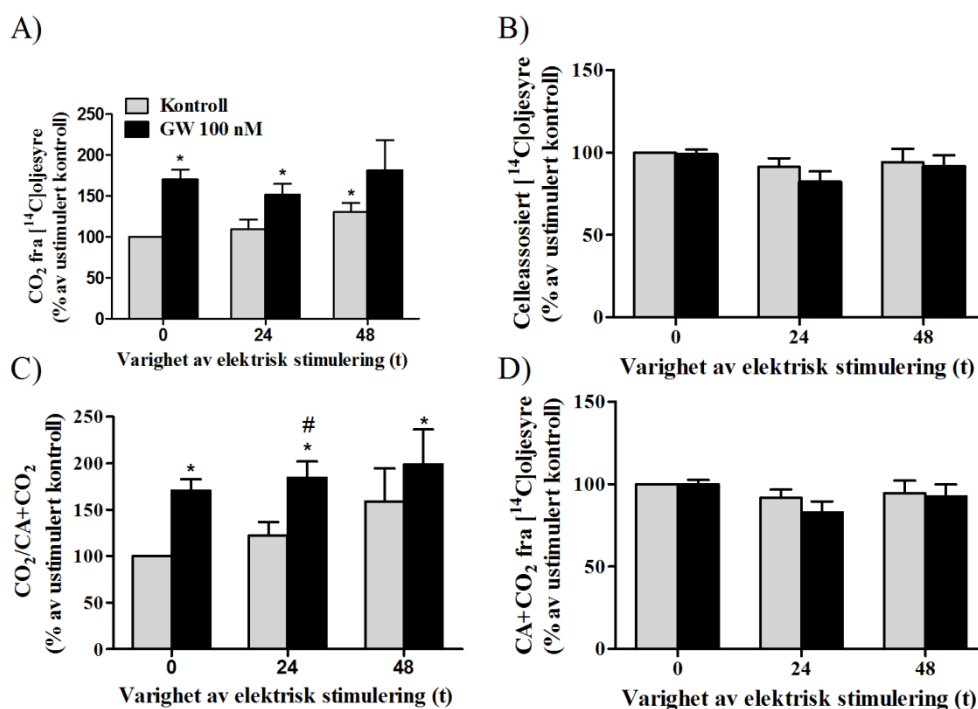


Figur 3.2: Oljesyreoksidasjon og -opptak etter EPS i humane myotuber. Effekter av EPS på CO₂ (A), CA (B), CO₂/CA+CO₂ (C) og CA+CO₂ (D). Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i to timer med [¹⁴C]oljesyre og CO₂ og celleassosiert radioaktivitet ble målt som beskrevet under materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra ni uavhengige forsøk (n=9) med tre paralleller i hvert forsøk. Data er oppgitt i relative verdier hvor ustimulert kontroll er satt til 100. *: p≤0,05 mot ustimulert kontroll.

3.2.2 Effekter av EPS og forbehandling med GW 501516 på oljesyremetabolismen

Kronisk forbehandling med PPAR δ -agonisten GW 501516 er vist å øke fettsyreoksidasjonen i humane myotuber [69]. Det ble derfor undersøkt om kombinasjonen av EPS og GW ga en tilleggseffekt på oksidasjon og opptak av oljesyre. 100 nM GW ble tilsatt de siste 48 timene av differensieringen.

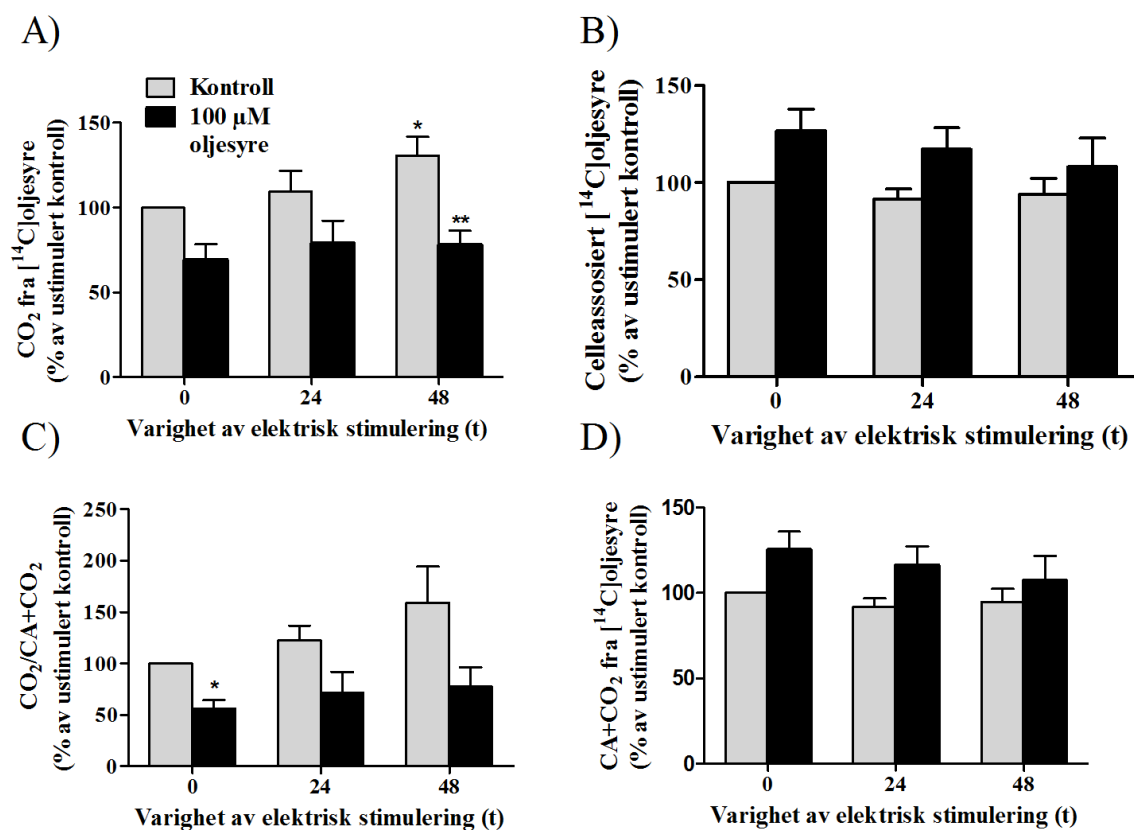
GW ga en signifikant økt oljesyreoksidasjon (CO₂) i cellene som kun ble behandlet med GW og i cellene som ble behandlet med GW og EPS i 24 timer sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.3 A). Hos de elektrisk stimulererte cellene ga ikke forbehandling med GW noen tilleggseffekter på oljesyreoksidasjonen, celleassosiert radioaktivitet (CA), fraksjonell oksidasjon (CO₂/CA+ CO₂) eller det totale oljesyreopptaket (CA+ CO₂) (figur 3.3). GW ga en signifikant økt fraksjonell oksidasjon i celler som ikke hadde blitt behandlet med EPS og i cellene som hadde blitt behandlet med EPS i 24 og 48 timer mot utstimulert kontroll (figur 3.3 C). GW ga også en signifikant økt fraksjonell oksidasjon i cellene som ble behandlet med EPS i 24 timer sammenlignet med kun EPS i 24 timer (figur 3.3 C).



Figur 3.3: Effekt av EPS og kronisk forbehandling med GW på oljesyremetabolismen. (A), CO₂, (B) CA (C) CO₂/CA+CO₂ og (D) CA+CO₂. Cellene er forbehandlet med 100 nM GW501516 (GW) de siste 48 timene av differensieringen. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i to timer med [¹⁴C]oljesyre og CO₂ og celleassosiert radioaktivitet ble målt som beskrevet under materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM fra 6-9 uavhengige forsøk (n=6-9) med tre paralleller i hvert forsøk. Data er oppgitt i relative verdier hvor ustimulert kontroll er satt til 100. *: p≤0,05 mot ubehandlede celler. #: p≤0,05 mot EPS i 24 timer.

3.2.3 Effekter av EPS og forbehandling med oljesyre på oljesyremetabolismen

Det var ønskelig å undersøke om kronisk forbehandling med oljesyre (OA) ga noen tilleggseffekter på oksidasjon og opptak av [^{14}C]OA. 100 μM OA ble derfor tilsatt de siste 24 timene av differensieringen. Resultatene viste at oksidasjon (CO_2) av [^{14}C]OA ble redusert ved forbehandling med OA (figur 3.4 A). I cellene som ble behandlet med EPS i 48 timer hadde OA en signifikant negativ effekt på oksidasjonen av [^{14}C]OA mot celler som kun ble behandlet med EPS i 48 timer (figur 3.4 A). Det kan se ut som forbehandling med OA hadde en tendens til å øke både celleassosiert radioaktivitet (CA) og det totale oljesyreopptaket ($\text{CA} + \text{CO}_2$) (figur 3.4 B og D). Sammenlignet med ustimulert kontroll hadde forbehandling med OA en signifikant negativ effekt på den fraksjonelle oksidasjonen ($\text{CO}_2/\text{CA} + \text{CO}_2$) av [^{14}C]OA i de cellene som ikke ble behandlet med EPS (figur 3.4 C).



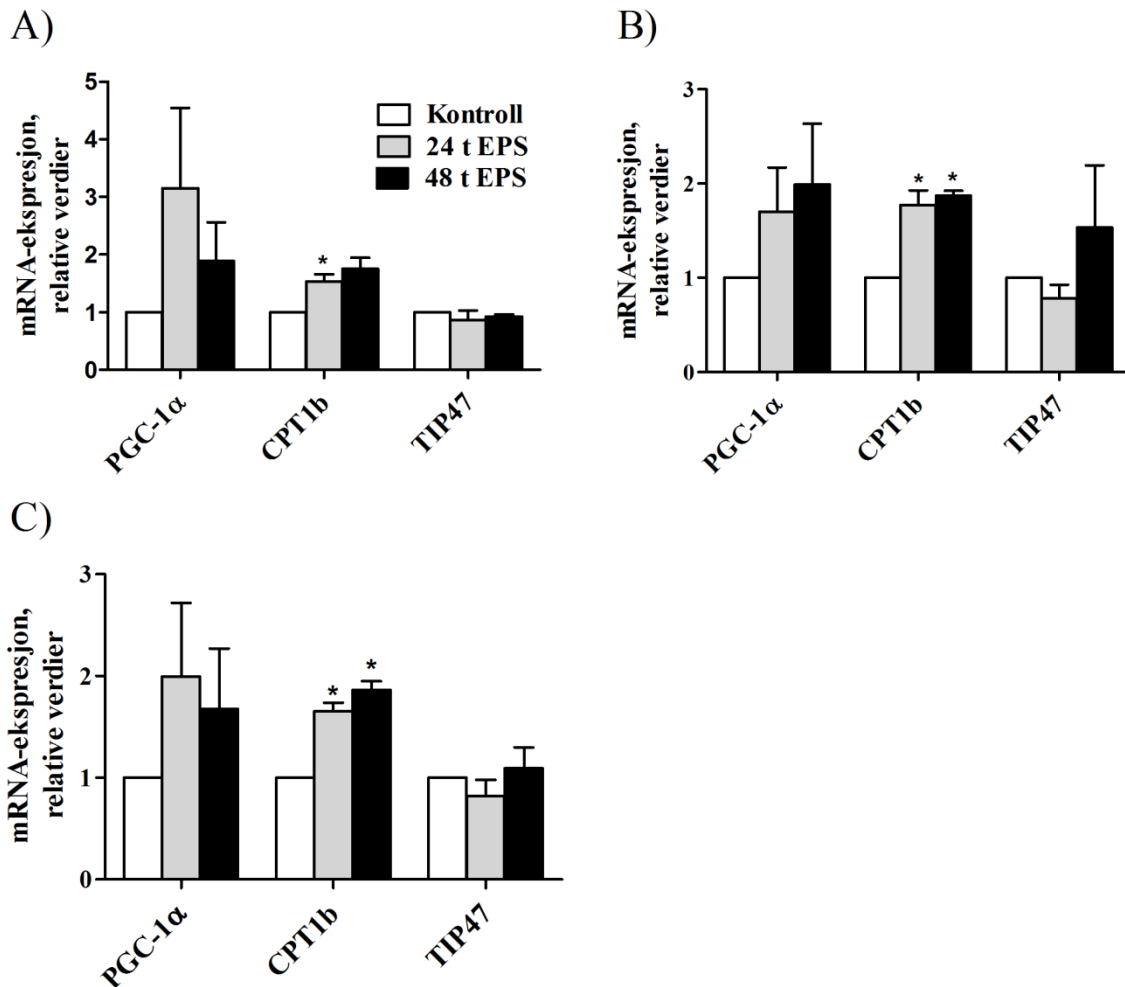
Figur 3.4: Effekter av EPS og forbehandling med oljesyre på oljesyremetabolismen. (A) CO_2 , (B) CA, (C) $\text{CO}_2/\text{CA} + \text{CO}_2$ og (D) $\text{CA} + \text{CO}_2$. Cellene er forbehandlet med 100 μM oljesyre de siste 24 timene av differensieringen. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i to timer med [^{14}C]oljesyre og CO_2 og celleassosiert radioaktivitet ble målt som beskrevet under materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 3-9 uavhengige forsøk ($n=3-9$) med tre paralleller i hvert forsøk. Data er oppgitt i relative verdier hvor ustimulert kontroll er satt til 100. *: $p \leq 0,05$ mot ubehandlede celler. **: $p \leq 0,05$ mot EPS 48 timer.

3.3 Effekter av EPS på genekspressjon

3.3.1 Effekter av EPS på ekspressjonen av gener som påvirker fetttsyremetabolismen

Det er vist tidligere i oppgaven at EPS ga en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen (figur 3.2 A). I dette forsøket var det derfor ønskelig å undersøke om EPS hadde påvirkning på mRNA-ekspressjonen av gener involvert i fetttsyremetabolismen. PPAR γ koaktivator 1 α (PGC-1 α), karnitin palmitoyltransferase1b (CPT1b) og "tail-Interacting Protein of 47 kDa" (TIP47) ble undersøkt.

Ekspressjonen av PGC-1 α viste en tendens til økning etter EPS i både 24 og 48 timer, men på grunn av stor spredning er det vanskelig å konkludere (figur 3.5). Sammenlignet med ustimulert kontroll ga EPS en signifikant økning i CPT1b-mRNA etter 24 timer når data ble normalisert mot "housekeeping"-genet 36B4 (figur 3.5 A). Data normalisert mot "housekeeping"-genet GAPDH og begge "housekeeping"-genene viste en signifikant økning i CPT1b-ekspressjonen etter EPS i både 24 og 48 timer sammenlignet med ustimulert kontroll (figur 3.5 B og C). EPS hadde ingen effekt på ekspressjonen av TIP47 (figur 3.5).

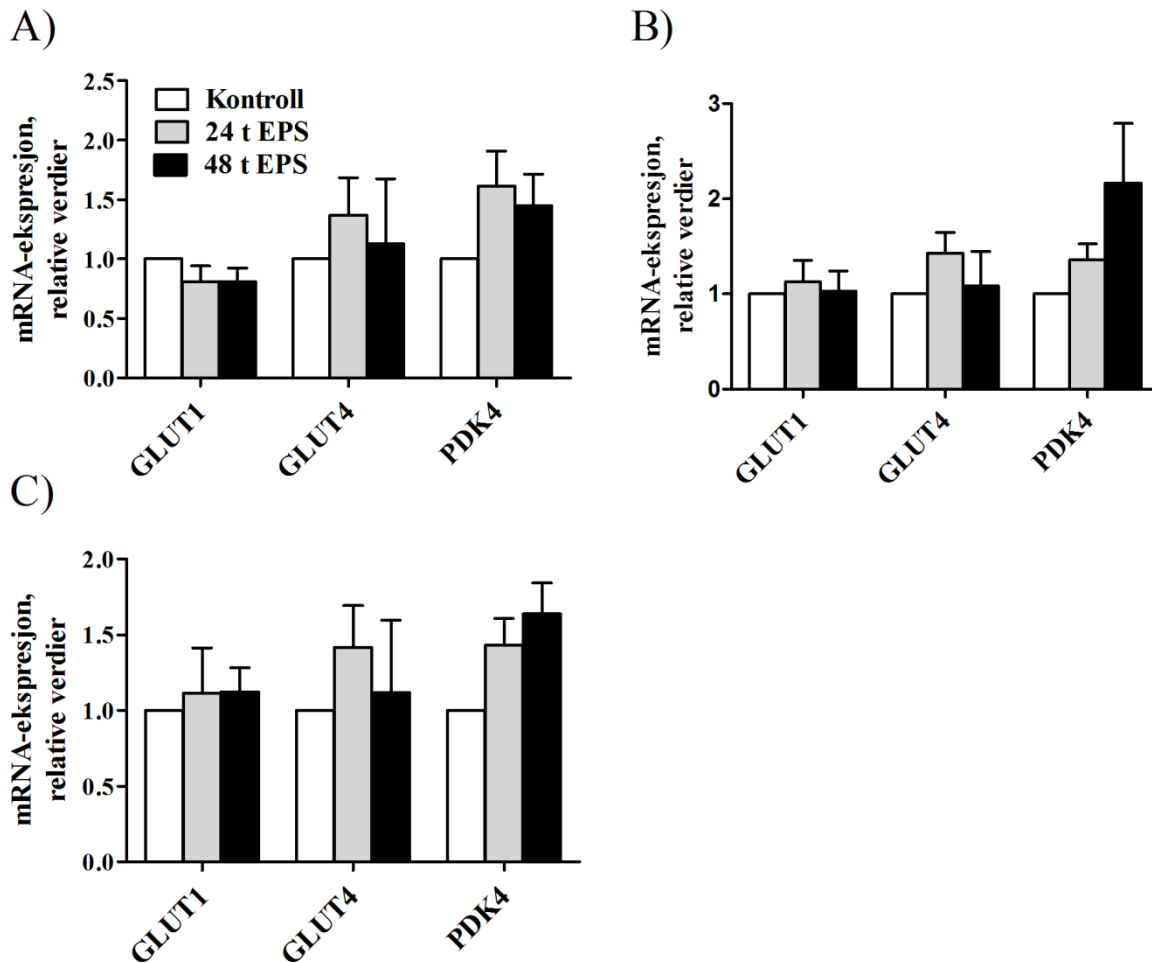


Figur 3.5: Effekter av EPS på mRNA-ekspressjon. mRNA-ekspressjon av tre ulike gener etter behandling med EPS i 24 eller 48 timer. Figuren viser relative verdier korrigert mot "housekeeping"-genene 36B4 (A) og GAPDH (B). I C er data korrigert mot begge "housekeeping"-genene. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. mRNA ble isolert på dag åtte av differensieringen. cDNA ble syntetisert og detektert ved real-time-PCR som beskrevet i materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra tre (n=3, CPT1b og TIP47) eller seks (n=6, PGC-1 α) uavhengige forsøk med tre paralleller i hvert forsøk. Data er oppgitt i relative verdier hvor ustimulert kontroll er satt til en. *: $p \leq 0,05$ mot ubehandlede celler.

3.3.2 Effekter av EPS på ekspressjonen av gener som påvirker glukosemetabolismen

Studier utført av Nikolić et al. viser at EPS øker glukosemetabolismen (opptak og oksidasjon) [71]. I dette forsøket var det derfor ønskelig å undersøke om mRNA-ekspressjonen av glukosetransportørene-1 og -4 (GLUT1 og GLUT4) og pyruvat dehydrogenasekinase-4 (PDK4), som alle er involvert i glukosemetabolismen, ble påvirket av EPS.

EPS påvirket ikke ekspresjonen av GLUT1 (figur 3.6). Ekspresjonen av GLUT4 ble heller ikke påvirket av EPS (figur 3.6). Med en p-verdi på 0,09 ved EPS i 48 timer, normalisert mot begge "housekeeping"-genene, viste ekspresjonen av PDK4 en tendens til økning (figur 3.6 C). Det var også en tendens til økning i ekspresjonen av PDK4 etter EPS i 24 timer (figur 3.6 C). Data normalisert mot "housekeeping"-genene 36B4 eller GAPDH viste også at PDK4 hadde en tendens til økning etter EPS i både 24 og 48 timer (figur 3.6 A og B).

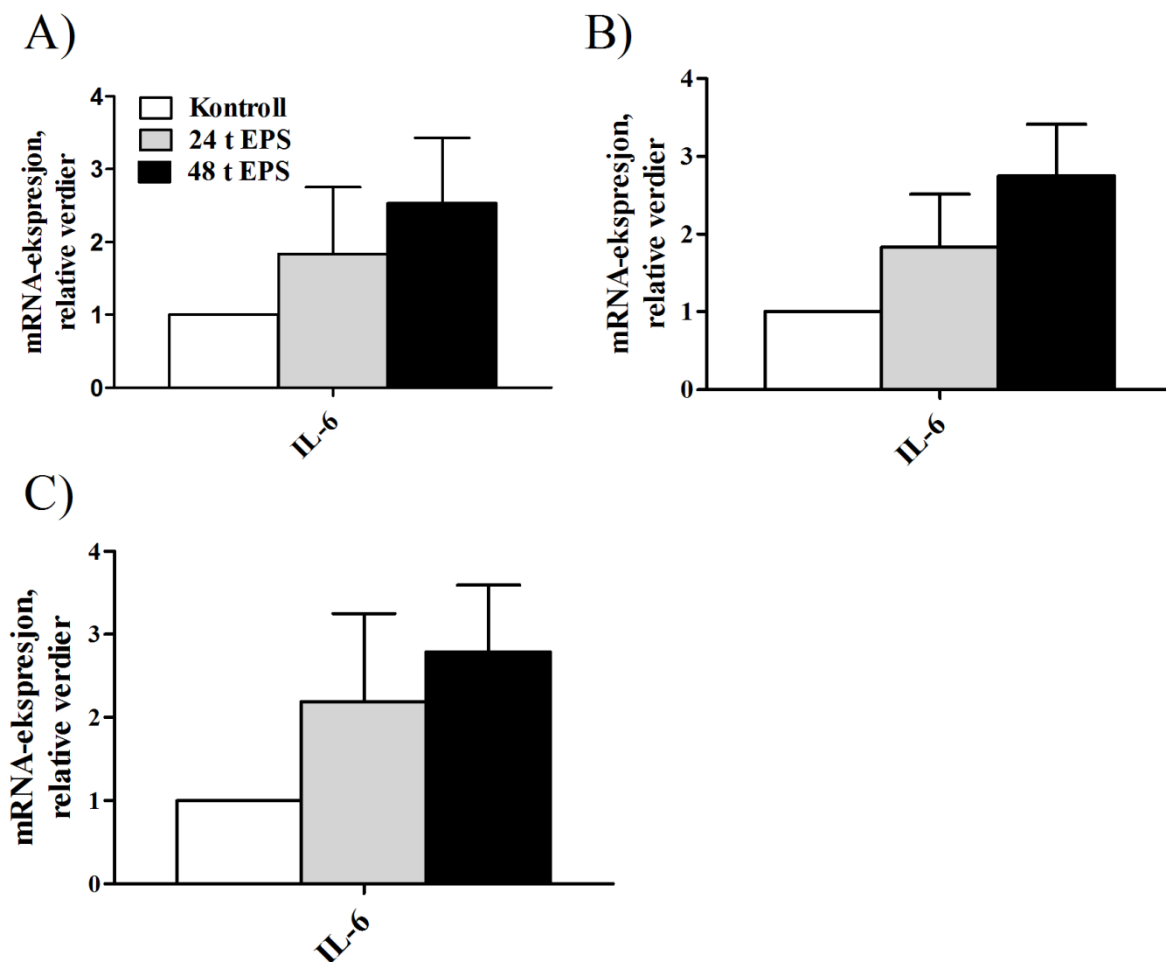


Figur 3.6: Effekter av EPS på mRNA-ekspresjon. mRNA-ekspresjon av tre ulike gener etter behandling med EPS i 24 eller 48 timer. Figuren viser relative verdier korrigert mot "housekeeping"-genene 36B4 (A) og GAPDH (B). I C er data korrigert mot begge "housekeeping"-genene. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. mRNA ble isolert på dag åtte av differensieringen. cDNA ble syntetisert og detektert ved real-time-PCR som beskrevet i materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra tre (n=3, GLUT1, PDK4) eller fire (n=4, GLUT4) uavhengige forsøk med tre paralleller i hvert forsøk. Data er oppgitt i relative verdier hvor ustimulert kontroll er satt til en.

3.3.3 Effekter av EPS på IL-6

Interleukin-6 (IL-6) er et myokinin som oppreguleres under trening. Formålet med dette forsøket var derfor å undersøke om dette også var tilfelle i vår modell.

mRNA-ekspressjonen av IL-6 viste en tendens til økning ved EPS både i 24 og 48 timer, men økningen var ikke signifikant (figur 3.7). Data normalisert mot "housekeeping"-genet GAPDH etter EPS i 48 timer viste den tydeligste tendensen til effekt med en p-verdi på 0,08 (figur 3.7 B). Data normalisert mot begge "housekeeping" genene viste også en tendens til økning med en p-verdi på 0,1 etter EPS i 48 timer (figur 3.7 C).



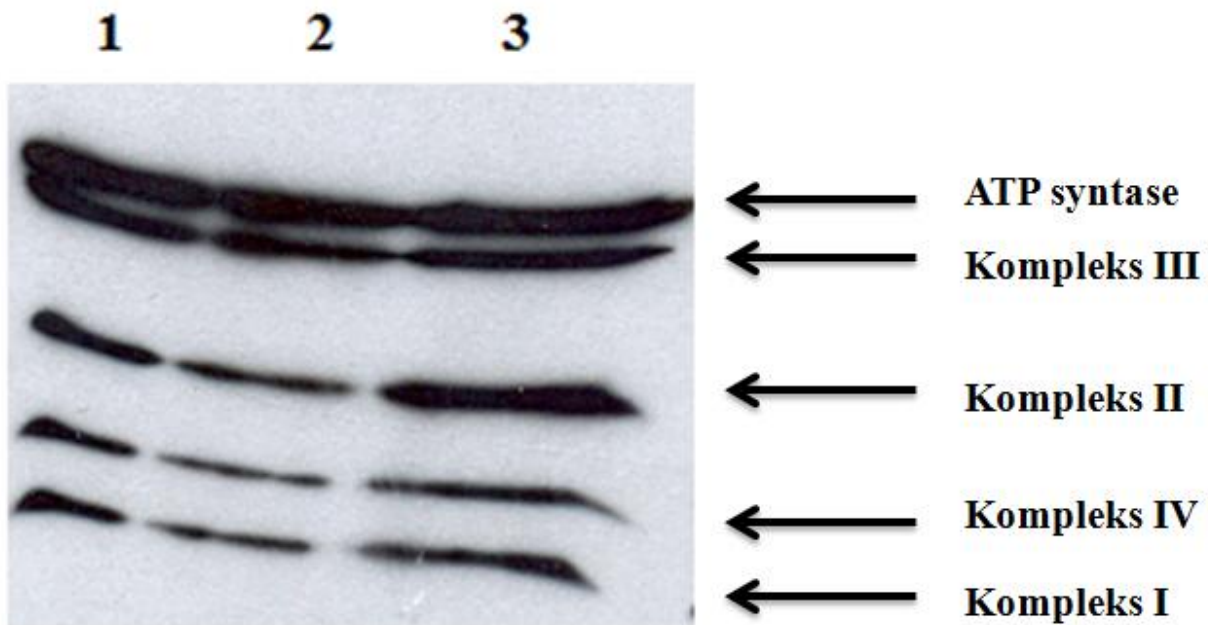
Figur 3.7: Effekter av EPS på mRNA-ekspressjon. mRNA-ekspressjon til IL-6 etter behandling med EPS i 24 eller 48 timer. Figuren viser relative verdier korrigert mot "housekeeping"-genene 36B4 (A) og GAPDH (B). I C er data korrigert mot begge "housekeeping"-genene. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. mRNA ble isolert på dag åtte av differensieringen. cDNA ble syntetisert og detektert ved real-time-PCR som beskrevet i materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra fire uavhengige forsøk (n=4) med tre paralleller i hvert forsøk. Data er oppgitt i relative verdier hvor ustimulert kontroll er satt til en.

3.4 Effekter av EPS på ulike proteiner involvert i glukose- og fettsyremetabolismen

3.4.1 Oksidativ fosforylering

Tidligere studier utført av Nikolić et al. viser at EPS ga en økning i mitokondriell masse og økt glukoseoksidasjon [71]. Figur 3.2 A viser at EPS ga en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen. Det var derfor interessant å undersøke om EPS ga en økning i enzymer involvert i oksidativ fosforylering. Dette ble gjort ved immunblotting (Westernblotting).

Figur 3.8 viser at proteinmengden for kompleks II i elektrontransportkjeden hadde en tendens til økning etter 48 timer EPS sammenlignet med ustimulert kontroll. EPS økte ikke proteinmengden for ATP-syntase, kompleks III, kompleks IV og kompleks I sammenlignet med ustimulert kontroll. Det ble gjort forsøk på to ulike donorer, begge viste samme resultat.



Figur 3.8. Effekter av EPS på enzymer involvert i oksidativ fosforylering. Brønn en viser ustimulert kontroll, brønn to og tre viser celler stimulert med EPS i henholdsvis 24 og 48 timer. EPS ble igangsatt på differensieringsdag seks. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. Westernblotting ble utført med et antistoff rettet mot en cocktail av ulike proteiner involvert i oksidativ fosforylering. Figuren viser ett forsøk av totalt to forsøk, begge viste det samme.

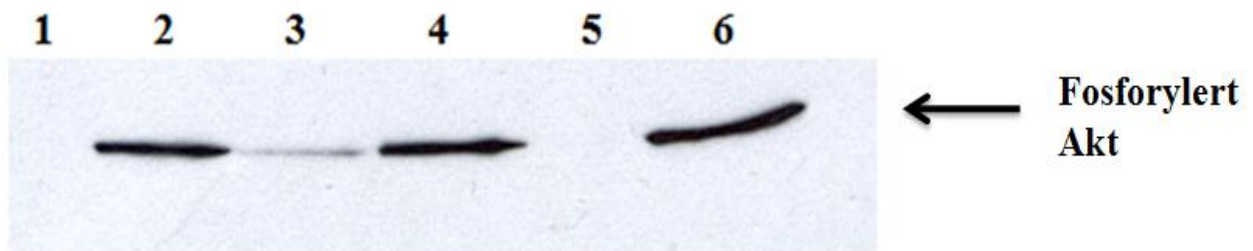
3.4.2 PGC-1 α

Det er vist tidligere i oppgaven at EPS ga en tendens til økning i ekspresjonen av PGC-1 α . Det ble derfor undersøkt om dette også var tilfelle på proteinnivå. Det ble kjørt westernblotting på to donorer, men ingen ga detekterbare resultater. Dette kan skyldes et dårlig antistoff.

3.4.3 Effekter av EPS på fosforylert Akt

Studier utført av Nikolić et al. viser at celler behandlet med EPS har økt glukoseopptak [71]. Akt er et enzym som aktiveres ved fosforylering i insulinsignalveien. Fosforylert Akt fremmer glukosetransport ved å stimulere translokasjonen av GLUT4 til plasmamembranen [20]. Det ble derfor undersøkt om EPS påvirket fosforyleringen og dermed aktiveringen av Akt og om dette dermed kunne være med å forklare det økte glukoseopptaket i EPS-behandlede celler.

Figur 3.9 viser at tilsetning av insulin i 15 minutter ga økt Akt-fosforylering i både kontrollcellene og i cellene som ble behandlet med EPS. Sammenlignet med ustimulert kontroll er det en mulig, men svak, effekt av EPS på fosforylert Akt etter 24 timer, som ikke sees etter 48 timer. Det ble også forsøkt å måle total Akt, men dette ble mislykket. Det ble derfor valgt å ikke kvantifisere resultatet.



Figur 3.9. Effekter av EPS på fosforylert Akt. Brønn en og to viser kontroll, brønn tre og fire viser celler stimulert med EPS i 24 timer og brønn fem og seks viser celler stimulert med EPS i 48 timer. Brønn to, fire og seks er tilsatt 100 nM insulin. EPS ble igangsatt på differensieringsdag seks. Betingelsene for lav-frekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. På forsøksdagen ble cellene inkubert i 15 minutter med insulin eller PBS. Westernblotting ble utført med antistoff rettet mot fosforylert Akt. Det er kun utført ett forsøk med fosforylert Akt.

4 Diskusjon

4.1 *In vitro*-treningsmodell

Formålet med denne masteroppgaven var å teste ut en *in vitro*-treningsmodell. For å etterligne regelmessig trening ble lav-frekvent elektrisk pulsstimulering (enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz i 24-48 timer) benyttet. Det ble tatt utgangspunkt i effekter sett *in vivo* etter trening og undersøkt om disse var tilstede i vår modell.

Modellen er egnet for å kunne studere effekter av trening på muskel uten påvirkning av systemiske faktorer. Videre vil også modellen være egnet til å studere direkte effekter av stoffer i samvirkning med EPS. Det har tidligere blitt utført flere studier med elektrisk pulsstimulering av myotuber fra mus [14, 79, 80]. Vår modell skiller seg fra disse studiene ved at vi benytter humane myotuber. Dette er fordelaktig da humane myotuber har den mest relevante genetiske bakgrunnen og de samme morfologiske, metabolske og biokjemiske egenskapene som finnes i skjelettmuskel hos mennesker. Dette gjør at studier på differensierte humane myotuber er et godt alternativ til *in vivo*-studier.

Det er imidlertid viktig å ikke glemme at det er flere forskjeller mellom vår modell og trening *in vivo*. Aktivering av muskelfibre gjennom motoriske nervefibre er erstattet med EPS i vår modell. Indirekte effekter av trening som for eksempel økt blodtilførsel til de kontraherende musklene er fraværende i vår modell. I tillegg er typen trening, intensitet og varighet av trening avgjørende faktorer for effekter av trening *in vivo*. Dette må tas hensyn til når vi sammenligner resultatene med effekter av trening *in vivo*.

4.2 Effekter av EPS på oljesyremetabolismen

Resultatene viste at EPS ga en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen etter 48 timer. Dette stemmer overens med *in vivo*-studier som viser at trening av mild til moderat intensitet kan gi opptil ti gangers økning i fettsyreoksidasjonen [3]. Økningen i fettsyreoksidasjonen var likevel liten i forhold til det som er sett *in vivo*, og kan skyldes at muskelceller i kultur forbrenner glukose i større grad enn fettsyrer. EPS hadde ingen effekt på oljesyreopptaket i vår modell. Dette er i motsetning til studier *in vivo* som viser at kontraksjoner øker fettsyreopptak i skjelettmuskel [3, 81]. En *in vivo*-studie fra Bonen et al. [81] viste at kronisk

elektrisk stimulering av muskel i rotte økte ekspresjon av FAT/CD36-mRNA og -protein, i tillegg økte fettsyretransport og fettsyreoksidasjon. Hvorfor ikke dette er tilfelle i vår modell er uklart. Studien til Bonen et al. [81] skiller seg fra vår modell på flere punkter. Her ble muskel i levende rotter stimulert kontinuerlig i sju dager, med en frekvens på 10 Hz. Noe av forklaringen på den manglende effekten på oljesyreopptaket i vår modell kan være at både intensitet og varighet av treningen kan spille en rolle for opptaket [3].

Det var ønskelig å undersøke om kombinasjonen EPS og forbehandling med GW eller OA ga en økning i den oksidative kapasiteten til cellene. Resultatene viste at forbehandling med GW ga en signifikant økt oljesyreoksidasjon. Dette var som forventet da GW er en selektiv og potent PPAR δ -agonist som tidligere har vist å øke fettsyreoksidasjonen i humane skjelettmuskelceller i kultur [69, 82]. Derimot ga GW ingen tilleggseffekter på EPS-behandlede celler. Det finnes ingen god forklaring på dette, men det er mulig at EPS gir en maksimal fettsyreoksidasjon og dermed vil forbehandling med GW ikke ha noen effekt. Tidligere studier med disse cellene i vår lab har vist lignende resultater. Blant annet viste Kaja Bogen i sin masteroppgave [83] at bruk av galaktose som næringskilde i cellenes vekstmedium ga økt fettsyreoksidasjon og at forbehandling med GW i disse cellene heller ikke hadde noen additiv effekt på fettsyreoksidasjonen.

Ved substrat-oksidasjonsmetoden er det opptak og oksidasjon av det radioaktivt merkede substratet som måles. En årsak til et tilsynelatende lavt oksidativt potensiale kan være at hoveddelen av substratene som oksideres ikke er radioaktivt merkede. Det var derfor ønskelig å undersøke om forbehandling med oljesyre kunne "fylle opp fettlagrene" slik at [^{14}C]OA ble tvunget til å gå til oksidasjon i mitokondriene og ikke til lagring. Forbehandling med OA ga en negativ effekt på oksidasjonen av [^{14}C]OA. Det som trolig har skjedd er at akutt tilført [^{14}C]OA har blitt fortynnet i OA som ble gitt som forbehandling, noe som gir en redusert oksidasjon av [^{14}C]OA.

4.3 Effekter av EPS på genekspresjon

Resultatene viser en tendens til økning i ekspresjonen av PGC-1 α etter EPS i både 24 og 48 timer, men det er vanskelig å konkludere på grunn av stor spredning i resultatene.

Utholdenhetstrening er vist å gi en tydelig økning i ekspresjonen av PGC-1 α i mennesker [43], og dette øker den oksidative kapasiteten til cellene ved blant annet å påvirke

lipidmetabolismen, mitokondriell biogenese og fibertyperegulering i skjelettmuskel [42]. Tendensen EPS hadde til å øke ekspresjonen av PGC-1 α kan dermed være med å forklare den økte oksidasjonen i EPS-behandlede celler. Den store spredningen i resultatene kan muligens forklares med at muskelceller i kultur uttrykker langt mindre PGC-1 α enn det som uttrykkes *in vivo* [47].

EPS-behandling ga en signifikant økning i CPT1b-mRNA etter både 24 og 48 timer. Disse resultatene samsvarer med tidligere studier som viste at ekspresjonen av CPT1b økte både ved elektrisk stimulering av museceller [14] og ved trening ved moderat intensitet *in vivo* [8]. CPTI blir sett på som det hastighetsbegrensede trinnet i oksidasjonen av fettsyrer [24], og dermed kan økningen i ekspresjonen av CPT1b være en medvirkende faktor til økt oljesyreoksidasjon i EPS-behandlede celler.

Økte mengder av triacylglyserol (TAG) intramuskulært i atleter, til tross for høy insulinsensitivitet, er et kjent paradoks [3, 84, 85]. Upubliserte data viser at EPS av humane skjelettmuskelceller gir en tendens til økning i antall lipiddråper etter 48 timer. Det var derfor ønskelig å undersøke om EPS-behandling hadde noen effekter på lipiddråpeproteinene ”tail-Interacting Protein of 47 kDa” (TIP47). Når adipocytter tilføres fettsyrer begynner de raskt å syntetisere TAG som lagres i lipiddråper. Dette skjer i perioder med overskudd av energi og i den etterfølgende lipolysen blir energi frigjort i form av frie fettsyrer og glyserol. Lipiddråpene i adipocytene er dekket av et lag med fosfolipider som inneholder flere proteiner. Disse proteinene er medlemmer av PAT familien. Navnet PAT kommer fra den første bokstaven fra hvert medlem av familien som er perilipin, ADRP og TIP47. TIP47 kalles også for perilipin 3 og spiller en viktig rolle i lagringen av intracellulære lipider [86-88]. EPS-behandling hadde ingen effekt på TIP47 i humane skjelettmuskelceller.

Nedgang i blodsukker som følge av et økt glukoseopptak, som igjen gir et redusert insulinbehov, er en kjent effekt av trening *in vivo*. Studier fra Nikolić et al. [71] viser at EPS-behandlede myotuber hadde en signifikant økning i både opptak og oksidasjon av glukose. EPS påvirket ikke ekspresjonen av GLUT1 i humane skjelettmuskelceller. Dette stemmer overens med studiene til Rodnick et al. [50] som viste at GLUT1-protein og basalopptaket av glukose ikke ble påvirket av trening i rotter. EPS påvirket heller ikke ekspresjonen av GLUT4. Studier i både mennesker og dyr viser at trening gir en oppregulering i GLUT4-mRNA og -proteinnivå [52, 53]. EPS av museceller i 24 timer ga også en økt ekspresjon av GLUT4 [14]. En mulig forklaring på manglende effekt i vår modell kan være at cellemodeller

generelt sett har et lavt GLUT4-uttrykk [47]. Det er imidlertid ingen klar sammenheng mellom GLUT4-mRNA, proteinuttrykk og GLUT4-translokasjon.

EPS ga tendens til økt ekspresjon av PDK4 etter både 24 og 48 timer. Dette stemmer overens med en tidligere studie *in vivo* i rotter [60]. Økning i PDK4 som oppstår under trening fører til at metabolismen i skjelettmuskel skifter fra glukose- til fettsyreoksidasjon [34] og dette kan være en medvirkende årsak til den økte oljesyreoksidasjonen som ble vist i myotubene.

Ekspresjonen av IL-6 viste en tydelig tendens til økning ved både 24 og 48 timer EPS. Økning i plasmakonsentrasjonen av IL-6 er en akutt respons av trening og det er kontraksjon av skjelettmuskel som utløser mekanismen som ender opp med syntetisering og frigjøring av IL-6 [62]. Dette kan indikere at humane skjelettmuskelceller *in vitro* kontraherer under elektrisk stimulering.

4.4 Effekter av EPS på ulike proteiner involvert i glukose- og fettsyremetabolismen

Det ble vist at EPS i 48 timer ga en mulig økning i proteinmengden til kompleks II i elektrontransportkjeden. EPS hadde ingen påvirkning på ATP-syntase og kompleks I, III og IV. Jeg viser tidligere i denne oppgaven at EPS ga en signifikant økt oljesyreoksidasjon og en tendens til økning i ekspresjonen av PGC-1 α . Studiene til Nikolić et al. [71] viste at EPS ga en signifikant økt glukoseoksidasjon, dobling i mitokondriell masse og en signifikant økning i ekspresjonen av cytokrom C. Ut i fra disse funnene var det forventet en tydeligere effekt av EPS på enzymene i elektrontransportkjeden. PGC-1 α aktiverer ekspresjon av flere gener involvert i oksidativ fosforylering, disse inkluderer cytokrom c oxidase (COX) kompleks II og IV og ATP syntase [47]. Som nevnt tidligere er PGC-1 α -uttrykket i skjelettmuskelceller i kultur lavere enn *in vivo* [47]. Da PGC-1 α er nødvendig for å aktivere disse genene, kan muligens dette være en årsak til det negative resultatet. Det er kun gjort to forsøk, så flere forsøk må til for å kunne trekke en konklusjon.

Resultatet viser som forventet at insulin gir økt Akt-fosforylering både i kontrollceller og i celler behandlet med EPS. I tillegg viser resultatet en mulig, men svak effekt av EPS på fosforylert Akt etter 24 timer. Det er vanskelig å si om denne svake effekten kan være med å forklare det økte glukoseopptaket i EPS behandlede celler [71]. Det er stor usikkerhet og flere teorier rundt mekanismen bak treningsindusert glukoseopptak. En studie fra Aas et al. [89]

viste at effektene av elektrisk stimulering på glukoseopptak kunne skje uavhengig av insulinstimulering. Det er kun gjennomført ett forsøk og flere må til for å kunne si noe sikkert om EPS sin effekt på fosforylering av Akt.

5 Konklusjon

Ved å gi en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen, økte kronisk lav-frekvent elektrisk pulsstimulering den oksidative kapasiteten til humane skjelettmuskelceller. Videre ga EPS en signifikant økning i ekspresjonen av CPT1b og en tendens til økt ekspresjon av PDK4 og PGC-1 α som er gener involvert i glukose- og fettsyremetabolisme. EPS ga en tendens til økt ekspresjon av IL-6, dette kan indikere at humane skjelettmuskelceller *in vitro* kontraherer under elektrisk stimulering.

Disse resultatene viser at vår modell gir mange av de samme effektene som er sett etter trening *in vivo*. Sammen med tidligere studier utført av Nikolić et al. kan vi dermed konkludere med at vår modell kan brukes for å studere effekter av trening *in vitro*.

Litteraturliste

1. Hawley, J.A. and J.O. Holloszy, *Exercise: it's the real thing!* Nutrition reviews, 2009. **67 (3)**: p. 172-178.
2. Pedersen, B.K., et al., *Searching for the exercise factor: Is IL-6 a candidate?* Journal of Muscle Research and Cell Motility, 2003. **24 (2-3)**: p. 113-119.
3. Turcotte, L.P. and J.S. Fisher, *Skeletal muscle insulin resistance: Roles of fatty acid metabolism and exercise.* Physical Therapy, 2008. **88 (11)**: p. 1279-1296.
4. Hawley, J.A., *Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29(3)**: p. 218-22.
5. Vander A, S.J., Luciano D, *Human Physiology. The mechanisms of body function* 1998.
6. Stanfield, C.L., *Principles of Human Physiology* **4**.
7. Goodyear LJ, K.B., *Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity.* Annu. Rev. Med. , 1998. **49**: p. 235-61.
8. Tunstall, R.J., et al., *Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle.* American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2002. **283 (1 46-1)**: p. E66-E72.
9. WHO, *World Health Organization: Diabetes.* 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
10. *Norsk legemiddelbok for helsepersonell 2010*
11. Patti, M.E. and S. Corvera, *The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes.* Endocr Rev, 2010. **31(3)**: p. 364-95.
12. Borghouts, L.B. and H.A. Keizer, *Exercise and insulin sensitivity: A review.* International Journal of Sports Medicine, 2000. **21 (1)**: p. 1-12.
13. Olav Sand, Ø.V.S., Egil Haug *Menneskets fysiologi.* Vol. 3. 2005, Oslo: Gyldendal Norsk Forlag.
14. Burch, N., et al., *Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle.* PLoS ONE, 2010. **5 (6)**: p. 1-11.
15. Schwenk, R.W., et al., *Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82(4-6)**: p. 149-54.
16. Spriet, L.L., *Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans.* Med Sci Sports Exerc, 2002. **34(9)**: p. 1477-84.
17. Campbell, S.E., et al., *A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: Involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279 (35)**: p. 36235-36241.
18. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia.* Acta Physiol Scand, 2005. **183(1)**: p. 31-41.
19. Steiber, A., J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Carnitine: A nutritional, biosynthetic, and functional perspective.* Molecular Aspects of Medicine, 2004. **25 (5-6)**: p. 455-473.
20. Khan, A.H. and J.E. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways.* Diabetologia, 2002. **45 (11)**: p. 1475-1483.
21. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature, 2001. **414(6865)**: p. 799-806.
22. Tremblay, F., M.J. Dubois, and A. Marette, *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle.* Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 2003. **8**: p. d1072-1084.

23. Bruce Alberts, D.B., Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Essential cell biology* 2004, New York: Garland Science.
24. Spriet, L.L., *Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans*. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2002. **34 (9)**: p. 1477-1484.
25. Kraegen, E.W., G.J. Cooney, and N. Turner, *Muscle insulin resistance: a case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105(22)**: p. 7627-8.
26. Wright, D.C., et al., *Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282 (1)**: p. 194-199.
27. Parikh, H., et al., *Molecular correlates for maximal oxygen uptake and type I fibers*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **294(6)**: p. E1152-9.
28. Kuhl, J.E., et al., *Exercise training decreases the concentration of malonyl-CoA and increases the expression and activity of malonyl-CoA decarboxylase in human muscle*. *American journal of physiology*, 2006. **Endocrinology and metabolism. 290 (6)**: p. E1296-1303.
29. Roepstorff, C., et al., *Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2005. **288 (1 51-1)**: p. E133-E142.
30. Knuttgen, H.G., *Strength training and aerobic exercise: comparison and contrast*. *J Strength Cond Res*, 2007. **21(3)**: p. 973-8.
31. Wang, Y.X., et al., *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta*. *PLoS biology*, 2004. **2 (10)**: p. e294.
32. Bassel-Duby, R. and E.N. Olson, *Signaling pathways in skeletal muscle remodeling*. *Annu Rev Biochem*, 2006. **75**: p. 19-37.
33. Constantin, D., et al., *PPARdelta agonism induces a change in fuel metabolism and activation of an atrophy programme, but does not impair mitochondrial function in rat skeletal muscle*. *The Journal of physiology*, 2007. **583 (Pt 1)**: p. 381-390.
34. Ehrenborg, E. and A. Krook, *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor*. *Pharmacological Reviews*, 2009. **61 (3)**: p. 373-393.
35. Na, H.K. and Y.J. Surh, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation*. *Biochemical pharmacology*, 2003. **66 (8)**: p. 1381-1391.
36. Barish, G.D., V.A. Narkar, and R.M. Evans, *PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome*. *J Clin Invest*, 2006. **116(3)**: p. 590-7.
37. Grimaldi, P.A., *Regulatory role of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR) in muscle metabolism. A new target for metabolic syndrome treatment?* *Biochimie*, 2005. **87 (1 SPEC. ISS.)**: p. 5-8.
38. Goto, M., et al., *cDNA cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. **274 (2)**: p. 350-354.
39. Hood, D.A. and A. Saleem, *Exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle*. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2007. **17 (5)**: p. 332-337.
40. Hood, D.A., *Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle*. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 2009. **34 (3)**: p. 465-472.
41. Norrbom, J., et al., *PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle*. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md, 2004. : **1985**). **96 (1)**: p. 189-194.

42. Liu, C. and J.D. Lin, *PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011.
43. Pilegaard, H., B. Saltin, and D.P. Neufer, *Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle*. Journal of Physiology, 2003. **546** (3): p. 851-858.
44. Lin, J., C. Handschin, and B.M. Spiegelman, *Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators*. Cell metabolism, 2005. **1** (6): p. 361-370.
45. Akimoto, T., et al., *Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280** (20): p. 19587-19593.
46. Sandra Kleiner, V.N.-T., Olivia Baré, Xueming Huang, Bruce Spiegelman and Zhidan Wu, *PPARδ Agonism Activates Fatty Acid Oxidation via PGC-1α but Does Not Increase Mitochondrial Gene Expression and Function*. The Journal of Biological Chemistry, 2009.
47. Michael, L.F., et al., *Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 3820-5.
48. Sato, Y., et al., *Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(10): p. 1208-12.
49. Dohm, G.L., *Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise*. J Appl Physiol, 2002. **93**(2): p. 782-7.
50. Rodnick, K.J., et al., *Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 1): p. C9-14.
51. Andersen, P.H., et al., *Increased insulin-stimulated glucose uptake in athletes: The importance of GLUT4 mRNA, GLUT4 protein and fibre type composition of skeletal muscle*. Acta Physiologica Scandinavica, 1993. **149** (4): p. 393-404.
52. Hughes, V.A., et al., *Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 1993. **264** (6 27-6): p. E855-E862.
53. Ren, J.M., et al., *Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269** (20): p. 14396-14401.
54. Host, H.H., et al., *Rapid reversal of adaptive increases in muscle GLUT-4 and glucose transport capacity after training cessation*. Journal of Applied Physiology, 1998. **84** (3): p. 798-802.
55. Terada, S., et al., *Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2001. **90**(6): p. 2019-24.
56. Holloszy, J.O., *Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity*. J Appl Physiol, 2005. **99**(1): p. 338-43.
57. Jessen, N. and L.J. Goodyear, *Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2005. **99**(1): p. 330-7.
58. Ruderman, N.B., et al., *Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase: Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome*. Diabetes, 2006. **55** (SUPPL. 2): p. S48-S54.
59. Tunstall, R.J., et al., *Reduced plasma free fatty acid availability during exercise: effect on gene expression*. Eur J Appl Physiol, 2007. **99**(5): p. 485-93.
60. Hildebrandt, A.L., H. Pilegaard, and P.D. Neufer, *Differential transcriptional activation of select metabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(5): p. E1021-7.

61. Nahle, Z., et al., *CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR/beta-mediated adaptation to metabolic stress*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283** (21): p. 14317-14326.
62. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiological Reviews, 2008. **88** (4): p. 1379-1406.
63. Pedersen, B.K., et al., *The metabolic role of IL-6 produced during exercise: Is IL-6 an exercise factor?* Proceedings of the Nutrition Society, 2004. **63** (2): p. 263-267.
64. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55** (10): p. 2688-2697.
65. Wallenius, V., et al., *Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 75-9.
66. H Bruunsgaard, H.G., J Halkjaer-Kristensen, T L Johansen, D A MacLean and B K Pedersen, *Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage*. Journal of Physiology, 1997. **499**: p. 833-841.
67. Willoughby, D.S., B. McFarlin, and C. Bois, *Interleukin-6 expression after repeated bouts of eccentric exercise*. International Journal of Sports Medicine, 2003. **24** (1): p. 15-21.
68. Oliver, W.R., Jr., et al., *A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5306-11.
69. Ciocoiu, C.C., et al., *Synthesis and dual PPARalpha/delta agonist effects of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole analogues of GW 501516*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(7): p. 3047-55.
70. Riserus, U., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men*. Diabetes, 2008. **57** (2): p. 332-339.
71. Nikolić N, B.S., Rudberg I, Halle IF, Thoresen GH, Rustan AC and Aas V, *Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as a model of exercise in vitro*. PLoS ONE. Innsendt.
72. Gaster, M., H. Beck-Nielsen, and H.D. Schroder, *Proliferation conditions for human satellite cells. The fractional content of satellite cells*. Apmis, 2001. **109** (11): p. 726-734.
73. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. Apmis, 2001. **109** (11): p. 735-744.
74. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.
75. Jaran Strand Olsen, E.M.F., Morten Opsahl, Gunnar Skogan, Janet Martha Blatny *Påvisning av næringsmiddelpatogener med PCR 2006*, Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)
76. Kubista M, A.J., Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N, *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular Aspects of Medicine, 2006. **27**: p. 95-125.
77. Abcam. *Western blotting - A beginner`s guide 2011*; Available from: <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>.
78. Station, M. *Western Blot 2011*; Available from: <http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/>.

79. Fujita, H., T. Nedachi, and M. Kanzaki, *Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(9): p. 1853-65.
80. Park, H., et al., *Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008. **2**(5): p. 279-87.
81. Bonen, A., et al., *Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(4 Pt 1): p. E642-9.
82. Nikolic N, R.M., Rustan AC, Storlien L, Thoresen GH and Strømstedt M. *Overexpression of PGC-1 α increases oxidative capacity of human skeletal muscle cells by increasing mitochondrial function and improving lipid metabolism*. *Biochem Res Int*. Innsendt
83. Bogen, K., *Modifisering av energimetabolisme i humane myotuber ved hjelp av galaktose*. 2010.
84. Moro, C., S. Bajpeyi, and S.R. Smith, *Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: Implications for insulin sensitivity*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2008. **294** (2): p. E203-E213.
85. Goodpaster, B.H., et al., *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: Evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001. **86** (12): p. 5755-5761.
86. Skinner, J.R., et al., *Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284** (45): p. 30941-30948.
87. Tai, E.S. and J.M. Ordovas, *The role of perilipin in human obesity and insulin resistance*. *Current Opinion in Lipidology*, 2007. **18** (2): p. 152-156.
88. Kimmel, A.R., et al., *Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins*. *Journal of Lipid Research*, 2010. **51** (3): p. 468-471.
89. Aas, V., et al., *Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 506-15.

Appendiks

1. Celledyrkning

1.1 Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
50 ml FCS (Foetal Calf serum)
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone

1.2 Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
10 ml FCS (Foetal Calf serum)
10 ml Ultrosor G
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone

1.3 Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
10 ml FCS (Foetal Calf serum)
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone
25 pmol insulin

2. Akuttmedium til substratoksidasjonsmetoden

2.1 Oljesyre

Kald OA (6 mM) i DPBS og BSA: 342 μ L (sluttkonsentrasjon 82 μ M)
Varm OA (100 μ Ci/ml): 250 μ L (sluttkonsentrasjon 1 μ Ci/ml)
BSA (2,4 mM): 75 μ L (sluttkonsentrasjon 7,2 μ M)
L-karnitin (1 M): 25 μ l (sluttkonsentrasjon 1 mM)
NaHCO₃: 0,0925 g (sluttkonsentrasjon 3700 mg/L eller 44,05 mol/L)
DPBS med HEPES: 24,306 mL

3. cDNA-syntese og real-time-PCR

3.1 Reaksjonsmedium til cDNA syntese (per prøve)

10 μ l RNA (prøve)
3,2 μ l DEPC-dH₂O
2 μ l 10xTaqMan RT buffer
0,8 μ l 25xdNTP mix
2 μ l 10xRT Random Primers
1 μ l RNase inhibitor
1 μ l Multiscribe Reverse Transcriptase

3.2 Medium til PCR-reaksjon (per prøve)

2,5 µl fortynnet cDNA prøve
12,5 µl 2xSYBR Green Master Mix
0,25 µl 30 µM Primer F (framover)
0,25 µl 30 µM Primer R (revers)
9,5 µl DEPC-dH₂O

4. Westernblotting**4.1 2xSample buffer**

12,5 ml 0,5 M Tris-HCL pH 6,8
10 ml glycerol
20 ml 10 % SDS
Justeres med dH₂O opptil 50 ml

4.2 12 % Polyakrylamid gel (2 stk)

4,36 ml dH₂O
3,25 ml gelbuffer (1,5 M Tris-Cl pH 8,8)
5,20 ml Monomer løsning (akrylamid)
130 µl SDS løsning (10%)
65 µl Ammonium persulfat (10%)
6,5 µl TEMED

4.3 4 % Stacking gel

6,10 ml dH₂O
2,50 ml stackgelbuffer (0,5 M Tris-Cl pH 6,8)
1,30 ml Monomer løsning (akrylamid)
100 µl SDS løsning (10%)
50 µl Ammonium persulfat (10%)
10 µl TEMED

4.4 Elektroforesebuffer

100 ml 10 x TGS (Tris/Glycine/SDS buffer)
900 ml dH₂O

4.5 Blottebuffer

100 ml 10 x TG (Tris/Glycine buffer)
200 ml metanol
700 ml dH₂O

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

10 mM Tris base (2,42 g)
100 mM NaCl (11,68 g)
Løses i ca 1,8 L dH₂O
pH justeres til 7,5 med konsentrert HCl
Justeres med dH₂O opptil 2 L
0,05 % Tween 20 (1 ml)

4.7 Fremkaller

50 ml fremkaller
150 ml springvann

4.8 Fikseringsvæske

50 ml fiks
150 ml springvann