

Effekt og metabolisme av forgrenede
aminosyrer og uttrykk av acyl-CoA
tioesterase 9 (ACOT9) i humane
skjelettmuskelceller

Sevnur Turan



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2016

Effekt og metabolisme av forgrenede aminosyrer og uttrykk av acyl-CoA tioesterase 9 (ACOT9) i humane skjelettmuskelceller

Sevnur Turan



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2016

Veiledere:

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Stipendiat Jenny Lund

© Sevnur Turan

2016

Effekt og metabolisme av forgrenede aminosyrer og uttrykk av acyl-CoA tioesterase 9 (ACOT9) i humane skjelettmuskelceller

Sevnur Turan

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2015 til mai 2016.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere, professor Arild C. Rustan og professor G. Hege Thoresen for god hjelp og rådgivning under hele masteroppgaven. Jeg vil spesielt rette en stor takk til stipendiat Jenny Lund for hjelp til alt jeg har lurt på, korrekturlesing og støtte gjennom hele masterperioden. Takk for at du har holdt ut med all maset mitt! Jeg vil også takke resten av "Muskelbunten" for veiledning på lab, faglige innspill og hjelp med spørsmål som har dukket opp underveis. Jeg vil benytte anledningen til å takke alle de ansatte i Gydas vei 8 for et hyggelig samarbeid. Takk til kull 2016 for alle de minner vi har hatt, og spesielt takk til alle på masterkontoret for motivasjon og hygge.

Farmasistudiet har også gitt meg vennskap jeg aldri kommer til å glemme, spesielt min beste venninne i disse fem årene, Janisha Mahendran. Takk for moralsk støtte, både gjennom studiet og ellers i livet.

Til slutt vil jeg selvfølgelig takke min familie. Takk til lillebror Aras som har støttet meg når jeg har vært i bunn og på topp. Takk til pappa, Ramazan Turan, og mamma, Sevgi Turan, for at dere har stilt opp for meg i alle år. Dere har vært mine rollemodeller og gjort meg til den jeg er i dag.

Oslo, mai 2016

Sevnur Turan

Sammendrag

Bakgrunn: Diabetes type 2 er et økende problem på verdensbasis og det forskes stadig på dette området. Flere patofysiologiske mekanismer kartlegges for å finne hva som utløser diabetes type 2 og hvordan man kan angripe disse mekanismene for å finne den ideelle behandling. Funksjonen til acyl-CoA tioesterase 9 (ACOT9) er et nytt forskningsområde innen diabetesfeltet. ACOT9 har vist å kunne ha en betydning for regulering av fettsyre- og aminosyremetabolisme. Preliminære data fra samarbeidspartnere ved Karolinska Institutet tydet på økt proteinuttrykk i myotuber fra ekstremt overvektige pasienter med diabetes type 2 sammenlignet med myotuber fra friske, normalvektige donorer. I denne oppgaven har vi analysert uttrykk av ACOT9 i myotuber fra ulike donorgrupper. Vi har også undersøkt aminosyremetabolisme i myotuber etter forbehandling av cellene med fettsyrer, og glukosemetabolisme etter forbehandling med forgrenede aminosyrer.

Metoder: Skjelettmuskelceller ble isolert, dyrket opp og differensiert til myotuber fra ulike donorgrupper; ekstremt overvektige donorer med normal glukosetoleranse (EO-NGT), ekstremt overvektige donorer med diabetes type 2 (EO-T2D), friske og normalvektige donorer (LD), normalvektige og overvektige donorer før og etter en 12 ukers treningsintervensjon, unge utrente og atletiske individer. Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) og western immunoblotting ble utført for å undersøke forskjeller i uttrykk av ACOT9. mRNA-ekspresjon av *ACOT9* ble relatert til *GAPDH* og *RPLP0*. Metabolske studier på aminosyre- og glukosemetabolisme ble utført på myotuber fra LD-donorer. Det ble brukt radioaktivt merkede substrater, henholdsvis L-[¹⁴C(U)]leucin og D-[¹⁴C(U)]glukose. Myotuber ble forbehandlet i 24 timer med eikosapentaensyre (EPA) og oljesyre (OA), begge 100 µM, før måling av aminosyremetabolismen. I forsøket for å undersøke glukosemetabolismen ble myotuber forbehandlet i 24 timer med forgrenede aminosyrer (BCAA) eller α-ketosyrene til forgrenede aminosyrer (BCKA), begge 30 mM.

Resultater: Det ble ikke observert signifikante forskjeller på mRNA-ekspresjon av *ACOT9* mellom myotuber fra EO-NGT-donorer eller EO-T2D-donorer sammenlignet med myotuber fra LD-donorer. Proteinuttrykket av ACOT9 var signifikant høyere i myotuber fra EO-T2D-donorer sammenlignet med myotuber fra LD-donorer, men myotuber fra EO-NGT-donorer viste ingen signifikant økning i proteinuttrykk av ACOT9 i forhold til myotuber fra LD-donorer. Det ble ikke observert endringer i proteinuttrykk av ACOT9 når myotuber fra atleter

og utrente donorer ble sammenlignet. Myotuber fra normalvektige og overvektige donorer før og etter 12 ukers treningsintervensjon viste ingen signifikant forskjell i proteinuttrykk av ACOT9. Det ble brukt for få donorer for å kunne undersøke forskjell i proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber forbehandlet med BCAA eller BCKA. Det ble observert en tendens til økning av fraksjonell oksidasjon av glukose i myotuber forbehandlet med BCAA sammenlignet med kontrollceller. Det ble også observert tendens til økning av fraksjonell oksidasjon av leucin i myotuber forbehandlet med EPA sammenlignet med kontrollceller.

Konklusjon: ACOT9 har et signifikant høyere proteinuttrykk i myotuber fra donorer med EO-T2D sammenlignet med myotuber fra LD-donorer. Forsøk med myotuber fra andre donorgrupper ble gjort og det var ikke signifikante forskjeller mellom de ulike donorgruppene i forhold til proteinkspresjon av ACOT9.

Abstract

Background: Type 2 diabetes is an increasing problem throughout the world and is a continually researched area. Several mechanisms are mapped to determine what triggers development of type 2 diabetes and how to combat these triggers to find the ideal treatment. The function of acyl-CoA thioesterase 9 (ACOT9) is a new area in the field of diabetic research, and has shown to possibly be involved in regulation of fatty acid and amino acid metabolism. Preliminary data from collaborators at Karolinska Institutet indicated increased protein expression of ACOT9 in myotubes from severely overweight individuals diagnosed with type 2 diabetes compared to myotubes from lean donors. This study analysed amino acid metabolism in myotubes after pretreatment with fatty acids, and glucose metabolism after pretreatment with branched-chain amino acids.

Methods: Skeletal muscle cells were isolated, cultured and differentiated to myotubes from various donor groups; severely overweight donors with normal glucose tolerance (EO-NGT), severely overweight donors with type 2 diabetes (EO-T2D), lean donors (LD), normal weight and overweight donors before and after a 12-week exercise intervention, young untrained and athletic individuals. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and western immunoblotting were performed to examine the expression of ACOT9 between myotubes from different donor groups. mRNA expression of *ACOT9* was related to *GAPDH* og *RPLP0*. Metabolical studies on amino acid and glucose metabolism were conducted on myotubes from LD. Substrates labelled with radioactivity, L-[¹⁴C(U)]leucine and D-[¹⁴C(U)]glucose, respectively, were used. Myotubes were preconditioned for 24-hours with eicosapentaenoic acid (EPA) and oleic acid (OA), both 100 µM, prior to the measurement of the amino acid metabolism. Moreover, the myotubes were preconditioned for 24 hours with branched-chain amino acids (BCAA) or α-keto acids of branched-chain amino acids (BCKA), both 30 mM to examine the effect on glucose metabolism.

Results: There were no significant differences in mRNA expression of *ACOT9* between myotubes from EO-NGT donors or EO-T2D donors compared to myotubes from LD. Protein expression of ACOT9 was significantly higher in myotubes from EO-T2D donors compared to myotubes from LD. Myotubes from EO-NGT donors displayed no significant increase in protein expression of ACOT9 relative to myotubes from LD. There were no changes in the ACOT9 protein expression when myotubes from untrained and athletic individuals were

compared. Myotubes from normal weight and overweight donors before and after 12 weeks of exercise intervention displayed no differences in the ACOT9 expression. Too few donors were included in the immunoblotting experiments with myotubes preconditioned with BCAA or BCKA to be able to statistically analyse differences in protein expression of ACOT9. It was observed a tendency to an increase of fractional oxidation of glucose in myotubes preconditioned with BCAA, when compared to control cells. Moreover, it was observed a tendency to an increased fractional oxidation of leucine in myotubes preconditioned with EPA, compared to control cells.

Conclusion: ACOT9 protein expression is significantly higher in myotubes from EO-T2D donors compared to myotubes LD. Experiments with myotubes from several other donor groups were also conducted but there were no significant differences between these donor groups with respect to ACOT9 protein expression and mRNA-expression.

Forkortelser

ACOT	Acyl-CoA tioesterase
ADP	Adenosindifosfat
Akt2	AKT serin/treoninkinase 2
AMPK	Adenosinmonofosfat-aktivert proteinkinase
ATP	Adenosintrifosfat
BCAA	Forgrenede aminosyrer
BCAT	Forgrenet aminosyre aminotransferase
BCKA	α -ketosyre til forgrenede aminosyrer
BCKD	Forgrenet ketosyredehydrogenase
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert radioaktivitet
CAT	Acyl-karnitin translokase
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Koenzym A
CPT I/II	Karnitin palmitoyltransferase I/II
DAG	Diasylglyserol
DEPC	Dietylpyrokarbonat

Forkortelser

DMEM	«Dulbecco's Modified Eagle Medium»
dNTP	Deoksynukleotid trifosfat
DPBS	«Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline»
DPP4	Dipeptidyl peptidase 4
EO-NGT	Ekstremt overvektig med normal glukosetoleranse
EO-T2D	Ekstremt overvektig med diabetes type 2
EPA	Eikosapentaensyre
ETK	Elektrontransportkjeden
FADH ₂	Flavin adenin dinukleotid (redusert form)
FAT/CD36	Fettsyretranslokase
FCS	Føtalt kalveserum
GAPDH	Glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase
GIR	Glukoseinfusjonsrate
GLP-1	Glukagon-lignende peptid 1
GLUT4	Glukosetransportør 4
H ₂ O	Vann
HbA _{1c}	Glykosylert hemoglobin
IDF	International Diabetes Federation

Forkortelser

IR	Insulinreseptor
IRS1	Insulinreseptorsubstrat 1
KMI	Kroppsmasseindeks
LD	«Lean donor»; frisk og normalvektig donor
LPL	Lipoprotein lipase
MT-ACT48	«Mitochondrial acyl-CoA thioesterase of 48 kDa»
mTOR	«Mechanistic target of rapamycin»
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid (redusert form)
OA	Oljesyre
OXPHOS	Oksidativ fosforylering
PBS	Fosfatbufret saltløsning
PKC θ	Proteinkinase C θ
PP2A	Proteinfosfatase 2A
PPAR	Peroksisom proliferatoraktivert reseptor
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
RPLP0	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
RPS6KB1	Ribosomal protein S6 kinase β 1
SDS	Natriumdodecylsulfat

Forkortelser

SEM	Standardfeil til gjennomsnittet
SGLT2	Natrium-glukose kotransportør 2
T-TBS	Tris-bufret saltløsning
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TAG	Triacylglycerol
WHO	Verdens helseorganisasjon

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
1.1	Overvekt og fedme	1
1.2	Insulinresistens	2
1.3	Diabetes type 2	4
1.3.1	Behandling av diabetes type 2.....	5
1.4	Energimetabolisme i skjelettmuskelceller	6
1.4.1	Glukosemetabolisme i skjelettmuskel.....	6
1.4.2	Lipidmetabolisme i skjelettmuskel.....	8
1.4.3	Aminosyremetabolisme i muskel.....	10
1.5	Acyl-CoA tioesterase 9 (ACOT9)	12
1.6	Mål for oppgaven.....	13
2	Materiale og metode.....	15
2.1	Materiale.....	15
2.1.1	Kjemikalier og reagenser	15
	Tabell 1: Liste over kjemikalier og reagenser brukt i forsøk. Oppgitt med tilhørende produsent.....	15
2.1.2	Utstyr.....	16
2.2	Celledyrking	18
2.2.1	Utsåing	18
2.2.2	Proliferasjon	19
2.2.3	Differensiering	19
2.3	Substratoksidasjonsforsøket	20
2.3.1	Forbehandling.....	20
2.3.2	Trappingprosessen.....	20
2.3.3	Celleassosiert radioaktivitet (CA)	21
2.3.4	Proteinmåling	22
2.4	Westernblott.....	22
2.4.1	Celledyrking til westernblott.....	22
2.4.2	Høsting til westernblott	23

2.4.3	Elektroforese	23
2.4.4	Blotting.....	24
2.4.5	Blokkering	24
2.4.6	Påsetting av antistoff	24
2.4.7	Fremkalling	25
2.4.8	Stripping og reblokkering av membran.....	25
2.5	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR)	25
2.5.1	Celldyrking til qPCR	25
2.5.2	Høsting til qPCR	25
2.5.3	RNA-isolering	26
2.5.4	Kvantifisering av mRNA-konsentrasjoner.....	26
2.5.5	cDNA-syntetisering.....	26
2.5.6	qPCR	27
2.6	Statistikk	28
3	Resultater	30
3.1	mRNA-ekspressjon av <i>ACOT9</i> i myotuber.....	30
3.2	Proteinuttrykk av <i>ACOT9</i> i myotuber fra ulike donorgrupper.....	31
3.2.1	Proteinuttrykk av <i>ACOT9</i> i myotuber fra overvektige med og uten diabetes type 2	31
3.2.2	Proteinuttrykk av <i>ACOT9</i> i myotuber fra godt trente og utrente individer	32
3.2.3	Proteinuttrykk av <i>ACOT9</i> i myotuber fra normalvektige og overvektige individer, før og etter en treningsintervensjon	32
3.2.4	Proteinuttrykk av <i>ACOT9</i> i myotuber etter forbehandling med BCAA og BCKA	34
3.3	Opptak og oksidasjon av glukose og leucin	35
3.3.1	Effekter av BCAA og BCKA på glukosemetabolismen i myotuber.....	35
3.3.2	Effekter av fettsyrer på aminosyremetabolismen i myotuber	36
4	Diskusjon.....	37
4.1	Dyrkede skjelettmuskelceller som en <i>in vitro</i> -modell.....	37
4.2	Effekter av BCAA og BCKA på glukosemetabolismen	37
4.3	Effekter av EPA og OA på leucinmetabolismen	39
4.4	Uttrykk av <i>ACOT9</i> i myotuber fra ulike donorgrupper og etter forbehandling med BCAA og BCKA.....	41
4.5	Veien videre.....	46

Innholdsfortegnelse

5	Konklusjon.....	48
	Litteraturliste.....	50
	Appendiks	59

1 Innledning

1.1 Overvekt og fedme

Overvekt og fedme er en økende tilstand globalt. Ifølge Verdens helseorganisasjon (WHO) var 39 % av verdens voksne befolkning klassifisert som overvektige i 2014. I tillegg var 11 % menn og 15 % kvinner av verdens befolkning klassifisert som alvorlig overvektige [1]. I Norge har 1 av 5 nordmenn vekt som er klassifisert som fedme [2]. Det finnes flere parametere som kan vurdere kroppsfett og fordelingen av fett relatert til helse. En av de mest brukte er kroppsmasseindeks (KMI). KMI er et indirekte mål på kroppsfett og er basert på vekten til en person som relateres til kvadratet av høyden i meter, og er angitt ved formelen $\text{vekt}/\text{høyde}^2$. Ifølge WHO er $\text{KMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ klassifisert som overvektig og $\text{KMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ klassifisert som fedme [1]. KMI er ikke påvirket av faktorer som alder, kjønn og muskelmasse [3]. Personer med høy muskelmasse kan få høy KMI, men det vil dermed ikke si at personen er overvektig. I tillegg er fettfordelingen og muskelmasse annerledes hos menn og kvinner. Ulike aldersgrupper har forskjellig fettfordeling og muskelmasse. Derfor må man være forsiktig med bruken av KMI alene som en direkte parameter for kroppsvekt [3]. En annen parameter som kan brukes for mål på overvekt er midjemål. Stort midjemål er ifølge "International Diabetes Federation" (IDF) definert som $\geq 94 \text{ cm}$ for menn og $\geq 80 \text{ cm}$ for kvinner [4]. Midjemål kan brukes sammen med KMI for å gi et bedre anslag på overvekt [5]. "Dual-energy x-ray" (DXA) måling, InBody, Omron og Bod-eComm kan også brukes, fordi disse gir et direkte mål på fettprosent i kroppen [6].

Det skal normalt være balanse mellom kroppens inntak og forbruk av energi. Dersom denne balansen forstyrres ved at inntaket av energi er høyere enn forbruket vil det føre til vektøkning [7]. Det er påvist at genetikk kan også ha en rolle i utvikling av overvekt og fedme [8]. Overvekt og fedme er risikofaktorer for utvikling av blant annet hjerte- og karsykdommer, enkelte kreftformer, dannelse av gallestein og polycystisk ovariesyndrom [9]. Diett med økt nivå av mettet fett [10] og trans-fettsyrer [11] har vist en forbindelse til insulinresistens. Det forekommer høyere dødelighet hos personer med overvekt og spesielt hos personer med fedme, i forhold til normalvektige [12].

Overvekt og fedme er en sentral faktor i metabolske syndromet. Ifølge IDF er metabolsk syndrom definert som:

- fedme (midjemål ≥ 94 cm for menn og ≥ 80 cm for kvinner, der det er spesifikke grenser for ulike etnisiteter)
- og minst to av følgende faktorer: høyt triglyseridnivå ($\geq 1,7$ mM), redusert HDL-kolesterol ($< 1,03$ mM for menn, $< 1,29$ mM for kvinner), høyt blodtrykk (systolisk blodtrykk ≥ 130 mm Hg eller diastolisk blodtrykk ≥ 85 mm Hg), økt fastende blodglukose ($\geq 5,6$ mM). [4]

Overvekt fører til akkumulasjon av frie fettsyrer i muskel og lever [13]. Adiponektin er et hormon som regulerer lipid- og glukosemetabolisme [14]. Det er vist at produksjonen av adiponektin er mindre hos personer som er overvektige [14]. Denne reduserte mengden adiponektin medfører til en forsterkning av insulinresistens [15].

Behandling mot overvekt og fedme vil hovedsakelig være livsstilsendringer der man inkorporerer økt fysisk aktivitet og et sunnere, variert kosthold [16]. Det er vist at trening og endring av matvaner kan føre til økning av lipidoksidasjon [17]. Dette er mange som har vanskeligheter med livsstilsendringer og er alvorlig syke grunnet overvekt og fedme. Derfor er legemiddelbehandling gunstig i slike tilfeller. Norge har et markedsført preparat, orlistat (Xenical[®]), mot fedme. Orlistat reduserer opptaket av triacylglyserol (TAG) ved å hemme lipaseaktivitet i tarm [18]. Dermed skjer det en redusert opptak av TAG og en større andel utskilles via avføringen. Det forskes også på flere mål for legemiddelbehandling. Sentralnervesystemet og energihomeostasen er potensielle mål. Det er foreløpig mye bivirkninger med slike legemidler fordi de også virker på andre mekanismer enn det som kan føre til vektreduksjon [18, 19].

1.2 Insulinresistens

Hovedoppgaven til insulin er å regulere energiinntaket. Insulin regulerer karbohydratmetabolisme, lipidmetabolisme og proteinsyntese [20]. Insulin syntetiseres i β -cellene i bukspyttkjertelen og sekreseres til blodomløpet. Sekresjonen av insulin stimuleres hovedsakelig ved inntak av mat [21]. Insulin vil da transporteres til ulike målorganer som blant annet lever eller skjelettmuskel. På celleoverflaten av disse målorganene finner vi insulinreseptorer (IR). IR består av to α -subgrupper og to β -subgrupper som hver har bundet til seg en autofosforylert tyrosinkinase [20]. Insulin kobles til α -subgruppene, aktiverer IR og

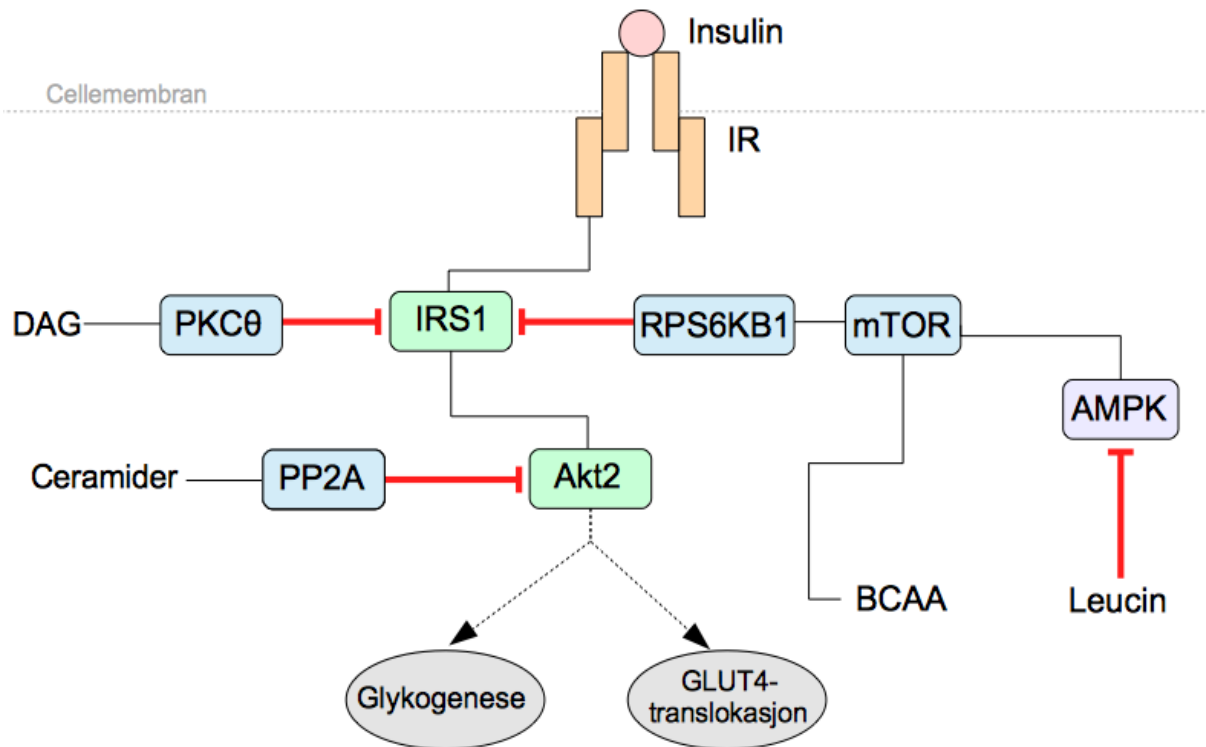
det skjer fosforylering av insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1) og aktivering AKT serin/treoninkinase 2 (Akt2). Deretter skjer blant annet translokasjon av glukosetransportør (GLUT) 4 til celleoverflaten som sørger for økt glukosetransport inn i celler [22] eller regulering av glykogensyntese ved å aktivere enzymet glykogen syntase [23, 24].

Insulinresistens fører til en redusert respons av insulin i målorganer og redusert opptak av glukose. Glukose vil dermed kunne akkumuleres i blodet og føre til senkomplikasjoner. Skjelettmuskulaturen står for et høyt insulin-avhengig glukoseopptak og er derfor det mest sentrale organet for insulinresistens [25]. Det er fortsatt mye uklart rundt hvordan insulinresistens oppstår. Mulige årsaker kan være defekter i IR, defekter i molekyler nedstrøms i insulinkaskaden, defekter i uttrykk og virkningen av GLUT4, og påvirkning av insulinsignalerings via proinflammatoriske molekyler og lipidintermediater [26].

Det er blant annet observert at insulinresistens kan induseres ved akkumulering av lipider (figur 1.1). Lipotoksisitet er forårsaket av høye plasmanivåer av frie fettsyrer og lipidintermediater. Ved akkumulering av blant annet TAG og nedsatt lipidmetabolisme i skjelettmuskelceller ble det funnet økning av blant annet lipidmetabolittene diasylglyserol (DAG) og ceramid [25, 27]. DAG vil aktivere proteinkinase C θ (PKC θ). PKC θ aktiverer serinkinaser og serinområdene på IRS1 fosforyleres [28]. Fosforylering av serinområdene forårsaker redusert kapasitet av IRS1 [27, 29]. Dannelse av ceramid er sterkt preget av proinflammatoriske mekanismer, blant annet tumornekrosefaktor α (TNF- α) [30]. Ceramider vil øke transkripsjon av proteinfosfatase 2A (PP2A) som forårsaker suppresjon av Akt2 [31]. Denne suppresjonen vil føre til manglende glukoseopptak og redusert dannelse av glykogen, samt forstyrrelser i andre mekanismer som reguleres av insulin.

Aminosyrer har også vist å påvirke insulinsignalerings [32, 33]. Flere funn har vist forbindelse mellom forgrenede aminosyrer (BCAA) og insulinresistens. Forbindelsen mellom BCAA og insulinsignalerings baserer seg på aktivering av «mechanistic target of rapamycin» (mTOR) og derved fosforylering av ribosomal protein S6 kinase β -1 (RPS6KB1) i skjelettmuskel slik det er vist på figur 1.1 [34, 35]. Kronisk aktivering av denne signalveien vil føre til serinfosforylering og dermed redusert effekt at IRS1 [27, 29]. Nedsatt aktivitet av adenosinmonofosfat-aktivert proteinkinase (AMPK) vil også føre til aktivering av mTOR/RPS6KB1-signalveien og leucin har vist å føre til en nedregulering av AMPK, [36]. Dette vil over tid føre til insulinresistens i skjelettmuskel. Dysmetabolisme av BCAA kan føre

til akkumulering av toksiske intermediater som kan føre til forstyrrelser i insulinsignaleringen og skader i β -cellene i bukspyttkjertelen [35].



Figur 1.1: Insulinsignalering og mekanismer som kan føre til insulinresistens. DAG og ceramider er lipidmetabolitter som reduserer effekt av molekyler nedstrøms i insulinkaskaden. BCAA kan også føre til forstyrrelser av insulinsignaleringen. Akt2, AKT- serin/treoninkinase 2; AMPK, adenosinmonofosfat-aktivert proteinkinase; BCAA, forgrenede aminosyrer; DAG, diacylglyserol; GLUT, glukosetransportør; IR, insulinreseptor; IRS1, insulinreseptorsubstrat 1; mTOR, ”mechanistic target of rapamycin”; PKC θ , proteinkinase C θ ; PP2A, proteinfosfatase 2A; RPS6KB1, ribosomal protein S6 kinase β 1.

1.3 Diabetes type 2

Diabetes mellitus type 2 er en kronisk metabolsk sykdom som oppstår ved insulinresistens [37]. Forstyrrelser i dannelse og effekt av insulin fører til en ubalanse i blodsukkernivåene og hyperglykemi kan oppstå. Blodsukkernivåene hos en diabetespasient kan ligge på $> 7,0$ mM i fastende tilstand og > 11.1 mM etter et måltid. 9 % av verdensbefolkning over 18 år lider av diabetes mellitus [1]. I Norge viser Reseptregisteret til at rundt 175 000 personer ble forskrevet antidiabetika i 2015 [38]. I tillegg til dette er det antatt at et stort antall er udiagnostisert [1].

Hyperglykemi kan føre til destruksjon av blodårer og nerver [39]. Disse skadene fører til senkomplikasjoner og er hovedsakelig relatert til vaskulære skader. Det kan oppstå mikrovaskulære skader som gir grunnlag for blant annet øyeskader (retinopati) [40] og nyreskader (nefropati) [41]. Makrovaskulære skader kan også inntreffe og disse øker risikoen for kardiovaskulære sykdommer [42]. Pasienter med diabetes type 2 har vanligvis en dårlig livsstil preget av usunt kosthold og lite fysisk aktivitet, og pasientene lider oftest av fedme. Dette fører til insulinresistens og svekket insulinsekresjon [43].

1.3.1 Behandling av diabetes type 2

Målet for hver enkelt pasient er å fjerne symptomer, normalisere energiomsetningen og dermed redusere risiko for utvikling av senkomplikasjoner forårsaket av diabetes. Behandlingsmål i henhold til Nasjonal faglig retningslinje for diabetes er glykosylert hemoglobin (HbA_{1c})-verdi rundt 7,0 % [44]. Ved behandling av diabetes er det først viktig med en livsstilsomlegging der røykslutt, bedret kosthold og fysisk aktivitet er sentralt [44].

Blodsukkersenkende legemidler kan innføres i tillegg til livsstilsrådene. Metformin, som er et biguanid, introduseres i første omgang [44]. Biguanider reduserer glukoneogenese (hepatisk glukoseproduksjon), øker opptaket av glukose i skjelettmuskel og regulerer karbohydrat- og fettsyremetabolismen [37]. Basalinsulin og sulfonylureaderivater (glimepirid, glibenklamid, glipizid) er andrevalgalternativer dersom metformin ikke gir tilstrekkelig effekt [44]. Sulfonylureaderivater øker frisettingen av insulin og øker effekten av endogent insulin dersom det fortsatt er insulinproduksjon i β -cellene [45].

Inkretiner kan bli brukt som tredjevalg eller ved kontraindikasjon av de legemidlene nevnt ovenfor [44]. Inkretiner virker på inkretinsystemet som forbereder kroppen på næringsinntak ved å øke insulinproduksjon og insulinsekresjon i bukspyttkjertelen [46]. Inkretinmimetika (exenatid, liraglutid) er analoger av glukagon-lignende peptid 1 (GLP-1). Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4)-hemmere (sitagliptin, vildagliptin) er kompetitive hemmere av DPP4 og inaktiverer nedbrytning av inkretiner.

Dapagliflozin, som er en natrium-glukose kotransportør 2 (SGLT2)-hemmer, kan brukes som andrevalg i behandling av diabetes type 2 [44]. En annen SGLT2-hemmer, emagliflozin, kan brukes som tredjevalg eller ved kontraindikasjon for legemidlene nevnt ovenfor. Disse hemmerene binder seg selektivt og reversibelt til kotransportøren SGLT2 i nyre. Ved å

blokkere SGLT2 vil mer glukose skilles ut via urin [47]. Alfaglucosidasehemmeren akarbose kan også brukes som tredjevalg eller ved kontraindikasjon for legemidlene nevnt ovenfor [44]. Akarbose reduserer absorpsjon av karbohydrater fra tarmsystemet og regulerer blodsukkeret ytterligere etter et måltid [48]. Kjernereseptoren peroksisom proliferatoraktivert reseptor (PPAR) γ har også vært et mål for legemidler ved at det skjer en reduksjon av hepatisk glukoseproduksjon og økt opptak av glukose i skjelettmuskelceller [49]. PPAR γ -agonisten pioglitazon kan innføres som tredjevalg eller ved kontraindikasjon av legemidlene nevnt ovenfor [44].

1.4 Energimetabolisme i skjelettmuskelceller

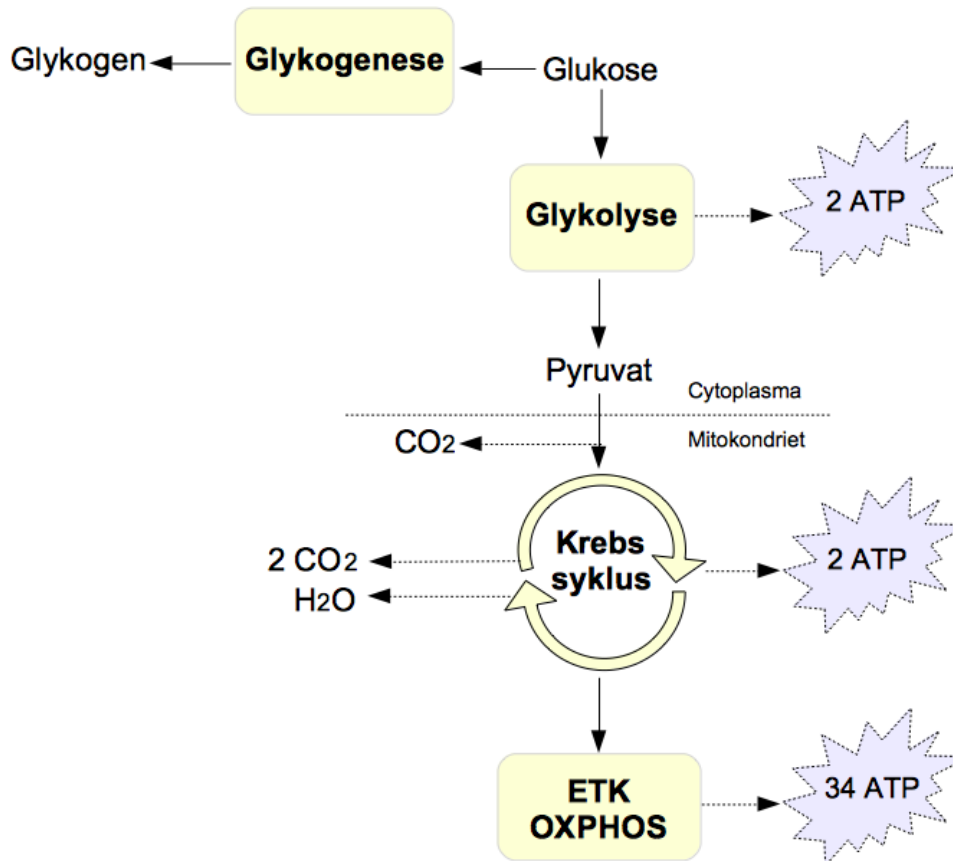
Skjelettmuskulaturen er klassifisert som det største organet i menneskekroppen og er fordelt på 650 separate muskler. Etter fødsel skjer det lite nydanning av skjelettmuskelceller. Når kroppen vokser vil skjelettmuskelcellenes størrelse øke slik at de kan få diameter på 0,01-0,1 mm og en lengde opptil 30 cm [50]. Skjelettmuskulaturen er en samling av flere muskelfiberbunter og disse inneholder myofibriller som går fra den ene enden til den andre enden av muskelfibren. Myofibriller består av aktin- og myosinfilamenter. Ved kontraksjon vil myosinfilamentene dra aktinfilamentene mot midtdelen av myosinfilamentene [51, 52]. Ved dannelse av et aksjonspotensial vil det frigjøres Ca^{2+} som sørger for at hodene på myosinfilamentene binder seg på aktinfilamentene. I tillegg bindes adenosintrifosfat (ATP) til disse hodene. ATP hydrolyseres til adenosindifosfat (ADP) og avgir energi slik at hodene kan bøye seg [50, 53]

1.4.1 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Glukose er en av hovedkomponentene for produksjon av energi i celler. I skjelettmuskulatur foregår det et høyt nivå av glukoseopptak ved insulinstimulering. Dette skjer via GLUT [54]. For skjelettmuskulatur er den viktigste subgruppen GLUT4 [55]. Insulin binder seg til reseptor på celleoverflaten og det oppstår signalkaskade (tidligere forklart i kapittel 1.2). Denne kaskaden fører til translokasjon av GLUT4 til celleoverflaten. Denne mekanismen skjer spesielt etter et måltid og sørger for at glukose tas opp i cellen for videre omdanning til energi eller lagres som glykogen i lever og skjelettmuskelceller [56].

Ved lagring av glukose vil det skje glykogenese. Glukose omdannes enzymatisk til glukose-6-fosfat og deretter omdannes enzymatisk videre til glukose-1-fosfat. Glukose-1-fosfat vil videre omdannes til uridindifosfatglukose, som vil danne forbindelse mellom flere glukosemolekyler [57]. Glykogen vil senere gå gjennom glykogenolyse hvis det er behov for glukose. Her blir glykogen brutt ned av glykogenfosforylase slik at det til slutt dannes glukosemolekyler som videre kan produsere energi [58]. Etter opptak til cytosol vil glukose gjennomgå en rekke prosesser slik at det produseres energi. Første steget er glykolysen. Under glykolysen vil glukose omdannes til pyruvat og produsere energi i form av totalt to ATP-molekyler, som vist i figur 1.2 [59]. I tillegg dannes to nikotinamid adenin dinukleotid molekyler (reduisert form) (NADH). Etter glykolysen vil pyruvat kløyves til acetyl-koenzym A (acetyl-CoA) [60]. Under denne omdanningen av pyruvat til acetyl-CoA genereres to NADH-molekyler og ett karbondioksid (CO_2)-molekyl [50, 59].

Acetyl-CoA er en viktig komponent i Krebs syklus. Krebs syklus skjer i matriks av mitokondriene og består av en rekke prosesser som danner totalt to ATP, seks NADH, to flavin adenin dinukleotid (reduisert form) (FADH_2) [50]. Under Krebs syklus produseres vann (H_2O) og CO_2 som avfallsstoffer, som vist i figur 1.2 [61]. Det siste steget i energiproduksjonen er oksidativ fosforylering (OXPHOS) og elektrontransportkjeden (ETK) (figur 1.2) [62]. Den indre mitokondrielle membran består av fire komplekser (I-IV) og et enzymkompleks ved navnet ATP-syntase [63]. For å drive reaksjonen er det viktig å ha elektronbærere tilstede. Elektronbærerne er de ti NADH og to FADH_2 som ble dannet under glykolysen og Krebs syklus [62]. Det vil oppstå en rekke med reduksjons- og oksidasjonsreaksjoner med disse elektronbærerne. En del av energien som dannes til denne delen av reaksjonen fører til transport av H^+ -ioner til intermembranmellomrommet i mitokondriet. Dermed dannes en konsentrasjonsgradient [62]. Energien som ble tilført for å transportere H^+ -ionene ut til intermembranmellomrommet, vil frigis når disse ionene transporteres inn gjennom ATP-syntasen. Denne energien brukes for å danne ATP fra ADP og fosfatgruppe. Når alle elektronbærerne har gått gjennom denne prosessen vil det optimalt dannes 34 ATP-molekyler, som vist i figur 1.2 [50].



Figur 1.2: Oppsummering av ATP-produksjonen fra glukose som utgangspunkt. Figuren viser også CO₂-produksjon. Dannelse av CO₂ har en betydning for måling av glukosemetabolismen *in vitro* (kapittel 2.3). ATP, adenosintrifosfat; CO₂, karbondioksid; ETK, elektrontransportkjeden; H₂O, vann; OXPPOS, oksidativ fosforylering.

1.4.2 Lipidmetabolisme i skjelettmuskel

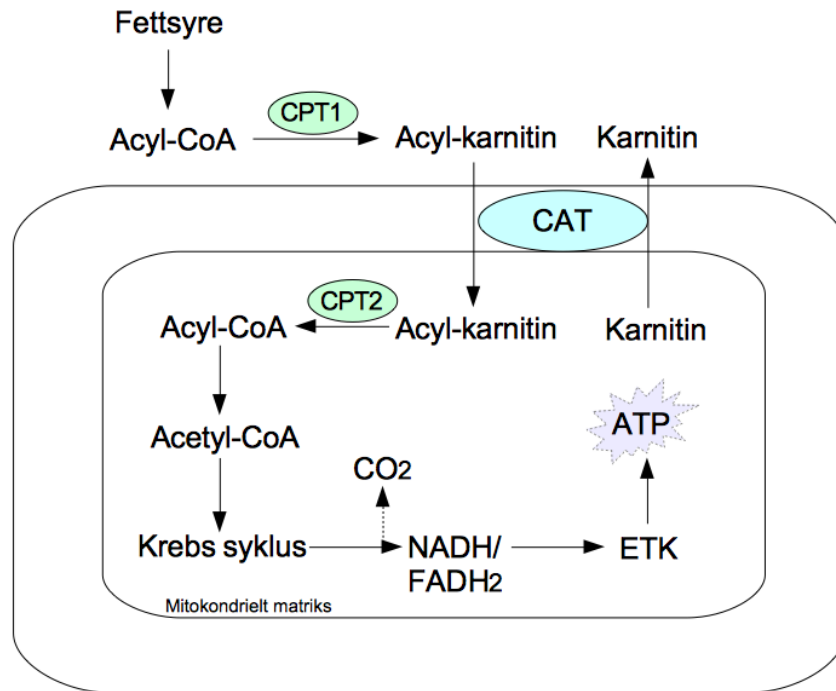
Fett er den største energikilden i kroppen, samt at kroppen lagrer energi i form av fett. Regulering av lipidmetabolismen har en vesentlig rolle i overvekt og fedme. I tillegg har dysfunksjonell lipidmetabolisme en rolle ved mange lidelser [64-66]

Dannelsen av miceller er nødvendig for at enterocytter i tynntarmen skal absorbere monoglyserider og frie fettsyrer fra mat. Micellene løser opp monoglyseridene og fettsyrene og disse diffunderer inn i enterocytene. Når disse er i enterocytene, vil de resyntetiseres til TAG igjen. TAG pakkes inn i kylomikroner som distribueres til målceller ved hjelp av lymfesystemet og kapillærer. Ved ankomst til målcelle vil lipoprotein lipase (LPL) hydrolysere TAG til frie fettsyrer og glyserol [67]. Blant annet vil LPL i muskel bli stimulert av insulin og det er vist at insulinresistens kan føre til redusert LPL-aktivitet [68, 69]. Frie

fettsyrer kan tas opp i målcellen ved passiv diffusjon, men det er også bevist at flere transportmekanismer fører til regulering av frie fettsyrer inn i celler. Frie fettsyrer er bundet til albumin og må frigjøres før de føres inn i celler. Fettsyretranslokase (FAT), også kjent som CD36, er eksempel på et transmembranprotein som sørger for opptak av fettsyrer inn til celler [70]. Det er gjort studier der overuttrykk av FAT/CD36 har ført til økt opptak av frie fettsyrer i muskelceller fra mus [71]. I mus der FAT/CD36-proteinet ikke var uttrykt, ble det transportert mindre frie fettsyrer inn i cellen [72].

Frie fettsyrer som befinner seg i cellens cytoplasma aktiveres ved å bindes til CoA og danner acyl-CoA [73]. Karnitin som finnes i cytoplasma er et transportmolekyl som spalter CoA-molekyler i acyl-CoA og danner acyl-karnitin. Denne reaksjonen katalyseres av karnitin palmitoyltransferase (CPT I) som befinner seg på den ytre mitokondrielle membran, som vist i figur 1.3 [74]. Mitokondriemembranen inneholder translokaser som fører denne forbindelsen inn i intermembranmellomrommet i mitokondriet. Et transmembran protein, acyl-karnitin translokase (CAT), sørger for å transportere acyl-karnitin inn i mitokondriet, som vist i figur 1.3 [75]. Deretter brytes forbindelsen mellom acyl-gruppen og karnitin. CoA binder seg til acyl-gruppen og danner acyl-CoA igjen. Denne reaksjonen katalyseres av CPTII som befinner seg i mitokondriell matriks [74]. Karnitin som frigis under denne reaksjonen transporteres tilbake ved hjelp av CAT for gjenbruk slik figur 1.3 viser.

Neste steg er β -oksidasjon av acyl-CoA i mitokondriet [73]. Denne prosessen starter med oksidasjon ved β -posisjon i acyl-CoA. Hydrogenatomene som frigjøres under denne oksidasjonsprosessen tas opp av flavin adenin dinukleotid (FAD^+) og danner FADH_2 . Deretter tas det opp ett H_2O . Etter opptaket av ett H_2O i β -posisjon, oksideres molekylet igjen og nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) reduseres til NADH . Det siste steget er å danne acetyl-CoA. Dette skjer ved at molekylet som ble oksidert i forrige trinn, binder seg til CoA og danner acetyl-CoA [76]. Det resterende fra acyl-CoA gjennomgår hele oksidasjonsprosessen på nytt. Acetyl-CoA går videre inn i Krebs syklus og ETK og det produseres energi i form av ATP, NADH , FADH_2 .

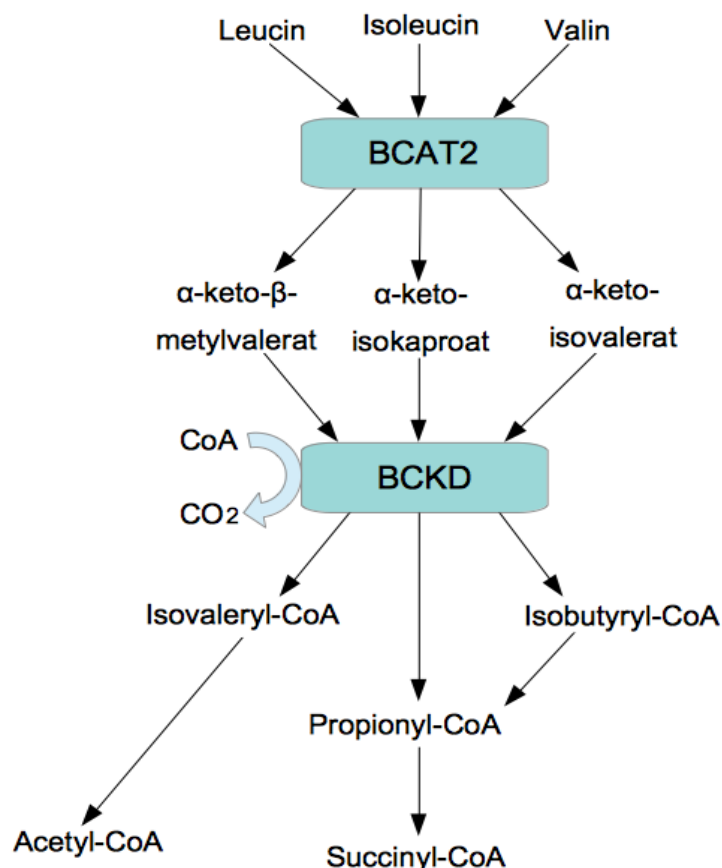


Figur 1.3: Fettsyremetabolisme i mitokondriell matris. ATP, adenosintrifosfat; CAT, acyl-karnitin translokase; CO₂, karbondioksid; CoA, koenzym A; CPT, karnitin palmitoyltransferase; ETK, elektrontransportkjeden; FADH₂, flavin adenin dinukleotid (redusert form); NADH, nikotinamid adenin dinukleotid (redusert form).

1.4.3 Aminosyremetabolisme i muskel

Aminosyremetabolisme står for ca. 5-10 % av total energiproduksjon i kroppen og er derfor en viktig faktor i produksjon av energi [77]. Aminosyrer kan deles inn i tre hovedgrupper. Glukogene aminosyrer (blant annet valin, serin og cystein) er bestanddeler for produksjon av pyruvat eller intermediater for ETK. Ketogene aminosyrer (leucin og lysin) er utløpere til acetyl-CoA. Det finnes også aminosyrer med både glukogene og ketogene egenskaper (blant annet isoleucin og tyrosin). Aminosyrer kan også klassifiseres ut i fra om de er essensielle eller ikke-essensielle. Essensielle aminosyrer er nødvendig å innta via mat fordi kroppen ikke kan syntetisere disse. Forgrenede aminosyrer (BCAA), som det fokuseres mest på i denne oppgaven, er essensielle aminosyrer. BCAA er en fellesbetegnelse for aminosyrene leucin, isoleucin og valin. Fellestrekk mellom disse aminosyrene er at de har forgrenet sidekjede og de første prosessene av metabolismen er lik for alle tre aminosyrene. Disse er hydrofobe aminosyrer og vil derfor spille en stor rolle i proteinstruktur [78]. Blant annet vil membranproteiner som består av BCAA vil danne et upolart miljø og dette vil ha noe å si for hvordan ulike substrater reagerer med disse membranproteinene.

BCAA har vist å ha høyest opptak i skjelettmuskel [78]. Enzymer som er med i BCAA-metabolismen er høyest uttrykt i skjelettmuskel [79]. I første trinn for metabolisme av BCAA forekommer det en deaminering av aminosyrene via forgrenet aminosyre aminotransferase (BCAT) og de korresponderende α -ketosyrer av BCAA (BCKA) dannes [78]. Det finnes to isoenzymer av BCAT. BCAT1 er et cytosolisk enzym og BCAT2 er et mitokondrielt enzym. I mennesker er BCAT1 hovedsakelig uttrykt i hjernen, mens BCAT2 finnes i fleste vev der det foregår BCAA-metabolisme [80, 81]. Det andre trinnet i BCAA-metabolismen baserer seg på dekarboksylering av BCKA via forgrenet ketosyredehydrogenase (BCKD) [78]. Under denne reaksjonen avgis NADH og CO₂, og CoA-derivater av α -ketosyrene dannes. Det er også vist i figur 1.4 at produktene fra isoleucinmetabolismen er propionyl-CoA, fra leucinmetabolismen er det acetyl-CoA og fra valinmetabolismen er det propionyl-CoA [82]. Propionyl-CoA omdannes til succinyl-CoA før inngang til Krebs syklus [83], mens acetyl-CoA vil gå direkte inn i Krebs syklus [84, 85].



Figur 1.4: Forenklet figur av BCAA-metabolismen. α -keto- β -metylvalerat, α -keto-isokaproat og α -keto-isovalerat er α -ketosyrene til henholdsvis leucin, isoleucin og valin. BCAT, forgrenet aminosyre aminotransferase; BCKD, forgrenet ketosyredehydrogenase; CO₂, karbondioksid; CoA, koenzym A. Figur modifisert fra [78, 86].

1.5 Acyl-CoA tioesterase 9 (ACOT9)

Acyl-CoA tioesteraser (ACOT) er identifisert hos både prokaryoter og eukaryoter [86]. Gergely J. *et al.* identifiserte ACOT i grisehjerte og beskrev den som et enzym som deacetylerer acetyl-CoA [87]. Det er ikke fullstendig kartlagt hvilke funksjoner ACOT har. Det er hittil bekreftet at alle ACOT katalyserer hydrolyse av acyl-CoA til frie fettsyrer og CoA [88]. Det er til nå identifisert 15 ACOT-enzymmer. Disse deles inn i to enzymesuperfamilier. ACOT1-6 tilhører α/β -hydrolase superfamilien og ACOT7-15 tilhører ”hotdog-fold” superfamilien. Det har blitt lokalisert ACOT i endoplasmatisk retikulum, cytosol, mitokondrier og peroksisomer [86]. Peroksisomer er spesielt viktig for degradering av fettsyrer og tilstedeværelse av ACOT i peroksisomer har derfor spesiell betydning for lipidmetabolismen [88, 89].

ACOT9 var tidligere identifisert som «mitochondrial acyl-CoA thioesterase of 48 kDa» (MT-ACT48) da det var antatt en forbindelse mellom EPS15 (et protein involvert i endocytose av epidermal vekstfaktor) og MT-ACT48. Dette fordi det ble karakterisert et 48-kDa polypeptid ved binding til EPS15. Det ble imidlertid ikke funnet en *in vivo* forbindelse mellom MT-ACT48 og EPS15 [90]. Ved undersøkelse av *ACOT9* mRNA-ekspressjon og proteinekspressjon av ACOT9 var det et variert forekomst i ulike vev fra mus. Dette inkluderte blant annet brunt fettvev og nyrer [86]. ACOT9 er en mitokondriell ACOT [86, 88]. Det er en hypotese at ACOT9 også kan ha en regulativ rolle i lipid- og aminosyremetabolismen. Flere forsøk har vist at ACOT9 i mitokondriene kan hydrolysere kortkjedet acyl-CoA i tillegg til middels og langkjedede acyl-CoA, i motsetning til andre mitokondrielle ACOT der det ikke foreligger mye bevis for at de kan hydrolysere kortkjedede acyl-CoA [86]. Det er spekulert om lokalisering av ACOT9 i mitokondrier kan ha en vesentlig betydning for lipidmetabolisme fordi den regulerer nivå av frie fettsyrer [86]. Mus som ble foret med høyfett-diett hadde økt genuttrykk av ACOT9 i lever ved utvikling av leversteatose [91].

ACOT9 har høyest enzymaktivitet på de kortkjedede acyl-CoA; propionyl-CoA, butyryl-CoA, isobutyryl-CoA og isovaleryl-CoA [86]. Det er spesielt viktig for denne oppgaven å påpeke at disse substratene er intermediater i aminosyremetabolismen. Det er derfor antatt at økt ekspressjon av ACOT9 kan ha en forbindelse til insulinresistens hos overvektige fordi ACOT9 øker mengden BCAA [86]. Grunnlaget for denne påstanden er at det har blitt påvist økte nivåer av BCAA hos personer med diabetes type 2 [35]. BCAA er antatt å interferere

med insulinsignaleringsen, slik det er vist på figur 1.1. ACOT9 bryter ned CoA-derivatene som kommer av BCAA-metabolisme. Ved nedbryting av CoA-derivater forstyrres BCAA-metabolisme og BCAA opphopes.

1.6 Mål for oppgaven

Overvekt og diabetes type 2 er et økende globalt problem. Derfor er det viktig å finne nye angrepspunkter for å bedre behandling av disse lidelsene. Det foregår stadig ny forskning og det har blitt funnet mange forbindelser mellom både kjente og mindre kjente signalveier, som kan resultere i forstyrrelser av energimetabolisme og utvikling av insulinresistens. Betydningen av acyl-CoA tioesterase 9 (ACOT9) i utvikling av diabetes type 2 hos overvektige er interessant å undersøke. Preliminære forsøk, utført av samarbeidspartnere ved Karolinska Institutet, på myotuber fra ekstremt overvektige individer med diabetes type 2 tydet på forhøyet proteinekspressjon av ACOT9 sammenlignet med muskelceller fra friske, normalvektige donorer. Som tidligere nevnt i innledningen, kan ACOT9 regulere fettsyre- og aminosyremetabolismen [86]. Gjennom nærmere studier av denne koblingen mellom fettsyre- og aminosyremetabolismen er det kanskje mulig i fremtiden å introdusere en hemmer mot ACOT9. Ved bruk av en slik hemmer vil man muligens kunne regulere fettsyre- og aminosyremetabolisme hos pasienter med diabetes type 2, og dermed hindre progresjon av sykdommen. Hovedmålet for denne oppgaven var derfor å undersøke effekt av forgrenede aminosyrer (BCAA) og α -ketosyre til BCAA (BCKA) på glukosemetabolismen, samt eikosapentaensyre (EPA) og oljesyre (OA) på aminosyremetabolismen i dyrkede humane skjelettmuskelceller (myotuber), samt undersøke ekspressjon av ACOT9 i myotuber på mRNA- og proteinnivå.

Følgende delmål ble satt:

- Undersøke om det er ulikt proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra ulike donorgrupper:
 - Myotuber fra donorer med ekstrem overvekt med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og myotuber fra donorer med ekstrem overvekt med diabetes type 2 (EO-T2D) sammenlignet med myotuber fra friske og normalvektige donorer (LD)

- Myotuber fra utrente donorer sammenlignet med myotuber fra atletdonorer
- Myotuber fra normalvektige og overvektige, før og etter en 12 ukers treningsintervensjon
- Undersøke om det er ulik mRNA-ekspresjon av *ACOT9* i myotuber fra EO-NGT- og eller EO-T2D-donorere sammenlignet med myotuber fra LD-donorere.
- Undersøke hvordan myotuber regulerer opptak og oksidasjon av glukose etter 24 timers forbehandling med forgrenede aminosyrer (BCAA) og α -ketosyre til BCAA (BCKA).
- Undersøke hvordan myotuber regulerer opptak og oksidasjon av aminosyren leucin etter 24 timers forbehandling med fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og oljesyre (OA).

2 Materiale og metode

2.1 Materiale

2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 1: Liste over kjemikalier og reagenser brukt i forsøk. Oppgitt med tilhørende produsent.

Produsent	Kjemikalie/reagens
Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA, USA)	Power SYBR Green PCR Master Mix, 5 ml
Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA)	10x Tris/Glycine/SDS Electrophoresis Buffer
	10x Tris/Glycine Transfer Buffer
	Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate. (#1706515)
	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
	Clarity ECL Western Blotting Substrate
	Precision Plus Protein Dual Color Standards
	Tween 20
Cell Signaling Technology [®] Inc. (Danvers, MA, USA)	B-Actin, rabbit antibody (#4970S)
Gibco [®] Invitrogen, Gibco Life Technologies (Paisley, Skottland, Storbritannia)	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS) uten Ca ²⁺ og Mg ²⁺
	Fungizone [®] (250 µg/ml amphotericin B)
	Føtalt kalveserum (FCS)
Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Primere (ACOT9, GAPDH, RPLP0)
Merck Millipore Corp. (Billerica, MA, USA)	Sodium hydroxide, 40 g/mol

Pall Life Sciences (Washington, NY, USA)	Ultroser™ G
PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA, USA)	Glucose D-[¹⁴ C(U)], 100 µCi/ml
	Leucine L-[¹⁴ C(U)], 100 µCi/ml
	Oleic acid [1- ¹⁴ C], 100 µCi/ml
	OptiPhase Supermix Cocktail
	Lysis Buffer RLT Plus
Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA)	Anti-rabbit, antibody (#R33830)
	Bovint serumalbumin (BSA)
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	Bromfenolblått
	2-merkaptoetanol
	Protease Inhibitor Cocktail
	Restore Western Blot Stipping Buffer

2.1.2 Utstyr

Tabell 2: Liste over utstyr brukt i forsøk. Oppgitt med tilhørende produsent.

Produsent	Utstyr
Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA, USA)	MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate
	MicroAmp® Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free
	StepOnePlus™ Real-Time PCR System
Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)	ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software
	Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis

Materiale og metode

	System
	Mini-PROTEAN [®] TGX-gel 4-20 %
GE Healthcare (Chicago, IL, USA)	Amersham Protran Premium nitrocellulose blotting membrane 0,45 µm
	Amersham ECL Semi-Dry Transfer Unit TE70
Kubota Corp.	Kubota 2010 Compact Tabletop Centrifuge
PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA, USA)	IsoPlate [™] 96, hvit
	Microbeta ² Plate Counter
	Unifilter [®] 96 GF/B
	Victor [™] X4 Multilabel Plate Reader
QIAGEN Inc. (Valencia, CA, USA)	QIAshredder
	RNeasy Plus Mini Kit
Sigma-Aldrich [™] (St. Louis, MO, USA)	Corning [®] CellBIND [®] 96-well plates
	Eppendorf [®] Safe-Lock microcentrifuge tubes 1,5 ml
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	Corning [™] CentriStar [™] Centrifuge Tubes, 15 ml
	Corning [™] CentriStar [™] Centrifuge Tubes, 50 ml
	Corning [™] Stripette [™] Disposable Plastic-Wrapped Polystyrene Serological Pipettes, 5 ml
	Corning [™] Stripette [™] Disposable Plastic-Wrapped Polystyrene Serological Pipettes, 10 ml
	Corning [™] Stripette [™] Disposable Plastic-Wrapped Polystyrene Serological Pipettes, 25 ml

	Dynabeads [®] MX2 Mixer
	Heraecus [™] Fresco [™] 21 Microcentrifuges
	NanoDrop [™] Lite Spectrophotometer
	Nunc [™] Cell Culture Treated EasyFlasks [™] , 25 cm ²
	Nunc [™] 96-Well Polypropylene MicroWell [™] Plate
	Primer Express [®]
	Reagent Reservoir, 25 ml
VWR [®] (Radnor, PA, USA)	Grade 703 Blotting paper

2.2 Celledyrking

2.2.1 Utsåing

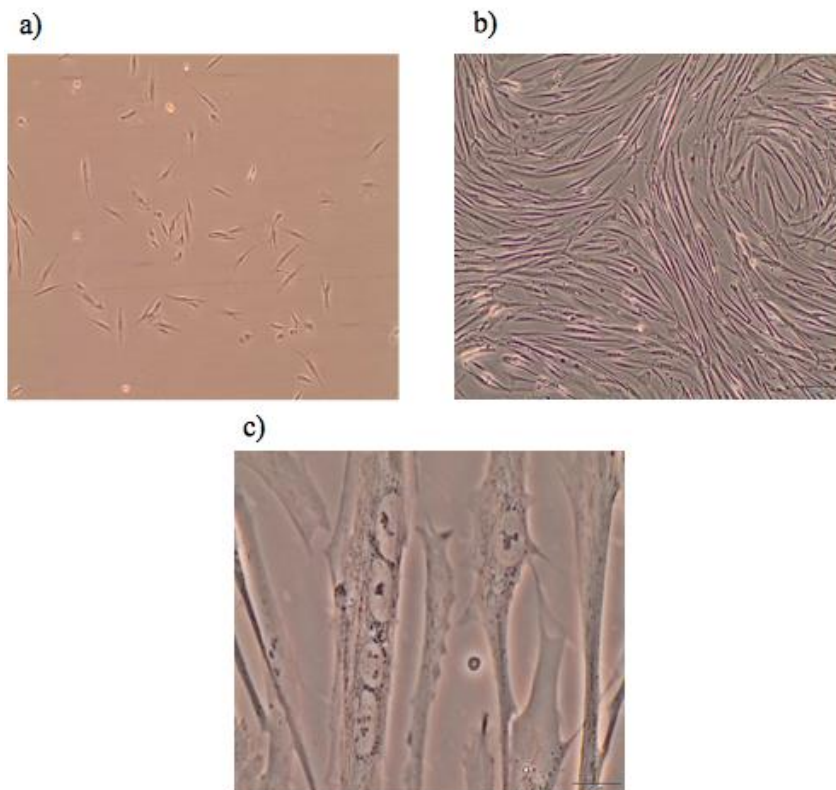
Utsåingsmedium (appendiks 1.1) ble overført til et 50 ml sentrifugerør. Dette ble varmet opp i vannbad på 37 °C. Deretter ble ampulle med cellene hentet fra nitrogentank og tinet opp i vannbad mens korken ble skrudd av noen ganger for å utligne trykket etter frysing. Innholdet i ampullen ble overført til 10 ml sentrifugerør og tilsatt 5 ml utsåingsmedium. Røret med cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter. Så ble supernatanten fjernet forsiktig. Dette trinnet sørget for at dimetylsulfoksid som var i frysemediet ble fjernet. Cellepelletten ble resuspendert i 9 ml utsåingsmedium og cellesuspensjonen ble overført ved hjelp av reservoar og multikanalpipette til 96-brønners brett. Det ble overført 100 µl cellesuspensjon til hver brønn. Cellene ble inkubert i 5 % CO₂-kontrollert inkubator ved 37 °C i 24 timer. Under dette punktet ble myoblaster dyrket og disse skulle så gå gjennom myogenesen til å bli muskelfibre.

2.2.2 Proliferasjon

Mediet i cellene ble byttet fra utsåingsmedium til proliferasjonsmedium (appendiks 1.2) etter 24 timer. Utsåingsmediet ble sugd av og det ble tilsatt 100 μ l proliferasjonsmedium til hver brønn. Proliferasjonsmediet sørget for at antallet celler (myoblaster) økte og vi fikk et tilstrekkelig antall celler til senere differensiering. Cellene ble inkubert i 5 % CO₂-kontrollert inkubator ved 37 °C. Mediet ble byttet senest hver 2.-3. dag og cellene ble dyrket i proliferasjonsmedium til de var 80-90 % konfluente (figur 2.1b).

2.2.3 Differensiering

Cellene ble tilsatt differensieringsmedium (appendiks 1.3) da de var blitt 80-90 % konfluente. Differensieringsmediet sørget for at det ble dannet flerkjernede myotuber (figur 2.1c). Denne prosessen tok 5-8 dager og differensieringsmediet ble byttet annenhver dag. Cellene ble inkubert i 5 % CO₂-kontrollert inkubator ved 37 °C.



Figur 2.1: Bilder av humane skjelettmuskelceller fra celledyrkning. a) Bilde av muskelceller etter 24 timer i utsåingsmedium. Bildet er tatt med 4x forstørring. b) Bilde av muskelcellene etter 7 dager i proliferasjonsmedium, der cellene har blitt 80-90 % konfluente. Bildet er tatt med 4x forstørring. c) Bilde av muskelceller etter 5 dager i differensieringsmedium, der det er mulig å se flerkjernede myotuber. Bildet er tatt med 40x forstørring.

2.3 Substratoksidasjonsforsøket

Denne metoden baserer seg på bruk av trappemedium med ^{14}C -merkede substrater som akkumuleres og oksideres i celler. Dette gir et grunnlag for måling av mengden $^{14}\text{CO}_2$ som avgis av cellene til et filter fuktet med 1 M NaOH som befinner seg over cellebrettet under inkubasjonen [92].

2.3.1 Forbehandling

Cellebrett ble forbehandlet 24 timer før inkubasjonsprosessen (appendiks 2.1). Forbehandlingen gikk ut på tilsetninger av EPA, OA, blanding av BCAA og blanding av BCKA til cellene. Noen av radene ble brukt som kontroll der vi tilsatte differenseringsmedium (appendiks 1.3) og «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (DMEM)-Glutamax (lav glukose – 5 mM, med natriumpyruvat). Differenseringsmediet ble fjernet og 100 μl av tilhørende forbehandling ble tilsatt (tabell 3).

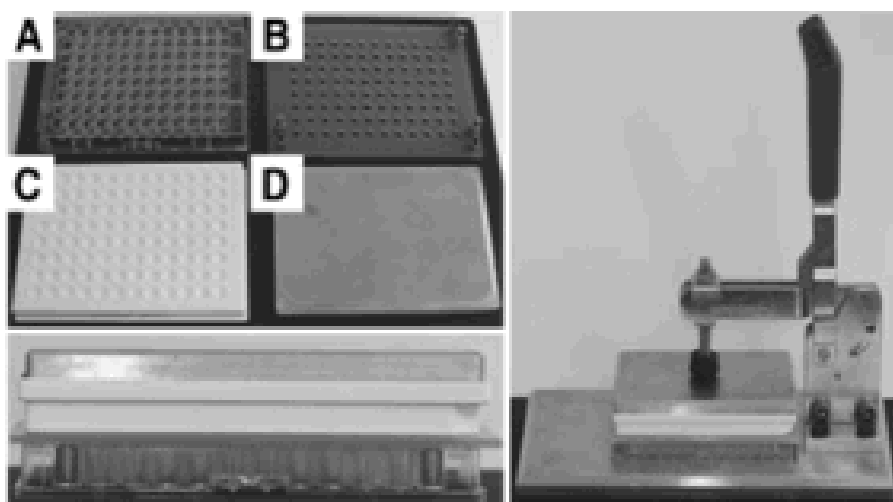
Tabell 3: Oppsett for forbehandling. Muskelcellene ble dyrket til 80-90 % konfluens før de ble differensiert til myotuber, i henhold til kapittel 2.2. De siste 24 timene av differenseringsprosessen ble myotubene forbehandlet med løsningene beskrevet i appendiks 2.1. BCAA, forgrenede aminosyrer; BCKA, α -ketosyre til de forgrenede aminosyrene; EPA, eikospentaensyre; K, kontroll; OA, oljesyre.

^{14}C -Glukose 0,58 $\mu\text{Ci/ml}$ 200 μM				^{14}C -Leucin 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ 100 μM		
5	6	7	8	9	10	11
K	BCAA 30 mM	K	BCKA 30 mM	K	EPA 100 μM	OA 100 μM

2.3.2 Trappingprosessen

Etter 24 timers forbehandling ble brettet inkubert med trappemedier (appendiks 2.2). Først ble filterbrett gjort klart ved å fjerne filterpapiret i de fire hjørnene hvor skruene skulle være. Det ble satt på en plastfilm under filterbrettet, før 20 μl nylaget 1 M NaOH ble tilsatt. Forbehandlingsmediene ble sugd av før trappemedier ble overført til reservoir. Det ble tilsatt 50 μl trappemedium til hver brønn som beskrevet i tabell 3. Deretter ble cellebrettet plassert i trappeholderen (figur 2.2). Bunnskrue ble satt på og brettet ble dekket med silikonplate.

Toppskruer og filterplate ble satt på øverst. Metallplate ble satt over og klemt sammen ved hjelp av en hendel og deretter ble hele trappholderen inkubert ved 37 °C i 4 timer.



Figur 2.2: Utstyret som ble benyttet for gjennomførelse av substratoksidasjon. A: 96-brønners Brett, B: silikonlapp og skruer, C: 96-brønners UniFilter® Brett, D: metallplate (aluminium). Bilde hentet fra [92].

Etter 4 timer ble trappholderen demontert og trappemediene ble sugd forsiktig av. Cellene ble vasket 2 ganger med 150 µl romtemperert fosfatbufret saltløsning (PBS). Det ble til slutt tilsatt 200 µl 0,1 M NaOH i hver brønn og brettet ble forseglet med plastfilm og lokk. Dette ble plassert ved -20 °C for senere analyse. Filterbrettet ble tilsatt 40 µl Optiphase Supermix tellervæske i hver brønn og brettet ble dekket med TopSeal®-A plus plastfilm. Dette filterbrettet stod 2 dager i romtemperatur før det ble utført måling av CO₂ på MicroBeta² scintillasjonsteller.

2.3.3 Celleassosiert radioaktivitet (CA)

CA-måling baserer seg på måling av mengden radioaktivitet som er akkumulert av cellene. Cellebrett som var lagret ved -20 °C og rester av trappemediene ble satt i inkubator for å tines. Det ble tatt ut 50 µl av lysatet fra hver brønn og overført til 96-brønners Isoplate™ Brett. Minimum fire paralleller à 50 µl av de radioaktive forsøksmediene ble tilsatt i de tomme radene for kontrolltelling. Til slutt ble det tilsatt 100 µl Optiphase Supermix tellervæske til hver brønn og brettet ble dekket med TopSeal®-A plus plastfilm. Dette brettet stod 2 timer i romtemperatur før telling av radioaktivitet i MicroBeta² scintillasjonsteller.

2.3.4 Proteinmåling

Proteinmålingen ble utført etter metode utviklet i 1976 av Marion Bradford [93]. Bradford-metoden er rask og har mindre uforlikeligheter slik som konvensjonelle metoder for proteinmåling. Denne metoden baserer seg på binding av fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 til proteiner og sørger for kvantifisering ved at fargestoffet skifter farge fra rødt til blått ved kontakt med proteiner. Høyere konsentrasjon av proteiner i prøven fører til sterkere blåfarge. Denne fargereaksjonen fører til endring av absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Konsentrasjonen av proteiner i prøven sammenlignes med standarder med kjente proteinkonsentrasjoner. Oftest brukes ulike fortynninger av BSA som standarder.

Cellebrettet og BSA-standarder (0, 5, 10, 20, 40, 80 og 160 µg/ml løst i 0,1 M NaOH) ble satt inn i inkubator for å tines. Rad 1 og 2 i brettet ble tilsatt standardene, to paralleller à 50 µl av hver. Resten av brettet ble brukt til proteinmåling av lysatet, 50 µl til hver brønn. BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ble fortynnet 1:5 med destillert H₂O. Det ble tilsatt 200 µl av denne løsningen til hver brønn og brettet stod i ca. 5 minutter før måling på Victor™ X4 Multilabel plateleser.

2.4 Westernblott

Denne metoden detekterer spesifikke proteiner i vev/homogenat ved hjelp av molekylvekt til proteiner og bindingsspesifisiteten av antistoff til proteinene. Prøvene ble overført til en gel og tilsatt antistoffer som er spesifikk for proteinet som skal identifiseres.

2.4.1 Celledyrking til westernblott

Dyrking av celler for westernblott ble utført som beskrevet på kapittel 2.2. Den eneste forskjellen var at cellene ble resuspendert i 3 ml utsåingsmedium etter sentrifugering og det ble brukt 25 cm² flasker til utsåing av cellene. Cellene ble tilsatt proliferasjonsmedium 24 timer etter utsåing og ble dyrket til de er 80-90 % konfluente, og deretter tilsatt differensieringsmedium.

2.4.2 Høsting til westernblott

Når cellene ble godt differensierte ble cellene høstet for bruk i westernblott-forsøkene. Gammelt medium ble sugd ut av flasken med celler og innholdet ble vasket 2 ganger med 2 ml PBS. Flasken ble tilsatt 150 µl høstebuffer (appendiks 3.1) og cellene ble skrapet med celledskape og overført til eppendorfrør. Høstebufferen inneholdt 2x-samplebuffer, proteasehemmer og fosfatasehemmercocktail. Innholdet i 2x-samplebuffer består av natriumdodecylsulfat (SDS), glyserol og Tris HCl. SDS er en detergent som denaturerer proteiner, gjør dem uniformt negativt ladet og proteinene blir lineære slik at det er størrelsen til proteinet som bestemmer hvor langt den vandrer i gelen under elektroforesen. Glyserol øker tettheten og får prøven til å synke ned i brønnen på gelen under elektroforesen. Tris HCl er buffer som gir en pH på ca. 6,8.

Eppendorfrør med cellelysat ble kokt ved 100 °C i 5 min. Deretter ble det utført proteinmåling ved hjelp av NanoDrop™ Lite spektrofotometer. Hvis dette steget skulle bli utført senere, ble cellelysatet oppbevart ved -20 °C. Etter proteinmåling ble det tilsatt 10 % 2-merkaptoetanol og 5 % bromfenylblått. 2-merkaptoetanol er et reduksjonsmiddel som reduserer S-S-bindinger og øker grad av linearisering. Bromfenylblått er en fargeindikator og visualiserer vandringen av proteiner i gel under elektroforesen. Lysatet ble kokt igjen ved 100 °C i 5 min. Rørene ble oppbevart ved -20 °C.

2.4.3 Elektroforese

Elektroforesen består av en anode og en katode som er koblet til et apparatur med buffer og gel der prøvene er tilsatt. Proteinene i prøvene er negativt ladede, fordi de er tilsatt SDS og 2-merkaptoetanol. Prøvene vil derfor bevege seg mot anoden. Gelen inneholder en polymer av acrylamid som danner et nettverk. Konsentrasjonen til denne gelen bestemmer tettheten til nettverket, altså porestørrelsen. Store proteiner vil møte mer motstand i gelen og vil derfor detekteres øverst, mens mindre proteiner vil vandre lenger. Dermed kan man separere proteinene fra hverandre og påvise spesifikke proteiner i prøvene.

Plastikkbeskyttelse på toppen og bunnen av gelen ble fjernet og gelene ble satt på elektroforeseapparatet. Apparatet ble fylt med elektroforesebuffer (appendiks 3.2). I første kammer ble det tilsatt 5 µl Biorad Precision Plus Protein Dual Color Standards, som er en standard. Prøvene ble blandet og applisert i et volum tilsvarende 20 µg protein i de

resterende kamrene. Elektroforesebuffer ble fylt rundt gelene til korrekt nivå etter markering på apparaturen, og koblet til en strømkilde. Gelen ble kjørt på 200 V i ca. 1 time.

2.4.4 Blotting

Som forberedelse til blotting ble 6 filterpapir og 1 membran per gel fuktet i minimum 10 minutter. Disse ble fuktet i blottebuffer (appendiks 3.3). Det var svært viktig å ikke ta for hardt på membranene for å unngå merker under fremkallingen. Når elektroforeseprosessen var slutt, ble proteinene overført til en nitrocellulose blottingmembran. Det ble laget en sandwich av 3 filterpapir, membran, gelen fra elektroforesen og deretter de resterende 3 filterpapirene og det ble pipettert over litt blottebuffer. Eventuelle luftbobler ble fjernet ved hjelp av rulle. To ulike systemer ble brukt til blotting. For Trans-Blot[®] Turbo Transfer System, ble blottingen kjørt på 25 V og 1,0 A i 25 minutter, mens for Amersham ECL Semi-Dry Transfer Unit TE70 ble blottingen kjørt på 30 mA (1 gel) eller 64 mA (2 geler) i 1 time.

2.4.5 Blokking

Etter blotting ble standarden markert på membranen før den ble overført til kar og tilsatt 5-10 ml 5 % tørrmelk (appendiks 3.6). Denne prosessen kalles for blokking. Blokking er viktig for å unngå uspesifikk antistoffbinding til membranen, samt for å identifisere proteinet av interesse. Tørrmelken ble fjernet etter 1 time og membranen ble overført til 50 ml sentrifugerør. Det var igjen viktig å være forsiktig under overføringen av membran til sentrifugerør.

2.4.6 Påsetting av antistoff

Det ble tilsatt 5 ml primærantistoff per membran (appendiks 3.7). Sentrifugerørene med membran og primærantistoff ble satt på Dynabeads[®] MX2 Mixer i et kjølerom over natten. Neste dag ble membranene overført til kar, satt på BellyDancer[®] og vasket 3-5 ganger i 10-15 minutter med ca. 10 ml 1x tris-bufret saltløsning (T-TBS) (appendiks 3.5). 10 ml sekundærantistoff (appendiks 3.8) ble tilsatt etter vask. Dette fikk virke i minimum 1 time ved romtemperatur. Membranene ble vasket 3-5 ganger i 10-15 minutter med ca. 10 ml 1x T-TBS på BellyDancer[®].

2.4.7 Fremkalling

For fremkalling ble det benyttet BioRad Clarity Western ECL Substrate, som består av en peroksidløsning og en luminol/enhancer-løsning. Disse ble blandet i 1:1 forhold. Membran ble inkubert med dette i minimum 5 minutter. Fremkallingsvæsken inneholder «horseradish peroksidase»-enzymet som konjugerer med sekundærtantistoff og danner et signal som kan detekteres. Membranen fremkalles så i Bio-Rad ChemiDoc Molecylar Imager XRS+.

2.4.8 Stripping og rebløkking av membran

Det er mulig å fjerne antistoff som er på en membran (stripping) for å så rebløkke og påsette nytt antistoff. Ulempen med stripping av membran er at det også fjernes en del proteiner fra prøvene. Først ble membranen vasket med 3-5 ganger á 10 minutter med 10 ml 1x T-TBS. Deretter ble det tilsatt 10 ml Thermo Scientific RestoreTM Western Blot strippevæske. Etter 30 minutter ble strippevæsken fjernet og membranen ble igjen vasket 3-5 ganger á 10 minutter med 10 mL 1x T-TBS. Etter vasking ble prosedyrene under kapittel 2.4.5, 2.4.6 og 2.4.7 fulgt.

2.5 Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR)

2.5.1 Celledyrking til qPCR

Dyrking av celler til qPCR-forsøket foregikk på samme måte som dyrking til westernblott-forsøket (se kapittel 2.4.1).

2.5.2 Høsting til qPCR

Differensieringsmediet ble fjernet fra flaskene og cellene ble vasket to ganger med 2 ml PBS før cellene ble tilsatt 500 µl lysisbuffer. Deretter ble cellene skrapet og innholdet ble overført til eppendorfrør. Her var det viktig å kontrollere at mesteparten av cellene er overført og det ikke var gjenværende celler i flasken. Dersom det var mye celler igjen, ble cellelysatet pipettert tilbake og skrappingen gjentatt. Cellelysatet ble overført til kolonne fra QIAshredder og sentrifugert i 2 minutter ved 1800x g for homogenisering av cellelysatet. Etter sentrifugeringen ble lysatet oppbevart i fryser på -80 °C.

2.5.3 RNA-isolering

Ved RNA-isolering ble kit fra Qiagen brukt og produsentens protokoll ble fulgt. Cellelysate ble overført til kolonne med samlerør som eliminerte gDNA etter homogeniseringen og sentrifugert i 30 sekunder ved 8000x g. Innholdet i samlerøret ble spart på og tilsatt 70 % etanol lik lysatets volum. Deretter ble alt overført til en kolonne med samlerør som isolerte RNA og sentrifugert i 15 sekunder ved 8000x g. Innholdet i samlerøret ble kastet og kolonnen ble spart på. Kolonnen ble tilsatt 700 µl vaskebuffer og sentrifugert i 15 sekunder ved 8000x g. Kolonnen ble tilsatt 500 µl konsentrert vaskebuffer og sentrifugert i 15 sekunder ved 8000x g. Innholdet i samlerøret ble kastet og kolonnen spart på. Denne prosessen ble gjentatt med 500 µl konsentrert vaskebuffer. Deretter ble kolonnen satt på et nytt 2 ml samlerør og sentrifugert 1 minutt ved full hastighet for å tørke membranene. Kolonnen ble så tilsatt 30-50 µl RNase-fritt vann og sentrifugert i 1 minutt ved 8000x g for å eluere ut mRNA. Denne prosessen ble gjentatt for å sikre høyere innhold av mRNA.

2.5.4 Kvantifisering av mRNA-konsentrasjoner

NanoDrop™ Lite spektrofotometer ble brukt for kvantifisering av mRNA i prøvene etter isoleringen. Alle prøvene ble målt ved absorbans lik 260 nm. Det ble tilsatt 1 µl av nukleasefritt vann som blankprøve. Deretter ble 1 µl av prøvene tilsatt og konsentrasjonene ble målt. Til slutt ble spektrofotometeret rensert med 3 µl deionisert vann i 2-3 minutter.

2.5.5 cDNA-syntetisering

Her laget vi den komplementære DNA (cDNA) fra mRNA-prøvene. Dette ble gjort fordi mRNA er veldig ustabil og må oppbevares og håndteres med forsiktighet. mRNA er ikke stabil for qPCR-analysering ettersom PCR-reaksjonen kun bruker DNA som templat. cDNA er enkelttrådet og derfor vil det være mulig å syntetisere dobbeltrådet DNA-kjede gjennom å bruke DNA-polymerase. TaqMan Reverse Transcription Reagents kit ble brukt for syntetisering av cDNA fra mRNA-prøvene. Dette kitet inneholder revers transkriptase som lager cDNA-kjeden. Det ble først laget en reaksjonsblanding for det totale antallet prøver som skal brukes (appendiks 4.1). Hver MicroAmp mini-ependorfrør ble tilsatt 13,6 µl av denne reaksjonsblandingen. Deretter ble alle rørene tilsatt nukleasefritt vann uten dietylpyrokarbonat (DEPC) og destillert vann i den mengden som er avhengig av volum RNA som ble tilsatt. Til slutt ble det tilsatt RNA-prøver og hele blandingen ble pipettert opp og ned for å blande

innholdet. Prøvene ble plassert i Thermal Cycler 9600 for å syntetisere cDNA under betingelsene 25 °C i 10 minutter, 37 °C i 80 minutter og 85 °C i 5 minutter. Etter cDNA-syntetiseringen ble prøvene oppbevart i -20 °C.

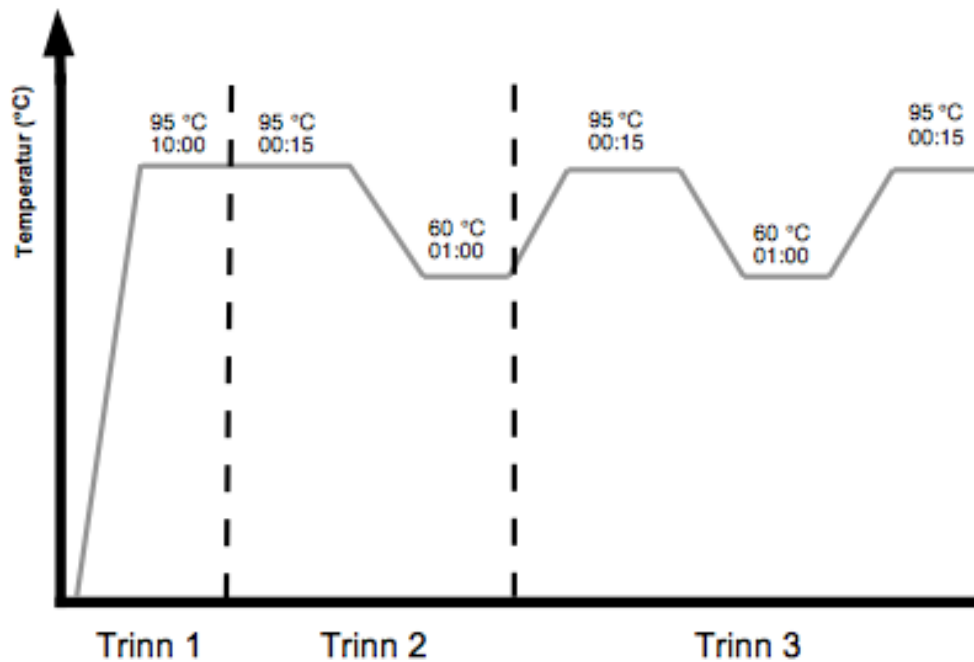
2.5.6 qPCR

Under qPCR amplifiseres DNA fra cDNA. qPCR er «real-time», altså at den måler amplifiseringen underveis (figur 2.2). Det ble utført kvantifisering av *ACOT9* og to endogene kontroller (glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase (*GAPDH*) og syreholdig ribosomal fosfoprotein P0 (*RPLP0*)). Primere ble designet ved hjelp av Primer Express[®] (tabell 4).

Tabell 4: Primere brukt i qPCR. *ACOT9*, acyl-CoA tioesterase 9; *GAPDH*, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; *RPLP0*, syreholdig ribosomal fosfoprotein P0; F, ”forward”; R, ”reverse”.

Gen	Genbanknummer	Primersekvens
<i>ACOT9</i>	AF132950.1	F: 5'-GGCAGCGGCATTTCAACT-3' R: 5'-GTTCTTAGGGCTCCACAAGGTAGTC-3'
<i>RPLP0</i>	M17885	F: 5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' R: 5'-AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
<i>GAPDH</i>	NM002046	F: 5'-TGCACCACCACCTGCTTAGC-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Det ble laget 4 standarder (appendiks 4.2). Nukleasefritt vann ble brukt som negativ kontroll. Alle prøvene ble fortynnet 1:2 med nukleasefritt vann. Det ble tilsatt 2,5 µl av alle prøvene (appendiks 4.4), standardene og negativ kontroll til MicroAmp[®] Optical Reaction Plate. Til slutt ble det tilsatt 22,5 µl SYBR Green PCR mix til hver brønn. Denne reaksjonsblandingen inneholder primere som gjenkjenner områder på cDNA-kjeden og definerer hvor DNA-polymerasen skal starte syntetiseringen. Reaksjonsblandingen inneholder også SYBR Green som binder seg til dobbeltrådet DNA og dette fører til fluoresens som detekteres.



Figur 2.2: Reaksjonen som skjedde under qPCR. Trinn 1: Denatureringen ble startet. Trinn 2: Amplifisering over 40 sykluser. Her skjedde det en denaturering og primeren festet seg. Trinn 3: Fluorescens lys monitorerte produktene som ble dannet under trinn 2 og genererte en dissosiasjonskurve.

2.6 Statistikk

Fremstilling av resultater samt alle statistiske analyser i denne oppgaven ble utført ved bruk av GraphPad Prism 6 for Mac (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Dataene er presentert som gjennomsnittsverdi \pm standardfeil til gjennomsnittet (SEM).

For substratoksidasjonsforsøkene ble det utført 5 uavhengige forsøk på myotuber fra LD-donorere. Det ble beregnet gjennomsnitt ut fra disse forsøkene. I qPCR-forsøkene ble det benyttet myotuber fra 12 donorer, 5 EO-NGT-donorere, 5 EO-T2D-donorere og 3 LD-donorere. Det ble utført 3 paralleller for hver donor. Gjennomsnittet ble beregnet fra de 3 parallellene. Det ble utført fire uavhengige forsøk med westernblott:

1. Myotuber fra EO-NGT- og EO-T2D-donorere sammenlignet med myotuber fra LD-donorere: 5 EO-NGT, 5 EO-T2D og 3 LD.
2. Myotuber fra utrente donorer sammenlignet med myotuber fra atleter: 6 utrente donorer og 6 atleter.

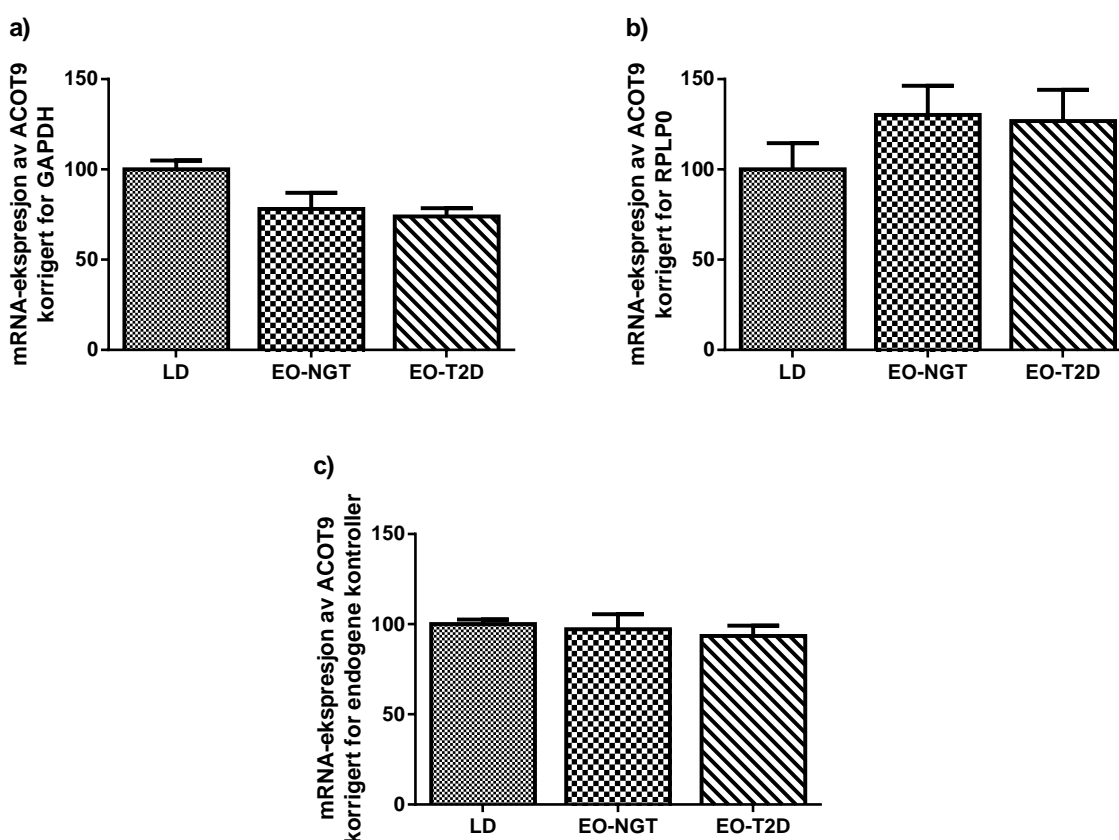
3. Myotuber fra donorer før og etter en 12 ukers treningsintervensjon: 3 normalvektige og 3 overvektige donorer.
4. Myotuber som er forbehandlet med BCAA og BCKA: 2 uavhengige forsøk med myotuber fra henholdsvis 1 utrent donor og 1 EO-T2D-donor.

Statistiske analyser for substratoksidasjonsforsøkene ble utført med paret ikke-parametrisk *t*-test (“Wilcoxon matched-pairs signed rank test”). Ved analyse av westernblott-forsøkene og qPCR-forsøkene ble det utført uparet ikke-parametrisk *t*-test (“Mann-Whitney test”). For westernblott-forsøket som analyserte normalvektige, før og etter 12 uker med trening, samt overvektige før og etter 12 uker med trening ble det benyttet paret ikke-parametrisk *t*-test (“Wilcoxon matched-pairs signed rank test”). Signifikansnivå på 5 % ($\alpha = 0,05$) ble benyttet for alle analysene. Tendens ble definert som signifikansverdier mellom 5 % og 10 % ($\alpha = 0,05 - 0,10$).

3 Resultater

3.1 mRNA-ekspressjon av *ACOT9* i myotuber

qPCR på vev fra mus viste at *ACOT9* var uttrykt i flere ulike vev [86]. For å undersøke mRNA-uttrykket av *ACOT9* i myotuber fra EO-donorer med eller uten diabetes type 2 ble det utført qPCR på myotuber fra disse donorene.



Figur 3.1: mRNA-ekspressjon av *ACOT9*. a) mRNA-ekspressjonen er korrigert for *GAPDH* og normalisert mot LD-donorer. b) mRNA-ekspressjonen er korrigert for *RPLP0* og normalisert mot LD. c) mRNA-ekspressjonen er korrigert for gjennomsnitt av *GAPDH* og *RPLP0*, og normalisert mot LD. Cellene ble høstet etter 7 dager i differensieringsmedium, og mRNA-ekspressjon ble målt som beskrevet i kapittel 2.5. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 6 EO-NGT-donorer og 6 EO-T2D-donorer normalisert mot 3 LD-donorer. *ACOT9*, acyl-CoA tioesterase 9; EO-NGT, donorer med ekstrem overvekt og normal glukosetoleranse; EO-T2D, donorer med ekstrem overvekt og diabetes type 2; *GAPDH*, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; LD, friske, normalvektige donorer; *RPLP0*, syreholdig ribosomal fosfoprotein P0.

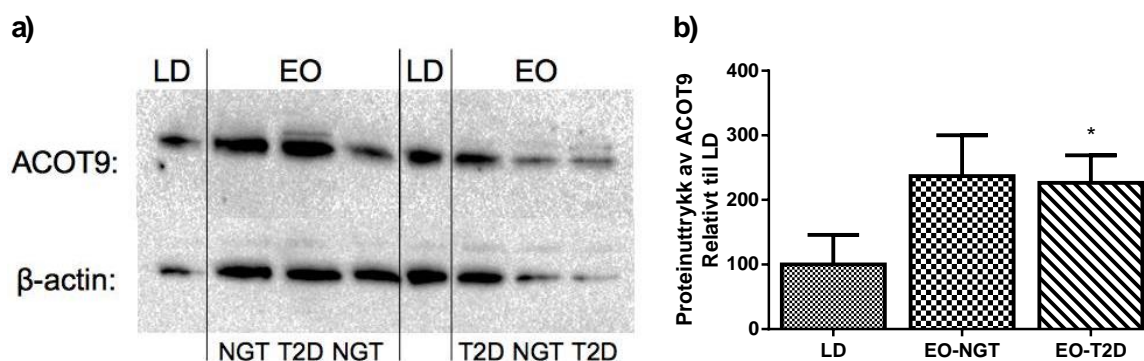
Ingen signifikante endringer i mRNA-ekspressjon ble observert for myotuber fra EO-NGT- eller EO-T2D-donorer ved normalisering mot myotuber fra LD-donorer. Dette gjaldt både ved

korrigering mot *GAPDH* (figur 3.1a), *RPLP0* (figur 3.1b) og gjennomsnittet av *GAPDH* og *RPLP0* (figur 3.1c).

3.2 Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra ulike donorgrupper

3.2.1 Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra overvektige med og uten diabetes type 2

Data fra tidligere preliminære forsøk tydet på forskjell i proteinuttrykk av ACOT9 mellom myotuber fra EO-T2D-donorere og LD-donorere. Dette forsøket ble utvidet med å undersøke myotuber fra et større antall EO-T2D-donorere og LD-donorere, og i tillegg ble myotuber fra EO-NGT-donorere undersøkt.

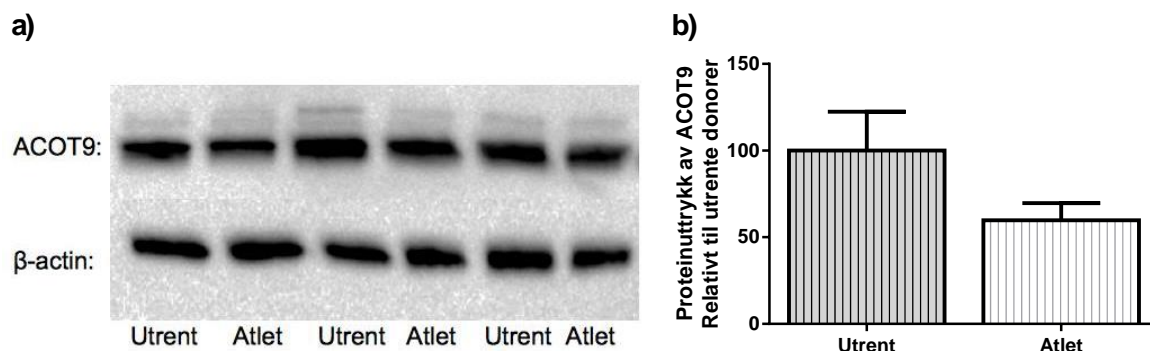


Figur 3.2: Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra EO-NGT- og EO-T2D-donorere relativt til LD-donorere. a) Representativt westernblott for proteinekspressjon av ACOT9 i myotuber fra LD-, EO-NGT- og EO-T2D-donorere b) Kvantifiserte westernblott for forskjellene i proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber mellom de tre ulike donorgruppene. Forsøket ble utført i henhold til beskrivelsene i kapittel 2.4. Kort beskrevet ble cellene høstet etter 7 dager i differensieringsmedium, og det ble kjørt gelelektroforese og blotting over på membranen. Etter blokkering og vasking ble membranene tilsatt antistoffer mot ACOT9 og β -aktin. Forsøket bestod av myotuber fra 3 LD-donorere, 6 EO-NGT-donorere og 6 EO-T2D-donorere. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Verdiene er normalisert mot LD-donorere og fremstilt som ACOT9 relatert til β -aktin. * $p < 0,05$ i forhold til LD (uparet ikke-parametrisk t test). ACOT9, acyl-CoA tioesterase 9; EO-NGT, donorere med ekstrem overvekt og normal glukosetoleranse; EO-T2D, donorere med ekstrem overvekt og diabetes type 2; LD, friske, normalvektige donorere.

Som figur 3.2b viser var det en signifikant økning i proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra EO-T2D-donorere sammenlignet med LD-donorere. Det var ingen signifikant forskjell i proteinuttrykk av ACOT9 mellom myotuber fra EO-NGT-donorere og LD-donorere.

3.2.2 Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra godt trente og utrente individer

Ut fra preliminære funn om økt proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra EO-T2D-donorers sammenlignet med myotuber fra LD-donorers ville vi også undersøke om det kunne være ulikt proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra unge, friske utrente menn og menn karakterisert som atleter.

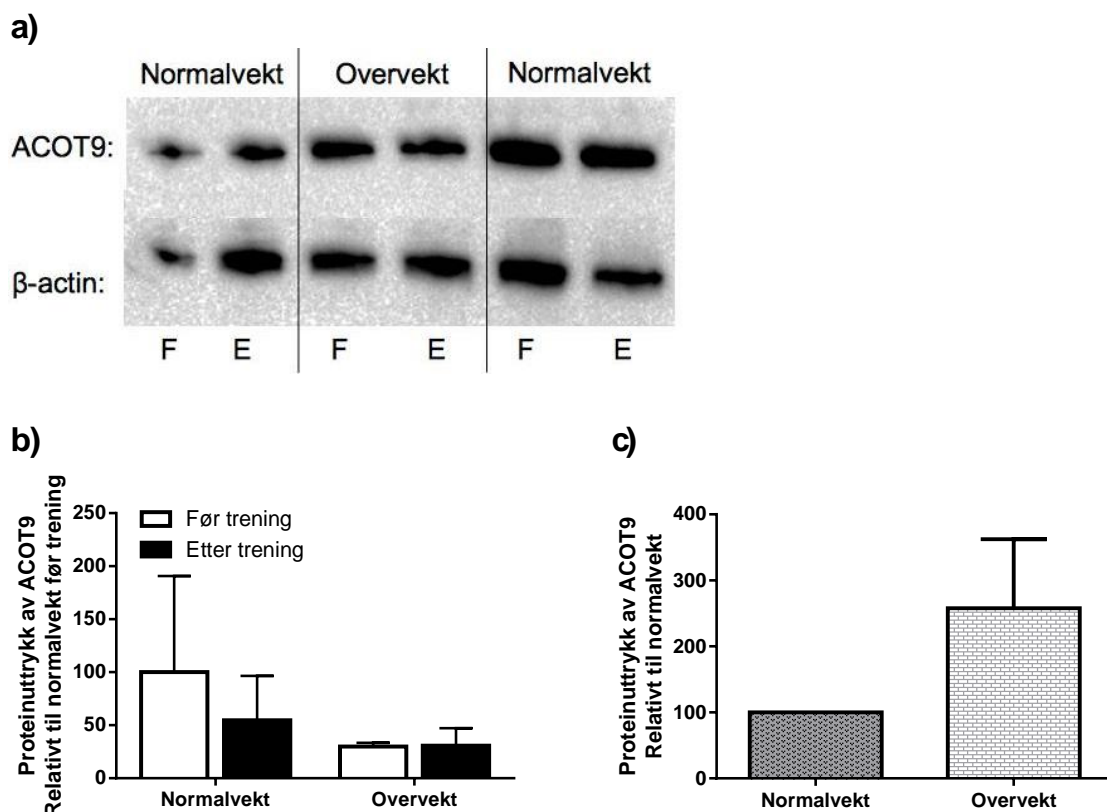


Figur 3.3: Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra atleter sammenlignet med myotuber fra utrente donorer. a) Representativt westernblott for ekspresjon av ACOT9 i myotuber fra utrente og atleter. b) Kvantifisert westernblott for forskjellen i proteinuttrykk av ACOT9 mellom de to ulike donorgruppene. Forsøket ble utført i henhold til beskrivelsene i kapittel 2.4. Kort beskrevet ble cellene høstet etter 7 dager i differensieringsmedium, og det ble kjørt gelelektroforese og blotting over på membranen. Etter blokkering og vasking ble membranene tilsatt antistoffer mot ACOT9 og β -aktin. Forsøket bestod av myotuber fra 6 utrente og 6 atleter. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Verdiene er normalisert mot utrente og fremstilt som ACOT9 relatert til β -aktin. ACOT9, acyl-CoA tioesterase 9.

Figur 3.3b viser proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra utrente donorer og atleter. Det ble ikke funnet signifikant forskjell i proteinuttrykk av ACOT9 mellom utrente donorer og atleter.

3.2.3 Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra normalvektige og overvektige individer, før og etter en treningsintervensjon

I kapittel 3.2.2 ble myotuber fra utrente og atleter undersøkt. Vi ville også se nærmere på hvilken betydning en treningsintervensjon *in vivo* kunne ha for uttrykk av ACOT9, og undersøkte myotuber fra normalvektige og overvektige donorer før og etter en 12 ukers treningsintervensjon.



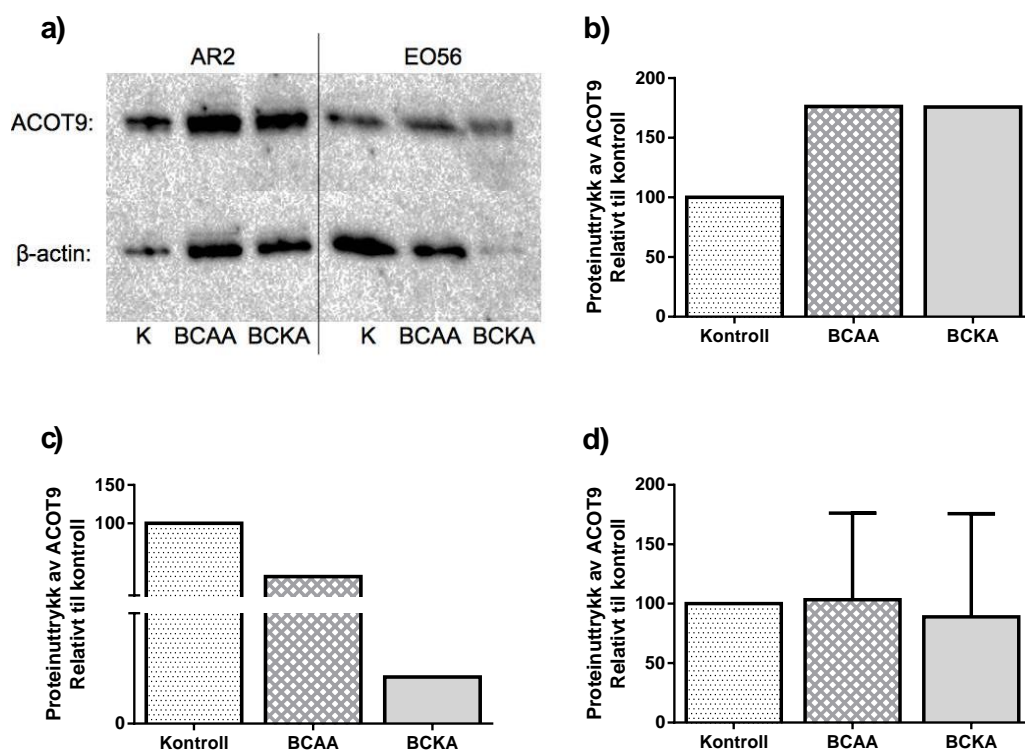
Figur 3.4: Proteinuttrykk av ACOT9 i normalvektige og overvektige donorer før og etter en 12 ukers treningsintervensjon. a) Representativt westernblott for ekspresjon av ACOT9 i myotuber fra overvektige og normalvektige, før og etter 12 ukers treningsintervensjon *in vivo*. b) Kvantifiserte western blott for forskjellen i proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra de to ulike donorgruppene før og etter treningsintervensjonen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Verdiene er normalisert mot normalvekt før trening og fremstilt som ACOT9 relatert til β -aktin. c) Kvantifiserte western blott for forskjellen i proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra to ulike donorgrupper. Resultater for hver av donorgruppene før og etter trening er kombinert og presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Verdiene er normalisert mot normalvekt og fremstilt som ACOT9 relatert til β -aktin. Forsøket ble utført i henhold til beskrivelsene i kapittel 2.4. Kort beskrevet ble cellene høstet etter 7 dager i differensieringsmedium, og det ble kjørt gelelektroforese og blotting over på membranen. Etter blokkering og vasking ble membranene tilsatt antistoffer mot ACOT9 og β -aktin. Forsøket bestod av myotuber 3 normalvektige og 3 overvektige donorer. ACOT9, acyl-CoA tioesterase 9; E, etter 12 ukers treningsintervensjon; F, før 12 ukers treningsintervensjon.

Figur 3.4b viser proteinuttrykk i myotuber fra biopsier tatt før og etter treningsintervensjonen fra normalvektige og overvektige donorer. Myotuber fra overvektige personer før 12 ukers treningsintervensjon sammenlignet med normalvektige personer før trening viste ingen signifikante forskjeller i proteinuttrykk av ACOT9. Det ble heller ikke funnet signifikante forskjeller i proteinuttrykk av ACOT9 ved sammenligning av normalvektige før og etter trening. Figur 3.4c presenterer resultater der tall for normalvektige, før og etter treningsintervensjon, og tall for overvektige før og etter treningsintervensjon er kombinert slik

at vi får et totalt fremstilling på andelen ACOT9 som er uttrykt i begge donor gruppene. Det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom normalvektige og overvektige.

3.2.4 Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber etter forbehandling med BCAA og BCKA

Det er antatt at ACOT9 kan regulere nivået av BCAA basert på nedbryning av intermediater involvert i metabolismen av BCAA [86]. Derfor ble proteinuttrykket av ACOT9 undersøkt i myotuber som var forbehandlet med BCAA. Det ble også forbehandlet med BCKA for å undersøke om intermediater (α -ketosyrer) i aminosyremetabolismen også kunne ha en effekt på proteinuttrykk av ACOT9.



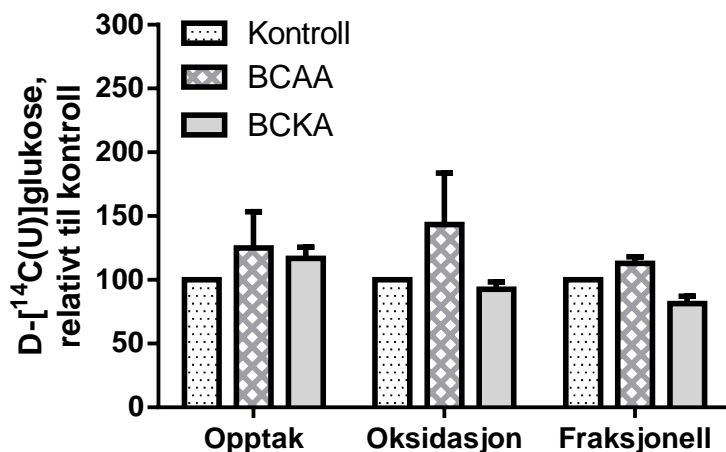
Figur 3.5: Proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber forbehandlet med BCAA eller BCKA. a) Representativt westernblott for ekspresjon av ACOT9 i myotuber forbehandlet i 24 timer med BCAA (30 mM) og BCKA (30 mM). b) Kvantifisert westernblott for forskjellen i proteinuttrykk av ACOT9 for myotuber fra den utrente donoren. c) Kvantifisert westernblott for forskjellen i proteinuttrykk av ACOT9 for myotuber fra EO-T2D-donoren. d) Kvantifiserte westernblott for forskjellen i proteinuttrykk av ACOT9 etter de to ulike forbehandlingene. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra myotubene fra de to ulike donorene som ble benyttet. Verdiene er normalisert mot kontroll og fremstilt som ACOT9 relatert til β -aktin. Forsøket ble utført i henhold til beskrivelsene i kapittel 2.4. Kort beskrevet ble cellene høstet etter 7 dager i differensieringsmedium, og det ble kjørt gelelektroforese og blotting over på membranen. Etter blokkering og vasking ble membranene tilsatt antistoffer mot ACOT9 og β -aktin. ACOT9, acyl-CoA tioesterase 9; BCAA, forgrenede aminosyrer; BCKA, α -ketosyre til forgrenede aminosyrer; K, kontroll.

Det ble kun utført 2 uavhengige forsøk og det er dermed ikke mulig foreløpig å konkludere om forbehandlingen har noen effekt på proteinuttrykket av ACOT9 (figur 3.5d). Figur 3.5b og 3.5c viser at det var stor variasjon mellom de to forsøkene som ble gjort.

3.3 Opptak og oksidasjon av glukose og leucin

3.3.1 Effekter av BCAA og BCKA på glukosemetabolismen i myotuber

Det var ønskelig å undersøke hvilke effekter 24 timers forbehandling med BCAA (30 mM) kunne ha på glukosemetabolismen i myotuber. Myotuber for dette forsøket var fra LD-donorere. Glukose ble brukt som radioaktivt substrat. Også 24 timers forbehandling med BCKA (30 mM) ble også utført for å monitorere om intermediater (α -ketosyrer) i aminosyremetabolismen kunne ha en effekt på glukosemetabolismen.



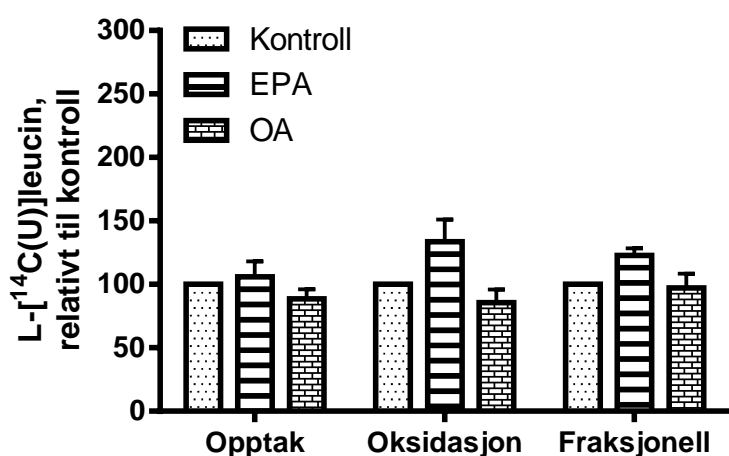
Figur 3.6: Effekt av BCAA og BCKA på glukosemetabolismen. Forsøket ble utført i henhold til beskrivelsene i kapittel 2.3. Forbehandling med BCAA (30 mM) og BCKA (30 mM) skjedde 24 timer før ^{14}C -glukose ble tilsatt som akuttsubstrat. Kontroll var myotuber tilsatt differensieringsmedium. Opptak viser til estimert totalopptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) av glukose. Oksidasjon (CO_2) viser til mengden glukose som ble oksidert av cellene. Fraksjonell forklarer andelen av det som var tatt opp som ble oksidert ($\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM og normalisert til kontroll. Det ble utført 5 uavhengige forsøk ($n = 5$) med myotuber fra LD-donorere. Absolutte verdier for kontroll: opptak = $93,7 \pm 6,42$ nmol/mg protein, oksidasjon = $59,33 \pm 4,2$ nmol/mg protein, og fraksjonell oksidasjon = $0,63 \pm 0,02$ nmol/mg protein.

Figur 3.6 viser opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av glukose ved forbehandling med BCAA eller BCKA. Ved måling av opptak av glukose ble det ikke funnet signifikant effekt av forbehandling med BCAA eller BCKA. Det var heller ikke signifikant effekt av forbehandling med BCAA eller BCKA på glukoseoksidasjon. Det ble observert en tendens til

økning av fraksjonell oksidasjon av glukose hos myotuber forbehandlet med BCAA sammenlignet med kontrollceller ($p = 0,06$). Myotuber forbehandlet med BCKA hadde ingen signifikant effekt ved fraksjonell oksidasjon av glukose.

3.3.2 Effekter av fettsyrer på aminosyremetabolismen i myotuber

Vi ønsket å undersøke effekter av fettsyrer på metabolismen av aminosyrer i myotuber. Derfor ble leucin brukt som radioaktivt substrat for å måle aminosyremetabolismen etter 24 timers forbehandling med $100 \mu\text{M}$ av fettsyrene EPA og OA.



Figur 3.7: Effekt av EPA og OA på leucinmetabolismen. Forsøket ble utført i henhold til beskrivelsene i kapittel 2.3. Forbehandling med EPA ($100 \mu\text{M}$) og OA ($100 \mu\text{M}$) skjedde 24 timer før ^{14}C -leucin ble tilsatt som akuttsubstrat. Kontroll var celler tilsatt differensieringsmedium. Det ble utført 5 uavhengige forsøk ($n = 5$) med LD-donorer. Opptak viser til estimert totalopptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) av leucin. Oksidasjon (CO_2) viser til mengden leucin som ble oksidert av cellene. Fraksjonell forklarer andelen av det som var tatt opp som ble oksidert ($\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM og normalisert til kontroll. Det ble utført 5 uavhengige forsøk ($n=5$) med myotuber fra LD-donorer. Absolutte verdier for kontroll: opptak = $41,2 \pm 3,2$ nmol/mg protein, kontroll oksidasjon = $8,4 \pm 0,5$ nmol/mg protein, kontroll fraksjonell oksidasjon = $0,25 \pm 0,02$ nmol/mg protein.

Figur 3.7 viser opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av leucin ved forbehandling med EPA eller OA. Ingen signifikant effekt av forbehandling med EPA og OA ble funnet på opptak og oksidasjon av leucin. Imidlertid ble tendens til økning av fraksjonell oksidasjon av leucin ble observert i myotuber forbehandlet med EPA sammenlignet med kontrollceller ($p = 0,06$). Myotuber forbehandlet med OA hadde ingen signifikant effekt på fraksjonell oksidasjon av leucin.

4 Diskusjon

4.1 Dyrkede skjelettmuskelceller som en *in vitro*-modell

Satelittceller ble isolert fra muskelbiopsier fra ulike donorgrupper. Satelittceller prolifereres til myoblaster og differensieres til flerkjernede myotuber, slik det vises i figur 2.1 [94]. Det blir utført *in vitro* forsøk på disse myotubene. Generelt har myotuber flere likheter med skjelettmuskelceller *in vivo*. Blant annet vil proteinuttrykk i myotuber være ganske samsvarende med uttrykket i skjelettmuskelceller *in vivo* og dette vil gi oss et representabelt resultat som kan relateres til skjelettmuskelceller [95]. Derfor er det tenkelig at effekter nådd *in vivo* vil bevares til *in vitro* forsøk. Den største ulempen med myotuber er at de selvfølgelig mangler omgivelsene gitt *in vivo*. Myotuber har også en lavere respons på insulin på grunn av høyere GLUT4-uttrykk sammenlignet med skjelettmuskelceller og insulin-mediert glukoseopptak vil være lavt [96].

4.2 Effekter av BCAA og BCKA på glukosemetabolismen

De essensielle aminosyrene BCAA, er et viktig ledd i kostholdet. Det er påvist at BCAA-rikt kosthold har positive effekter både for mennesker og dyr. Det er antatt at BCAA via aktivering av mTOR fører til utskillelse av blant annet hormonene leptin [97] og GLP-1 [98, 99] som er viktig for regulering av glukose- og lipidnivåene i blodet. Det er gjort en rekke studier med leucin og dens metabolske effekter som økt insulinsensitivitet og redusert forekomst av hyperglykemi [100, 101]. I tillegg har det blitt utført forsøk på skjelettmuskelceller isolert fra rotter. Skjelettmuskelcellene ble forbehandlet med leucin (2 mM) og leucin førte til et signifikant økt glukoseopptak, men det var ikke antatt at dette opptaket var insulinmediert opptak grunnet insulin-fri omgivelse i cellene [102]. Det antas at leucin øker translokasjon av GLUT4 i skjelettmuskelceller ved å aktivere Akt2 eller proteinkinase C [102, 103], men denne mekanismen er ikke godt nok kartlagt. Isoleucin har også vist å potensere glukoseopptak i skjelettmuskelceller fra rotter [104, 105].

Det er også flere forsøk som har vist forbindelse mellom BCAA og vektreduksjon. Leucin har vist vektreduksjon i mus som fikk kalori restriksjon [106], og vekt nedgang samt motvirkning av vektøkning hos mus foret med høyfett-diett [101]. I mennesker er det gjort studier som har vist at BCAA fører til vektreduksjon [107-109]. Spesielt hos godt trente individer er det

populært med BCAA-tilskudd på grunn av stimulerende effekt på proteinsyntesen og økning av muskelvekst [85, 110, 111]. Dette kan dermed kan ha en innvirkning på prestasjonsevnen [112]. Det er også funn som viser at BCAA ikke nødvendigvis øker prestasjon, men at den reduserer tiden for gjentakelse av neste treningsøkt med tanke på stivhet og ømhet i muskulaturen [113]. Tilskudd av α -ketosyrer av BCAA har vist å øke prestasjonsevnen og redusert tiden for gjentakelse av neste treningsøkt [114].

Hittil er det mye som tyder på at BCAA kan ha en positiv effekt på insulinsignaleringsen, men BCAA kan også interferere med insulinsignaleringsen slik at det kan oppstå insulinresistens [85, 115]. Dette fremkommer spesielt hos overvektige individer. Det er flere studier som tyder på at høye nivåer av BCAA har en nedregulerende effekt på insulinsignaleringsen hos overvektige med eller uten diabetes type 2 [116-118]. BCAA kan føre til kontinuerlig aktivering av insulinreseptoren via mTOR/RPS6KB1 (tidligere beskrevet i kapittel 1.2). mTOR har en stor rolle i regulering av proteinsyntese og gentranskripsjon for vekst av skjelettmuskelceller [119, 120]. Av alle BCAA er leucin den mest potente aktivatoren av mTOR [119, 121, 122]. Ved kontinuerlig aktivering kan det skje fosforylering av serindelen (Ser-1101) på IRS1 [123, 124] og dermed inhibere IRS1 slik at glukose ikke transporteres inn i cellen [115, 125]. Denne teorien ble ytterligere bekreftet ved en studie der det ble utført infusjon av aminosyrer til mennesker, og biopsier av skjelettmuskel ble tatt før og etter infusjonen av aminosyrer. Det ble funnet kontinuerlig aktivering av mTOR/RPS6KB1 i biopsiene tatt etter infusjon av aminosyrer [126]. I tillegg til dette var genuttrykk av enzymer som er med i BCAA-katabolisme nedregulert hos ekstremt overvektige med prediabetes/diabetes type 2 sammenlignet med friske, overvektige individer [127]. Leucin kan også føre til en nedregulering av AMPK og det vil da skje en aktivering av mTOR/RPS6KB1-signalveien [36, 128]. Dette tyder derfor på at effekt av BCAA er avhengig av hvilken helsetilstand individet har med tanke på kroppsvekt.

Denne oppgaven inkluderte blant annet en undersøkelse av glukosemetabolisme i myotuber fra normalvektige, friske donorer ved tilstedeværelse av høye konsentrasjoner av BCAA (30 mM) i 24 timer (figur 3.6). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i opptak og oksidasjon av glukose etter forbehandling av myotubene med BCAA. Det ble imidlertid funnet en tendens til økning av fraksjonell oksidasjon av glukose etter forbehandling med BCAA ($p = 0,06$). Det må tas i betraktning at donorene som ble brukt i denne oppgaven var friske, normalvektige individer og at glukosemetabolismen ikke vil bli påvirket av BCAA i samme

retning som det er forventet med overvektige donorer med eller uten diabetes type 2. Hos friske, normalvektige donorer kan det forekomme en gunstig effekt av BCAA ved at glukosemetabolismen bedres, slik det ble nevnt tidligere i dette kapittelet [98-101], i forhold til overvektige der BCAA-konsentrasjonen i plasma er økt på grunn av et høyt inntak av proteinrik diett og det er en dysfunksjonell BCAA-metabolisme.

Det kan imidlertid tenkes at BCAA må inn i cellen og metaboliseres til til BCKA, og det er mulig at dette må til for at BCAA skal utøve en effekt. Derfor var det nyttig å gjøre forsøk på BCKA i lik linje med BCAA. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i opptak og oksidasjon av glukose etter forbehandling av myotubene med BCKA. Det har blitt gjort forsøk på skjelettmuskelceller isolert fra rotter der cellene ble forbehandlet med α -ketosyren til leucin (2 mM). Dette viste et signifikant økt glukoseopptak i skjelettmuskelceller, men denne effekten var svakere sammenlignet med leucin [102].

4.3 Effekter av EPA og OA på leucinmetabolismen

EPA, som er en omega-3-fettsyre, kan motvirke lipiddysfunksjon [129, 130]. Det er publisert en rekke vitenskapelige artikler som viser effekt av EPA i menneskekroppen, spesielt i forbindelse med kardiovaskulære sykdommer [131-133]. EPA er en ligand for PPAR α (PPAR α -agonist). PPAR α regulerer uttrykk av gener som er sentrale i energihomeostasen, deriblant gener som en spiller rolle i aminosyre- og lipidmetabolismen [134-136]. Det er også vist at EPA spesielt kan oppregulere BCAA-metabolisme, men dette kan også være relatert til direkte effekter av EPA og ikke effekter via PPAR α [137]. EPA har også vist å oppregulere ACOT-enzymmer, da mest ACOT1 [130]. Ved tilstedeværelse av EPA er det vist en økning av proteinsyntese i skjelettmuskelceller fra mus [138]. Figur 3.7 viser opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av leucin i myotuber fra friske, normalvektige donorer forbehandlet med EPA og OA. Forsøkene i denne oppgaven fant derimot ingen signifikant effekt av EPA på opptak og oksidasjon av leucin i myotubene. Det ble imidlertid observert en tendens til økning av fraksjonell oksidasjon av leucin etter forbehandling med EPA ($p = 0,06$). At EPA kan øke metabolisme av leucin er derfor mulig.

Dette kan også støttes ved å se på nivåene av intermediater i aminosyre- og lipidmetabolismen. Intermediatene må bindes til karnitin for å kunne transporteres gjennom mitokondriemembranen og inn i mitokondrielt matriks for å omdannes til energi i Krebs

syklus (tidligere beskrevet i kapittel 1.4.2) [139]. Intermediater som er bundet til karnitin (acylkarnitiner) kan være en markør for aminosyre- og lipidmetabolisme. Rotter på høyfett diett med høyt inntak av fiskeolje viste økt plasmakonsentrasjon av blant annet propionylkarnitin og isovalerylkarnitin [140]. Propionylkarnitin og isovalerylkarnitin er molekyler som transportes inn i mitokondriell matriks for å danne henholdsvis propionyl-CoA og isovaleryl-CoA. Disse CoA-derivatene er metabolitter av BCAA (tidligere beskrevet i kapittel 1.4.3) [86]. Dette kan vise til mulig økt metabolisme av aminosyrer, og spesielt metabolisme av BCAA etter inntak av fiskeolje. Det er også gjort funn på lave nivåer av ubundet karnitin i plasma ved regelmessig inntak av EPA [140]. Dette kan tolkes på to måter: det har skjedd mer deponering av karnitin til vev og at dette fremmer metabolisme av aminosyrer og lipidoksidasjon, eller at EPA selv er bundet til karnitin og er substrat for lipidoksidasjon. Det finnes imidlertid også en annen side som omhandler karnitin. Ved ekstrem overvekt oppstår det høy grad av ufullstendig lipidoksidasjon og/eller BCAA-metabolisme, og det forekommer en akkumulering av intermediater fra oksidasjonsprosessen [130]. Acylkarnitiner kan også være en indikator for ufullstendig metabolisme [141] og EPA har vist å redusere opphopningen av acylkarnitiner [130]. Dette kan være fordi EPA forsterker metabolisme av lipider og aminosyrer slik at intermediatene ikke akkumuleres, men metaboliseres videre.

OA er en omega-9-fettsyre og det er mulig at OA kan ha en gunstig effekt ved inntak [142], selvom dette er omdiskutert [143]. OA er et av hovedkomponentene i olivenolje som har flere gunstige effekter forbundet til seg ved inntak. Blant annet kan OA minske risiko for kardiovaskulære sykdommer [144-146]. Det er derfor også mulig at OA kan ha lignende effekter som å øke metabolisme av lipider og aminosyrer. Figur 3.7 viser opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av leucin ved forbehandling med OA. Det ble imidlertid ikke funnet signifikante forskjeller mellom myotuber forbehandlet med OA og kontrollceller. Myotubene forbehandlet med OA hadde ikke økt effekt på opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av leucin.

4.4 Uttrykk av ACOT9 i myotuber fra ulike donorgrupper og etter forbehandling med BCAA og BCKA

Det er vist at overvekt har en sterk assosiasjon til utvikling av diabetes type 2 [147]. Hovedårsaken til dette er at overvekt kan føre til utvikling av insulinresistens [148, 149]. Det er en sammenheng mellom kroppsvekt og insidensen av diabetes type 2 fordi utvikling av insulinresistens kan motvirkes med vektneidgang [150, 151]. Flere proinflammatoriske mediatorer som TNF- α og interleukin-6 er kraftig forhøyet ved overvekt. Det forekommer også høye plasmakonsentrasjoner av frie fettsyrer hos individer som er overvektige. Dette skyldes fettrik kosthold samt for høyt energiinntak og/eller en dysfunksjon i lipidmetabolisme der forholdet mellom acetyl-CoA og acyl-CoA er forstyrret [152]. Ved dysfunksjonell lipidmetabolisme kan det også skje akkumulering av lipidmetabolitter slik som DAG og ceramider, slik det ble nevnt i kapittel 1.2 [152, 153]. Økt nivå av frie fettsyrer i plasma har også vist å påvirke det første trinnet i glykolysen ved å hemme heksokinase, enzymet som omdanner glukose til glukose-6-fosfat. GLUT4 kan også bli påvirket av frie fettsyrer enten ved inhibering av insulinsignaleren, nedsatt translokasjon av GLUT4 og/eller feil ved fusjonering av GLUT4 med cellemembranen slik at glukosetransport inn i cellen reduseres [154, 155].

Ved dysfunksjon av lipidmetabolismen kan det tenkes at cellulære funksjoner og produksjon av cellekomponenter vil forstyrres, samt forstyrre dannelse av ATP via β -oksidasjon og mitokondriell respirasjon. Kroppen vil da spare på energi for å kompensere for uregelmessighetene i cellulær funksjon. Det vil også skje mindre opptak av glukose på grunn av forstyrrelser i insulinsignaleren, noe som også vil føre til mindre energiproduksjon fordi glukose står for en høy andel av energiproduksjonen i kroppen (tidligere beskrevet i kapittel 1.4.1). Enzymer som ACOT9 kan hydrolysere acyl-CoA [86, 156] og danne frie fettsyrer som akkumuleres i kroppen som en mekanisme for energisparing fordi det ikke er tilstrekkelig produksjon av energi via glukose- og lipidmetabolismen. Effekter på energibesparelse har blitt undersøkt med andre acyl-CoA tioesteraser, spesielt ACOT11 og ACOT13, som også tilhører "hotdog-fold" superfamilien av tioesteraser [157-159]. ACOT11 har et høyt uttrykk i brunt fettvev [157]. Brunt fettvev har mer variert sammensetning enn hvitt fettvev ved at den inneholder flere mitokondrier og har flere vaskulære forgreninger [160]. Brunt fettvev har en rolle i termogenesen, der energien frigjøres i form av varme. Dette skjer via "uncoupling

protein-1” som befinner seg på den indre mitokondrielle membran, der dette proteinet fører til frikobling av energiproduksjon via ETK og OXPHOS, og det dannes i stedet varme [161, 162]. Imotsetning til brunt fett, vil hvitt fettvev lagre energi som triglyserider. Normalvektige har mer brunt fettvev enn overvektige [163]. Den termogene effekten av brunt fettvev har derfor en betydning for vektnedgang hos overvektige fordi den fører til økt energiforbruk [163]. Forsøk gjort på ACOT11^{-/-} mus viste økt energiforbruk, samt mindre forekomst av overvekt og insulinresistens [164, 165]. Forsøk på ACOT13^{-/-} mus viste økt energiforbruk på grunn av høyere uttrykk av termogene gener [158]. Dette tyder på kjennetegn til energibesparelse ved høy ACOT11- og ACOT13-aktivitet og det er ikke usannsynlig at andre ACOT kan ha samme effekt.

I kapittel 4.2 ble det trukket fram hvordan BCAA påvirker glukosemetabolismen hos normalvektige og overvektige donorer, selv om det ikke ble gjort forsøk på myotuber fra overvektige donorer i relasjon til dette i denne oppgaven. BCAA er av vesentlig betydning for utvikling av insulinresistens hos overvektige. Det er funnet opptil 20 % høyere mengde valin og 14 % høyere mengde leucin/isoleucin sammenlignet med friske, normalvektige individer [141]. Siden BCAA er forbundet til insulinresistens og diabetes type 2, har dermed ACOT9-uttrykk blitt aktuelt å studere i donorer som er overvektige med og uten diabetes type 2.

Høsten 2014 ble det gjort innledende forsøk av Veronika Tillander ved Karolinska Institutet (Stockholm, Sverige) på proteinlysater fra humane myotuber for å avklare om ACOT9 var uttrykt. Forsøket ble gjort med westernblotting og ACOT9 var godt uttrykt i disse cellene sammenlignet med HeLa-celler (upubliserte resultater). Videre ble det undersøkt om det var forskjell i proteinuttrykk i myotuber fra et lite antall donorer med EO-T2D (n = 2) sammenlignet med myotuber fra LD-donorer (n = 2). Resultatet tydet på en vesentlig høyere proteinkspresjon av ACOT9 i EO-T2D-myotuber sammenlignet med LD-myotuber (upubliserte resultater).

Det var derfor interessant å undersøke myotuber fra flere EO-T2D-donorer om uttrykket av ACOT9 faktisk var forhøyet. Figur 3.2b viser forskjell i proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra EO-NGT-, EO-T2D- og LD-donorer. Det ble funnet en signifikant økning av ACOT9-proteinuttrykk i myotuber fra EO-T2D-donorer sammenlignet med myotuber fra LD-donorer. Myotuber fra EO-NGT-donorer ble også inkludert i forsøket for å avklare om ACOT9 generelt sett kunne være økt hos ekstremt overvektige, før diabetes type 2 inntreffer, med tanke på at det er sett høye nivåer av BCAA hos overvektige, prediabetiske pasienter [141, 166].

Det var ikke signifikant forskjell mellom uttrykk av ACOT9 i myotuber fra EO-NGT-donorere i forhold til myotuber fra LD-donorere.

Trening fører til flere molekylære endringer i muskulaturen [167]. Det skjer blant annet endringer i proteiner som er ansvarlig for kontraksjonsmekanismen [168]. Det oppstår også økning av respiratorisk kapasitet som følge av endringer i mitokondrielle enzymer [169, 170]. Glukoseopptak i skjelettmuskelceller økes på grunn av forbedret insulinsensitivitet hos atleter [171]. Naturligvis vil også fettprosenten hos atleter være mindre enn hos utrente individer på grunn av økt lipidoksidasjon [172, 173]. Derfor var det interessant å se på uttrykk av ACOT9 i muskelceller fra friske individer, der noen var godt trente atleter og noen var utrente. De godt trente donorene (atletene) hadde et maksimalt oksygenopptak (VO_{2maks}) > 60 ml/kg/min og utrente donorer hadde $VO_{2maks} < 50$ ml/kg/min. De utrente donorene hadde heller ikke drevet med organisert trening (definert som < 1 time/uke) det siste året før biopsiene ble tatt. Donorkarakteristika viste at donorprøvene fra atletene hadde signifikant lavere fettprosent og fastende S-glukose enn utrente donorer.

Myotuber fra utrente donorer ble sammenlignet med myotuber fra atleter, slik det vises i figur 3.3b, og det ble sett om proteinuttrykket av ACOT9 var høyere i myotubene fra de utrente. Det var mest sannsynlig at myotuber fra atletiske individer skulle ha lavere proteinuttrykk av ACOT9 i forhold til myotuber fra utrente individer ettersom utrente individer kan ha en annerledes fettdistribusjon og mitokondriell aktivitet sammenlignet med atletiske individer [174, 175], og at denne fordelingen av fett og mitokondriell aktivitet kan ha noen fellestrekk med overvektige. Det ble ikke observert noen signifikant forskjell i proteinuttrykket av ACOT9 i myotuber fra utrente sammenlignet med myotuber fra atleter.

Det var også ønskelig å undersøke effekter av en 12 ukers treningsintervensjon på uttrykk av ACOT9 i myotuber. Normalvektige og overvektige individer deltok i en 12 ukers treningsintervensjon, bestående av både stryke- og utholdenshetstrening. Muskelbiopsier for isolering av satelittceller ble tatt før og etter treningsintervensjonen, og myotuber ble dyrket opp for å se på mulige modifiseringer som følge av treningen. Etter en treningsintervensjon vil det være fysiologiske endringer, som blant annet økt energiforbruk [176]. Økt energiforbruk i forhold til energiinntak er et av hovedpunktene for å unngå overvekt og fedme [177]. Ved å øke energiforbruket via trening kunne det tenkes at nivået ACOT9 er lavere etter trening. Denne hypotesen er relatert til at overvektige kan ha et høyt uttrykk av ACOT9

prediabetes, slik vi sammenlignet i forsøket med der vi benyttet myotuber fra donorer med EO-NGT/EO-T2D mot myotuber fra LD-donorer.

Etter 12 ukers treningsintervensjon hadde de overvektige donorene en signifikant reduksjon i vekt og KMI, samt signifikant økt glukoseinfusjonsrate (GIR). Normalvektige hadde også en signifikant økning av GIR etter treningsintervensjonen, men ingen signifikant reduksjon i kroppsvekt og KMI. Normalvektige hadde imidlertid en signifikant reduksjon i fettprosent etter de 12 ukene med trening. [178]

Det ble tatt utgangspunkt i ulike sammenligninger av resultatene. I figur 3.4b ble kontrollen definert som myotuber fra normalvektige før trening, og resultatene ble normalisert mot dette. Det ble ikke funnet signifikante endringer i proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra normalvektige etter trening sammenlignet med normalvektige før trening. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom overvektige før trening sammenlignet med normalvektige før trening. Det ble heller ikke funnet signifikant forskjell mellom myotuber fra overvektige før og etter. Figur 3.4c fremstiller totalt proteinuttrykk av ACOT9 i myotuber fra normalvektige og overvektige ved at resultatene fra før og etter trening for hver av donorgruppene ble lagt sammen. Her relateres resultatene mot myotuber fra normalvektige donorer. Det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom myotuber fra normalvektige og overvektige donorer

ACOT9 har antageligvis en regulerende effekt på fettsyre- og aminosyremetabolismen, og som nevnt i innledningen (kapittel 1.4) er det antatt at økt uttrykk av ACOT9 vil føre til endringer i BCAA-metabolisme [86]. Spesifisitet av ACOT9 ble målt for å kunne kartlegge hvilke CoA-derivater ACOT9 har høy spesifisitet for. Den katalytiske effektiviteten til ACOT9 (K_{Cat}/K_M) viser at ACOT9 har høyest spesifisitet for isobutyryl-CoA, propionyl-CoA, acetoacetyl-CoA og isovaleryl-CoA [86]. Disse CoA-derivatene er intermediater i BCAA-metabolismen (tidligere beskrevet i kapittel 1.4.3). Å forbehandle cellene med BCAA og BCKA kan si oss noe om hvordan proteinuttrykket av ACOT9 påvirkes i sammenheng med høyt inntak av BCAA. Forsøkene med myotuber er avhengig av de donorer som blir brukt. Dersom man bruker myotuber fra en overvektig donor vil man kunne tenke seg at proteinuttrykk av ACOT9 er høyt fra før, slik det ble diskutert tidligere i dette kapitlet. Friske og normalvektige donorer vil muligens ha et lavere proteinuttrykk av ACOT9 fordi de ikke har samme inntak av næringstoffer og ikke har dysfunksjonell metabolisme av lipider og aminosyrer.

Myotubene ble forbehandlet med BCAA eller BCKA i 24 timer før høsting til westernblott. Forbehandling med BCKA ble utført i dette forsøket for å undersøke om disse myotubene uttrykker ACOT9 på lik linje med myotuber forbehandlet med BCAA. Det ble utført to uavhengige forsøk, det vil si ett forsøk per donorgruppe, fordi det oppstod problemer underveis i celledyrkingen slik at det ikke kunne inkluderes flere donorer i dette forsøket. Derfor er det for stor spredning mellom resultatene fra disse donorene og ikke mulig å kunne beregne statistikk. I figur 3.5d ble det sett på den totale forskjellen i BCAA- og BCKA-nivåene sammenlignet med kontrollceller, uavhengig av donorgruppe. Figur 3.5b viser den utrente donoren. Denne donoren hadde $KMI = 37,3 \text{ kg/m}^2$, som tilsier at donoren er ekstremt overvektig. Figur 3.5c viser myotuber fra den overvektige donoren med diabetes type 2. Hypotesen var at denne donoren som allerede har diabetes type 2 vil ha ufullstendig metabolisme av BCAA. ACOT9 vil ha en effekt som fører til ytterligere opphopning av BCAA som kan være på grunn av energisparingen fordi kroppen ikke får nok glukoseopptak. Som følge av at det ble benyttet kun én donor per donorgruppe er det naturligvis ikke mulig å kunne konkludere i forhold til denne hypotesen foreløpig.

Det har tidligere blitt utført qPCR på ulike vev fra mus [86]. Her ble det avdekket hvilke vev som hadde høyest mRNA-ekspressjon av *ACOT9*. Høyest mRNA-ekspressjon ble funnet i testis. I tillegg ble det funnet høyt nivå i brunt fettvev, nyrer, binyrer, lunger og hjerte. Lavest ekspressjon ble funnet i lever. Søk i databaser som UniProt og Expression Atlas kartlegger hvilke humane vev *ACOT9* er høyt uttrykt i. *ACOT9* er høyest uttrykt i hjerte, lunge, tykktarmen, lymfeknuter og mindre uttrykt i nyrer og binyrer. Expression Atlas viser også til at *ACOT9* er uttrykt i skjelettmuskelceller, men ikke like høyt som i organene nevnt tidligere. Utifra dette ville vi undersøke mRNA-ekspressjon av *ACOT9* i humane myotuber. Det var ønskelig å undersøke muskelceller fra donorer som vi antar har en økt ekspressjon av *ACOT9*.

Disse donorene var overvektige og halvparten av dem var diagnostisert med diabetes type 2, forkortet henholdsvis EO-NGT og EO-T2D. Grunnen til at disse donorgruppene ble valgt var basert på hypotesen om at *ACOT9* kan være høyere uttrykt hos overvektige med diabetes type 2 (upubliserte resultater). I denne oppgaven ble det gjort forsøk med westernblott der de samme donorgruppene ble brukt for å finne forskjell i proteinuttrykk av *ACOT9*. Basert på sammenligning med myotuber fra friske, normalvektige donorer (LD) ble det ikke funnet en signifikant endring i mRNA-ekspressjon av *ACOT9* i myotuber fra EO-NGT eller EO-T2D, relatert til *GAPDH* (figur 3.1a) eller *RPLP0* (figur 3.1b). Resultatene ble også presentert som

uttrykk av *ACOT9* relatert til gjennomsnittet for de endogene kontrollene (figur 3.1c). Her ble det heller ikke funnet signifikante forskjeller mellom myotuber fra donorer med EO-NGT eller EO-T2D sammenlignet med myotuber fra LD. Der ser ut til at mRNA-ekspresjon av *ACOT9* holder seg likt i EO-NGT- og EO-T2D- myotuber, sammenlignet med LD-myotuber når vi ser på gjennomsnittet av *GAPDH* og *RPLP0* relatert til *ACOT9*.

Endogene kontroller som ble brukt var *GAPDH* og *RPLP0*. *GAPDH* er et av de mest brukte kontrollgenene og er derfor egnet som endogen kontroll [179]. *RPLP0* er et ribosomalt protein, er mye brukt og er godt egnet som endogen kontroll [180]. Resultatene viser at de endogene kontrollene gav tildels motstridende resultater (figur 3.1a,b), selv om det verken er tendens eller signifikans som bekrefter dette. Videre er det også viktig å se på r^2 -verdi for regresjonskurven. Denne verdien sier noe om hvor bra resultatet er korrelert mot standardkurven som er generert. Det ble observert en r^2 -verdi lik 0,968 for *GAPDH* og 0,992 for *RPLP0*. Siden resultatene i *GADPH* ga noe lavere korrelasjon er det mulighet for at dette fører til de motstridende effektene. Dessuten har *GADPH* et veldig høyt uttrykk i muskel og spiller en rolle i flere mekanismer enn glykolysen [181, 182]. Den vil derfor kunne gi noe variable resultater. På grunnlag av disse faktorene vil det være nødvendig med en tredje endogen kontroll for å potensielt kunne si noe konkluderende om mRNA-ekspresjon av *ACOT9* i myotuber fra EO-NGT og EO-T2D sammenlignet med LD. Innføring av en tredje kontroll vil ikke nødvendigvis føre til at en signifikans avdekkes, men variasjoner mellom kontrollene vil minske.

4.5 Veien videre

Ved å bruke flere donorer kan det avdekkes eventuelle signifikante forskjeller mellom ulike donorgrupper med tanke på proteinuttrykk av *ACOT9*. Det hadde vært spennende å se på *ACOT9*-uttrykk i myotuber fra flere donorgrupper (blant annet friske og normalvektige donorer) og flere donorer per donorgruppe på forsøket der vi forbeholdt myotubene med BCAA og BCKA (kapittel 3.2.4). Det ville gitt mer informasjon ved å se på eventuelle forskjeller i *ACOT9* uttrykk mellom donorgrupper dersom det var gjort forsøk på flere donorer fra ulike grupper. For undersøkelse av aminosyre- og glukosemetabolismen med substratoksidasjonsmetoden ville det ha vært gunstig å bruke myotuber fra andre donorgrupper enn LD-donorer, for eksempel EO-NGT- eller EO-T2D-donorer, for å undersøke om BCAA og BCKA påvirker glukosemetabolisme i disse donorgruppene.

Myotuber fra andre donorgrupper, som EO-NGT og EO-T2D, ville også være nyttig for å undersøke om EPA og OA påvirker aminosyremetabolismen hos disse donorene. Det ville også være interessant med knockout eller overuttrykk av ACOT9 i humane myotuber eller myotuber fra mus for å se på effekter av dette på fettsyre- og aminosyremetabolismen. Samtidig ville en hemmer av ACOT9 vært ønskelig for å undersøke hvilke opp-/nedreguleringer som skjer i metabolismen, og på akkumulering av substrater for ACOT9. Det ville vært interessant å se på effekten av insulin på glukosemetabolismen (glykogensyntese) ved høye konsentrasjoner av BCAA eller BCKA, og ikke bare basal glukosemetabolisme ved forbehandling med BCAA eller BCKA slik det ble gjort i denne oppgaven. Ved å undersøke effekten av insulin kan vi bekrefte om BCAA eller BCKA interferer med insulinsignaleren. For undersøkelse av mRNA-ekspressjon ville det ha vært ønskelig å utføre forsøkene med tredje endogen kontroll for å minimere spredningen som oppstod i forsøket som ble utført med bare *GAPDH* og *RPLP0*.

5 Konklusjon

Resultatene fra denne oppgaven viser at myotuber fra humane donorer med ekstrem overvekt og diabetes type 2 (EO-T2D) har signifikant høyere proteinuttrykk av ACOT9 sammenlignet med myotuber fra friske, normalvektige donorer (LD), mens myotuber fra humane donorer med ekstrem overvekt og normal glukosetoleranse (EO-NGT) ikke hadde signifikant høyere proteinuttrykk av ACOT9 sammenlignet med myotuber fra LD-donorer. Myotuber fra unge, atletiske individer sammenlignet med myotuber fra unge, utrente individer viste ingen signifikant forskjell i proteinuttrykk av ACOT9. Myotuber fra normalvektige og overvektige donorer, før og etter en 12 ukers treningsintervensjon *in vivo*, hadde heller ikke signifikante forskjeller i proteinuttrykk av ACOT9. Det var ikke mulig å trekke konklusjon fra forsøket der myotuber ble forbehandlet med BCAA og BCKA på grunn av for få donorer i forsøket.

mRNA-ekspresjon av *ACOT9* i myotuber fra EO-NGT-donorer var ikke signifikant forskjellig sammenlignet med myotuber fra LD-donorer. Samtidig var ikke mRNA-ekspresjon av *ACOT9* i myotuber fra EO-T2D-donorer signifikant forskjellig sammenlignet med myotuber fra LD-donorer. Dette gjaldt både når *ACOT9* ble relatert til de endogene kontrollene *GAPDH* og *RPLP0*, og når *ACOT9* ble relatert til gjennomsnittet av de endogene kontrollene.

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av glukose ved forbehandling med BCAA eller BCKA sammenlignet med kontrollceller. Det ble observert en tendens til økning av fraksjonell oksidasjon av glukose i myotuber forbehandlet med BCAA sammenlignet med kontrollceller ($p = 0,06$). I tillegg ble det heller ikke funnet signifikante forskjeller på opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av leucin ved forbehandling med BCAA eller BCKA sammenlignet med kontrollceller. Imidlertid ble det funnet en tendens til økning av fraksjonell oksidasjon av leucin i myotuber forbehandlet med EPA sammenlignet med kontrollceller ($p = 0,06$).

Preliminære data fra samarbeidspartnere ved Karolinska Institutet er bekreftet i denne oppgaven ved at ACOT9 har signifikant økt uttrykk i myotuber fra EO-T2D-donorer sammenlignet med myotuber fra LD-donorer. Det kan derfor være en forbindelse mellom ACOT9 og fetttsyre- og aminosyremetabolisme ved diabetes type 2, samt at dette enzymet kan ha en betydning for BCAA-nivåene.

Litteraturliste

1. World Health Organization. *Global status report on noncommunicable diseases*, 2014. Siteret: 10.februar.2016. Available from: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>.
2. Helsedirektoratet, *Nasjonale faglig retningslinjer: Forebygging, utredning og behandling av overvekt og fedme hos voksne*. 2010.
3. Rothman, K.J., *BMI-related errors in the measurement of obesity*. Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 3**: p. S56-9.
4. International Diabetes Federation. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. 2006.
5. Janssen, I., P.T. Katzmarzyk, and R. Ross, *Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(3): p. 379-84.
6. Jensky-Squires, N.E., et al., *Validity and reliability of body composition analysers in children and adults*. Br J Nutr, 2008. **100**(4): p. 859-65.
7. Hill, J.O., H.R. Wyatt, and J.C. Peters, *Energy balance and obesity*. Circulation, 2012. **126**(1): p. 126-32.
8. Herrera, B.M. and C.M. Lindgren, *The genetics of obesity*. Curr Diab Rep, 2010. **10**(6): p. 498-505.
9. Segula, D., *Complications of obesity in adults: a short review of the literature*. Malawi Med J, 2014. **26**(1): p. 20-4.
10. Lichtenstein, A.H. and U.S. Schwab, *Relationship of dietary fat to glucose metabolism*. Atherosclerosis, 2000. **150**(2): p. 227-43.
11. Bray, G.A., et al., *The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation*. J Nutr, 2002. **132**(9): p. 2488-91.
12. Bellanger, T.M. and G.A. Bray, *Obesity related morbidity and mortality*. J La State Med Soc, 2005. **157 Spec No 1**: p. S42-9; quiz 49.
13. Grundy, S.M., *Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. **89**(6): p. 2595-2600.
14. Kawano, J. and R. Arora, *The role of adiponectin in obesity, diabetes, and cardiovascular disease*. J Cardiometab Syndr, 2009. **4**(1): p. 44-9.
15. Simons, P.J., et al., *Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization*. J Endocrinol, 2007. **192**(2): p. 289-99.
16. Riccardi, G., R. Giacco, and A.A. Rivellese, *Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome*. Clin Nutr, 2004. **23**(4): p. 447-56.
17. Achten, J. and A.E. Jeukendrup, *Optimizing fat oxidation through exercise and diet*. Nutrition, 2004. **20**(7-8): p. 716-727.
18. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(4): p. 295-309.
19. Ziauddeen, H. and P.C. Fletcher, *Central nervous system biomarkers for antiobesity drug development()*. Drug Discovery Today, 2013. **18**(23-24): p. 1282-1291.
20. Wilcox, G., *Insulin and Insulin Resistance*. Clinical Biochemist Reviews, 2005. **26**(2): p. 19-39.
21. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, *Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes*. Current diabetes reviews, 2013. **9**(1): p. 25-53.
22. Schmitz-Peiffer, C. and J.P. Whitehead, *IRS-1 regulation in health and disease*. IUBMB Life, 2003. **55**(7): p. 367-74.

23. Halse, R., et al., *Control of glycogen synthesis by glucose, glycogen, and insulin in cultured human muscle cells*. *Diabetes*, 2001. **50**(4): p. 720-6.
24. Yeaman, S.J., et al., *Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells*. *Biochem Soc Trans*, 2001. **29**(Pt 4): p. 537-41.
25. 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.
26. Sesti, G., *Pathophysiology of insulin resistance*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006. **20**(4): p. 665-79.
27. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(2): p. 171-6.
28. Li, Y., et al., *Protein kinase C Theta inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser(1101)*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(44): p. 45304-7.
29. Draznin, B., *Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin*. *Diabetes*, 2006. **55**(8): p. 2392-7.
30. Summers, S.A., *Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity*. *Prog Lipid Res*, 2006. **45**(1): p. 42-72.
31. Mahfouz, R., et al., *Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(7): p. e101865.
32. Krebs, M., et al., *Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans*. *Diabetes*, 2002. **51**(3): p. 599-605.
33. Tremblay, F., et al., *Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance*. *Annu Rev Nutr*, 2007. **27**: p. 293-310.
34. Lu, J., et al., *Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids*. *Front Med*, 2013. **7**(1): p. 53-9.
35. Lynch, C.J. and S.H. Adams, *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*. *Nature reviews. Endocrinology*, 2014. **10**(12): p. 723-736.
36. Saha, A.K., et al., *Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle*. *Diabetes*, 2010. **59**(10): p. 2426-34.
37. Rang, H., et al., *Rang and Dale's Pharmacology*. 6th edition. 2004. London: Elsevier.
38. Reseptregisteret., *Diabetesmedikamenter*. Søkt: 23.03.2016. Available from: www.reseptregisteret.no
39. Stolar, M., *Glycemic Control and Complications in Type 2 Diabetes Mellitus*. *The American Journal of Medicine*, 2010. **123**(3, Supplement): p. S3-S11.
40. Dodson, P.M., *Diabetic retinopathy: treatment and prevention*. *Diab Vasc Dis Res*, 2007. **4 Suppl 3**: p. S9-s11.
41. Gross, J.L., et al., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment*. *Diabetes Care*, 2005. **28**(1): p. 164-76.
42. Forbes, J.M. and M.E. Cooper, *Mechanisms of diabetic complications*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(1): p. 137-88.
43. Kahn, S.E., M.E. Cooper, and S. Del Prato, *Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future*. *Lancet*, 2014. **383**(9922): p. 1068-83.
44. Helsedirektoratet. *Nasjonal faglig retningslinje for diabetes* (versjon under revisjon). 2016.
45. Proks, P., et al., *Sulfonylurea stimulation of insulin secretion*. *Diabetes*, 2002. **51 Suppl 3**: p. S368-76.

46. Kase E.T, B.K.I., *Antidiabetika som påvirker inkretinsystemet*. Tidsskr Nor Legeforen, (2009): p. 129-205.
47. Scheen, A.J., *Pharmacodynamics, Efficacy and Safety of Sodium–Glucose Co-Transporter Type 2 (SGLT2) Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus*. Drugs, 2015. **75**(1): p. 33-59.
48. Hanefeld, M. and F. Schaper, *Acarbose: oral anti-diabetes drug with additional cardiovascular benefits*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2008. **6**(2): p. 153-63.
49. Janani, C. and B.D. Ranjitha Kumari, *PPAR gamma gene--a review*. Diabetes Metab Syndr, 2015. **9**(1): p. 46-50.
50. Sand, O., *et.al.. Menneskets fysiologi* Oslo (2011): Gyldendal.
51. Scott, W., J. Stevens, and S.A. Binder–Macleod, *Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications*. Physical Therapy, 2001. **81**(11): p. 1810-1816.
52. Lodish., H., *et. al. Molecular Cell Biology*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21724/>. 4 ed. 2000, New York: W.H Freeman.
53. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber types in mammalian skeletal muscles*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1447-531.
54. Yang, J., *Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **121**: p. 133-63.
55. Richter, E.A., W. Derave, and J.F.P. Wojtaszewski, *Glucose, exercise and insulin: emerging concepts*. The Journal of Physiology, 2001. **535**(Pt 2): p. 313-322.
56. Jensen, J., *et al., The Role of Skeletal Muscle Glycogen Breakdown for Regulation of Insulin Sensitivity by Exercise*. Frontiers in Physiology, 2011. **2**: p. 112.
57. Azpiazu, I., *et al., Control of glycogen synthesis is shared between glucose transport and glycogen synthase in skeletal muscle fibers*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(2): p. E234-43.
58. Adeva-Andany, M.M., *et al., Glycogen metabolism in humans()*. BBA Clinical, 2016. **5**: p. 85-100.
59. Bouche, C., *et al., The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 807-30.
60. Patel, M.S. and L.G. Korotchkina, *Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 2): p. 217-22.
61. Li, X.-b., J.-d. Gu, and Q.-h. Zhou, *Review of aerobic glycolysis and its key enzymes – new targets for lung cancer therapy*. Thoracic Cancer, 2015. **6**(1): p. 17-24.
62. Smeitink, J., L. van den Heuvel, and S. DiMauro, *The genetics and pathology of oxidative phosphorylation*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(5): p. 342-52.
63. Das, A.M., *Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease*. Mol Genet Metab, 2003. **79**(2): p. 71-82.
64. Consitt, L.A., J.A. Bell, and J.A. Houmard, *Intramuscular Lipid Metabolism, Insulin Action and Obesity*. IUBMB life, 2009. **61**(1): p. 47-55.
65. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, *Altered lipid metabolism in brain injury and disorders*. Subcell Biochem, 2008. **49**: p. 241-68.
66. Maxfield, F.R. and I. Tabas, *Role of cholesterol and lipid organization in disease*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 612-621.
67. Wang, H. and R.H. Eckel, *Lipoprotein lipase: from gene to obesity*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2009. **297**(2): p. E271-E288.
68. Pollare, T., B. Vessby, and H. Lithell, *Lipoprotein lipase activity in skeletal muscle is related to insulin sensitivity*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(5): p. 1192-203.

69. Wang, H., et al., *Skeletal Muscle-Specific Deletion of Lipoprotein Lipase Enhances Insulin Signaling in Skeletal Muscle but Causes Insulin Resistance in Liver and Other Tissues*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 116-124.
70. Rać, M.E., K. Safranow, and W. Poncyłjusz, *Molecular Basis of Human CD36 Gene Mutations*. Molecular Medicine, 2007. **13**(5-6): p. 288-296.
71. Ibrahimi, A., et al., *Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26761-6.
72. Febbraio, M., et al., *A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19055-62.
73. Kompare, M. and W.B. Rizzo, *Mitochondrial Fatty-Acid Oxidation Disorders*. Seminars in Pediatric Neurology, 2008. **15**(3): p. 140-149.
74. Karlic, H. and A. Lohninger, *Supplementation of L-carnitine in athletes: does it make sense?* Nutrition, 2004. **20**(7-8): p. 709-15.
75. Rubio-Gozalbo, M.E., et al., *Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(5-6): p. 521-32.
76. Bartlett, K. and S. Eaton, *Mitochondrial β -oxidation*. European Journal of Biochemistry, 2004. **271**(3): p. 462-469.
77. Blomstrand, E. and B. Saltin, *Effect of muscle glycogen on glucose, lactate and amino acid metabolism during exercise and recovery in human subjects*. The Journal of Physiology, 1999. **514**(Pt 1): p. 293-302.
78. Brosnan, J.T. and M.E. Brosnan, *Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation*. J Nutr, 2006. **136**(1 Suppl): p. 207s-11s.
79. Suryawan, A., et al., *A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(1): p. 72-81.
80. Davoodi, J., et al., *Overexpression and Characterization of the Human Mitochondrial and Cytosolic Branched-chain Aminotransferases*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(9): p. 4982-4989.
81. Hutson, S., *Structure and function of branched chain aminotransferases*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. **70**: p. 175-206.
82. Crown, S.B., N. Marze, and M.R. Antoniewicz, *Catabolism of Branched Chain Amino Acids Contributes Significantly to Synthesis of Odd-Chain and Even-Chain Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145850.
83. Takahashi-Iniguez, T., et al., *Role of vitamin B12 on methylmalonyl-CoA mutase activity*. J Zhejiang Univ Sci B, 2012. **13**(6): p. 423-37.
84. Shimomura, Y., et al., *Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise*. J Nutr, 2004. **134**(6 Suppl): p. 1583s-1587s.
85. Kainulainen, H., J.J. Hulmi, and U.M. Kujala, *Potential role of branched-chain amino acid catabolism in regulating fat oxidation*. Exerc Sport Sci Rev, 2013. **41**(4): p. 194-200.
86. Tillander, V., et al., *Acyl-CoA thioesterase 9 (ACOT9) in mouse may provide a novel link between fatty acid and amino acid metabolism in mitochondria*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(5): p. 933-48.
87. Gergely, J., P. Hele, and C.V. Ramakrishnan, *Succinyl and acetyl coenzyme a deacylases*. J Biol Chem, 1952. **198**(1): p. 324-34.
88. Hunt, M.C., M.I. Siponen, and S.E. Alexson, *The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(9): p. 1397-410.

89. Hunt, M.C., V. Tillander, and S.E. Alexson, *Regulation of peroxisomal lipid metabolism: the role of acyl-CoA and coenzyme A metabolizing enzymes*. *Biochimie*, 2014. **98**: p. 45-55.
90. Poupon, V., et al., *Molecular cloning and characterization of MT-ACT48, a novel mitochondrial acyl-CoA thioesterase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(27): p. 19188-94.
91. Duval, C., et al., *Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice*. *Diabetes*, 2010. **59**(12): p. 3181-91.
92. 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.
93. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**(1): p. 248-254.
94. Aas, V., et al., *Are cultured human myotubes far from home?* *Cell Tissue Res*, 2013. **354**(3): p. 671-82.
95. Berggren, J.R., C.J. Tanner, and J.A. Houmard, *Primary cell cultures in the study of human muscle metabolism*. *Exerc Sport Sci Rev*, 2007. **35**(2): p. 56-61.
96. Al-Khalili, L., et al., *Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(5): p. 991-8.
97. Lynch, C.J., et al., *Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **291**(3): p. E621-30.
98. Chen, Q. and R.A. Reimer, *Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro*. *Nutrition*, 2009. **25**(3): p. 340-9.
99. Potier, M., N. Darcel, and D. Tome, *Protein, amino acids and the control of food intake*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2009. **12**(1): p. 54-8.
100. Macotela, Y., et al., *Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21187.
101. Zhang, Y., et al., *Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms*. *Diabetes*, 2007. **56**(6): p. 1647-54.
102. Nishitani, S., et al., *Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **299**(5): p. 693-6.
103. Greiwe, J.S., et al., *Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **281**(3): p. E466-71.
104. Doi, M., et al., *Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity*. *J Nutr*, 2005. **135**(9): p. 2103-8.
105. Doi, M., et al., *Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **312**(4): p. 1111-7.
106. Donato, J., Jr., et al., *Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction*. *Nutrition*, 2006. **22**(5): p. 520-7.
107. Mourier, A., et al., *Combined effects of caloric restriction and branched-chain amino acid supplementation on body composition and exercise performance in elite wrestlers*. *Int J Sports Med*, 1997. **18**(1): p. 47-55.
108. Shah, S.H., et al., *Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss*. *Diabetologia*, 2012. **55**(2): p. 321-30.

109. Devkota, S. and D.K. Layman, *Protein metabolic roles in treatment of obesity*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. **13**(4): p. 403-7.
110. Stoppani, J., et al., *Consuming a supplement containing branched-chain amino acids during a resistance-training program increases lean mass, muscle strength and fat loss*. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2009. **6**(Suppl 1): p. P1-P1.
111. Tom, A. and K.S. Nair, *Assessment of branched-chain amino Acid status and potential for biomarkers*. *J Nutr*, 2006. **136**(1 Suppl): p. 324s-30s.
112. De Palo, E.F., et al., *Plasma lactate, GH and GH-binding protein levels in exercise following BCAA supplementation in athletes*. *Amino Acids*, 2001. **20**(1): p. 1-11.
113. Negro, M., et al., *Branched-chain amino acid supplementation does not enhance athletic performance but affects muscle recovery and the immune system*. *J Sports Med Phys Fitness*, 2008. **48**(3): p. 347-51.
114. Liu, Y., et al., *Improved training tolerance by supplementation with α -Keto acids in untrained young adults: a randomized, double blind, placebo-controlled trial*. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2012. **9**(1): p. 1-9.
115. Lynch, C.J. and S.H. Adams, *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. **10**(12): p. 723-36.
116. Newgard, C.B., *Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance*. *Cell Metab*, 2012. **15**(5): p. 606-14.
117. Gougeon, R., et al., *Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2008. **31**(1): p. 128-33.
118. Cheng, S., et al., *Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans*. *Circulation*, 2012. **125**(18): p. 2222-31.
119. Dodd, K.M. and A.R. Tee, *Leucine and mTORC1: a complex relationship*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(11): p. E1329-42.
120. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. *Journal of Cell Science*, 2009. **122**(20): p. 3589-3594.
121. Liu, K.A., et al., *Leucine supplementation differentially enhances pancreatic cancer growth in lean and overweight mice*. *Cancer & Metabolism*, 2014. **2**(1): p. 1-12.
122. Anthony, J.C., et al., *Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway*. *J Nutr*, 2000. **130**(10): p. 2413-9.
123. Tremblay, F., et al., *Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(35): p. 14056-61.
124. Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, and J.F. Tanti, *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. *Biochimie*, 2005. **87**(1): p. 99-109.
125. Hartley, D. and G.M. Cooper, *Role of mTOR in the degradation of IRS-1: regulation of PP2A activity*. *J Cell Biochem*, 2002. **85**(2): p. 304-14.
126. Tremblay, F., et al., *Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability*. *Diabetes*, 2005. **54**(9): p. 2674-84.
127. Lackey, D.E., et al., *Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2013. **304**(11): p. E1175-E1187.
128. Coughlan, K.A., et al., *Nutrient Excess in AMPK Downregulation and Insulin Resistance*. *J Endocrinol Diabetes Obes*, 2013. **1**(1): p. 1008.

129. Shiba, S., et al., *Regulation of lipid metabolism by palmitoleate and eicosapentaenoic acid (EPA) in mice fed a high-fat diet*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011. **75**(12): p. 2401-3.
130. Horakova, O., et al., *Preservation of metabolic flexibility in skeletal muscle by a combined use of n-3 PUFA and rosiglitazone in dietary obese mice*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43764.
131. Siriwardhana, N., N.S. Kalupahana, and N. Moustaid-Moussa, *Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid*. Adv Food Nutr Res, 2012. **65**: p. 211-22.
132. Kwak, S.M., et al., *Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials*. Arch Intern Med, 2012. **172**(9): p. 686-94.
133. Gillies, P.J., et al., *Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil*. Journal of Lipid Research, 2012. **53**(8): p. 1679-1689.
134. van Raalte, D.H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future*. Pharm Res, 2004. **21**(9): p. 1531-8.
135. Kersten, S., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism*. Faseb j, 2001. **15**(11): p. 1971-8.
136. Hessvik, N.P., et al., *Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2090-104.
137. Lu, Y., et al., *Comparative transcriptomic and metabolomic analysis of fenofibrate and fish oil treatments in mice*. Physiological Genomics, 2011. **43**(23): p. 1307-1318.
138. Kamolrat, T. and S.R. Gray, *The effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on protein synthesis and breakdown in murine C2C12 myotubes*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **432**(4): p. 593-8.
139. Reuter, S.E. and A.M. Evans, *Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects*. Clin Pharmacokinet, 2012. **51**(9): p. 553-72.
140. Bjorndal, B., et al., *Fish oil and the pan-PPAR agonist tetradecylthioacetic acid affect the amino acid and carnitine metabolism in rats*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66926.
141. Newgard, C.B., et al., *A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance*. Cell metabolism, 2009. **9**(4): p. 311-326.
142. Sales-Campos, H., et al., *An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease*. Mini Rev Med Chem, 2013. **13**(2): p. 201-10.
143. Schwingshackl, L. and G. Hoffmann, *Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses*. Nutrients, 2012. **4**(12): p. 1989-2007.
144. Temme, E.H., R.P. Mensink, and G. Hornstra, *Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(6): p. 897-903.
145. Lopez-Huertas, E., *Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies*. Pharmacol Res, 2010. **61**(3): p. 200-7.
146. Perdomo, L., et al., *Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process*. Cardiovasc Diabetol, 2015. **14**: p. 75.
147. Haffner, S.M., *Relationship of metabolic risk factors and development of cardiovascular disease and diabetes*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 3**: p. 121s-127s.

148. Hardy, O.T., M.P. Czech, and S. Corvera, *What causes the insulin resistance underlying obesity?* Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity, 2012. **19**(2): p. 81-87.
149. McKenney, R.L. and D.K. Short, *Tipping the balance: the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes mellitus.* Surg Clin North Am, 2011. **91**(6): p. 1139-48, vii.
150. Mokdad, A.H., et al., *The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States.* Jama, 2001. **286**(10): p. 1195-200.
151. Golay, A. and J. Ybarra, *Link between obesity and type 2 diabetes.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 649-63.
152. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.* Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
153. Boden, G., *Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003. **111**(3): p. 121-4.
154. Kahn, B.B., *Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action.* Diabetes, 1996. **45**(11): p. 1644-54.
155. Roden, M., et al., *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.* Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**(12): p. 2859-2865.
156. Ellis, J.M., C.E. Bowman, and M.J. Wolfgang, *Metabolic and tissue-specific regulation of acyl-CoA metabolism.* PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0116587.
157. Han, S. and D.E. Cohen, *Functional characterization of thioesterase superfamily member 1/Acyl-CoA thioesterase 11: implications for metabolic regulation.* J Lipid Res, 2012. **53**(12): p. 2620-31.
158. Kang, H.W., et al., *Thioesterase superfamily member 2/Acyl-CoA thioesterase 13 (Them2/Acot13) regulates adaptive thermogenesis in mice.* J Biol Chem, 2013. **288**(46): p. 33376-86.
159. Cao, J., et al., *The Mechanisms of Human Hotdog-fold Thioesterase 2 (hTHEM2) Substrate Recognition and Catalysis Illuminated by a Structure and Function Based Analysis.* Biochemistry, 2009. **48**(6): p. 1293-1304.
160. Frühbeck, G., et al., *BAT: a new target for human obesity?* Trends in Pharmacological Sciences, 2009. **30**(8): p. 387-396.
161. Seale, P. and M.A. Lazar, *Brown fat in humans: turning up the heat on obesity.* Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1482-4.
162. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies.* Journal of Experimental Biology, 2010. **214**(2): p. 242-253.
163. Ginter, E. and V. Simko, *Brown fat tissue - a potential target to combat obesity.* Bratisl Lek Listy, 2012. **113**(1): p. 52-6.
164. Zhang, Y., et al., *Targeted deletion of thioesterase superfamily member 1 promotes energy expenditure and protects against obesity and insulin resistance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5417-22.
165. Cohen, D.E., *New players on the metabolic stage: How do you like Them Acots?* Adipocyte, 2013. **2**(1): p. 3-6.
166. McCormack, S.E., et al., *Circulating branched-chain amino acid concentrations are associated with obesity and future insulin resistance in children and adolescents.* Pediatr Obes, 2013. **8**(1): p. 52-61.
167. Benziane, B., et al., *Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1427-38.

168. Widrick, J.J., et al., *Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(2): p. R408-16.
169. Spina, R.J., et al., *Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise*. J Appl Physiol (1985), 1996. **80**(6): p. 2250-4.
170. Sidossis, L.S., R.R. Wolfe, and A.R. Coggan, *Regulation of fatty acid oxidation in untrained vs. trained men during exercise*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 1): p. E510-5.
171. Cartee, G.D., et al., *Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise*. Am J Physiol, 1989. **256**(4 Pt 1): p. E494-9.
172. Horowitz, J.F. and S. Klein, *Lipid metabolism during endurance exercise*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(2 Suppl): p. 558s-63s.
173. Ramos-Jiménez, A., et al., *The Respiratory Exchange Ratio is Associated with Fitness Indicators Both in Trained and Untrained Men: A Possible Application for People with Reduced Exercise Tolerance*. Clinical Medicine. Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine, 2008. **2**: p. 1-9.
174. Brownell, K.D., S.N. Steen, and J.H. Wilmore, *Weight regulation practices in athletes: analysis of metabolic and health effects*. Med Sci Sports Exerc, 1987. **19**(6): p. 546-56.
175. Davy, K.P., et al., *Adiposity and regional body fat distribution in physically active young and middle-aged women*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20**(8): p. 777-83.
176. Thompson, D., et al., *Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology*. Physiol Rev, 2012. **92**(1): p. 157-91.
177. Hill, J.O., H.R. Wyatt, and J.C. Peters, *Energy Balance and Obesity*. Circulation, 2012. **126**(1): p. 126-132.
178. Lund, J., et al., *Exercise in vivo marks human myotubes in vitro: Training-induced increase in lipid metabolism and insulin receptor substrate 1 (IRS1) first exon DNA methylation*, 2016. Submitted to American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism. Upublisert.
179. Barber, R.D., et al., *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. Physiol Genomics, 2005. **21**(3): p. 389-95.
180. Akamine, R., et al., *Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species*. J Biochem Biophys Methods, 2007. **70**(3): p. 481-6.
181. Hara, M.R., et al., *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 665-74.
182. Butterfield, D.A., S.S. Hardas, and M.L. Lange, *Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration*. J Alzheimers Dis, 2010. **20**(2): p. 369-93.

Appendiks

1. Medier brukt under dyrking av humane skjelettmuskelceller

1.1 Utsåingsmedium:

500 ml DMEM m/Glutamax m/1,0 g glukose/l
50 ml FCS
2,5 ml (10 000 enheter/ml) Penicillin/Streptomycin
2,5 ml (250 g/ml) Fungizone (Amphotericin B)
500 µl (0,05 mg/ml) Gentamycin

1.2 Proliferasjonsmedium:

500 ml DMEM m/Glutamax m/1,0 g glukose/l
10 ml FCS
10 ml Ultrosor G
2,5 ml (10 000 enheter/ml) Penicillin/Streptomycin
2,5 ml (250 g/ml) Fungizone (Amphotericin B)
500 µl (0,05 mg/ml) Gentamycin

1.3 Differensieringsmedium:

500 ml DMEM m/Glutamax m/1,0 g glukose/l
10 ml FCS
2,5 ml (10 000 enheter/ml) Penicillin/Streptomycin
2,5 ml (250 g/ml) Fungizone (Amphotericin B)
25 pmol Insulin
500 µl (0,05 mg/ml) Gentamycin

2. CO₂-trapping

2.1 Løsninger for forbehandling:

Alle forbehandlingsløsningene ble beregnet med noe overskudd.

Negativ kontroll:

36 µl DMEM uten tilsetninger

3600 µl differensieringsmedium

100 µM, EPA-løsning:

30 µl (6 mM) EPA bundet til fettsyre fri BSA

1800 µl differensieringsmedium

100 µM, OA-løsning:

30 µl (6 mM) OA bundet til fettsyre fri BSA

1800 µl differensieringsmedium

160 mM stamløsning leucin:

153,1 mg leucin (løselighet: 24,3 mg/ml)

6,6 ml DMEM uten tilsetninger

150 mM stamløsning isoleucin:

39,35 mg isoleucin (løselighet: 41,2 mg/ml)

2 ml DMEM uten tilsetninger

300 mM stamløsning valin:

35,14 mg valin (løselighet: 85 mg/ml)

1 ml DMEM uten tilsetninger

30 mM, BCAA-blanding:

62,5 µl (160 mM) leucin

66,7 µl (150 mM) isoleucin

33,5 µl (300 mM) valin

1000 µl differensieringsmedium

300 mM stamløsning α -ketoleucin:

45,64 mg α -ketoleucin (løselighet: 50 mg/ml)

1 ml DMEM uten tilsetninger

300 mM, stamløsning α -ketoisoleucin:

45,64 mg α -ketoisoleucin (løselighet: 50 mg/ml)

1 ml DMEM uten tilsetninger

300 mM, stamløsning α -ketovalin:

41,43 mg α -ketovalin (løselighet: 100 mg/ml)

1 ml DMEM uten tilsetninger

30 mM, BCKA-blanding:

33,5 μ l (300 mM) α -ketoleucin

33,5 μ l (300 mM) α -ketosoleucin

33,5 μ l (300 mM) α -ketovalin

1000 μ l differensieringsmedium

2.2 Trappemedier for CO₂-trapping:

Alle trappemedier ble laget med noe overskudd.

¹⁴C-Glukose:

1 brett = 32 brønner med ¹⁴C-Glukose.

14,85 μ l (200 μ M, 0,58 μ Ci/ml) ¹⁴C-Glukose

2,56 μ l (1 M) L-karnitin

10,1 μ l (2,4 mM) BSA

2,532 ml, DPBS m/ 10 mM HEPES

Totalt: 2,56 ml

¹⁴C-Leucin:

1 brett = 24 brønner med ¹⁴C-Leucin.

9,6 μ l (100 μ M, 0,5 μ Ci/ml) ¹⁴C-Leucin

1,2 μ l (0,16 M) Leucin

1,92 μ l (1 M) L-Karnitin

8 µl (2,4 mM) BSA

1,88 ml DPBS m/10 mM HEPES:

Totalt: 1,92 ml

3. Reagenser brukt i Western blot

3.1 Høstebuffer:

2x-samplebuffer

10 µl/ml proteasehemmer

10 µl/ml fosfatasehemmercocktail 2

3.2 Elektroforesebuffer:

For 1 l elektroforesebuffer:

100 ml 10x Tris/Glycine/SDS Electrophoresis Buffer

900 ml destillert H₂O

3.3 Blottebuffer:

For 4 l blottebuffer:

400 ml 10x Tris/Glycine Transfer Buffer,

800 ml MeOH

2,8 l destillert H₂O

3.4 10x TBS:

For 1 l 10x TBS:

24 g Tris-HCl

5,6 g Tris-base

88 g NaCl

900 ml destillert H₂O

3.5 1x T-TBS:

For 1 l 1x T-TBS:

0,5 ml Tween 20 (0,05 %)

100 ml 10xTBS

900 ml destillert H₂O

3.6 5 % Tørrmelk:

Tørrmelk er fast stoff som skal løses i 1xT-TBS.

For 100 ml 5 % tørrmelk:

5 g tørrmelk

100 ml 1xTTBS

3.7 Primærantistoff:

Anti-ACOT9. Anbefalt fortyning oppgitt fra produsent var 1:1000 – 1:2500. Valgte å fortynne 1:2500.

Lagde 5 ml primærantistoff per membran.

$5000 \mu\text{l} / 2500 = 2 \mu\text{l}$ primærantistoff i 5 ml 5 % tørrmelk

Anti- β -actin. Anbefalt fortyning oppgitt fra produsent var 1:5000. Den anbefalte fortyningen ga for svake bånd, valgte derfor å fortynne 1:2500.

Lagde 5 ml primærantistoff per membran.

$5000 \mu\text{l} / 2500 = 2 \mu\text{l}$ primærantistoff i 5 ml 5 % tørrmelk

3.8 Sekundærantistoff:

Goat anti-rabbit. Ble brukt fordi antistoffene for ACOT9 og β -actin var fra kanin. Anbefalt fortyning oppgitt fra produsent var 1:3000.

Lagde 10 ml per membran.

$10000 \mu\text{l} / 3000 = 3,33 \mu\text{l}$ sekundærantistoff i 5 ml 5 % tørrmelk + 5 ml 1x T-TBS.

4. Reaksjonsblanding til cDNA-syntetisering:

4.1 Reaksjonsblanding per prøve:

4,0 μl 10x TaqMan RT Buffer

1,6 μl 25x deoksynukleotid trifosfat-mix

4,0 μl 10x RT random hexamers

2,0 μl RNase inhibitor (20 U/ μl)

2,0 μl Multiscribe reverse transcriptase (50 U/ μl)

26,4 μl DEPC- dH_2O^+

4.2 Standardløsninger:

cDNA-mix: 2,8 µl fra hver prøve: 2,8 µl x 12 prøver = 33,6 µl

Standard 1000 (1:2 fortynning av cDNA-mix): 30 µl cDNA-mix + 30 µl nukleasefritt vann

Standard 500 (1:2 fortynnet standard 1000): 30 µl standard 1000 + 30 µl nukleasefritt vann

Standard 250 (1:2 fortynnet standard 500): 30 µl standard 500 + 30 µl nukleasefritt vann

Standard 125 (1:2 fortynnet standard 250): 30 µl standard 250 + 30 µl nukleasefritt vann

4.3 Primer:

Stock har konsentrasjon 300 µM. Skal ha konsentrasjon 30 µM. Fortynner 1:10.

Lager 100 µl = 10 µl primer + 90 µl nukleasefritt vann

4.4 cDNA-prøver:

2,5 µl av hver prøve x 3 paralleller x 3 gener = 22,5 µl (lager 30 µl av hver prøve)

Fortynnes 1:2: 30 µl/2 = 15 µl av hver cDNA-prøve

15 µl cDNA-prøve + 15 µl nukleasefritt vann