

AMPK SOM REGULATOR AV MITOKONDRIELL BIOGENESE I EN NY REPORTER- CELLEMODELL

Bina Qassem Ahmed

Senter for farmasi

September 2011



UNIVERSITETET I BERGEN

Forord

Master oppgaven ble utført ved Seksjon for biomedisin, Universitet i Bergen i perioden september 2010 til september 2011.

Først vil jeg takke min veileder Karl Johan Tronstad og min biveileder Linn Iren Hodenland Nilsson, for all hjelpen jeg har fått gjennom master perioden. En spesiell takk for mye hjelp i den siste perioden med rettelse og bearbeiding av det skriftlige arbeidet. Uten deres hjelp ville det vært kjempe vanskelig å skrive oppgaven.

Jeg vil gjerne takke både Ingrid og Julie, for hjelpen jeg har fått på laboratoriet.

Takke alle ansatte ved seksjon for biomedisin som har snakket med meg, og oppmuntret meg i vanskelige perioder.

Takker alle i familien min som har holdt ut med meg i de 5 årene, støttet og oppmuntret meg.

Bergen, 01.09.2011

Bina Qassem Ahmed

Innholdsfortegnelse**Innholdsfortegnelse**

Forord	1
Innholdsfortegnelse	2
Forkortelser	4
1.Mål	5
2. Introduksjon	6
2.1 Mitokondriene	6
2.2 Cellenes energimetabolisme	7
2.2.1 Glykolyse (glukose ->pyruvat)	8
2.2.2 Mitokondriell respirasjon og oksidativ fosforylering	8
2.3 Regulering av mitokondriell biogenese	9
2.3.1 Signalveier som er involvert i mitokondriell biogenese	10
2.3.1.1 PGC-1 α	11
2.3.1.2 NRF1	12
2.3.1.3 AMPK α	12
2.3.1.4 ACC	13
2.3.2 Faktorer som påvirker stimulering eller inhibering av AMPK og ACC	14
2.3.2.1 AICAR	14
2.3.2.2 Metformin	15
2.3.2.3 Compound C (CC)	15
3. Materiale	16
3.1 Kjemikalier	16
3.2 Cellelinjer	17
3.3 Buffere og løsninger	17
3.3.1 Løsninger til Komplett medium	17
3.3.2 PBS løsning	17
3.3.3 Buffere og løsninger for gelelektroforese og western blotting	18
3.3.3.1 Løsninger for lysering av celler	18
3.3.3.2 Løsninger for gelelektroforese	18
3.3.3.3 Løsninger for blotting av membran	18
3.3.3.4 Løsninger for flowcytometri	19
3.4 Antistoffer	19
3.5 Dataprogrammer	20
3.6 Kommersielle analyser	20
3.7 Cellekultur og utstyr	20
4. Metode	21
4.1 Cellemodell	21
4.2 Håndtering av mammalske celler	21
4.2.1 Dyrking og splitting av adherent cellelinje	22
4.2.2 Kaldt trypsinering av celle	22

4.2.3 Bestemmelse av celletall	22
4.2.4 Lysering av trypsinerte cellekulturer	23
4.3 Proteinuttrykk	23
4.3.1 Sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)	24
4.3.2 Western blotting	25
4.3.3 Fiksering, permeabilisering og immunmerking av celler for flowcytometri	26
4.3.4 Flowcytometri analyser	27
4.4 Forsøksdesign	28
5. Resultater	29
5.1 Aktivering av AMPK respons og test av antistoffer	29
5.1.1 Optimalisering og deteksjon av AMPK fosforylering (fosfo-AMPK) (pAMPK)	29
5.1.2 Optimalisering og deteksjon av ACC fosforylering (fosfo-ACC) (pACC)	31
5.2 Effekten av Compound C (CC) på fosforylering av AMPK og ACC	32
5.2.1 Flowcytometri – pAMPK	33
5.2.2 Western blotting – pAMPK	34
5.2.2.1 Kaldt trypsinering	35
5.2.2.2 Direkte cellelysis	36
5.2.3 Flowcytometri – pACC	37
5.2.4 Western blotting – pACC	38
5.3 Effekten av metformin på fosforylering av AMPK og ACC	39
5.3.1 Flowcytometri – pAMPK	39
5.3.2 Western blotting – pAMPK	41
5.3.3 Flowcytometri – pACC	42
5.3.4 Western Blotting – pACC	43
6. Diskusjon	45
6.1 Test av antistoffer og AMPK aktiveringsbetingelser	45
6.2 AMPK aktivering og fosforylering av dens nedstrøms substrat ACC etter AICAR behandling	46
6.3 Effekt av DMSO på AMPK aktivering	49
6.4 Muligens AMPK aktivering etter behandling med metformin	49
7. Konklusjon	52
8. Fremtidige perspektiv	53
Referanser	54
Appendiks 1	58
Appendiks 2	59
Appendiks 3	60

Forkortelser

Forkortelse	Navn
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AMPK	Adenosine monophosphate aktivert protein kinase
ATP	Adenosine triphosphate
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
CAMKK β	Calcium calmodulin kinase kinase β
COX4	Cytochrome c oxidase subenhet 4
CC	Compound C ((6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy) phenyl]3 pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a] Pyrimidine)
DMSO	Dimetylsulfoxid
ERR α	Estrogen-related receptor alpha
FADH ₂	Flavin adenine dinucleotide H ₂
GTP	Guanosine triphosphate
IB	Inkubasjonsbuffer
IMP	Inositol monophosphat
mtDNA	Mitokondrielt DNA
mitGFP	Mitokondrielt fluoreserende protein
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NLS	Nuclear localization signal
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coaktivator 1 α
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Tfam	Mitochondrial transcription factor

1. Mål

Hovedmålet med dette prosjektet var å studere rollen til den cellulære energisensoren Adenosine Monophosphate Aktivert Protein Kinase (AMPK) ved mitokondriell biogenese i en ny reportercellemodell, HelaNRF1mitoGFP. Hensikten med denne modellen er å studere regulering av mitokondriell biogenese via AMPK og transkripsjonsfaktoren Nuclear respiratory factor 1 (NRF1) .

To kjente AMPK agonister, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) og metformin, og antagonisten Compound C (CC), ble brukt til å studere AMPK fosforylering og aktivering i HelaNRF1mitoGFP cellene. Effektene ble undersøkt ved å måle immunofluoresens ved hjelp av flowcytometri, og proteinuttrykk ved hjelp av western blotting

Delmål

- 1- Bestemme AMPK fosforylering etter behandling med AICAR i HelaNRF1mitoGFP cellelinjen.
- 2- Undersøke AMPK aktivering etter Aicar behandling ved å måle ACC fosforylering.
- 3- Studere effekten av Compound C (CC) på AMPK aktivering.
- 4- Studere AMPK fosforylering og aktivering etter metformin behandling i HelaNRF1mitoGFP cellelinjen.

2. Introduksjon

Alle levende organismer er bygd opp av celler. Celler tar opp næringsstoffer og konverterer dem til energi som de bruker til å utføre sine funksjoner, samt til reproduksjon. Normale celler har evnen til å respondere på, og tilpasse seg, endringer i eksterne og/eller interne faktorer som for eksempel næringstilgang, temperatur, proteinmangel, vekstfaktorer og farmakologiske stoffer. Celler inneholder mange ulike organeller som opprettholder cellens struktur og funksjon. Hver organelle inni cellen utfører ulike funksjoner. Den som vi har fokusert på i dette prosjektet er mitokondriet.

2.1 Mitokondriene

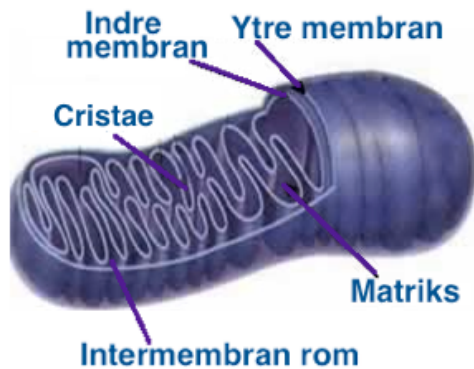
Mitokondriet er en viktig organelle som fungerer som cellens energifabrikk. Maten vi spiser blir her omdannet til en anvendelig form for energi kalt adenosine triphosphate (ATP). Mitokondriene deltar også i andre funksjoner som fettsyremetabolisme, biosyntese av cellulære komponenter og i ulike signalveier.

Mitokondrier er langformede og bevegelige organeller i cellene (8). De består av ytre membran, intermembran rom, indre membran og matriks som vist på figur 2.1.

Den indre rommet av mitokondriene er matriks som inneholder flere identiske kopier av mitokondrie genomet som koder for 13 mitokondrielle respiratoriske subenheter, mitokondriell ribosomer, tRNA, og ulike enzymer som er nødvendige for uttrykk av mitokondrielle gener. I tillegg inneholder mitokondriene et mangfold av enzymer som kodes fra kjerne DNA, inkludert de som trengs for oksidering av pyruvat, fettsyrer og for sitronsyresyklusen. Matriks er omgitt av indre membran, som er foldet i mange cristae som øker overflatearealet. Den er ugjennomtrengelig for ioner og ladete molekyler.

Indre membran inneholder proteiner som utfører oksidasjonsreaksjoner i elektron transport kjede, ATP syntase som danner ATP i matriksen og transport proteiner som tillater passasje av metabolitter inn og ut av matriksen. Intermembran rom er mellom indre og ytre membran. Det inneholder flere enzymer og transportproteiner som for eksempel cytokrom C og proteiner som forbinder ytre og indre membran. Hele mitokondriet er omgitt av en gjennomtrengelig ytre membran. Den inneholder poriner som tillater passasje av store molekyler og enzymer som er nødvendig i mitokondrie

lipid syntese og enzymer som er nødvendig for fettsyremetabolisme.

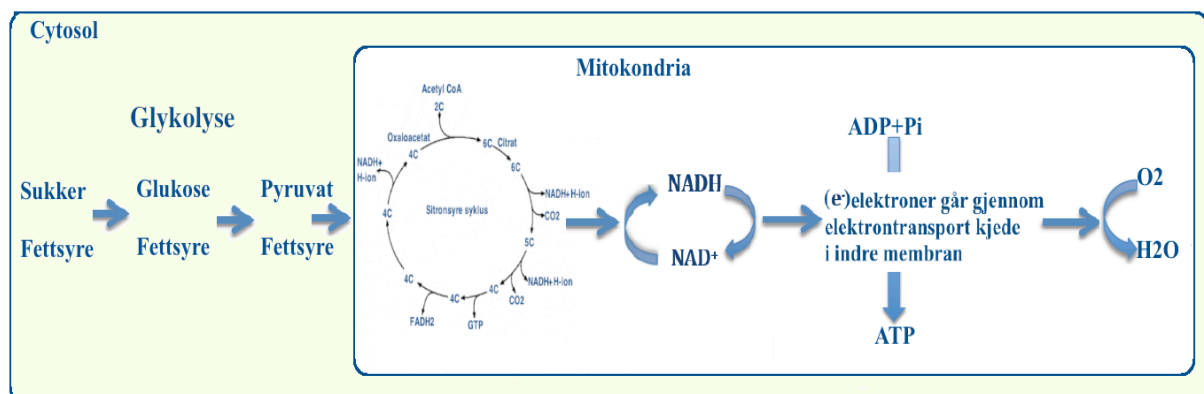


Figur 2.1: Mitokondriell oppbygning

Mitokondrier består av et indre matriks, indre membran (som er foldet i mange cristae), intermembran rom og ytre membran. Figuren ble modifisert fra <http://click4biology.info/c4b/2/cell2.3.htm>.

2.2 Cellenes energimetabolisme

Energi i maten vi spiser kan ikke anvendes direkte av kroppen og må konverteres til en type energi, ATP, som kan brukes av kroppen. Denne katabolske nedbrytningen av mat skjer gjennom en rekke biokjemiske metabolismeveier som avgir energirike elektroner i form av nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) og flavin adenine dinucleotide (FADH₂) som brukes til ATP produksjon ved oksidativ fosforylering i mitokondriene (Figur 2.2).



Figur 2.2: Viser oksidering av mat molekyler

Suktermolekyler nedbrytes i cytosol inne i cellen, hvor det for hvert glukose molekyl blir dannet 2 pyruvat molekyler. Pyruvat og fettsyrer blir transportert til mitokondriene. Der brytes de ned til acetyl-CoA. Acetyl-CoA går gjennom 8 trinn og det blir som en syklus; syklusen blir kalt for sitronsyresyklusen. I sitronsyresyklusen blir det dannet energirike elektron bærere som (NADH,

GTP, FADH₂). NADH og FADH₂ blir oksidert og elektronene går gjennom elektrontransportkjeden i den indre mitokondrielle membranen.

2.2.1 Glykolyse (glukose ->pyruvat)

Maten vi spiser først blir overført fra fordøyelsessystemet til blodet, deretter inn til cellene. Inne i cytosol vil glukose bli omdannet til pyruvat via glykolysen. I glykolysen produseres noe ATP uten å bruke oksygen O₂. Glukose omformes til 2 pyruvat molekyler, det skjer totalt i 8 trinn (8). For hvert glukose molekyl hydrolyseres 2 ATP i tidlige trinn, mens 4 ATP molekyler produseres i senere trinn. Det vil si at netto utbytte av glykolyse er 2 ATP og 2 NADH molekyler for hvert glukose molekyl. Den pyruvaten som er dannet fra glykolysen blir transportert til mitokondriene, der det går gjennom en rekke reaksjoner.

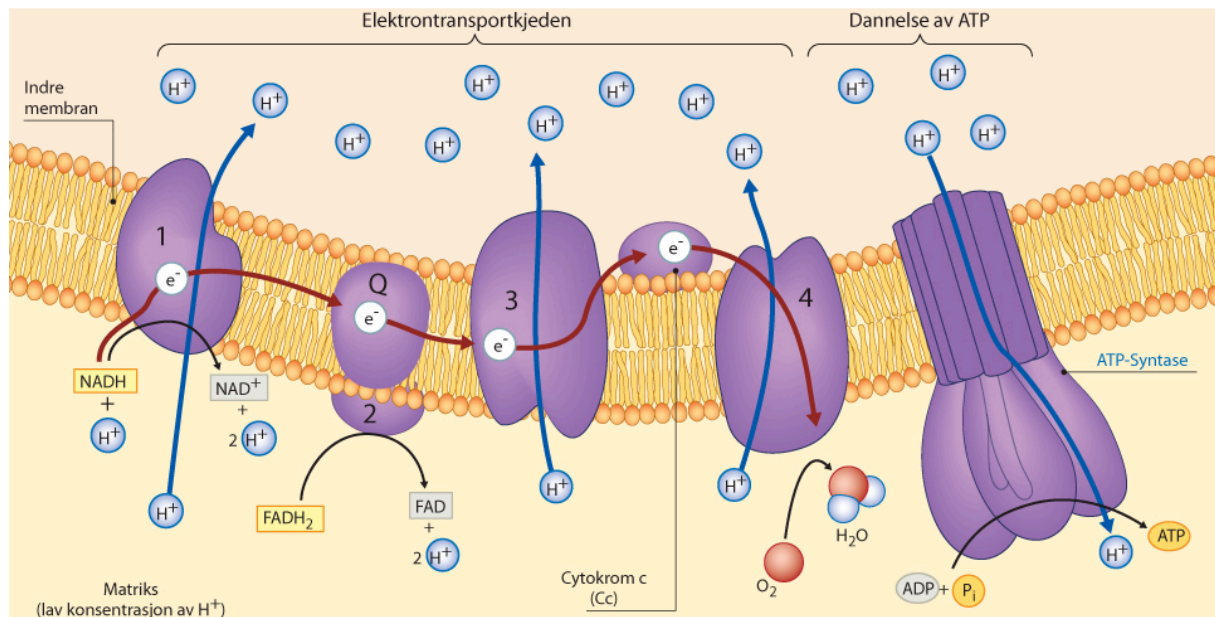
2.2.2 Mitokondriell respirasjon og oksidativ fosforylering

Pyruvat som er dannet fra glykolyse prosessen, transporteres til mitokondriene. Der skjer dekarboksylering av pyruvat ved hjelp av et enzym kalt pyruvat dehydrogenase kompleks (8). Deretter dannes det CO₂, NADH og acetyl-CoA. Fettsyrer, som oksideres gjennom en rekke mitokondrielle reaksjoner, omdannes også til acetyl-CoA. Acetyl-CoA går inn i sitronsyresyklusen ved at gruppen overføres til oxaloacetat. Deretter dannes det seks-karbon trikarboksyl syre kalt sitronsyre. I slutten av prosessen regenereres det oxaloacetat som går igjen i reaksjonene, derfor blir prosessen kalt for sitronsyre syklus. Tre type energibærer molekyler blir produsert, NADH, FADH₂ og GTP.

Elektronbærerene NADH og FADH₂ overfører e⁻ til elektrontransportkjeden som er innbygd i den indre membran av mitokondriet.

Elektrontransportkjeden består av 4 proteinkomplekser, kompleks 1-4 (Figur 2.3). Elektronene avgis fra NADH til kompleks 1, og FADH₂ til kompleks 2, før de går videre via kompleks 3 og cytokrom c, til kompleks 4 hvor de reduserer O₂ til H₂O. Når elektronene (e⁻) passerer den lange kjeden med spesielle elektron akseptor og elektron donor molekyler, faller de til lavere energi tilstand. Den energien som blir frigjort fra e⁻ i prosessen brukes til å pumpe H⁺ ioner (i kompleks I, II, og IV) fra matriks, gjennom den

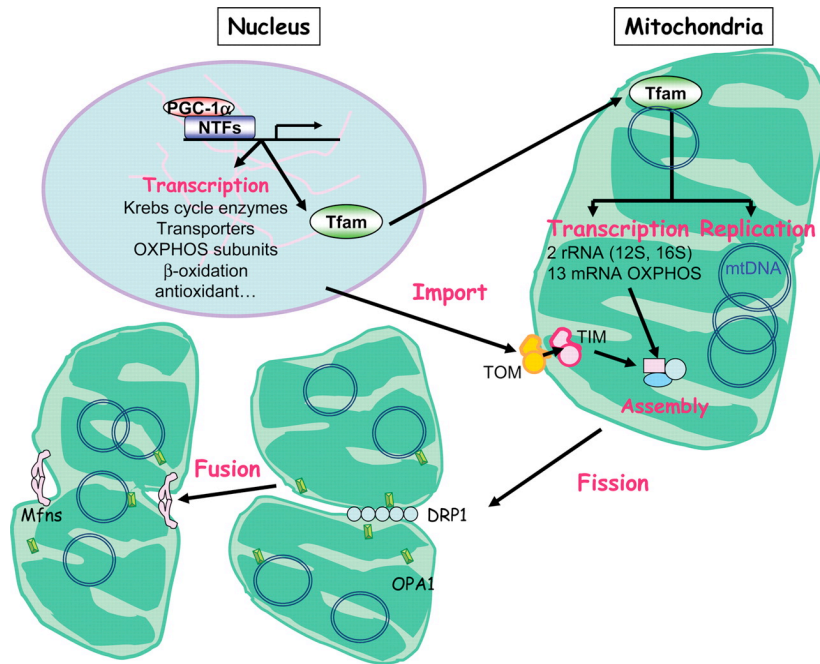
indre mitokondrie membranen, til intermembran rom. Dermed produseres en elektronkjemisk protongradient over innermembranen. Protonene strømmes gjennom ATP syntase inn i matriks på grunn av elektronkjemisk protongradient over membranen. Dette fører til at ADP blir omdannet til ATP og O_2 reduseres til H_2O . Denne prosessen er kalt for **oksidativ fosforylering**. Netto gevinst ved oksidering av et glukose molekyl til vann og CO_2 er ca 30 ATP molekyler.



Figur 2.3: Viser elektrontransportkjede og ATP syntase i den indre mitokondrie membranen Elektron transportkjeden består av 4 komplekser, hvor kompleks 1, 3 og 4 bidrar til protonoverføring. Elektronene fra NADH og FADH₂ går henholdsvis via kompleks 1 og 2 til ubiquinon (Q), og videre til kompleks 3 og 4. Ved kompleks 4 reduseres O_2 til H_2O . ATP syntase som også er i den indre membranen, danner ATP når protonene på grunn av den elektrokjemiske protongradienten strømmes tilbake til matriks (53).

2.3 Regulering av mitokondriell biogenese

Mitokondriell biogenese er en prosess som fører til dannelsen av flere mitokondrier i cellen (Figur 2.4). Denne prosessen påvirkes av en rekke indre og ytre stimuli, og både transkripsjons faktorer og ko-aktivatorer deltar i reguleringen (2).



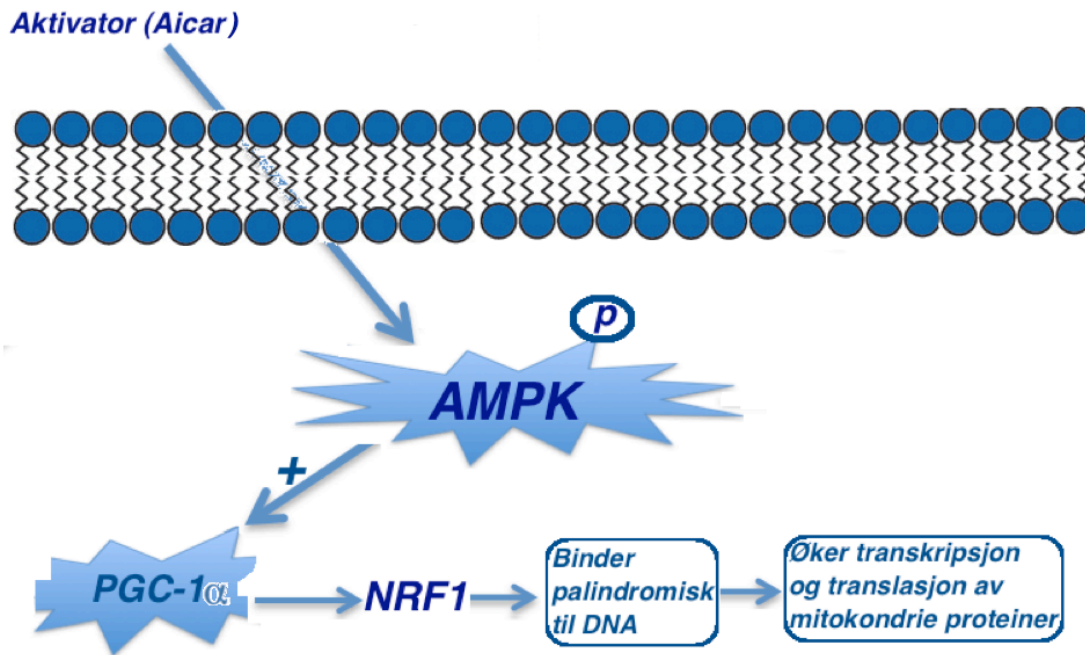
Figur 2.4: Viser en skjematisert framstilling av mitokondriell biogenese.

Peroxisom proliferator aktivert reseptor gamma co-aktivator 1α (PGC-1α) koaktiverer transkripsjonsfaktorer i kjernen (NTFs) som fører til transkripsjon av en rekke kjerne kodede gener der genproduktene er essensielle for mitokondriell funksjon og biogenese, blant annet den mitokondrielle transkripsjonsfaktor (Tfam). Tfam aktiverer transkripsjon og replikasjon av mitokondrie genomet (54).

2.3.1 Signalveier som er involvert i mitokondriell biogenese

Det er mange faktorer som deltar i mitokondriell biogenese som er vist på figur 2.4. I dette prosjektet vil vi fokusere på mekanismer som omhandler proteinene nuclear respiratory factor 1 (NRF1), AMP-aktivert protein kinase (AMPK) og acetyl-CoA carboxylase (ACC). Disse proteinene interagerer med Peroxisom proliferator activated reseptor gamma co-aktivator 1α (PGC-1α) som er en nøkkelfaktor i mitokondriell biogenese.

AMPK-fosforylering påvirker en rekke signaltransduksjonsveier. En av de er aktivering av koaktivator PGC-1α som fører til NRF1 aktivering og dermed transkripsjon og translasjon av mitokondrie respiratoriske proteiner (figur 2.5).



Figur 2.5: Viser AMPK aktivering

Når AMPK aktiveres fører dette til økt transkripsjon og translasjon av mitokondrieproteiner. AMPK-aktivering påvirker mange faktorer i cellene og AMPK, PGC1α og NRF1 er de viktigste for oss.

2.3.1.1 PGC-1α

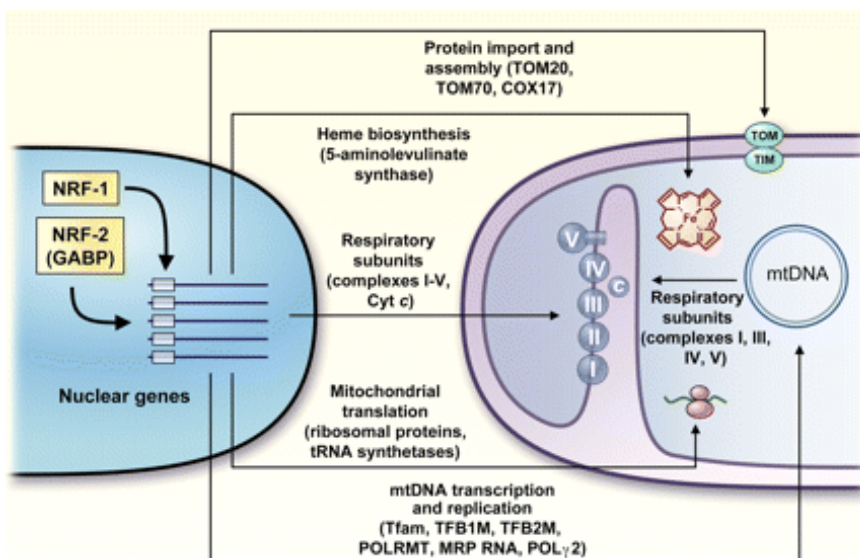
PGC-1α, er en viktig transkripsjonell regulator av mitokondrie genuttrykk (3). Den ble identifisert i en differensiert brunt fett cellelinje gjennom interaksjon med PPARγ (2).

En rekke ekstracellulære signaler (2-4), inkludert temperatur, energi mangel, tilgjengeligheten av næringsstoffer og vekstfaktorer fører til PGC-1α aktivering. Når koaktivatoren aktiveres bindes den til NRF1 og kan trans-aktivere NRF1 målgener som er involvert i mitokondriell respirasjon, eksempler på slike målgener er Tfam og cytokrom c oksidase. PGC-1α samhandler med Estrogen related receptor alpha (ERR-α) og peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) i å aktivere fettsyre oksidasjons veien, samt cytochrome c oksidase (COX4) og cytokrom c protein nivåene. Slike endringer fører til en synlig økning i mitokondrietall (2).

2.3.1.2 NRF1

NRF1 fungerer som en positiv regulator på transkripsjonen av mitokondrie proteiner. Den binder en GC-rik palindrom som homodimer til målgenets promoterregion(3).

NRF1 har et sentralt DNA bindende domene (2), ved siden av er det kjerne lokaliserings signal (NLS) og to plasser med transkripsjons aktiverings domener. Serin fosforylering i det N-terminale domenet av NRF1, forbedrer både DNA binding og trans-aktiverings funksjonen. Fosforylering av NRF1 gir bedre binding til DNA. Spesifikk NRF1 bindingssete er tilstede i promotorer av flere kjerne gener som er nødvendig for mitokondriell respirasjons funksjon. Derfor medfører aktivering av NRF1 økt mitokondriell biogenese og respirasjon (figur 2.6).



Figur 2.6: Skjematisk oversikt over viktigste funksjonene til NRF1.

NRF1 bidrar direkte og indirekte til uttrykk av mange gener som kreves for vedlikehold og funksjon av mitokondrie respirasjons apparatet. NRF1 er også involvert i uttrykket av viktige komponenter av proteinimport (2).

2.3.1.3 AMPK

AMPK er en serin/ treonin kinase og fungerer som energisensor inne i cellene. Det eksisterer som en heterotrimer kompleks sammensatt av en katalytisk α subenhet og to regulatorisk β og γ subenheter (4, 6, 15, 41, 42). Flere isoformer har blitt identifisert for hver subenhet (α 1, α 2, β 1, β 2, γ 1, γ 2, γ 3), som kan føre til dannelse av 12 ulike

komplekser. Disse kombinasjonene gir ulike egenskaper til AMPK komplekser og viser relativ vev spesifisitet (14, 42).

α -subenheten inneholder en serin /treonin kinase domene som fosforyleres av oppstrøms kinaser. Et karbohydrat bindende modul (CBM) ligger innenfor den sentrale regionen av β -subenheten, og har blitt foreslått å fungere som et regulatorisk domene som tillater AMPK å sanse cellulær energireserver i form av glykogen. Hver γ subenhet inneholder fire tandem gjentakelser av cystathionine β -syntase (CBS) motiver. Disse CBS motivene, 2 og 2 pakkes sammen for å generere to Bateman domener (41, 42). Disse fungerer til å gi bindingssteder for de regulatoriske nukleotidene AMP og ATP. Binding av AMP til γ subenheten fører til konformasjonsendring av komplekset, slik at oppstrømskinaser kan fosforylere α -subenehten på Thr172 (4, 10, 14, 50).

AMPK aktiveres som respons på en økning i den cellulære AMP: ATP ratio. Dette resulterer i hemming av ATP-krevende prosesser som glukoneogenese og fettsyre syntese, og stimulering av ATP-genererings prosesser, som fettsyre oksidasjon og glykolyse (3).

Hypoksi, iskemi, varmesjokk, stress, trening er potente aktivatorer av AMPK (6, 50).

AMPK fosforyleres og aktiveres med 2 AMPK kinase veier, LKB1 og calcium calmodulin kinase kinase β (CAMKK β) (2, 4).

AMPK aktivering medfører fosforylering av en rekke nedstrøms proteiner og modulerer transkripsjon av gener involvert i regulering av energistoffskiftet ved å slå på katabolske veier som produserer ATP og slår av anabole veier som forbruker ATP (2).

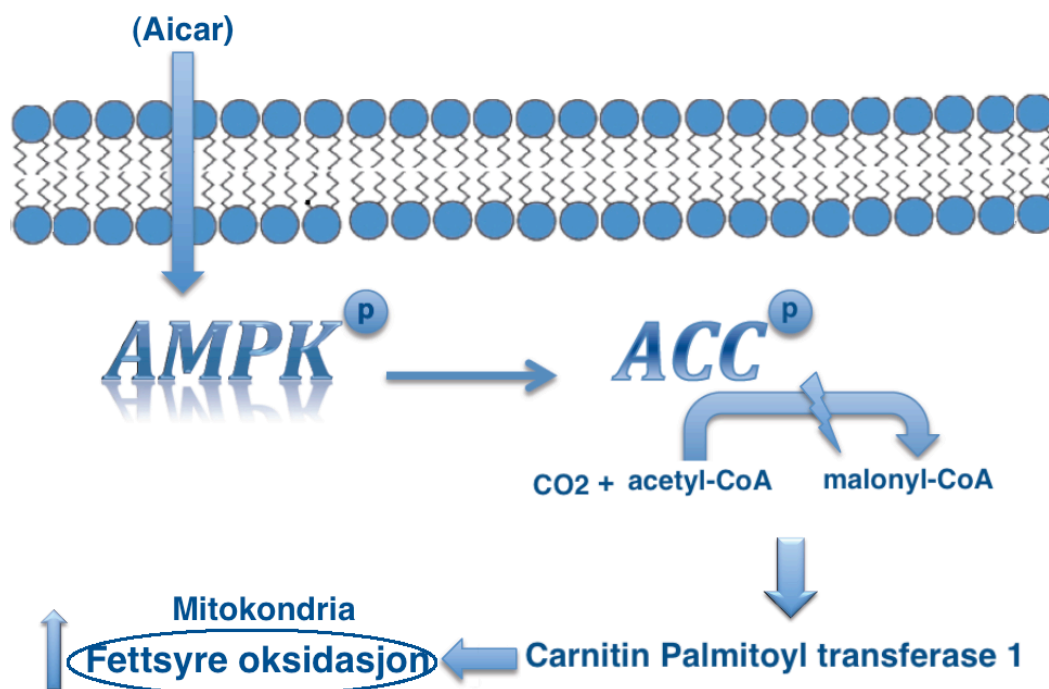
2.3.1.4 ACC

ACC er et viktig enzym som katalyserer den hastighetsbegrensende reaksjonen i biosyntesen av fettsyrer. Det finnes i to isoformer som finnes i ulike vev i kroppen (51).

ACC katalyserer syntesen av malonyl-CoA fra acetyl-CoA og CO₂ (13, 34, 40, 51).

ACC er raskt regulert av reversibel fosforylering av AMPK. Fosforylering inaktiverer ACC, mens defosforylering fører til aktivering av enzymet. Aktivering av ACC fører til en økning av malonyl-CoA. Dette hemmer carnitin palmitoyl transferase-1, enzymet som er

ansvarlig for transporten av fettsyrer i mitokondriene, som igjen fører til en hemming av mitokondriell fettsyre oksidering vist på figur 2.7.



Figur 2.7: Viser AMPK aktivering og fosforylering av dens nedstrøms kinase ACC
 Ved ACC fosforylering hemmes dannelse av malonyl CoA, som fører til mitokondrie membran protein (carnitin palmitoyl transferase) ikke hemmes. Når den ikke hemmes øker transport av fettsyre over membran til mitokondrie, hvor oksidasjon av fettsyre finner sted.

2.3.2 Faktorer som påvirker stimulering eller inhibering av AMPK og ACC

Mange faktorer påvirker AMPK signalveiene, men i denne studien har vi fokusert på effekter av de farmakologiske stoffene 5-aminoimidazol-4-carboxamid ribonucleotide (AICAR), metformin og Compound C (6 - [4 - (2-piperidin-1-yl-Etoxy)-fenyl] 3-pyridin-4-yl-pyrazolo [1,5-a] pyrimidin) (CC) (11).

2.3.2.1 AICAR

AICAR fungerer som AMPK aktivator (1, 4, 10, 14).

AICAR er tatt opp av cellene med adenosin transportere, og deretter blir omdannet av adenosin kinase til monofosforylerte derivater som ZMP. ZMP etterligner AMP i sin

form. Derfor vil den binde seg til γ subenheten på AMPK og medføre allosterisk aktiveringen av AMPK. Dens effekter inkluderer forbedringer i glukosetoleranse, og reduserte nivåer av triglyserider og frie fettsyrer i blodet (4).

2.3.2.2 Metformin

Metformin er et biguanid derivat, som brukes til å behandle type 2 diabetes (4). Det virker ved å redusere blodsukkernivået ved hjelp av hemming av hepatisk glukoneogenese. Metformin øker AMPK aktivitet, noe som resulterer i økt fettsyre oksidasjon, nedsetter glukose produksjon og stimulerer glukoseopptak.

Den eksakte mekanismen for handling av metformin er ukjent, men det finnes ulike teorier om hva mekanismen bak effektene er.

Noe publiserte studier mener at metformin krever LKB1 til å aktivere AMPK (20, 21).

Mens de fleste publiserte studier rapporterer at metformin hemmer kompleks I i mitokondrie respirasjonsskjede, noe som medfører til indirekte aktivering av AMPK ved å øke intracellulær AMP: ATP nivå (4, 16, 17, 22, 23, 24, 33, 35, 36).

Den nyeste studie rapporterer at metformin aktiverer AMPK ved å hemme AMP deaminase (AMPD). Dette fører til økt AMP nivå, som medfører økt AMP/ATP ratio (18).

2.3.2.3 Compound C (CC)

CC er et celle-gjennomtrengelig pyrazolopyrimidin derivat kjent for å fungere som en potent reversibel hemmer av AMPK ved å redusere fosforylering av Thr 172 på AMPK. CC brukes ofte eksperimentelt til å bestemme hvilken rolle AMPK har i ulike fysiologiske prosesser.

Noe publiserte studier rapporterer at CC også hemmer mitokondriell respirasjon, men ikke på en slik måte som fører til energi uttømming (9).

3. Materialer

3.1 Kjemikalier

<i>Kjemikalier</i>	<i>Kjemisk formel,</i>	<i>Mw g/mol</i>	<i>Levarandør</i>
AICAR	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₅	258,2	Toronto Research Chemicals
Bovint serum albumin (BSA)	-	-	Sigma- Aldrich
Compound C	C ₂₄ H ₂₅ N ₅ O	399,5	Merck
Dimetylsulfoxid DMSO	C ₂ H ₆ OS	78,1	Sigma
Dulbecco modified eagle's Medium (+4500mg glukose/L, uten L- glutamin	DMED		Sigma
Etanol, 96%	C ₂ H ₅ OH	46,1	Sigma
Fetalt Bovin Serum- heat inaktivert	FBS-HI	-	The Cell Culture company
Formaldehyd, 37% løsning	CH ₂ O	30,0	Sigma
Frysetørket melk	-	-	Marvel
Glutemat	C ₅ H ₈ NO ₄ Na	169,1	Sigma
Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂	75,1	Merck
Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,1	Fluka
Kaliumklorid	KCl	74,5	Merck
L-glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146,1	Sigma
Magic Marker	-	-	Invitrogen
Magnesiumklorid	MgCl ₂	46,0	Scharlau
Metanol	CH ₃ OH	32,0	Merck
Metformin	C ₄ H ₁₁ N ₅	129,2	Sigma
Monokaliumfosfat	KH ₂ PO ₄	136,1	Merck
Nonidet P40	NP40, (C ₆ H ₄ O) _n C ₁₄ H ₂₂ O	-	Sigma
Natrium deoksyholat	NaDOC, C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na	414,6	Calbiochem
Natrium dodecylsulfat	SDS, C ₁₂ H ₂₅ O ₄ SNa	2884,4	Merck
Natriumfosfat	Na ₂ HPO ₄	70,0	Merck
Natriumklorid	NaCl	58,4	Merck
Natrium ortovandat	Na ₃ VO ₄	183,9	Sigma
Pencillin/streptomycin	PenStrep C ₁₆ H ₁₇ N ₂ NaOS:C ₄₂ H ₈₄ N ₁₄ O ₂₆ S ₃	-	The Cell Culture Company
Precision plus	-	-	Invitrogen
Complete mini protease inhibitor cocktail	-	-	Roche
Trizma® base	TRIS, C ₄ H ₁₁ NO ₃	121,1	Sigma
Trypsin-EDTA	-	23.4 KDa	Sigma

TWEEN 20	-	-	Sigma
----------	---	---	-------

3.2 Cellelinje

<i>cellelinje</i>	<i>Celle type</i>	<i>Opphav</i>	<i>Leverandør</i>
HeLa celle	tumor i livmor halsen	En afroamerikansk kvinne som døde i 1951.	Gave fra Professor Stein Ove Døskeland. originalt fra ATCC.

3.3 Buffere og løsninger

3.3.1 Løsninger til Komplet medium

<i>Ingredienser</i>	<i>Mengde</i>
DMEM (4,5g/L glucose, uten L-glutamin)	500 ml
Føtalt bovin serum ¹⁾	50ml
L-glutamin	5ml
Pencillin/streptomycin	5ml

1) Varmeinaktivert i 30 minutter ved 56 °C

3.3.2 PBS løsning

<i>Løsning</i>	<i>Ingredienser</i>	<i>Mengde (g)</i>
1xPBS	Natriumklorid	8
	Kaliumklorid	0,2
	Monokaliumfosfat	0,24
	Natriumfosfat	1,44
	HCl	Juster PH til 7,4
	H ₂ O	Til 1 liter

3.3.3 Buffere og løsninger for gelelektroforese og western blotting

3.3.3.1 Løsninger for lysering av celler

<i>Løsning</i>	<i>Ingredienser</i>	<i>Final konsentrasjon</i>
NP40 RIPA buffer	Nonidet P40 (NP40)	1% (v/v)
	Glycerol	10% (w/v)
	Tris PH 7,4	50mM
	NaCl	200mM
	MgCl ₂	2,5mM
	Complete mini protease inhibitor cocktail	1X

3.3.3.2 Løsninger for gelelektroforese

<i>Stoffer</i>	<i>Reagens</i>	<i>Volum</i>
Running buffer	20xNuPAGE @MOPS SDS Running buffer	50mL
	MilliQ water	950mL
Standard	Magic Mark ^{MT} XP Western protein standard	5µL
	Precision Plus Protein dual color standard	5µL

3.3.3.3 Løsninger for blotting av membran

10x Blottebuffer

<i>Stoffer</i>	<i>Mengde tilsatt</i>
Trizma base	30,3g
Glycine	144,0 g
H ₂ O	Til 1L

Overføringsbuffer

<i>Stoffer</i>	<i>Mengde</i>
100% methanol	300ml
10x Blottebuffer	200ml
MilliQ water	1500ml
Total volum	2L

Løsninger	Ingredienser
TBS 20X	96,8g Trizma base, PH 7,6 320,0g NaCl Til 2L milliQ vann
TBS-Tween vaskebuffer	1X TBS løsning (fortynnet i milliQ vann) 0,1% Tween
TBS-Tween blokkeringsbuffer	1X TBS løsning (fortynnet i milliQ vann) 0,1% Tween 1% BSA

3.3.3.4 Løsninger for flowcytometri

Løsning	Ingrediens
Fikseringsløsning Inkubasjonsbuffer (IB) ¹⁾	3.7% formaldehyd i 1XPBS 0,5g bovint serum albumin 100ml 1X PBS

1) Oppbevares ved 4 °C

3.4 Antistoffer

Antistoff	Vert	Fortynning	Leverandør
Primære antistoff			
p-AMPK alfa (#2535)	kanin	WB: 1:1000 i 3% BSA i TBS-T Flow: 1:50 i inkubasjonsbuffer	Cell signaling
p-ACC (#3661)	Kanin	WB: 1:1000 i 3% BSA i TBS-T Flow: 1:100 i inkubasjonsbuffer	Cell signaling
Anti-beta aktin (ab8227-50)	Kanin	WB: 1:5000 i 3% BSA i TBS-T	abCam
Sekundære antistoff			
IgG(H+L)- HRP konjugat (#170-6515)	kanin	WB: 1:10 000 i 5% melk i TBS-T	BioRad
Alexa 647 Goat anti rabbit (A-21244)	kanin	1:1000 i inkubasjonsbuffer	BD Bioscience

3.5 Dataprogrammer

<i>Program</i>	<i>Bruksområde</i>	<i>Leverandør</i>
FlowJo	Flowcytometri	Flow Jo
Expert 96 UV Microplate Reader	konsentrasjonsbestemmelse	Biochrom
Image Reader las-3000	Bilde prosessering	Fujifilm

3.6 Kommersielle analyser

<i>Kit</i>	<i>Leverandør</i>
Pierce® BCA protein Assay Kit	Pierce Biotechnology

3.7 Cellekultur utstyr

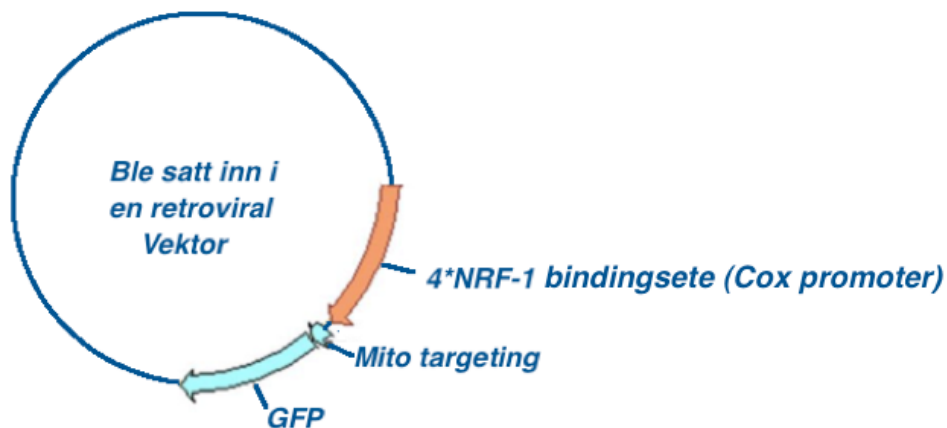
<i>Apparat</i>	<i>Leverandør</i>
Tissue culture flask 175 cm ²	Sarsted
Tissue culture plate 96 well (mikroplate)	Sarsted
Pipetter	Sarsted
Eppendorf Rør	Sartstedt
Incubator	Termaks
Hera cell Inkubator 150	Heraeus
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Vannbad HAAKE DC 10	Thermo
Biologikal safety Kabinet class2 (Laminal Air flow)	Nuaire
Mikroskop TS100	Nikon
Vacunsafe confort	IBS integra Bioscinces

4. Metoder

4.1 Cellemodell

Cellemodellen brukt i denne studien er HeLa celle. HeLa celle er den mest brukte kreftcellelinjen i biomedisinsk forskning. Den ble tatt fra en tumor i livmor halsen fra en afroamerikansk kvinne som døde i 1951.

Basert på denne cellelinjen har forskninggruppen min (LH Nilsson, KJ Tronstad m.fl.) utviklet en modell for studier av mitokondriell biogenese og regulering av transkripsjonsfaktoren (NRF1). Disse cellene inneholder en reporter DNA sekvens (stabilit innsatt vha retroviral vektor) med 4 bindingssteder for NRF1 i promoterregionen foran et gen for mitokondrielt Green Fluorescent Protein (mitoGFP). Aktivering av NRF1 i cellene fører dermed til økning i proteinuttrykket av mitoGFP, som på grunn av sin mito-sekvens vil transporteres til mitokondriene slik at disse kan detekteres vha metoder som flowcytometri eller mikroskopi. Denne cellemodellen kalles HeLaNRF1mitoGFP og hensikten er å bruke reportersystemet til å studere mitokondriell biogenese ved aktivering av NRF1.



Figur 4.1: Viser vektor sammensetning

Vektoren inneholder en Cox promoter med 4 bindingssteder for NRF1, etterfulgt av et mitokondriell lokalisering signal og GFP.

4.2 Håndtering av mammalske celler

Alt utstyr som ble brukt ved dyrking av celle ble desinfisert med 70% etanol. Alle løsningene ble varmet til 37°C i vannbad før bruk. Håndtering av cellene skjedde alltid under sterile forhold i et LAF (laminar air flow) kabinet. Deretter ble cellene oppbevart

under standardiserte forhold i inkubator. Inkubatoren holder 37°C og 5% CO₂. Veksten og viabiliteten til cellene ble kontrollert ved bruk av mikroskop.

4.2.1 Dyrking og splitting av adherent cellelinje

Adherente cellene ble dyrket i celle kultur flasker med DMEM medium med 10% FBS, 1% (v/v) penicillin-streptomycin og 1% L-glutamin.

Når cellene hadde oppnådd ca 80% konfluens ble de splittet . Medium ble fjernet og cellene ble vasket en gang med steril 1xPBS og løsnet fra flaskebunnen ved tilsetning av Trypsin-EDTA (0,25% trypsin i 1mM EDTA i 1xPBS) i 2min ved 37°C i inkubatoren. Av og til under trypsinering gav vi flasken et lett slag på undersiden slik at cellene løsnet. Trypsineringen ble stoppet ved å tilsette forvarmet DMEM komplett medium. Cellene ble deretter resuspendert i komplett medium til videre dyrking til større forsøk. Cellene ble vanligvis splittet 1:10 i medium hver 3. dag.

4.2.2 Kaldt trypsinering av celle

Under forsøk hvor man skulle se på fosforylering i cellene, ble cellene høstet ved kaldtrypsinering. Alt arbeidet her forgår under kaldt miljø, for å hindre at defosforyleringen skjer under trypsinering og prøvepreparering. Cellene ble vasket med iskald 1xPBS, deretter tilsatt 2,5% kaldt trypsin EDTA, og lot dem, stå i ca 25min på is. Når cellene hadde løsnet ble kaldt DMEM komplett medium tilsatt for å stoppe trypsineringsreaksjonen. Cellesuspensjonen ble overført til 15ml falkonrør, pipetterte 100µl av prøven over til eppendorfrør til videre telling før cellene ble spunnet ned på 900rpm i 4 minutter ved 4°C.

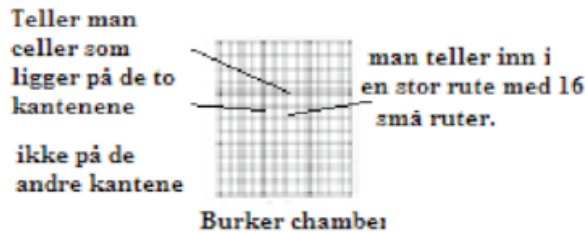
4.2.3 Bestemmelse av celletall

Celletall ble bestemt ved bruk av Bürker tellekammer. Cellesuspensjon ble pipettert over til kammeret og antall celle per ml ble bestemt. Kammeret inneholder et rutenett (Figur 4.2), og ved å telle antall celler i 16 små ruter (=1 stor rute) kan deretter celletallet bestemmes. Celler i 3 store ruter ble talt , og deretter regnet man

gjennomsnitt av det.

100 celler i en stor rute = $1 \cdot 10^6$ celler per 1 ml

Antall celler i de 16 rutene $\times 1 \cdot 10^4 \times$ volum i flasken(ml) = antall celler i flasken



Figur 4.2: Bürker Tellekammer

Tellekammer består av 9 store ruter, hver stor rute består av 16 små ruter. Ved celleteling telte vi 3 store ruter, og tok gjennomsnitt av det, og brukte beregningsmåten som vist i teksten.

4.2.4 Lysering av trypsinerte cellekulturer

Cellene etter kaldt trypsinering ble overført til 15ml falkon rør, og sentrifugert ved 800 rpm i 4min ved 4°C, vasket 2 ganger med kaldt PBS før rørene ble satt på is.

Cellepelleten ble lysert i 250µl kaldt RIPA lysesbuffer og inkubert i 5-10 min på is.

Overførte alle prøvene til eppendorf rør og spant ned i 10 min ved 16 100 rpm i kjølerommet. Tok supernatanten over til nye eppendorf rør og oppbevarte prøvene ved -20 til videre analyser ble utført.

Ved direkte cellelysis, etter at flaskene var behandlet med AICAR/ metformin, ble de vasket med kaldt 1XPBS, deretter ble 250µl av lysisbuffer tilsatt direkte i flaskene. Cell scraper ble brukt til å skrape godt på bunnen av flasken. Lysatet ble pipettert over til små eppendorfrør, og lot dem deretter stå på is i 5-10 minutter. Prøvene ble så sentrifugert på kjølerommet ved 16 100 rpm. Tok supernatanten over til et nytt eppendorfrør. Tilslutt ble konsentrasjonen til prøvene bestemt.

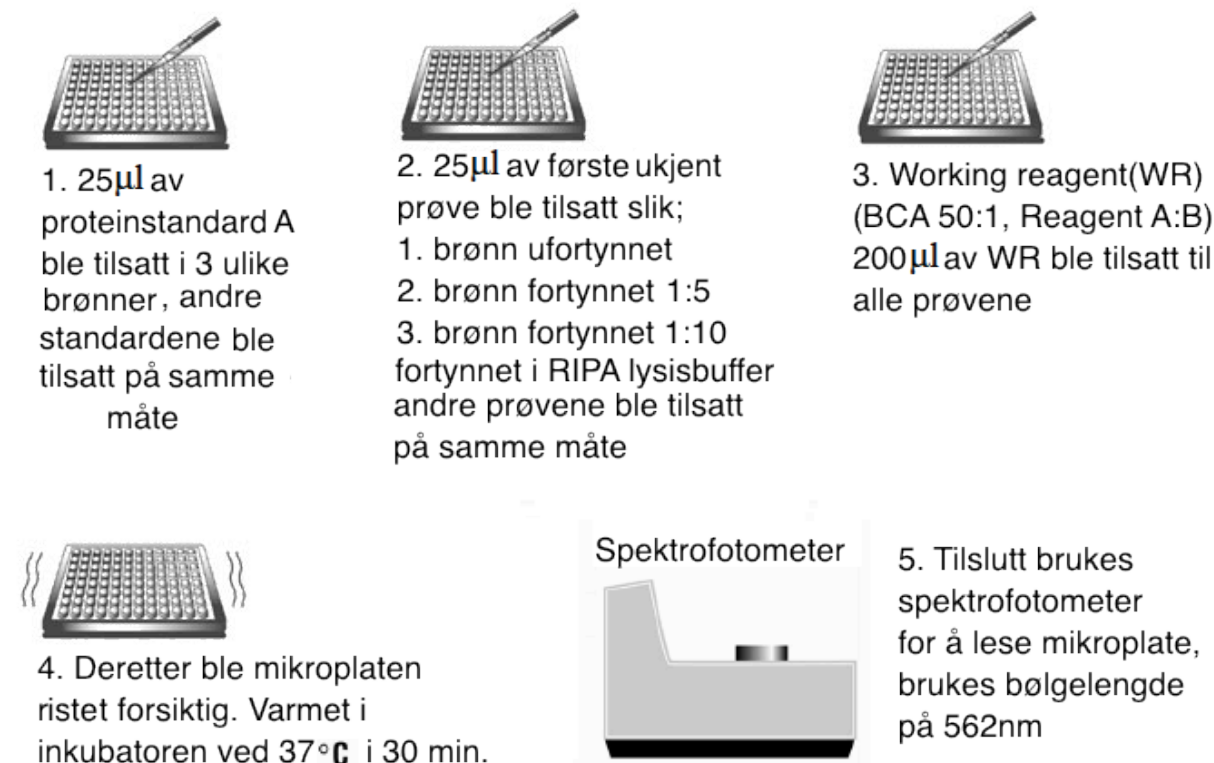
4.3 Proteinuttrykk

Nøyaktig måling av protein konsentrasjon ble bestemt ved å bruke Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay kit, som inneholder en albumin serum protein standard.

Bruksanvisningen ble hentet fra www.piercenet.com/files/1296as8.pdf.

BSA konsentrasjonene var 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 og 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Cellelysaten ble fortynnet i 1:5 og 1:10, og ble satt i mikroplaten som vist i figuren under.



Figur 4.3: Viser nøyaktig hvordan konsentrasjonen av prøvene ble bestemt.

Først proteinstandard ble tilsatt i ulike brønner med lavest konsentrasjon (0 $\mu\text{g/ml}$) til høyest konsentrasjon (2000 $\mu\text{g/ml}$). Deretter ble de både ufortynnet og fortynnet prøvene ble tilsatt i hver av brønnene etter standardene. 200 μl Working reagent (50:1, A:B) fra thermo scientific ble tilsatt i alle brønnene. Mikroplaten ble ristet forsiktig, pakket i aluminiumfolie og, varmet i inkubator i 30min. Tilsatt ble konsentrasjonen bestemt med mikroplate reader fra Biochrom.

Absorbansen ble bestemt ved 562nm med å bruke Asys Expert 96 UV Microplate Reader fra Biochrom. Proteinkonsentrasjonene ble regnet ut vha standardkurven som vist i appendiks 1-3.

4.3.1 Sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

Etter proteinkonsentrasjonsbestemmelse ble 20-35 μg protein blandet med 4x XT sample buffer og destillert vann (Appendiks 3). Deretter ble prøvene kokt ved 95°C i

10min. Magic mark og Prestained Precision plus protein standard ble blandet i 1:1 for å kunne bestemme molekylvekt på proteinene. Magic marker brukt for å kunne se båndene under chemiluminisense, mens Precision plus ble brukt for å kunne se standarden direkte på gelen.

Proteinene ble separert på bakgrunn av deres molekylvekt ved elektroforese på NuPAGE® 4-12% NOVEX® Bis-Tris Mini gel. Elektroforesen ble gjennomført i MOPS SDS running buffer i XCell SureLock™ Mini-cell system (Invitrogen) ved 200V i 1,5 time i romtemperatur.

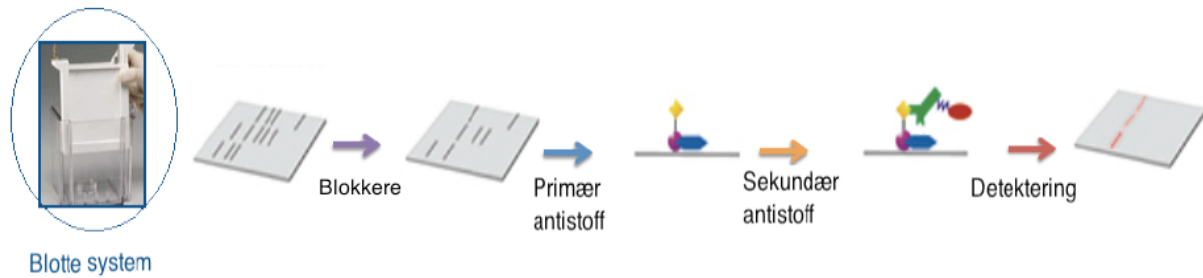
4.3.2 Western blotting

Her overføres proteinene fra gelen over til membran, hvor proteiner av interesse detekteres ved å merke med spesifikke antistoffer (Figur 4.5). Proteinoverføringen kalles for blotting.

Til blotting brukte vi XCell II™ Blot Module fra Invitrogen og gjennomførte blottingen som beskrevet i tilhørende protokoll. Vi brukte en polyvinyliden difluorid (PVDF) membran, som ble aktivert ved å tilsette 100% metanol i 30 sekunder, vasket med destillert vann og deretter lagt i blottebuffer. Western blottingen ble kjørt med en konstant spenning på 30V i 1,5 time i romtemperatur. Etter blotting ble gelen lagt i coomassie brilliant blue farging for å sjekke om det meste av proteinene ble overført til membranen. Membranen ble så inkubert i blokkeringsbuffer (TBS-tween med 3% BSA) i ca. 2 timer ved romtemperatur for å hindre uspesifikk binding av antistoff. Etter blokkering ble membranen inkubert med primær antistoff (pAMPK α , pACC, β -actin) fortynnet i blokkeringsbuffer, på rullemaskinen i kjølerommet til neste dag.

Membranen ble så vasket 4x5 min med TBS-tween. Horseradish peroksidase (HRP) konjugert sekundær antistoff (i TBS-Tween m/5% tørrmelk) ble deretter tilsatt og membranen ble inkubert i 1 time på rullemaskin i romtemperatur. Deretter ble den vasket igjen med TBS-tween i 4x5min.

Tilslutt ble membranen skylt med destillert vann for å fjerne skum. Tilsatte 750 μ l av deteksjons agent Pierce ECL Western Blotting Substrate i forhold 1:1 og fremkalte blottet på Luminescent image analyzer las-3000 fra Fujifilm.



Figur 4.5:- Viser skjematisk bilde av western blotting

Etter blotting, ble det først tilsatt primær antistoff (1:1000 i 3% BSA i TBS-Tween) og det ble inkubert over natt på kjølerommet. Deretter vaskes blottet 4 ganger 5min. Så tilsettes det sekundær antistoff (1:10 000 i 5% melk i TBS-Tween). Vaskes igjen 4 ganger 5min. Tilslutt forberedes det deteksjons agent (1:1), da er blottet klar til framkalling (figur ble modifisert fra http://www.genscript.com/western_tech.html).

4.3.3 Fiksering, permeabilisering og immunmerking av celler for flowcytometri

For fiksering, permeabilisering og immunmerking av celler for flowcytometrisk analyse fulgte vi protokoll fra Cell Signaling

(<http://www.cellsignal.com/support/protocols/Flow.html>)

Etter kaldt trypsinering, sentrifugerte vi cellene ved 800rpm i 4min ved 4 °C og resuspenderte deretter cellene i 5ml kaldt PBS. Vi sentrifugerte cellene på nytt. Resuspenderte så cellepelleten i 1ml PBS med 3,7% formaldehyd og fikserte i inkubator ved 37 °C i 10min, og lot dem deretter stå på is i 1min. Tilslutt tilsatte vi 90% metanol. Inkuberte i 30min på is for permeabilisering. Prøvene ble lagret i -20 °C til senere bruk. For å ta cellene videre til analyse ble 500 000 celler i hvert rør sentrifugert i 5 min ved 1400 rpm, 4 °C. Fjernet deretter restene av metanol løsningen og tilsatte 3 ml inkubasjonsbuffer (0,5g BSA i 100ml 1XPBS) til hvert rør og sentrifugerte i 5min ved 1400 rpm. Vi fjernet så supernatanten, tilsatte 1 ml inkubasjonsbuffer og overførte alle prøvene til nye eppendorfrør. Prøvene ble spunnet ned i 5min ved 1300 rpm og resten av supernatanten ble fjernet. Cellene ble så resuspendert i 100 µL inkubasjonsbuffer per analyse rør. Lot cellene stå i inkubasjonsbuffer i 10min ved romtemperatur før en tilsatte primær antistoff (pAMPKα fra Cell signaling fortynnet i (1:50) eller pACC fra cell signaling fortynnet i (1:100)) i prøvene og inkuberte i 60min ved romtemperatur. Deretter ble prøvene vasket 2 ganger med inkubasjonsbuffer. Sekundært antistoff Alexa Fluor ® 647 geit anti-kanin IgG (1:1000 i IB) fra Invitrogen ble tilsatt prøvene, og

inkuberte ved romtemperatur i 30min. Tilslutt ble cellene vasket 2 ganger i inkubasjonsbuffer, spunnet ned i 5min ved 1300rpm, og deretter resuspendert i 0,3ml iskald inkubasjonsbuffer.

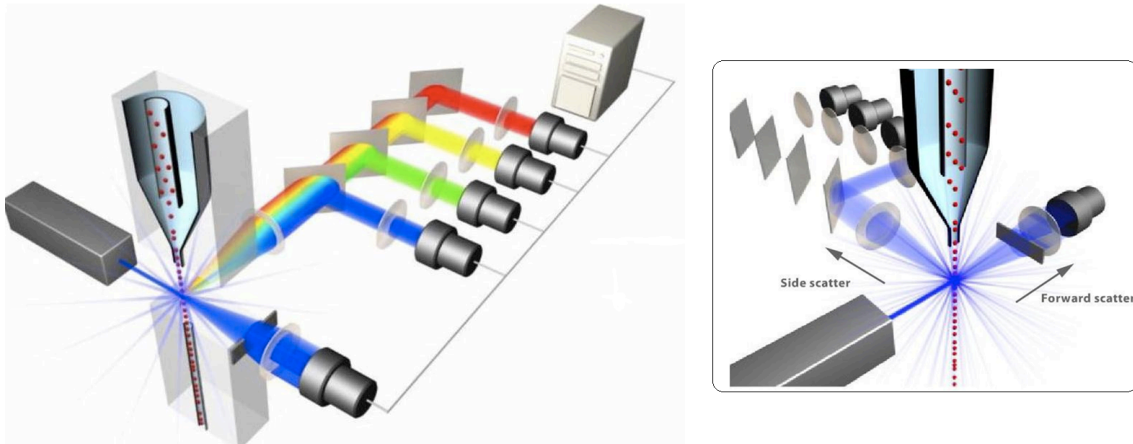
4.3.4 Flowcytometri analyser

Flowcytometri er en teknikk for å kunne studere og sortere celler av en viss størrelse (1-15 mikron i diameter) i en suspensjon. Cellene blir analysert i et optisk system som består av lasere, speil, filtre og detektorer. Tusenvis av celler sendes in per sekund gjennom en laserstråle og lyset fanges opp av detektorer. Når en celle passerer gjennom laseren, vil lys spres i alle vinkler. For nøyaktig datainnsamling, er det viktig at partikler eller celler passerer laserstrålen en om gangen. En rekke parametere er rettet mot det punktet hvor strømmen passerer gjennom lysstrålen.

To ulike parameteren er forward scatter og side scatter. Størrelsen på forward scatter er omtrent proporsjonal med størrelsen på cellen. Side scatter spredning er et mål for cellens indre granularitet og strukturelle kompleksitet inne i cellen vist på figur 4.6.

Når cellene merkes med spesifikke fluoreserende antistoff, vil fluorokromet eksiteres til et høyere enerignivå når laser lys med riktig bølgelengde treffer den. Energien sendes ut igjen som fluoreserende signal som blir detektert, og dataene samles i datafiler.

En del av populasjon ble analysert (10 000 celler), med hensyn på GFP i FL-1A kanaler og pAMPK α og pACC i FL-4A kanaler. I resultatene har vi ikke tatt med GFP uttrykk på grunn av det ikke skjer noe forandring i GFP uttrykk på så kort tid, siden vi studerer akutt effekt av AICAR og metformin. Dataene ble analysert i dataprogrammet FlowJo etterpå.



Figur 4.6: Skjematisk bilde av Flowcytometri.

Viser måling av enkeltceller som strømmer forbi en rekke detektorer. Fluorokromene vil eksiteres til et høyere energinivå, og sender ut energien som registreres og lagres i en flowcytometrisk programvare som kan studeres videre (hentet fra http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=5)

4.4 Forsøksdesign

En kultur flaske per betingelse i hvert forsøk.



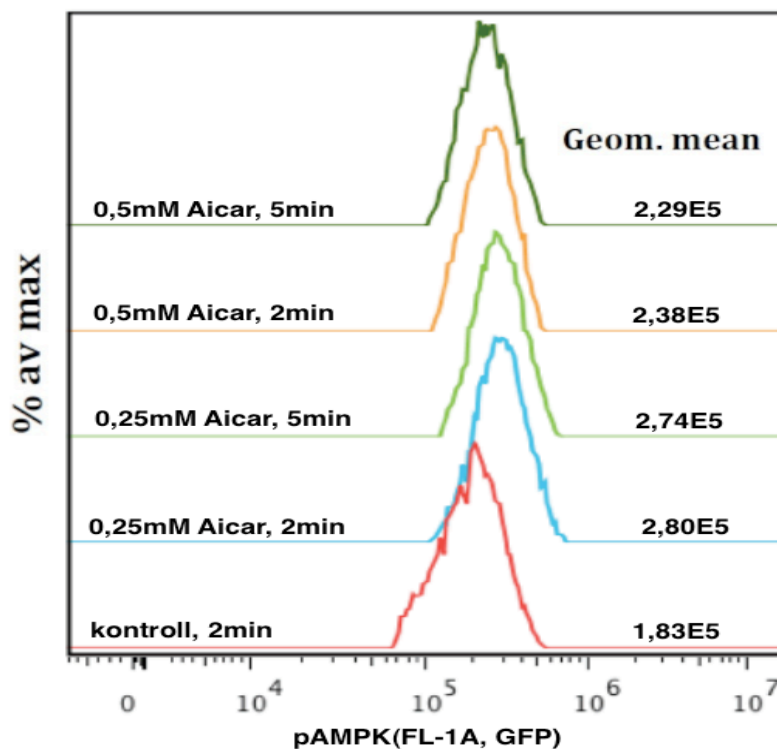
Til forsøk sådde vi ut 400 000 celler i T175 flasker i totalt 29ml DMEM komplett medium (4500mg/L) og lot cellene stå 1 dag for å feste seg og vokse. Den påfølgende dagen gjennomførte vi forsøket ved å behandle cellene med 0,5 mM AICAR eller 4mM metformin i 0 (ktr), 2, 5, 10 og 15 minutter. Noen av HelaNRF1mitoGFP cellene ble preinkubert med 10 μ M Compound C i 30 min før de behandlet med AICAR eller metformin som beskrevet over. Etter behandling gjennomførte vi kaldtrypsinering (4.2.2) av cellene som skulle analyseres ved Flowcytometri og Western blotting i tillegg til at vi gjennomførte direkte cellelysis (4.2.4) på noen av cellene som skulle analyseres vha. Western blotting.

5. Resultater

5.1 Aktivering av AMPK respons, og test av antistoffer

Vi vet fra tidligere at AICAR stimulerer GFP uttrykk i HeLaNRF1mitoGFP cellemodellen (upubliserede resultater, Linn H. Nilsson). I det første eksperimentet ønsket vi å optimalisere betingelsene for AMPK aktivering i denne cellelinjen. Videre ville vi validere at AICAR behandling øker fosforylering av AMPK som dermed aktiveres til å fosforylere ACC. Vi undersøkte fosforylering av AMPK og ACC (som fosforyleres av AMPK) ved å bruke fosfospesifikke antistoffer og deteksjon vha flowcytometri og western blotting. Samtidig ville vi undersøke spesifisiteten til antistoffene som ble brukt. HeLaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med 2 ulike AICAR konsentrasjoner (0,25 mM og 0,5 mM) og sammenlignet med ubehandlede celler (kontroll) ved 2 ulike tidspunkt (2 min og 5 min).

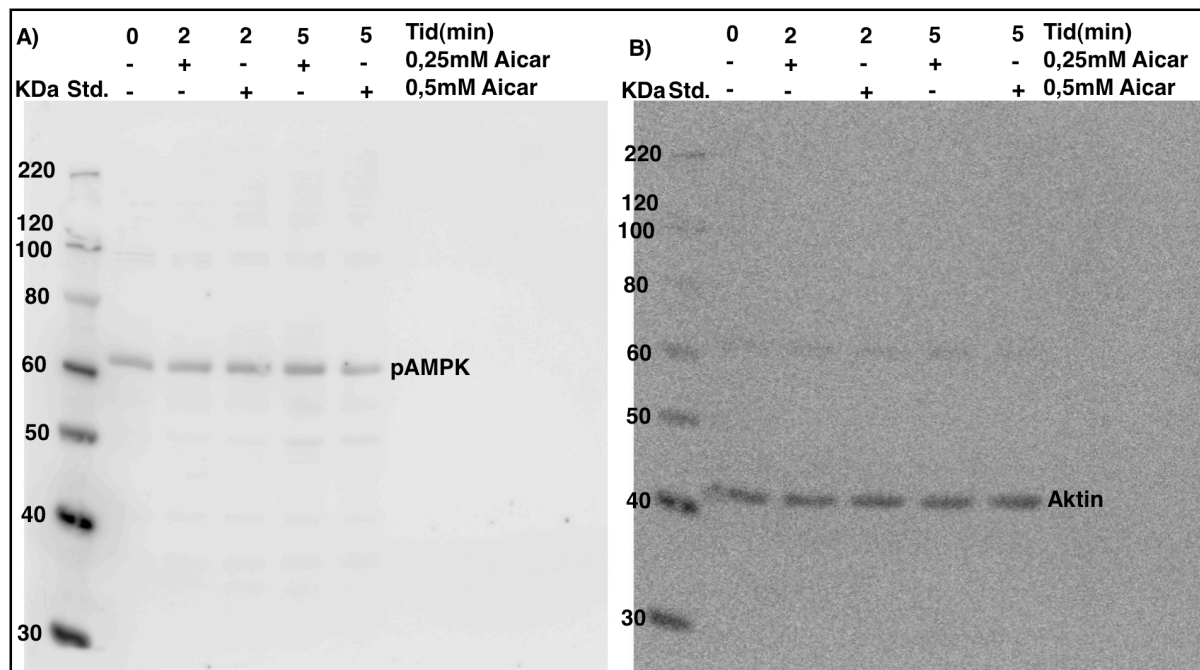
5.1.1 Optimalisering og deteksjon av AMPK fosforylering (fosfo-AMPK) (pAMPK)



Figur 5.1: AICAR aktiverer AMPK fosforylering påvist med flowcytometri. HeLaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med 0(ktr), 0,25 og 0,5mM AICAR i 2 og 5 minutter før de

ble kaldtrypsinert, fiksert og merket med primær antistoff mot pAMPK α (1:50 i inkubasjonsbuffer (IB)) og deretter merket med sekundær antistoff anti-kanin IgG (H+L) i (1:1000 i IB). 10 000 celler per prøve ble analysert på flowcytometri.

Figur 5.1 viser at stimulering med AICAR gir fosforylering av AMPK α . De to AICAR dosene og behandlingstidene gav sammenlignbare nivå av AMPK fosforylering. Den sterkeste aktiveringen ble sett ved bruk av 0,25 mM AICAR i 2 min. Høyere dose (0,5 mM) og lengre behandlingstid (5 min) gav ikke ytterligere effekt.



Figur 5.2: AICAR aktiverer AMPK fosforylering påvist med Western blotting.

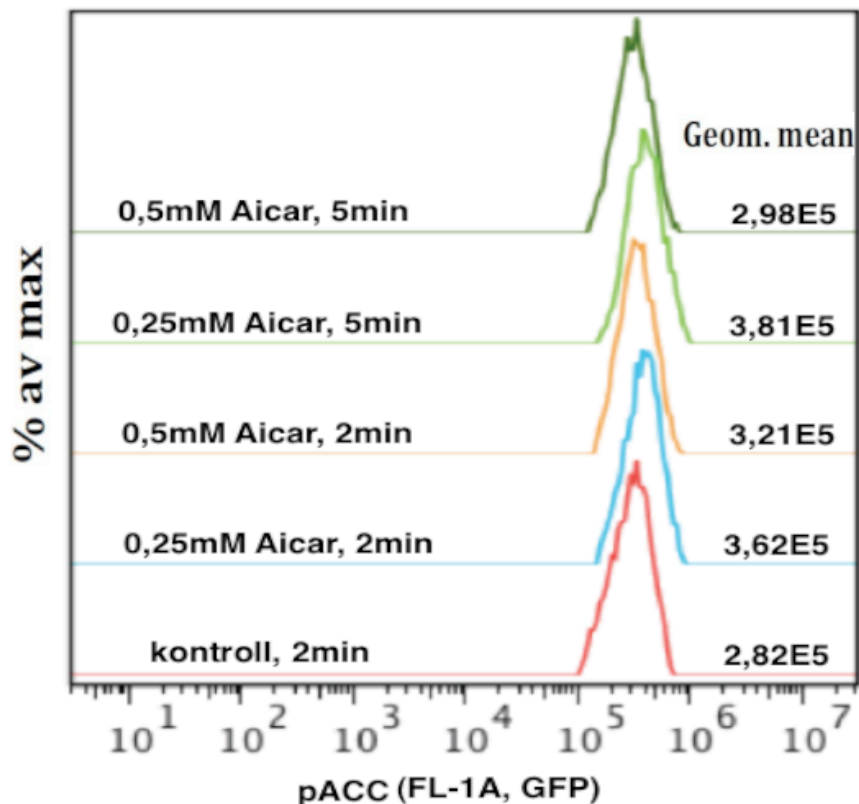
HeLaNRF1mitoGFP celler ble stimulert med 0,25 og 0,5mM AICAR i 0(ktr), 2 og 5 minutter og deretter lysert i Ripa buffer. Proteiner (25 μ g) ble separert på 4-12% SDS-PAGE. Fosforylering av AMPK ble undersøkt ved western blotting mot pAMPK α (1:1000) antistoff (A). Aktin antistoff (1:5000) ble brukt for å undersøke om man hadde like mengder protein i de ulike prøvene(B).

Funnet fra figur 5.1 ble bekreftet med western blotting som vist i figur 5.2,A).

Molekylvekten til AMPK er ca 62kDa og gelen viser at de ulike prøvene har et fremtredende bånd rundt denne molekulvekten detektert med pAMPK spesifikt antistoff. Fravær av sekundære bånd og riktig molekulvekt tyder på at dette antistoffet er spesifikt og ikke påviser andre proteiner enn pAMPK. Blottet viser noe sterkere bånd etter behandling med AICAR, og i dette eksperimentet gav 5min med 0,25mM AICAR den sterkeste fosforylering. Resultatet viser også at AMPK er noe fosforylert i ubehandlede celler.

Antistoff mot aktin ble brukt for å detektere om vi har likt mengde protein i hver brønn (Figur 5.2,B). Molekylvekt til Aktin er ca 42KDa. I figuren vises det bånd med forholdsvis lik intensitet rundt 40KDa. Det vil si at brønnene ble fylt med lik mengde protein.

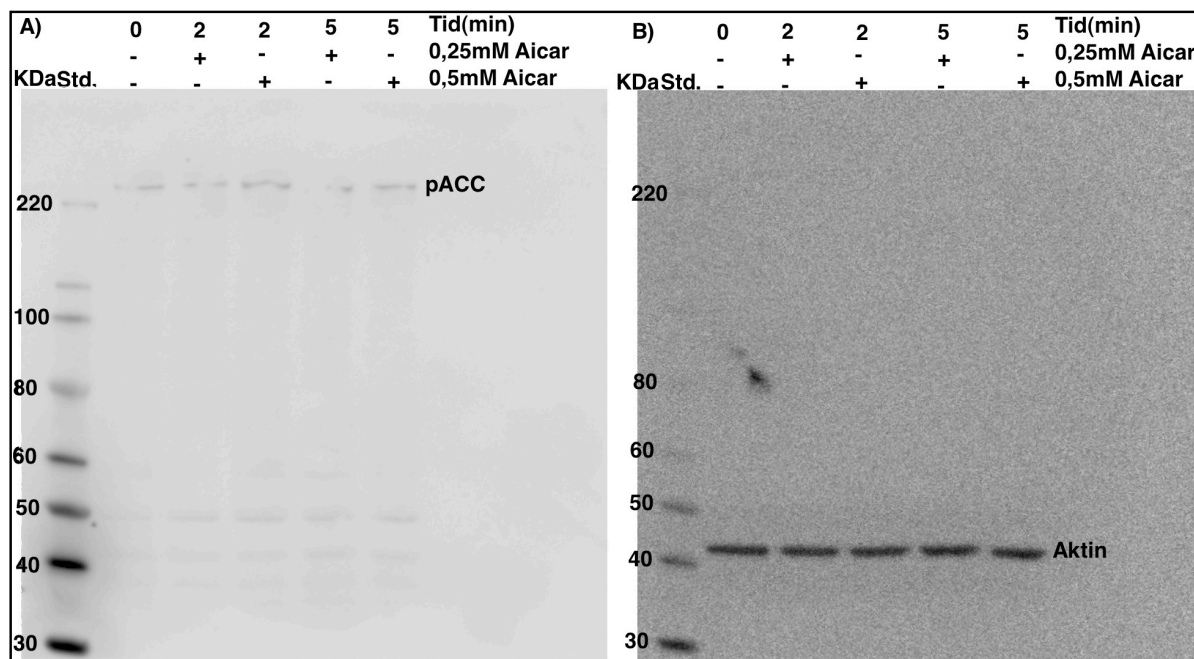
5.1.2 Optimalisering og deteksjon av ACC fosforylering (fosfo-ACC) (pACC)



Figur 5.3: AICAR fremmer fosforylering av ACC vist med flowcytometri.

HeLaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med 0 (ktr), 0,25 og 0,5mM AICAR i 2 og 5 minutter før de ble kaldtrypsinert, fiksert og merket med primær antistoff mot pACC (1:100 i IB) og deretter merket med sekundær antistoff anti-kanin IgG (H+L) i (1:1000 i IB). 10 000 celler per prøve ble analysert på flowcytometri.

Resultatet i figur 5.3 viser at fosforylering av ACC samsvarer med fosforylering av AMPK. Behandling med AICAR gav en moderat økning i pACC sammenlignet med ubehandlet kontroll. Det var ikke er stor forskjell i grad av ACC fosforylering ved bruk av 0,25mM og 0,5 mM AICAR etter 2 min og 5 min.



Figur 5.4: AICAR fremmer fosforylering av ACC på vist med western blotting

HeLaNRF1mitoGFP celler ble stimulert med 0,25 og 0,5mM AICAR i 0(ktr), 2 og 5 minutter og deretter lysert i Ripa buffer. Proteiner (25µg) ble separert på 4-12% SDS-PAGE. Fosforylering av ACC ble undersøkt ved western blotting mot p ACC (1:1000) antistoff (A). Aktin antistoff (1:5000) ble brukt for å undersøke om man hadde lik mengde proteiner i de ulike prøvene(B).

Molekylvekten for ACC er ca 280KDa. På figur 5.4,A) ser vi noe svake bånd ved bruk av pACC antistoffet, men båndene ligger på riktig molekulvekt og det er ingen sekundære bånd i nærheten. Vi antar at mengden pACC er såpass liten at det akkurat er nok til å detekteres med antistoffet vårt. Det kan se ut som at AICAR behandlingen tenderer til å gi økning i pACC, men på grunn av noe svake og utydelige bånd er det vanskelig å fastslå noe med sikkerhet basert på dette blottet. Like mengder protein (loading kontroll) i de ulike brønnene ble påvist ved bruk av antistoff mot aktin (Figur 5.4,B).

5.2 Effekten av CC på fosforylering av AMPK og ACC

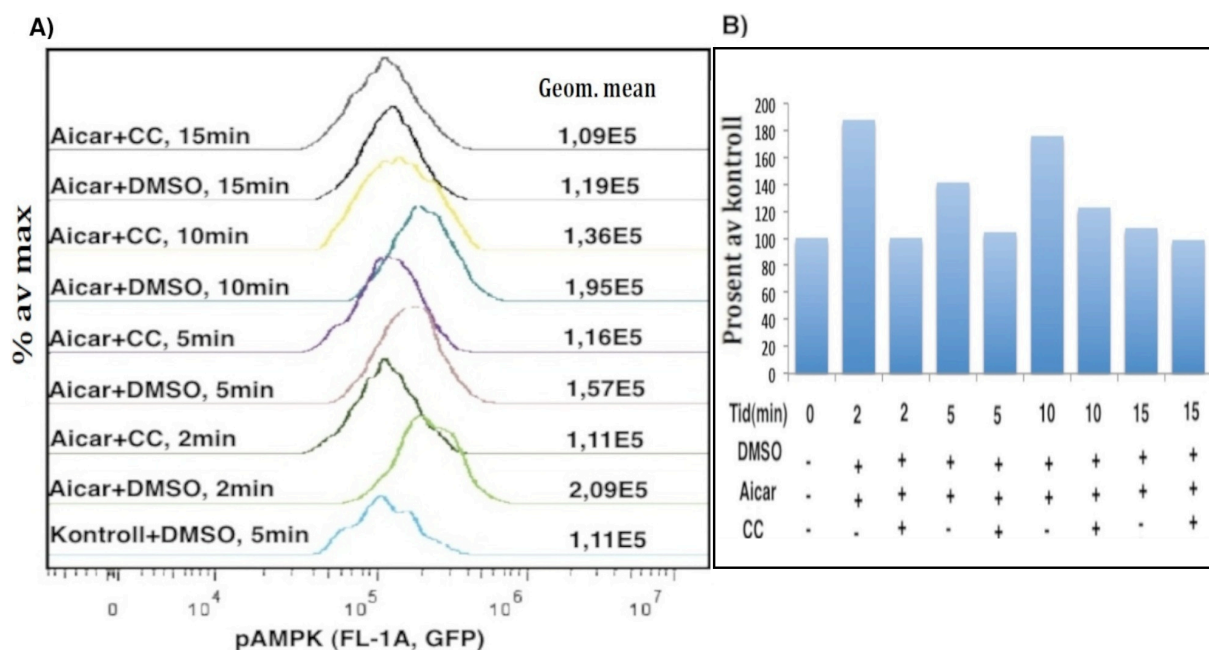
For å bekrefte at AICAR virker gjennom AMPK aktivering i HeLaNRF1mitoGFP cellene tok vi i bruk AMPK hemmeren CC. Vi ønsket med dette å undersøke om CC reduserer fosforyleringen av AMPK og dens nedstrøms fosforylerings substrat ACC. Cellene ble behandlet med 0,5mM AICAR i ulike tidspunkt, i nærvær eller fravær av CC (10 µM).

AMPK hemmeren CC, ble brukt parallelt i dette og nesten alle påfølgende eksperimenter for undersøke mekanismen for endringer i fosforylering av AMPK og ACC.

Som en kontroll har vi i forsøkene valgt å tilsette tilsvarende mengde DMSO som CC i de flaskene som ikke ble preinkubert med CC, siden CC ble løst i DMSO. Formålet var at vi skulle kunne se bort fra en eventuell effekt av DMSO.

Effekten ble observert både med flowcytometri og Western Blotting.

5.2.1 Flowcytometri - pAMPK



Figur 5.5 : AICAR fremmer fosforylering av AMPK påvist med flowcytometri.

A) viser forsøk 1 hvor HelaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med 0,5mM AICAR i 0(ktr), 2, 5, 10 og 15 minutter. I tillegg ble noen preinkubert med 10µM CC i 30 minutter, deretter behandlet med 0,5mM AICAR i 2, 5, 10 og 15 minutter. Alle flaskene ble kaldtrypsinert, fiksert og merket med primær antistoff mot pAMPKα (1:50 i IB) og deretter merket med sekundær antistoff anti-kanin IgG (H+L) i (1:1000 i IB). 10 000 celler per prøve ble analysert på flowcytometri. B) Viser resultat for forsøk 1 som prosent endring sammenlignet med kontroll.

På figur 5.5,A) kan vi se at stimulering med AICAR har størst effekt allerede etter 2min, noe som sammenfaller med tidligere eksperiment (Figur 5.1). Man ser også at når cellene preinkuberes med AMPK hemmeren CC, inhiberes effekten av AICAR. Vi la merke til at AICAR stimulering i 15min har mindre aktiverende effekt sammenlignet med tidligere tidspunkt. Samme eksperiment ble gjort flere ganger for å verifisere

resultatene våre. I figur 5.5,B) er samme resultat som figur 5.5,A) men vist i stolpediagram. I tabell 5.1 vises samlet resultater fra 3 forsøk som prosent endring sammenlignet med kontroll. I forsøk 1 ser vi klart at AICAR gir fosforylering av AMPK og CC hemmer denne effekten. Vi observerte at både i forsøk 1 og forsøk 3 har vi høyeste fosforylering etter 2min AICAR m/DMSO, mens i forsøk 2 vises det høyeste verdi på 5min AICAR m/DMSO. Kontroll for forsøk 3 viste noe høy fosforylerings verdi, noe som gir lav prosentvis AMPK fosforylering for de AICAR behandlede prøvene. Til tross for noe uklare resultater fra forsøk 3 (pga høy verdi i kontrollen), tyder disse resultatene generelt på at vi får fosforylering ved bruk av AICAR og hemming av dens effekt ved bruk av CC.

Tabell 5.1: Viser prosent endring normalisert mot kontroll i 3 ulike flowcytometrisk forsøk

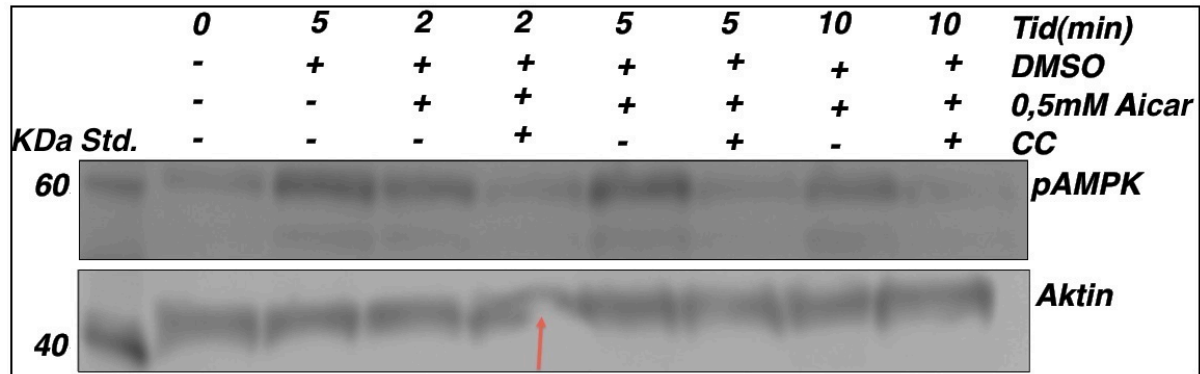
	1	2	3
kontroll+DMSO, 5min	100	100	100
Aicar+DMSO, 2min	187	114	100
Aicar+CC, 2min	100	60	84
Aicar+DMSO, 5min	141	124	84
Aicar+CC, 5min	105	88	79
Aicar+DMSO, 10min	176	112	86
Aicar+CC, 10min	123	59	75
Aicar+DMSO, 15min	107	96	-
Aicar+CC, 15min	98	96	-

I de påfølgende forsøkene tok vi ikke med 15min fordi det er den akutte effekten av AICAR som er mest interessant for oss. Tabell 5.1 viser at AICAR gir respons allerede etter 2 minutter, og at responsen etter 15 minutter er mye redusert.

5.2.2 Western blotting – pAMPK

Funnene fra figur 5.5) og tabell 5.1 ble videre undersøkt med western blotting. Deteksjon av protein fosforylering ved hjelp av SDS-PAGE og western blotting kan påvirkes av måten celleprøvene behandles på. Vi undersøkte derfor prøver som var opparbeidet både ved kaldt trypsinering og ved direkte cellelysis. Direkte cellelysis er en mer direkte og raskere måte å behandle cellene på, noe som kan være fordelaktig når en studerer fosforyleringsstatus.

5.2.2.1 Kaldt trypsinering

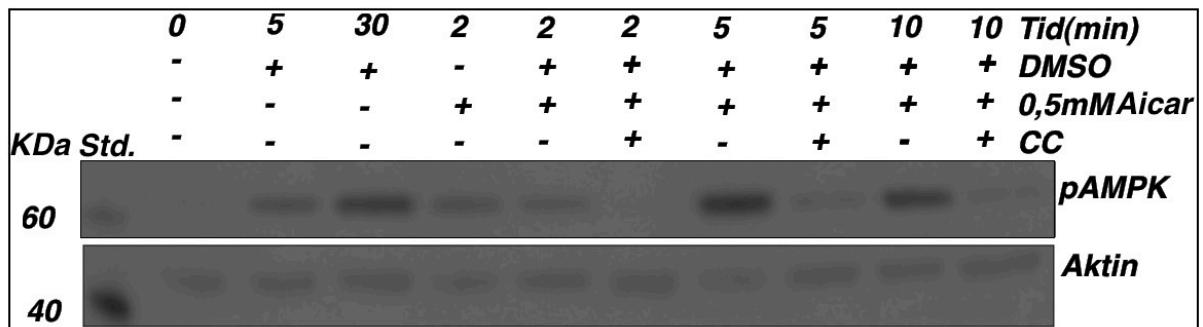


Figur 5.6: AMPK fosforylering påvist med western blotting ved bruk av kaldt trypsinering
Noen av HeLaNRF1mitoGFP cellene ble preinkubert med 10 μ M CC i 30 minutter, deretter ble alle cellene behandlet med 0,5mM AICAR i 0(ktr), 2, 5, og 10 minutter. Alle cellene ble kaldtrypsinert før de ble lysert i Ripa lysisbuffer. Proteiner (31,8 μ g) ble separert på 10% SDS-PAGE. Fosforylering av AMPK ble undersøkt ved western blotting mot pAMPK α (1:1000) antistoff. Aktin antistoff (1:5000) ble brukt som loading kontroll. Pilen viser mulige luftbobler.

Kaldt trypsinering ble brukt her på grunn av at samme metode ble brukt på flowcytometri, og dette gjør at resultatene blir mer sammenlignbare. Alt arbeidet skjedde under kaldt miljø. Siden spesifisiteten til antistoffene ble vist tidligere (Figur 5.2 og 5.4) vises her bare området av blottet som ligger rundt den aktuelle molekylvekten.

Ved kaldt trypsinering ser vi 2 bånd som vist i figur 5.6, et er sterkere og ligger over 60KDa og det andre er svakere og ligger under 60KDa. Kontroll m/DMSO viser sterkere fosforylering sammenlignet med kontroll u/DMSO. Man ser fosforylering ved bruk av AICAR og deretter inhibering av fosforylering med CC. Her ser vi sterkere fosforylering med 5min AICAR m/DMSO enn for 2 og 10 min. Tidligere har vi sett sterkere fosforylering med 2min AICAR m/DMSO sammenlignet med 5 og 10min (Figur 5.5).

5.2.2.2 Direkte cellelysis

**Figur 5.7: Aktivering av AMPK påvist med western blotting med direkte cellelysis**

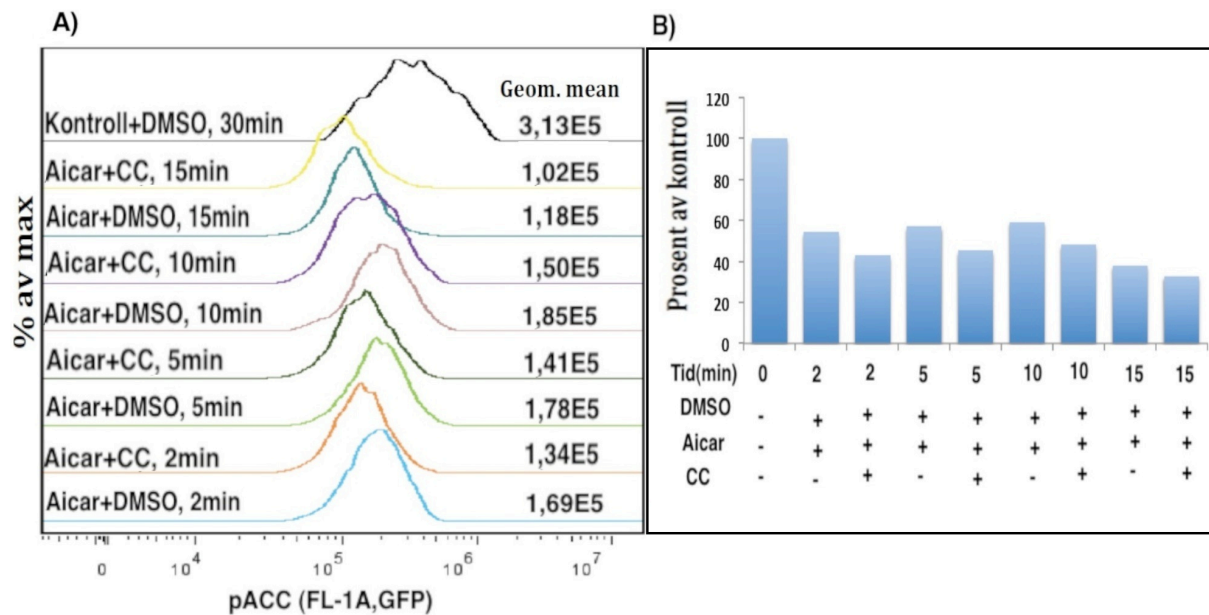
Noen av *HeLa*NRF1mitoGFP celler ble preinkubert med 10 μ M CC i 30 minutter, deretter ble cellene behandlet med 0,5mM AICAR i 0(ktr), 2, 5, og 10 minutter, Ripa buffer ble brukt for å lysere cellene. Proteiner (30,19 μ g) ble separert på 10% SDS-PAGE.. Fosforylering av AMPK ble undersøkt ved western blotting mot pAMPK α (1:1000) antistoff. Aktin antistoff (1:5000) ble brukt som loading kontroll.

På figur 5.7 ser vi bare ett bånd som ligger over 60KDa og ikke 2 bånd som er vist i kaldt trypsinering (Figur 5.6). Her hadde vi 3 kontroller. Kontroll u/DMSO og kontroll m/DMSO med 2 ulike tidspunkt. I en kontroll det ble tilsatt DMSO i 30min. Det som var interessant i sammenligningen mellom kontrollene at jo lengere cellene ble behandlet med DMSO, jo sterkere fosforylering ser man sammenlignet med kontroll u/DMSO og 5min m/DMSO.

Generelt viser resultatene det samme som er vist for kaldt trypsinering (Figur 5.6), hvor 5min AICAR m/DMSO ga sterkere fosforylering sammenlignet med 2 og 10 min, og at CC hemmer AMPK fosforylering. Resultatet som vi har fått på flowcytometri (Figur 5.5) viser at 2min stimulering med AICAR m/DMSO gir sterkest fosforylering, mens resultatene fra western blotting både med kaldt trypsinering og direkte cellelysis metode viser at 5min stimulering med AICAR m/DMSO gir sterkere fosforylering enn i de andre prøvene.

Vi valgte å bruke direkte cellelysis i de påfølgende eksperimenter, siden denne metoden ble vurdert som den beste.

5.2.3 Flowcytometri - pACC



Figur 5.8: AICAR fremmer fosforylering av ACC påvist med flowcytometri

A) Viser forsøk 1 hvor HeLaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med 0,5mM AICAR i 0(ktr), 2, 5, 10 og 15 minutter. I tillegg ble noe av HeLaNRF1mitoGFP cellene preinkubert med 10 μ M CC i 30 minutter, deretter behandlet med 0,5mM AICAR i 2, 5, 10 og 15 minutter. Alle cellene ble kaldtrypsinert, fiksert og merket med primær antistoff mot pACC (1:100 i IB) og deretter merket med sekundær antistoff anti-kanin IgG (H+L) i (1:1000 i IB). 10 000 celler per prøve ble analysert på flowcytometri. B) Viser resultat for forsøk 1 som prosent endring sammenlignet med kontroll.

På figur 5.8 observerer vi høy verdi for kontrollen. Dersom vi sammenligner prøvene som er tilsatt AICAR med de som er tilsatt CC og se bort fra kontroll så ser vi samme effekt som vi har sett tidligere for AMPK. AICAR fører til fosforylering av ACC. Man ser også at preinkubering av prøvene med CC inhiberer fosforyleringen. Vi observerte at stimulering med AICAR i 10min ga noe sterkere fosforylering enn 2, 5 og 15 minutter. Flere forsøk ble gjort for pACC for å bekrefte resultatene. Tabell 5.2 viser resultater fra 3 forsøk på samme måte som for AMPK (Tabell 5.1).

Forsøk 1 viser resultat som forventet, med unntak av kontrollen som har høy verdi. Vi observerte at både i forsøk 1 og 3 har vi høyeste fosforylering etter 10min stimulering med AICAR m/DMSO. Verdiene for 5min og 10min i Forsøk 2 er i kontrast med tidligere funn vist på tabellen under.

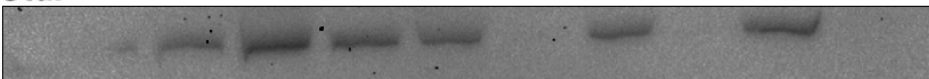
Tabell 5.2: Viser prosent endring i 3 ulike flowcytometrisk forsøk for pACC, normalisert mot kontroll

	1	2	3
kontroll+DMSO, 5min	100	100	100
Aicar+DMSO, 2min	54	64	76
Aicar+CC, 2min	43	62	62
Aicar+DMSO, 5min	57	71 *	86
Aicar+CC, 5min	45	96 *	57
Aicar+DMSO, 10min	59	36 *	115
Aicar+CC, 10min	48	84 *	67
Aicar+DMSO, 15min	38	110	-
Aicar+CC, 15min	33	76	-

* verdiene her stemmer ikke overens med det vi forventer.

5.2.4 Western blotting - pACC

Fosforylering av ACC ble også undersøkt ved hjelp av western blotting i celleprøver opparbeidet med direkte cellelysis metoden.

	0	5	30	2	2	2	5	5	10	10	Tid(min)
	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	DMSO
	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0,5mMAicar
KDa Std.	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	CC
220											pACC

Figur 5.9: ACC fosforylering påvist med western blotting

Noen av *HelaNRF1mitoGFP* celler ble preinkubert med $10\mu\text{M}$ CC i 30 minutter og, deretter ble cellene behandlet med $0,5\text{mM}$ AICAR i 0(ktr), 2, 5, og 10 minutter, Ripa buffer ble brukt for å lysere cellene. Proteiner ($30,2\ \mu\text{g}$) ble separert på 4-12% SDS-PAGE. Fosforylering av AMPK ble undersøkt ved western blotting mot pACC (1:1000) antistoff.

På figuren 5.9 ser vi bånd for pACC. På samme måte som tidligere ble prøvene behandlet med AICAR og CC. Kontroll 30min m/DMSO ga sterkere fosforylering sammenlignet med kontroll u/DMSO og 5min m/DMSO. Samme resultat ble påvist tidligere for pAMPK

(Figur 5.7). 10min stimulert med AICAR m/DMSO ga en sterkere fosforyleringsgrad enn 2 og 5min akkurat som det ble vist på figur 5.8.

På blottet kjørte vi 2 ganger med antistoff mot aktin. Resultatet så ikke bra ut noen av gangene. Den første gangen på grunn av bruk av gammelt sekundær antistoff anti-kanin (H+L)-HRP. Andre gang var det mange tomme plasser, noe som kan indikere tilstedeværelse av luftboble. Derfor ble ingen av bildene av disse blottene tatt med her.

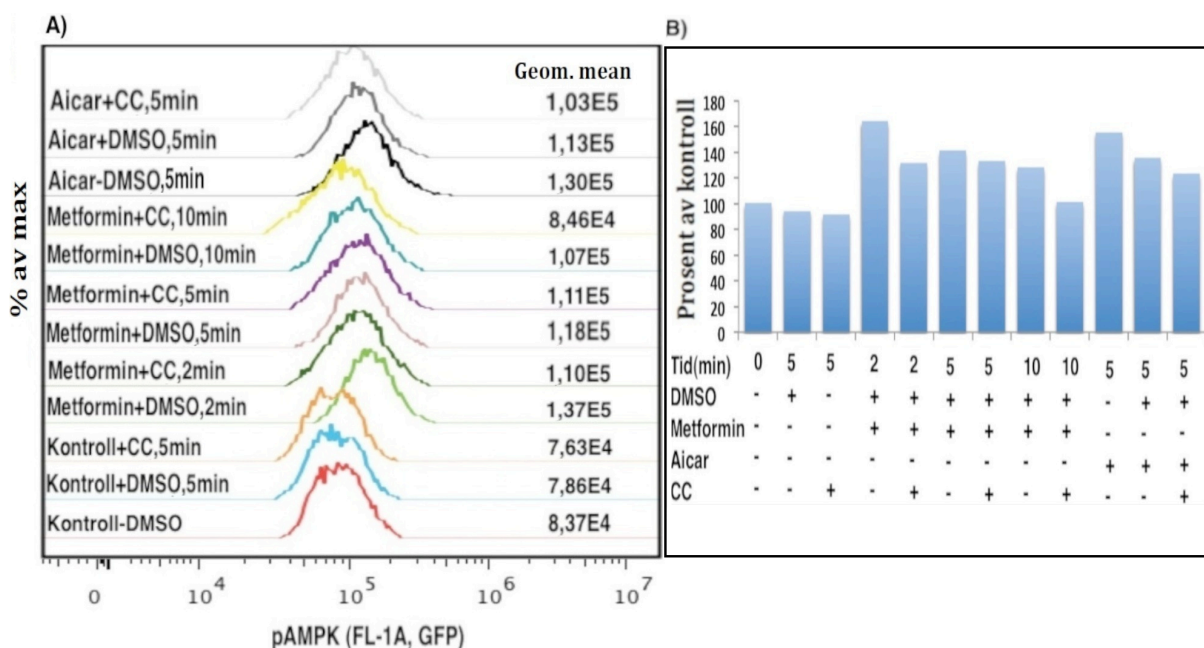
5.3 Effekten av metformin på fosforylering av AMPK og ACC

HelaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med metformin i nærvær og i fravær av CC. På samme måte som for AICAR, ble hemmende CC 10 μ M brukt parallelt i eksperimentene. Det ble tilsatt DMSO i flaskene hvor det ble ikke tilsatt CC på grunn av at CC er løst i DMSO.

HelaNRF1mitoGFP cellene ble behandlet med 4mM metformin i ulike tidsperioder (2min, 5min og 10min). Noen av dem ble preinkubert med 10 μ M CC i 30 min, deretter ble det tilsatt 4mM metformin. De andre flaskene hvor det ble ikke tilsatt CC, ble det tilsatt DMSO i tillegg til metformin.

Effektene ble undersøkt med Flowcytometri og deretter bekreftet med Western Blotting.

5.3.1 Flowcytometri - pAMPK



Figur 5.10: Metformin fører til AMPK fosforylering påvist på flowcytometri

A) HelaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med 4mM metformin i 0(ktr), 2, 5 og 10 minutter i fravær eller nærvær av CC. Her tok vi med en ekstra kontroll behandlet i 5min med 10 μ M CC. Alle cellene ble kaldtrypsinert, fiksert og merket med antistoff mot pAMPK (1:50 IB), deretter sekundær antistoff anti-kanin (H+L) i (1:1000 IB). B) Viser resultat for forsøk 1 som prosent endring sammenlignet med kontroll.

I figur 5.10 tok vi en ekstra kontroll hvor vi behandlet kontroll m/CC i 5min.

Det var for å sjekke effekten av DMSO på kontrollene. Kontroll u/DMSO ga sterkere fosforylering enn kontroll m/DMSO. Kontroll m/CC ga nesten likt grad av fosforylering som kontroll u/DMSO. Behandling av cellene med metformin gir en liten økning i fosforylering av AMPK, og med CC inhiberes fosforylering. Den høyeste grad av fosforylering ser vi i prøven som behandlet med metformin i 2min. Behandling av HelaNRF1mitoGFP cellene med 0,5mM AICAR m/DMSO , u/DMSO og m/CC ble tatt med her. Behandling av cellene med 0,5mM AICAR m/ og u/ DMSO viser høyere fosforylering av AMPK, mens preinkubering med CC inhiberer denne effekten.

I tabell 5.3 samme data som vist i figur 5.10 men her vises verdiene i prosent av kontroll.

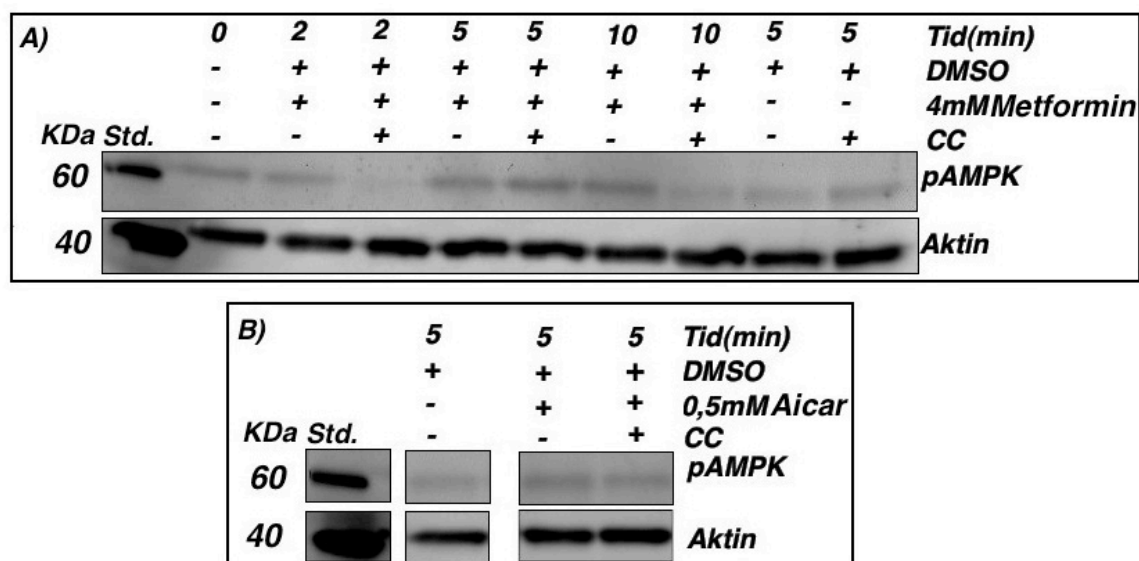
Tabell 5.3: Viser målingene for pAMPK normalisert mot kontroll

	1
Kontroll-DMSO	100 *
Kontroll+DMSO, 5min	94 *
kontroll+CC, 5min	91
Metformin+DMSO, 2min	164
Metformin+CC, 2min	131
Metformin+DMSO, 5min	141
Metformin+CC, 5min	133
Metformin+DMSO, 10min	128
Metformin+CC, 10min	101
Aicar-DMSO, 5min	155 *
Aicar+DMSO, 5min	135 *
Aicar+CC, 5min	123

* Verdiene her stemmer ikke overens med det vi forventer.

5.3.2 Western blotting – pAMPK

Effekten av metformin på fosforyleringen av pAMPK i HeLaNRF1mitoGFP celler ble også undersøkt ved hjelp av SDS-PAGE og western blotting analyser av celleprøver opparbeidet med direkte cellelysis metoden. I figur 5.11 vises resultater av to forsøk utført i denne analysen.



Figur 5.11: Metformin fremmer fosforylering av AMPK påvist med Western blotting.

Her kjørte vi 2 gel samtidig hvor den første var separasjon av proteiner fra celler behandlet med metformin og CC, mens den andre gelen var separasjon av proteiner fra celler behandlet med AICAR og CC.

A) HeLaNRF1mitoGFP celler ble stimulert med 4mM metformin i 0(ktr), 2, 5 og 10 minutter. Noen celler ble preinkubert med 10 μ M CC i 30min, og ble deretter behandlet med 4mM metformin. Cellene ble lysert i Ripa lysisbuffer. Proteiner (31,2 μ g) ble separert på 4-12% SDS-PAGE. Fosforylering av AMPK ble undersøkt ved Western Blotting mot pAMPK α (1:1000) antistoff. Aktin antistoff (1:5000) ble brukt som loading kontroll. B) Noen av HeLaNRF1mitoGFP cellene ble behandlet med 0,5mM AICAR i 5min nærvær og fravær av CC. Alle cellene ble lysert i Ripa lysis buffer. Proteiner ble separert og merket som i A).

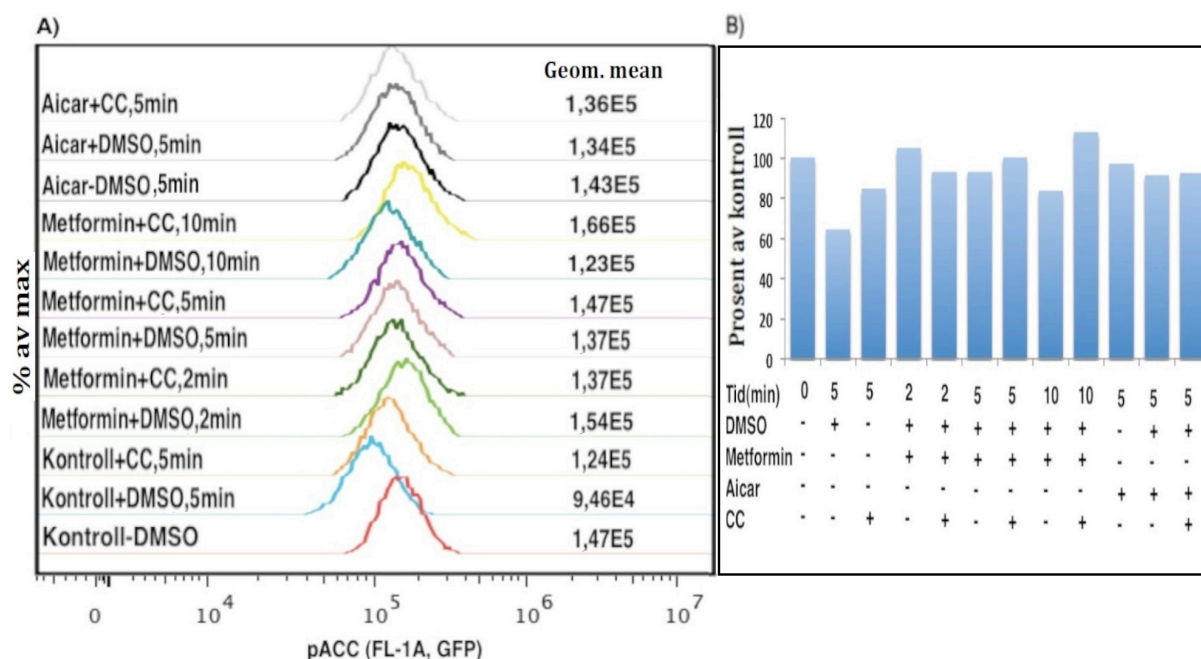
Resultatet som ble funnet i figur 5.11,A) samsvarer med resultatene som vi har fått med flowcytometri, med unntak av 5min metformin m/og u/CC som viser lik grad av fosforylering. Metformin synes å gi en liten økning i pAMPK fosforylering, og CC tenderer til å motvirke denne effekten. Det vises sterkere AMPK fosforylering etter 10min metformin behandling sammenlignet med de andre prøvene.

Figur 5.11,B) viser at AICAR stimulerer fosforylering i HeLaNRF1mitoGFP cellene, men

ikke i lik stor grad som vi har sett tidligere, og CC inhiberer denne effekten (Figur 5.6 og 5.7).

5.3.3 Flowcytometri – pACC

Effekten av metformin på fosforylering av ACC ble undersøkt ved hjelp av flowcytometri i samme forsøk som beskrevet over (Figur 5.10)



Figur 5.12: Effekt av metformin på ACC påvist på flowcytometri

A) *HeLa*NRF1mitoGFP celler ble behandlet med 4mM metformin i 0 (ktr), 2, 5 og 10 minutter. Noen av cellene ble preinkubert med 10 μ M CC, deretter ble behandlet med 4mM metformin. Her tok vi med en ekstra kontroll behandlet med 10 μ M CC i 5 min, og behandling med 0,5mM AICAR og CC. Alle cellene ble kaldtrypsinert, fiksert og merket med primær antistoff mot pACC (1:100 IB), deretter sekundær antistoff anti-kanin (H+L) i (1:1000 IB). B) Viser resultat for forsøk 1 som prosent endring sammenlignet med kontroll.

I dette forsøket så vi liten eller ingen grad av endring i pACC nivået i metformin-behandlede celler sammenlignet med kontroll. Tilsetting av CC hadde heller ingen klar og entydig effekt på fosforyleringen av ACC. Det må imidlertid understrekes at AICAR, som var tatt med som positiv kontroll (Figur 5.12.B), heller ikke gav den forventede økningen i pACC som observert tidligere (f.eks. Figur 5.3 og 5.8).

I tabell 5.4 samme data som vist i figur 5.12 men her vises verdiene i prosent av kontroll.

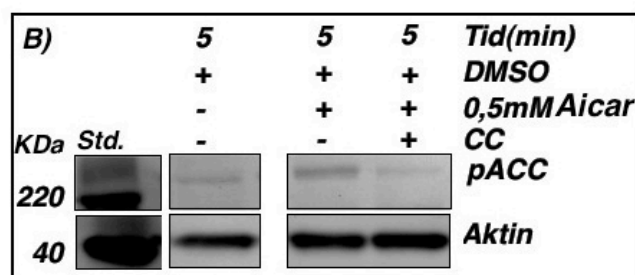
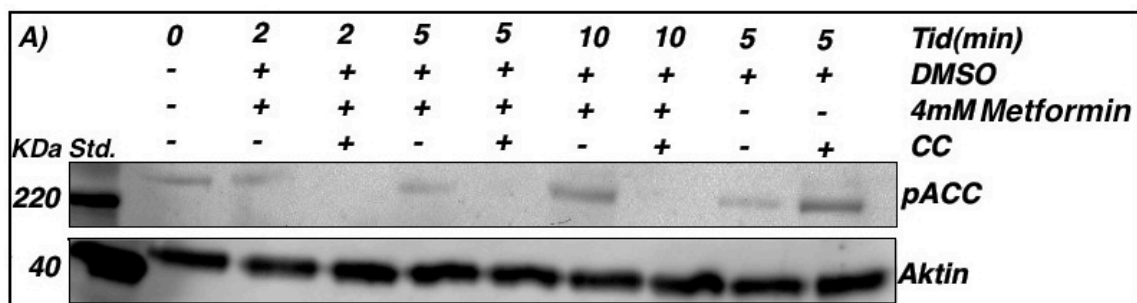
Tabell 5.4: Viser målingene for pACC normalisert mot kontroll

	1
Kontroll-DMSO	100 *
Kontroll+DMSO, 5min	64 *
kontroll+CC, 5min	84 *
Metformin+DMSO, 2min	105
Metformin+CC, 2min	93
Metformin+DMSO, 5min	93 *
Metformin+CC, 5min	100 *
Metformin+DMSO, 10min	84 *
Metformin+CC, 10min	113 *
Aicar-DMSO, 5min	97
Aicar+DMSO, 5min	91 *
Aicar+CC, 5min	93 *

* verdier som stemmer ikke overens med det vi forventer.

5.3.4 Western Blotting - pACC

Nivået av pACC ble også studert i cellekulturer behandlet med metformin etter opparbeiding med direkte cellelysis metoden. Figur 5.13 viser to blott fra denne analysen.



Figur 5.13: Metformin stimulerer ACC påvist med Western blotting.

Her kjørte vi 2 gel på samme måte som for AMPK.

A) HeLaNRF1mitoGFP celler ble stimulert med 4mM Metformin i 0 (ktr), 2, 5 og 10 minutter. Noen av cellene ble preinkubert med 10 μ M CC i 30min. Cellene ble lysert i Ripa lysisbuffer. Proteiner (31,2 μ g) ble separert på 4-12% SDS-PAGE. Fosforylering av ACC ble undersøkt ved Western Blotting mot pACC (1:1000) antistoff. Aktin antistoff (1:5000) ble brukt som loading kontroll. B) Noen av HeLaNRF1mitoGFP celler ble behandlet med 0,5mM AICAR i 5min i nærvær og fravær av CC. Deretter ble de lysert i Ripa lysis buffer. Proteiner ble separert og merket som i A).

Resultatet i figur 5.13,A) tyder på at metformin stimulerer fosforylering av ACC, mens CC hemmer denne effekten. Det vises sterkere ACC fosforylering etter 10min metformin behandling sammenlignet med de andre prøvene. I figur 5.13,B) hvor AICAR ble tatt med som positiv kontroll, viste AICAR behandlede celler økning i pACC, og denne effekten var nøytralisert av CC. I denne analysen var det liten effekt av DMSO alene på pACC nivået.

6. Diskusjon

I denne studien undersøkte vi AMPK aktivering i HelaNRF1mitoGFP cellelinjen når de blir behandlet med to kjente AMPK aktivatorer og en AMPK hemmer. Hypotesen var at aktivering av AMPK ville stimulere NRF1 og dermed føre til økt uttrykk av reporterproteinet mitoGFP (L. Hodenland Nilsson, upublisert). NRF1 aktivering fører til økt translasjon av det fluoreserende GFP proteinet som deretter blir transportert inn i mitokondriene på grunn av en N-terminal signalsekvens. Denne cellemodellen er nylig utviklet i vår forskningsgruppe for å studere mitokondriell biogenese. Effektene av AICAR, metformin og CC på fosforylering av AMPK og dens nedstrøms fosforylerings substrat ACC ble undersøkt. Dette ble det studert med flowcytometri og verifisert med western blotting.

AMPK er en viktig komponent som fungerer som cellens energi sensor og aktiveres som respons på økt AMP/ATP ratio (2,3). Vi valgte å studere AMPK signalisering i forbindelse med mitokondriell biogenese fordi mitokondriene er sentrale organeller i cellene hvor de er viktige produsenter av energi (ATP). Defekter i mitokondriene har blitt satt i sammenheng med ulike sykdommer som for eksempel diabetes, og kreft (2).

6.1 Test av antistoffer og AMPK aktiveringsbetingelser

I begynnelsen av prosjektet startet vi med å optimalisere dose og behandlingstid for aktivering av AMPK med AICAR, ved å se på fosforylering av AMPK og ACC i den nylig etablerte HelaNRF1mitoGFP cellelinjen. Samtidig undersøkte vi spesifisiteten til de fosfospesifikke antistoffene som ble brukt mot fosfo-AMPK og fosfo-ACC.

Fosfospesifisiteten til antistoffene som var brukt her ble undersøkt med western blotting vist på figur 5.2 og figur 5.4. Det viser riktig molekylvekt og ingen sekundære bånd. Dette tyder på at antistoffene som er brukt her er spesifikke.

Vi har ikke brukt total AMPK antistoff i dette prosjektet. Siden vi skulle studere effekter innenfor et forholdsvis kort tidsrom kan en anta at nivået av AMPK proteinet ikke endres betydelig. Endringer påvist ved hjelp av de fosfospesifikke antistoffene vil derfor tyde på endringer i fosforylering og ikke endringer i proteinnivå. De fosforylerte protein formene ble detektert med flowcytometri og western blotting.

Ved flowcytometri ble det tatt med 2 kontroller, hvor den ene hadde bare sekundær antistoff, mens den andre hadde primær antistoff. Vi observerte at kontrollene gav lav bakrunnsfluoresens. Dette indikerer altså at antistoffene var spesifikke.

På figur 5.1 viste resultatene at det ikke er stor forskjell i grad av AMPK aktivering med å bruke 2 ulike AICAR konsentrasjoner i 2 ulike tidspunkt. Det viser litt høyere grad av AMPK fosforylering med 0,25mM AICAR, 2 min sammenlignet med 0,5mM AICAR, 2 min (Figur 5.1). Det tyder på at høyere AICAR dose ikke gir høyere grad av fosforylering. Vi vet at fosforyleringsstatus for AMPK er reversibel, og at den defosforyleres ganske fort. Det kan resultere i at etter 5 minutter kan noe av den fosforylerte AMPK ha gått over til den defosforylerte formen. En liten minking i fosforyleringsgrad etter 5 min. stimulering, kan skyldes defosforylering.

Resultatene fra flowcytometri ble verifisert med western blotting (Figur 5.2). Blottet viser imidlertid at 0,25mM AICAR, 5min ga den sterkeste fosforylering. Grunnen til at det er noe avvik mhp tid kan skyldes mulige feilkilde som ulikhet i behandlingstid og prøve preparering.

ACC viste litt høyere grad av fosforylering med 0,25mM AICAR 5min sammenlignet med 0,25mM AICAR 2min (Figur 5.3). Dette kan forklares med at ACC ligger under AMPK i signalveien, og at denne fosforyleringen derfor kommer ved et senere tidspunkt. På samme måte som for AMPK, viser resultatene at høyere dose ikke nødvendigvis gir høyere grad av fosforylering.

Da det ikke var stor forskjell i grad av AMPK aktivering med 0,25mM og 0,5mM AICAR, samtidig som 0,5mM er en mye brukt dose i andre prosjekter i gruppen og i litteraturen, bestemte vi oss for å bruke 0,5mM AICAR i de påfølgende forsøkene.

6.2 AMPK aktivering og fosforylering av dens nedstrøms substrat ACC etter AICAR behandling

Etter å ha undersøkt aktiveringsbetingelsene ble 0,5mM AICAR brukt og AMPK hemmeren CC ble inkludert i forsøkene for å undersøke mekanismen for endringer i fosforylering av AMPK og ACC.

Figur 5.5 viser at AICAR øker fosforylering av AMPK, mens CC hemmer denne effekten. Effekten inntreffer etter 2 minutter. Vi så også at AICAR stimulering i 15 min har mindre aktiverende effekt sammenlignet med tidligere tidspunkt. Dette viser at AMPK fosforylering skjer ganske raskt og defosforylering skjer etter kort periode.

Vi har gjort dette forsøk flere ganger (Tabell 5.1). Vi observerte at både i forsøk 1 og forsøk 3 har vi høyeste fosforylering på 2 min AICAR m/DMSO, mens i forsøk 2 vises det høyeste verdi på 5 min AICAR m/DMSO. Variasjonen mellom forsøkene kan være på grunn av mulige feilkilder knyttet til gjennomføringen av forsøket, slik som behandlingstid og opparbeiding av prøvene.

Kontroll for forsøk 3 viste noe høy fosforylerings verdi. Grunnen kan skyldes at ved kaldt trypsinering måtte HelaNRF1mitoGFP cellene stå ca 25 minutter på is. Etter hvert måtte flaskene dunkes slik at cellene skulle løsne fra bunnen. Noen ganger satt cellene forholdsvis fast og mye dunking kan ha ført til at cellene ble stresset. Ved et tilfelle under prøvepreparering til flowcytometri ble HelaNRF1mitoGFP cellene sentrifugert ved 13000 rpm og ikke 1300 rpm som i protokollen. Dette kan ha ført til at noen av cellene var stresset og døde underveis.

Ved kald trypsinering på figur 5.6 ser vi 2 bånd rundt molekylvekten for AMPK α . Båndet som ligger under 60KDa kan skyldes uspesifikk binding av antistoffet, eller ulike isoformer av proteinet. Man ser fosforylering av AMPK α ved bruk av AICAR og deretter inhibering av fosforylering med CC. Her ser vi sterkere fosforylering med 5 min AICAR m/DMSO enn for 2 og 10 min. Dette kan skyldes eksperimentelle feilkilder. Små forskjeller i behandlingstid kan for eksempel gi endring i fosforyleringsgrad.

Figur 5.7 viser resultater med direkte cellelysis. Her ser vi et bånd over 60KDa vist og ikke 2 bånd som kaldt trypsinering (Figur 5.6), derfor ble direkte cellelysis metoden brukt i alle de andre påfølgende forsøkene.

På figur 5.8 for pACC observerte vi høy kontroll. Grunnen kan være påkjenningen HelaNRF1mitoGFP cellene har fått under kaldt trypsinering, som kan ha ført til cellene ble stresset. Kontrollen ble tilsatt DMSO som vi har vist kan forårsake fosforylering av AMPK. Vi observerte at AICAR behandling i 10 min gir høyere fosforylering enn de andre

prøvene. Årsaken kan som tidligere nevnt skyldes at ACC ligger nedenfor AMPK og effekten kan inntre best ved senere tidspunkt.

I forsøk 2 (Tabell 5.2) viser 5min AICAR m/DMSO lavere ACC fosforylering sammenlignet med 5min AICAR m/CC. På samme måte viser 10min AICAR m/DMSO lavere ACC fosforylering sammenlignet med 10min AICAR m/CC. Det er i strid med det vi forventer. Det kan hende at forveksling mellom prøvene har skjedd. Forsøk 1 og forsøk 3 viser imidlertid at tilsetning av AICAR fører til ACC fosforylering og preinkubering med CC reduserer denne effekten. I alle tre forsøkene har vi høy grad av fosforylering i kontrollene. Det kan være samme grunn som ble nevnt tidligere, at en ved å stresse cellene kan få feilaktige høye verdier. Figur 5.9 viste at 10min stimulering med AICAR m/DMSO ga strekere fosforylering enn 2 og 5min, akkurat som det ble vist på figur 5.8. Grunnen er at ACC ligger under AMPK og effekten på ACC kommer senere. På samme måte viste det seg at preinkubering med CC hemmer ACC fosforylering.

Tilsatt vil jeg nevne behandling av HelaNRF1mitoGFP med 0,5mM AICAR førte til AMPK aktivering og deretter ACC fosforylering. Vi vet fra litteraturen at Hela celler mangler uttrykt av LKB1 (19). Det vil si at AICAR ikke bruker denne veien for å aktivere AMPK. Alle resultatene våre både for flowcytometri og western blotting viser at AICAR gir fosforylering av AMPK. Vi vet at AICAR når den blir tatt opp av adenosin transporter, blir omdannet til ZMP, som ligner på AMP. Vi vet også at når AMP øker vil nivået av ATP minker, dette medfører binding av AMP til AMPK γ subenheten og forårsaker konformasjonsendring i AMPK formen, slik at AMPK α på T172 fosforyleres (4). Ut i fra dette kan vi anta at AICAR øker aktivering av AMPK og ACC (fosforyleres av AMPK) ved å etterligne økning i AMP/ATP ratio.

6.3 Effekt av DMSO på AMPK aktivering

Vi begynte å studere effekten av DMSO, siden vi registrerte at vi fikk høye verdier for pAMPK i kontrollene.

I figur 5.6 har vi tatt med 2 kontroller for å studere effekten av DMSO. Vi observerte at kontroll m/DMSO viser sterkere fosforylering sammenlignet med kontroll u/DMSO.

På figur 5.7 hadde vi tre kontroller. Kontroll u/DMSO, kontroll m/ DMSO i 2 ulike tidspunkt. Vi observerte at jo lengre HeLaNRF1mitoGFP cellelinjene ble behandlet med DMSO, desto sterkere ble båndene sammenlignet med kontroll u/DMSO. Det vil si at DMSO kan stimulere fosforyleringen av AMPK, noe som kan indikere at DMSO har en effekt på fosforylering av AMPK.

På figur 5.9 har vi også 3 kontroller; kontroll u/DMSO, og Kontroll m/DMSO i 2 ulike tidspunkt. Kontroll 30min m/DMSO ga sterkere fosforylering sammenlignet med kontroll u/DMSO og 5min m/DMSO. Samme resultat ble påvist tidligere for pAMPK (figur 5.7). Det vil si DMSO kan øke AMPK fosforylering.

DMSO i metformin forsøkene både for pAMPK (Figur 5.10) og pACC (Figur 5.12) gav alene et uventet lavt nivå av fosforyleringsgrad. Dette er i kontrast med det vi har påvist i tidligere forsøk (Figur 5.6, 5.7 og 5.9). Av tidmessige grunner kunne vi ikke repetere dette forsøket.

Vi fant ut at tilsetning av DMSO i kontrollene ikke er god kontroll for behandling med CC. Resultatene viser en imidlertid også at den effekten som induseres av DMSO, hemmes av CC, og dermed får ikke DMSO denne utilsiktede effekten når en tilsetter CC løst i DMSO.

6.4 Mulig AMPK -aktivering etter behandling med metformin

Effekten av metformin ble studert på samme måte som for AICAR.

På figur 5.10 viser kontroll u/DMSO sterkere fosforylering enn kontroll m/DMSO.

Kontroll m/CC ga nesten likt grad av fosforylering som kontroll u/DMSO. Det er noe i

strid med det vi har funnet ut tidligere, og det er derfor noe vanskelig å trekke en konklusjon basert på disse dataene. Forsøket ble utført bare en gang på grunn av tidsmessige begrensinger. Resultatene indikerer at behandling av HelaNRF1mitoGFP cellene med metformin gav en liten økning i fosforylering av AMPK, og med CC inhiberes fosforylering. Figur 5.10 viser den høyeste grad av fosforylering i prøven som ble behandlet med metformin i 2min. Det kan være samme grunn som ble nevnt tidligere at fosforylering av AMPK kommer raskt. Stimulering av HelaNRF1mitoGFP cellene med 0,5mM AICAR ble tatt med her, som positiv kontroll.

Resultatet som ble funnet i figur 5.11,A) samsvarer med resultatene som vi har fått på flowcytometri, med unntak av 5min metformin m/og u/CC som viser lik grad av fosforylering. Metformin synes å gi en liten økning i pAMPK fosforylering, og CC motvirker denne effekten. Det vises sterkere fosforylering etter 10min metformin behandling sammenlignet med de andre prøvene. Som tidligere nevnt kan vi ikke trekke noen faste konklusjoner her på grunn av at forsøket ble utført bare en gang.

Figur 5.12 viser effekten av metformin på pACC. Her ser vi liten grad av endring i pACC nivået i metformin og CC behandlede celler sammenlignet med kontroll. AICAR som var tatt med som positiv kontroll, hadde heller ikke den forventede økningen i pACC som observert tidligere (Figur 5.5). Siden metformin i forsøkene våre viser en liten effekt på pAMPK (Figur 5.10) er det ikke så overraskende at pACC heller ikke synes å være påvirket. Kontrollene i dette forsøket ikke gav forventet resultat er det vanskelig å trekke konklusjon på bakgrunn av disse resultatene.

Resultatet i figur 5.13,A) viser at metformin stimulerer fosforylering av ACC, mens CC hemmer denne effekten. Det viser sterkere grad av fosforylering med 10min metformin enn de andre prøvene. Det er på grunn av fosforylering av ACC skjer i senere tidspunkt. Figur 5.13,B) viser AICAR behandlede celler gir økning i pACC, og denne effekten var hemmet med CC. Det ble påvist i figur 5.8.

Vi kan ikke trekke noe konkrete konklusjoner for metformin, men vi vet fra publiserte artikler at det er ulike teorier om mekanismen til metformin (18). Siden vi har brukt HelaNRF1mitoGFP celler, vet vi at de mangler uttrykk av LKB1(19). Resultatet i figur 5.10 tyder på en liten grad av AMPK aktivering. Dermed tyder våre data på at metformin ikke kan aktivere AMPK gjennom LKB1, men det må være en annen vei for å aktivere

AMPK. Våre resultater støtter ikke det som er skrevet at metformin aktiverer AMPK gjennom LKB1 (20, 21). En annen hypotese er at metformin aktiverer AMPK indirekte ved å hemme mitokondriell ATP produksjon, som viser at de virker ved å hemme ATP syntese og dermed heve AMP. Dette fører til økt AMP/ATP ratio og igjen fører til AMPK aktivering (4, 22, 35, 36). Det kan hende at metformin har brukt denne veien for AMPK aktivering.

Den nyeste studien som har dukket opp viser at metformin kan øke AMP gjennom hemming av AMP deaminase (AMPD). Dette fører til økt AMP nivå, som betyr økt AMP/ATP nivå og igjen aktivering av AMPK (18). Metformin kan ha brukt denne veien for å aktivere AMPK. Igjen kan vi ikke bekrefte at metformin aktiverer AMPK gjennom de to siste nevnte veiene, på grunn av lite data.

Mulige feilkilder

- Gelelektroforese og western blotting:

Det er mulig at ulik opparbeiding av prøvene og kontaminering av kjemikalier kan føre til avvik i resultatene. Jeg opplevde vanskeligheter med å håndtere små mengder i µl. I noen av forsøkene var det vanskelig å fjerne luftbobler fra transfer membran under blotting.

- Flowcytometri:

Prøve samling og preparering kan muligens være ulik mellom forsøkene. I noen av forsøkene mistet jeg mange celler under vasking. En gang sentrifugerte jeg med 13000 rpm isteden for 1300 rpm fra protokoll. Dette kan medføre stressing av celler og celledød. Ved kaldtrypsinering dunket jeg noen ganger mer under flaskene for å løsne dem fra bunnen, igjen kan dette føre til cellostressing. I noen av forsøkene måtte flaskene ligge mer enn 20min, ca 30-40min pga cellene ble ikke løsnet fra flaske bunnen. Ulikhet i cellemengde i flaskene kan føre til at noen celler får mer antistoff på seg enn de som har mer celler per flasker.

7. Konklusjon

Hovedkonklusjonen er at AICAR behandling fører til en umiddelbar AMPK aktivering i den nye reporter cellemodellen (HelaNRF1mitoGFP) celler, og at dette har en sannsynlig sammenheng med NRF1-regulert mitokondriell biogenese. Når AMPK aktiveres medfører aktivering av transkripsjonsfaktoren NRF1 som binder til DNA hvor transkripsjon av respiratoriske gener finner sted. Dette fører til økt mitokondriell biogenese.

Mer spesifikt konkluderte vi med følgende:

- 1.** Vi fant ut at DMSO ikke er en god kontroll i undersøkelser på aktivering av AMPK. DMSO førte til stimulering av AMPK fosforylering. Denne effekten ble imidlertid hemmet av CC, og dermed får ikke DMSO denne utilsiktede effekten når en tilsetter CC løst i DMSO.
- 2.** Etter mange repetisjoner av AICAR forsøkene både for flowcytometri og western blotting analyser, kan vi konkludere med at AICAR fører til AMPK aktivering i HelaNRF1mitoGFP cellene.
- 3.** Vi har også bekreftet at CC fungerer som en antagonist på AMPK i HelaNRF1mitoGFP modellen. Det vil si CC vil konkurrere med aktivatorer som AICAR om binding på γ subenheten i AMPK. Når CC binder til AMPK vil fosforyleringen inhiberes. Det er det vi har fått i de forsøkene.
- 4.** Vi kan ikke trekke noen konkrete konklusjoner fra metformin forsøkene, men det synes som at at metformin kan føre til en liten grad økning i AMPK og ACC fosforylering.

8. Fremtidige perspektiver

Siden AMPK er meget viktig regulator av mitokondriell biogenese, kunne en studere mer om andre faktorer som påvirker aktiviteten og inhibering av AMPK og ser på deres effekt. Eksempel triglitazone, galaktose og rotenon.

Man kan også undersøke andre stimulatorer av mitokondriell biogenese, ved å måle proteiner som er økt ved AMPK aktivering.

Repetisjon av forsøkene til metformin kunne gi mer pålitelige resultater. En kunne også studere mekanismen bak metformin handling som fører til AMPK stimulering.

Bruke modellen til å undersøke effekten av ernæring, farmakologiske stoffer, mutasjoner, osv på mitokondriell biogenese.

Referanser:

1. Bradley EA, Eringa EC, Stehouwer CD, Korstjens I, van Nieuw Amerongen GP, Musters R, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside in the muscle microcirculation increases nitric oxide synthesis and microvascular perfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jun;30(6):1137-42.
2. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008 Apr;88(2):611-38.
3. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 2006 Mar 1;97(4):673-83.
4. Fogarty S, Hardie DG. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1804(3):581-91.
5. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr.* 1997 Apr;29(2):109-19.
6. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jun 7;1576(1-2):1-14.
7. Emerling BM, Viollet B, Tormos KV, Chandel NS. Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK. *FEBS Lett.* 2007 Dec 11;581(29):5727-31.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell* 2008.
9. Chua YL, Hagen T. Compound C prevents Hypoxia-Inducible Factor-1alpha protein stabilization by regulating the cellular oxygen availability via interaction with Mitochondrial Complex I. *BMC Res Notes.* 2011;4:117.
10. Shen QW, Gerrard DE, Du M. Compound C, an inhibitor of AMP-activated protein kinase, inhibits glycolysis in mouse longissimus dorsi postmortem. *Meat science.* 2008 2008;78(3):323-30.
11. Peyton KJ, Yu Y, Yates B, Shebib AR, Liu XM, Wang H, et al. Compound C Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration in an AMP-Activated Protein Kinase-Independent Fashion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Aug;338(2):476-84.
12. Labuzek K, Liber S, Gabryel B, Buldak L, Okopien B. Ambivalent effects of compound C (dorsomorphin) on inflammatory response in LPS-stimulated rat primary microglial cultures 3 November 2009:17.
13. Ha J, Daniel S, Broyles SS, Kim KH. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J Biol Chem.* 1994 Sep 2;269(35):22162-8.
14. Daval M, Fougelle F, Ferre P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol.* 2006 Jul 1;574(Pt 1):55-62.
15. PHOENIX PHARMACEUTICALS I. AMPK(AMP-activated Protein Kinase) an intracellular energy sensor maintaining the energy balance. 2006; Available from: http://www.phoenixpeptide.com/catalog/pnxfoget.php?id=pnxnews_00000244&title=Compound&sum=F.
16. Pellatt LJ, Rice S, Mason HD. Phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by metformin in the human ovary requires insulin. *Endocrinology.* 2011 Mar;152(3):1112-8.

17. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2420-5.
18. Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. Metformin Activates AMP Kinase through Inhibition of AMP Deaminase. 2010.
19. Sun Y, Connors KE, Yang DQ. AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol Cell Biochem*. 2007 Dec;306(1-2):239-45.
20. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005 Dec 9;310(5754):1642-6.
21. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005 Jun 4;330(7503):1304-5.
22. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, et al. Thiazolidinediones, Like Metformin, Inhibit Respiratory Complex I A Common Mechanism Contributing to Their Antidiabetic Actions? 2003.
23. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 2000 Jan 7;275(1):223-8.
24. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WGT, Schlattner U, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):43940-51.
25. Kim WH, Lee JW, Suh YH, Lee HJ, Lee SH, Oh YK, et al. AICAR potentiates ROS production induced by chronic high glucose: roles of AMPK in pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Signal*. 2007 Apr;19(4):791-805.
26. Collier CA, Bruce CR, Smith AC, Lopaschuk G, Dyck DJ. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Jul;291(1):E182-9.
27. Sakamoto K, Goransson O, Hardie DG, Alessi DR. Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Aug;287(2):E310-7.
28. DG. H. Neither LKB1 nor AMPK are the direct targets of metformin. 2006.
29. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J*. 2009 Mar 1;418(2):261-75.
30. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*. 2004 Jan;29(1):18-24.
31. Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M, Araki E. Topical Review: AMPK and cell proliferation - AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *The Journal of Physiology*. 2006 2006;574(1):63-71.
32. Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Shimojo Y, Ogura T, Lavin MF, et al. IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 19;324(3):986-92.
33. Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osorio-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, et al. Metformin Amplifies Chemotherapy-Induced AMPK Activation and Antitumoral Growth. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):3993-4005.
34. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005 Jan;1(1):15-25.

35. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1167-74.
36. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal.* 2000 June 15;348(Part 3):607-14.
37. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, et al. LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current biology : CB.* 2003 2003;13(22):2004-8.
38. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Fujishiro M, Ono H, Onishi Y, et al. Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *American journal of physiology.* 2002 2002;282(6 Part 1):E1239-44.
39. Gaidhu MP, Fediuc S, Ceddia RB. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside-induced AMP-activated protein kinase phosphorylation inhibits basal and insulin-stimulated glucose uptake, lipid synthesis, and fatty acid oxidation in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):25956-64.
40. Taylor EB, Ellingson WJ, Lamb JD, Chesser DG, Winder WW. Long-chain acyl-CoA esters inhibit phosphorylation of AMP-activated protein kinase at threonine-172 by LKB1/STRAD/MO25. 2004.
41. Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, et al. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2007 Sep 27;449(7161):496-500.
42. Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda).* 2006 Feb;21:48-60.
43. Zhou L, Deepa SS, Etzler JC, Ryu J, Mao X, Fang Q, et al. Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca²⁺/Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2009 Aug 14;284(33):22426-35.
44. Thomson DM, Herway ST, Fillmore N, Kim H, Brown JD, Barrow JR, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol.* 2008 Feb;104(2):429-38.
45. Fryer LGD, Parbu-Patel A, Carling D. MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION - The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry.* 2002 2002;277(28):7.
46. Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. 2003.
47. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade 2003.
48. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Feb 1;64(3):985-93.
49. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007 Mar;274(6):1393-418.
50. Cell Signaling Technology I. AMPK Signaling. 2006; Available from: <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/AMPK.html>.

51. Cell Signaling Technology I. Acetyl-CoA Carboxylase Antibody Available from: <http://www.cellsignal.com/products/3662.html>.
52. Universitet i oslo, institutt B. Elektrontransportkjede Available from: <http://www.mn.uio.no/bio/tjenester/kunnskap/plantefys/plfys/biokjemi/elektron.html>.
53. Eidsmo JA. Nedbrytning av glukose. Available from: http://web2.gyldendal.no/undervisning/felles/pixdir20/?archive=bi2_grunnbok&menutem=menu_6_2&resultsource=menu_6_2&detailsource=image_212.
54. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res.* 2008 Jul 15;79(2):208-17.
55. Regulation of lipogenesis by AMP. 2011; Available from: http://www.metabolic-database.com/html/amp_regulation_lipogenesis.html.

Appendiks 1

Standardene er fra Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay kit

Fra 1A til 4C ligger standard fra lavest konsentrasjon(mikrogram/milliliter) til høyest.

Fra 4D til 8A ligger ukjente uforynnet og fortyntet prøvene

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	125	750	2000	U(1:10)	U:(1:5)	Ukjent ⁸	U(1:10)				
B	0	250	750	2000	Ukjent ³	U(1:10)	U:(1:5)					
C	0	250	1000	2000	U:(1:5)	Ukjent ⁶	U(1:10)					
D	25	250	1000	Ukjent ¹	U(1:10)	U:(1:5)	Ukjent ⁹					
E	25	500	1000	U (1:5)	Ukjent ⁴	U(1:10)	U:(1:5)					
F	25	500	1500	U(1:10)	U:(1:5)	Ukjent ⁷	U(1:10)					
G	125	500	1500	Ukjent ²	U(1:10)	U:(1:5)	Ukjent ¹⁰					
H	125	750	1500	U:(1:5)	Ukjent ⁵	U(1:10)	U:(1:5)					

1) U: Ukjent

2) U:(1:5), betyr at ukjent prøven ble forynnet 1:5 i Ripa lysis buffer

3) U:(1:10), betyr at ukjent prøven ble forynnet 1:5 i Ripa lysis buffer

Deretter ble absorbansen til de ukjente prøvene bestemt via Asys Expert 96 UV

Microplate Reader fra Biochrom.

Plate *

DigiRead

Time of Measurement : 28. februar 2011 15:29:46

Measurement Options : Single 595 [nm]

Data Status : authentic

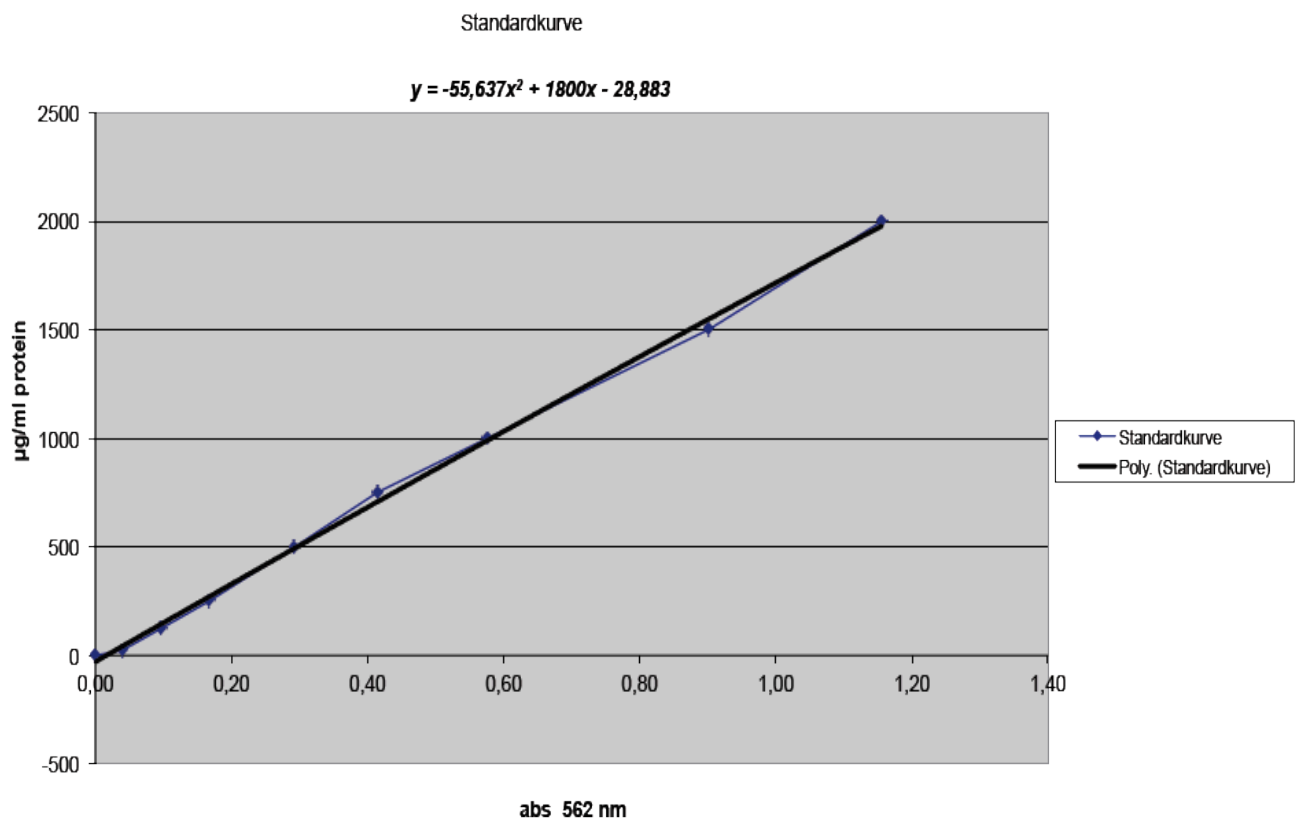
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.161	0.232	0.569	1.295	0.293	0.367	1.163	0.288	0.039	0.040	0.039	0.047
B	0.161	0.295	0.556	1.308	1.150	0.266	0.370	0.039	0.039	0.039	0.039	0.044
C	0.162	0.289	0.710	1.280	0.372	1.207	0.267	0.040	0.039	0.043	0.040	0.040
D	0.176	0.333	0.727	1.115	0.282	0.373	1.196	0.042	0.051	0.047	0.040	0.044
E	0.177	0.423	0.707	0.349	1.091	0.249	0.363	0.046	0.048	0.046	0.049	0.051
F	0.181	0.441	1.000	0.274	0.351	1.226	0.265	0.041	0.047	0.042	0.040	0.042
G	0.237	0.429	1.128	1.218	0.289	0.380	1.185	0.043	0.044	0.045	0.040	0.044
H	0.240	0.535	0.993	0.387	1.227	0.296	0.320	0.039	0.044	0.049	0.044	0.047

Appendiks 2

Protein pierce standard

Absorbansen til BCA protein standarder plottet mot konsentrasjonene.

Abs	µg/ml
0,00	0
0,04	25
0,10	125
0,17	250
0,29	500
0,42	750
0,58	1000
0,90	1500
1,16	2000



Appendiks 3

Likningen fra BCA protein standarder ble brukt for å finne konsentrasjonene til de ukjente prøvene.

Prøver	ABS	Abs - 0	konsent,	Fortynning	µg/ml	mg/ml	snitt mg/ml
1 Kontroll-DMSO, 25µL	1,12	0,95	1637,13	1	1637,13	1,64	
2 Kontroll-DMSO, 5µL	0,35	0,19	306,97	5	1534,83	1,53	
3 Kontroll-DMSO, 2,5µL	0,27	0,11	173,22	10	1732,20	1,73	1,63
4 Kontroll+DMSO,5min, 25µl	1,22	1,06	1811,01	1	1811,01	1,81	
5 Kontroll+DMSO,5min, 5µl	0,39	0,23	374,49	5	1872,46	1,87	
6 Kontroll+DMSO,5min, 2,5µl	0,29	0,13	207,16	10	2071,62	2,07	1,92
7 Kontroll+DMSO,30min, 25µL	1,15	0,99	1696,35	1	1696,35	1,70	
8 Kontroll+DMSO,30min, 5µl	0,37	0,21	347,86	5	1739,29	1,74	
9 Kontroll+DMSO,30min, 2,5µl	0,28	0,12	187,52	10	1875,16	1,88	1,77
10 Aicar-DMSO, 2min, 25µL	1,09	0,93	1596,45	1	1596,45	1,60	
11 Aicar-DMSO,2min, 5µl	0,35	0,19	310,52	5	1552,62	1,55	
12 Aicar-DMSO,2min, 2,5µl	0,29	0,13	200,02	10	2000,19	2,00	1,72
13 Aicar+DMSO,2min, 25µl	1,19	1,02	1755,43	1	1755,43	1,76	
14 Aicar+DMSO,2min, 5µl	0,32	0,16	255,33	5	1276,63	1,28	
15 Aicar+DMSO,2min, 2,5µl	0,29	0,13	198,23	10	1982,33	1,98	1,67
16 Aicar+CC,2min, 25µl	1,23	1,07	1826,15	1	1826,15	1,83	
17 Aicar+CC,2min, 5µl	0,37	0,21	338,97	5	1694,86	1,69	
18 Aicar+CC,2min, 2,5µl	0,27	0,10	158,92	10	1589,17	1,59	1,70
19 Aicar+DMSO,5min, 25µl	1,21	1,05	1792,50	1	1792,50	1,79	
20 Aicar+DMSO,5min, 5µl	0,37	0,21	349,63	5	1748,17	1,75	
21 Aicar+DMSO,5min, 2,5µl	0,25	0,09	128,50	10	1284,98	1,28	1,61
22 Aicar+CC,5min, 25µl	1,23	1,06	1824,47	1	1824,47	1,82	
23 Aicar+CC,5min, 5µl	0,38	0,22	362,07	5	1810,33	1,81	
24 Aicar+CC,5min, 2,5µl	0,30	0,13	212,52	10	2125,17	2,13	1,92
25 Aicar+DMSO,10min, 25µl	1,16	1,00	1718,31	1	1718,31	1,72	
26 Aicar+DMSO,10min, 5µl	0,37	0,21	344,30	5	1721,52	1,72	
27 Aicar+DMSO,10min, 2,5µl	0,27	0,11	160,70	10	1607,05	1,61	1,68
28 Aicar+CC,10min, 25µl	1,20	1,03	1773,97	1	1773,97	1,77	
29 Aicar+CC,10min, 5µl	0,36	0,20	331,86	5	1659,32	1,66	
30 Aicar+CC,10min, 2,5µl	0,27	0,10	157,13	10	1571,28	1,57	1,67

Prøvepreparering for gel elektroforese:

	kontroll- DMSO	Kontroll+DMSO,5min	Kontroll+DMSO,30min	Aicar-DMSO,2min	Aicar+DMSO,2min
Sample	18,47	15,74	17,05	17,59	18,06
BIO-RAD XT sample	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Deionized water	0,28	3,01	1,70	1,16	0,69
Total volume	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00

	Aicar+CC,2min	Aicar+DMSO,5min	Aicar+CC,5min	Aicar+DMSO,10min	Aicar+CC,10min
Sample	17,72	18,77	15,72	17,95	18,10
BIO-RAD XT sample	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Deionized water	1,03	-0,02	3,03	0,80	0,65
Total volume	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00