

13/6 2011 -25/2 2012
Stockholms Universitet
Södra Latins Gymnasium
Handledare:
Robert Csikasz
Jenny Alpsten

Muskelvävnad som modellsystem i diabetesforskning

Sara Scheibenpflug

Sammanfattning

Frågeställningen har varit om det går att öka koncentrationen av en glukotransportör (GLUT-4) vid cellmembranet i muskelceller genom att stimulera dessa med 3 olika substanser. Detta skulle i sådana fall öka cellens förmåga att ta upp socker ur boded. Våra experiment bestod av att först odla celler från en cell-linje (L6, råtta) och sedan stimulera dessa med insulin, isoprenalin och shikonin. För att få fram resultatet i form av bilder använde vi oss av immunocyto kemi och konfokalmikroskopi. Vi fick positiva resultat för både isoprenalin och shikonin. Våra prover med insulin och basal gav inga resultat och kommer därför inte att visas i rapportens resultatdel. I slutsatsen diskuterar jag för och nackdelar med en medicin mot diabetes samt felkällor till undersökningen.

Innehållsförteckning

Sammanfattning	2
1. Inledning.....	4
1.1 Bakgrund	4
1.1.1 Basal	5
1.1.2 Insulin.....	5
1.1.3 Isoprenalin.....	5
1.1.4 Shikonin	5
1.2 Immunocytokemi.....	6
1.3 Frågeställning	6
2. Material och metod.....	7
2.1 Odling och splittning	7
2.2 Stimulering	8
2.3 Immunocytokemi.....	9
3. Resultat/iakttagelser	10
3.1 Isoprenalin	10
3.2 Shikonin.....	10
4. Slutsats	11
4.1 Diskussion	11
4.2 Felkällor.....	12
5. Avtackande.....	12
6. Citerade arbeten.....	13
6.1 Bilder:	14
7. Bilaga 1	15

1. Inledning

1.1 Bakgrund

I dagläget är fetma och diabetes ett av våra största hälsoproblem. Fallen ökar lavinartat och vår livsstil som är den främsta bidragande faktorn ser inte ut att förändras nämnvärt inom den närmsta framtiden. De som lider av diabetes typ-2 kan inte längre ta upp socker ur blodet lika effektivt som en följd av att deras celler med tiden blivit allt mer okänsliga mot insulin. Bästa hjälpen mot typ-2 diabetes är idag ändrade kostvanor, motion och i vissa fall metformin men snart kan vi ytterligare en lösning. (1)

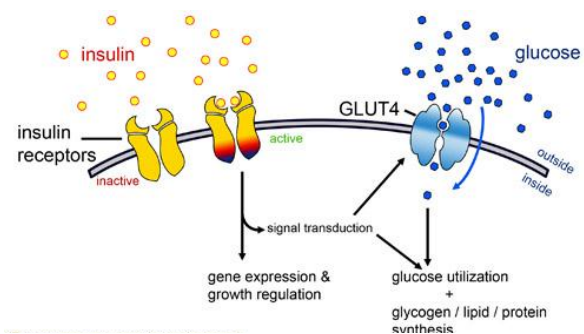
För att förstå hur vårt sockerupptag sker så måste man även veta lite om hur våra celler är uppbyggda. Vi människor har celler som består av flera olika delar och som innehåller många komplexa komponenter. Men om man förenklar det så kan man säga att cellen består av en kärna och flertalet organeller som innesluts av ett membran vars uppgift är att skydda och hålla ihop cellen. Membranet, som är uppbyggt av proteiner och lipider, sköter transporten av ämnen in och ut från cellen men på membranet finn det även cellens receptorer. (2)

Receptorer är speciella molekyler, oftast i form av protein, som binder till signalsubstanser. Receptorn är oftast utformad på ett sådant sätt att det bara är en unik signalsubstans som kan fästa vid den, den reagerar alltså på endast ett ämne. När signalsubstansen sedan möter receptorn kommer de att bindas till varande vilket triggar en signal som skickas in i cellen.

(3)

I människokroppen styrs sockerupptaget av hormonet insulin. Det produceras i bukspottskörteln då det finns socker i blodet och det är ett såkallat peptid hormon vilket innebär att insulinmolekylen är en kedja av aminosyror (4). Insulinet binder sedan till

insulinreceptorn som finns på cellernas membran vilket sätter igång en kedjeaktion i cellen. Denna reaktion, som kallas insulinvägen, avslutas med att glukostransportör 4 (GLUT-4), ett protein vars uppgift är att flytta in socker från blodet till cellen (5), aktiveras och rör sig mot cellmembranet. (6) Men de som lider av diabetes typ-2 har muskelvävnad som är relativt okänsliga mot insulin vilket gör att GLUT-4 inte stimuleras till att ta upp glukos ur blodet, insulinvägen fungerar alltså i sämre utsträckning. (7)



1: Schematisk bild över reaktionen som sker då GLUT-4 aktiveras

Mitt projekt har gått ut på att undersöka om man kan aktivera GLUT-4 med något annat sätt och därigenom hitta ett alternativ till insulinvägen. De preparat som jag valde för att stimulera muskelceller med var basal, insulin, isoprenalin och shikonin.

1.1.1 Basal

Basal är detsamma som destillerat vatten. Proven som vi preparerat med basal används alltså som kontrollprov att jämföra de andra försöken med.

1.1.2 Insulin

Insulin är ett peptid hormon som bildas i de langerhanska öarna i bukspottskörteln och det används för att reglera glukoshalten i kroppen. Detta sker då insulinet aktiverar en insulinreceptor på cellens yta som i sin tur ser till att GLUT-4 flyttas upp till cellmembranen. Det är alltså det hormon som är den naturliga regleraren av vårt glukosupptag. (8) Anledningen till att vi gjorde försök med insulin var att vi då kan jämföra effekten av de alternativa metoderna relativt insulin.

1.1.3 Isoprenalin

Isoprenalin är en syntetiskt framställd adrenerg drog. Den är en agonist vilket betyder att den har en stimulerande effekt och binder nästan uteslutande till betareceptorer. Då dessa receptorer aktiveras ökas ämnesomsättningen i kroppen vilket då också påverkar GLUT-4. Beta3-receptorn sitter utanpå muskelceller och då den aktiveras skickar den protein genom cellmembranet som aktiverar GLUT-4. (9)

1.1.4 Shikonin

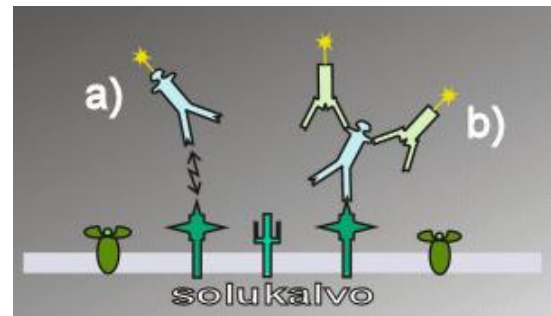
Shikonin är ett ämne som kommer från en växt vars rot ofta används i traditionella kinesiska mediciner. Den är antiinflammatorisk och har också antitumöriska effekter. Hur shikoninet faktiskt påverkar cellernas glukosupptag är ännu inte helt känt. Tidigare studier har dock visat att upptaget av glukos ökar trots okänslig insulinreceptor vilket tros bero på att shikoninet ökar upptaget av kalcium som är viktigt för reaktionen som aktiverar GLUT-4. (6)

1.2 Immunocytokemi

Immunocytokemi är en metod som går ut på att en märkt antikropp binder till en specifik antigen vilket gör att vi på lite olika sätt kan spåra den.

Vid indirekt immunocytokemi, vilket var den metod som vi använde för att få ett resultat i form av bilder, tillsätter man först en primär antikropp som binder till antigenen, som i vårt fall GLUT-4 protein ute vid cellens membran,

och till denna binder sedan den märka sekundära antikroppen. Den indirekta metoden med två antikroppar är mycket känsligare än den direkta där den primära antikroppen är märkt, men anledningen till att vi använde den indirekta är att flera märkta antikroppar kan binda till varje antigen vilket ger ett tydligare resultat (10)



2: a) Direkt immunocytokemi
b) Indirekt immunocytokemi

I vårt fall har den sekundära antikroppen en märkning i form av en fluorofor vilket är en molekyl som har förmågan att omvandla kortvågig strålning till långvågig strålning i form av synligt ljus. Detta går till på så sätt att den tillförda strålningen exciterar atomer i fluoroforen och den emitterar då synligt ljus. (11) Vi använde konfokalmikroskopi för att framkalla bilder av våra prover. Det är en metod som bygger på att vi bestrålar proverna med laser och sedan registrerar mängden ljus som fluorescerar från provet och man får då en bild som fungerar som ett optiskt snitt av det man undersökte. (12)

1.3 Frågeställning

Är det möjligt att öka mängden GLUT-4 i muskelcellers cellmembran och därigenom öka cellernas sockerupptag genom att stimulera dem med insulin, isoprenalin eller shikonin?

2. Material och metod

Genomförandet av undersökningen av vår frågeställning har bestått av tre delar. Först odlade vi celler till försöken och sedan stimulerade vi dessa med ett fåtal droger. För att kunna få ett avläsbart resultat av försöken använde vi oss av immunocytokemi och konfokalmikroskopi efter stimuleringen.

2.1 Odling och splittning

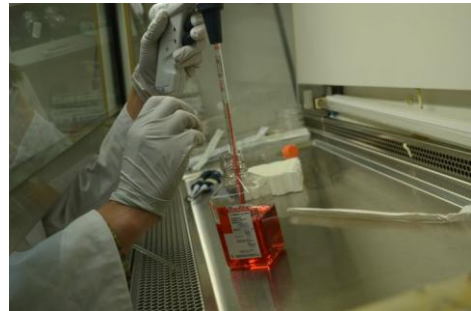
I våra försök har vi använt celler av typen L6-GLUT4myc. Det är en cellinje som kommer från råttor och där glukotransportören vi har tittat på i våra försök är myc-taggade. Det innebär att cellerna är modifierade så att alla GLUT-4 proteiner kan bindas till en speciell antikropp som i sin tur binder till ett substrat eller en sekundär antikropp.

När vi odlade våra celler så förvarade vi dem i en platt odlingsflaska i plast som vi lade in i en inkubator. En inkubator är ett slags värmeskåp där man har möjlighet

att reglera luftfuktighet och koldioxidhalt, så den ger oss möjlighet att skapa en miljö som är gynnsam för cellerna. Men för att cellerna ska överleva och kunna dela sig så har vi även en näringsvätska, ett så kallat cellodlingsmedium, i odlingsflaska för att det ska lika cellernas ”naturliga miljö”. Vad mediet består av varierar beroende på vilka celler man odlar eftersom olika sorter har olika behov.



3: Inkubator



4: Cellmedium

När våra celler delat sig tillräckligt länge tog vi ut odlingsflaskan och kontrollerade att cellerna levde genom att undersöka cellodlingsflaskan i ett ljusmikroskåp. Då vi konfirmerat att cellerna fortfarande lever så suger vi ut mediet ur odlingsflaskan och tillsätter trypsin. Trypsin är ett enzym som återfinns naturligt i människans matspjälkningssystem och som spjälkar proteiner, då enzymet tillsätts lossar cellerna sina bindningar från odlingsytan. Detta tar ungefär 10 minuter och vi förvarar hela tiden odlingsflaskan i inkubatorn. Vi kontrollerar att cellerna lossnat i ett ljusmikroskop och flyttar sedan över blandningen av celler och

trypsin till ett falconrör med hjälp av en pipett. För att kunna isolera cellerna så centrifugerar vi vårt falconrör i en hastighet med en hastighet av 2000 varv/minuten. Eftersom cellerna är tyngre än trypsinet kommer det att bildas två lager i röret, ett undre med celler och ett övre med trypsin. Då detta skett kan vi med hjälp av en luftsug försiktigt suga ut trypsinet så att det endast är celler kvar i behållaren. Först då kan man tillsätt nytt medium och man får pelleten av celler att lösas upp genom att man vortexar falconröret vilket i princip innebär att du får röret att vibrera så att innehållet blandas. Anledningen till att man måste byta medium hos cellerna är för att de ständigt behöver ny näring för att kunna fortsätta leva i odlingsflaskan.

Efter att man bytt medium kan man välja vilken slags behållare man vill flytta cellerna till. Vill man fortsätta odla fram fler celler späder man ut lösningen och fördelar i odlingsflaskor men om man har tillräckligt med celler placerar man dem i lämpliga behållare för försöken. I våra försök använde vi en slide med åtta brunnar, så vi satte en del av cellerna i den till våra senare försök samt satte tillbaka en del i en odlingsflaska. Detta gjorde vi för att hålla liv i cellerna om vi skulle ha behov av att använda fler celler av denna typ i senare försök.

2.2 Stimulering

Före vi stimulerar våra celler så rengör vi behållarna för att avlägsna alla rester av cellmediet. Efter det täcker vi cellerna med såkallat ”starvation media”, det är ett medium som tar bort onödiga serum som bildats under odlingstiden utan att själva cellerna påverkas. Cellodlingsflaskorna med det nya mediet förvaras i inkubator över natten för att det ska ha tid att verka. Dagen efter avlägsnar vi mediet och placerar våra celler i en mikroplatta med sex brunnar. Därefter stimulerar vi med basal, insulin(1uM), isoprenalin(1uM) samt shikonin(1uM). Vi låter därefter preparaten få verka i två timmar.



5: Microplatta med 6 brunnar

Innan vi kan börja med att färga in våra celler måste vi se till att fixera dem. Först så rengör vi cellerna med PBS som är en saltlösning som gör att provets pH och osmolaritet hålls på en jämn nivå. Sedan så tillsätter vi 4 % formaldehyd(1ml 36 % formaldehyd i 9ml PBS) för att cellerna ska bevaras i sitt nuvarande stadium. Efter det så tvättar vi återigen med PBS och tillsätter 50mM glycin och låter det stå i tio minuter. Avlägsna glycinet och tvätta återigen med PBS, blocka sen med BSA(5 % BSA i PBS) under en timme. Både glycin och PBS har effekten att ta bort ospecifika bindningar som uppstått i cellprovet. Då detta är gjort är cellerna klara för nästa steg.

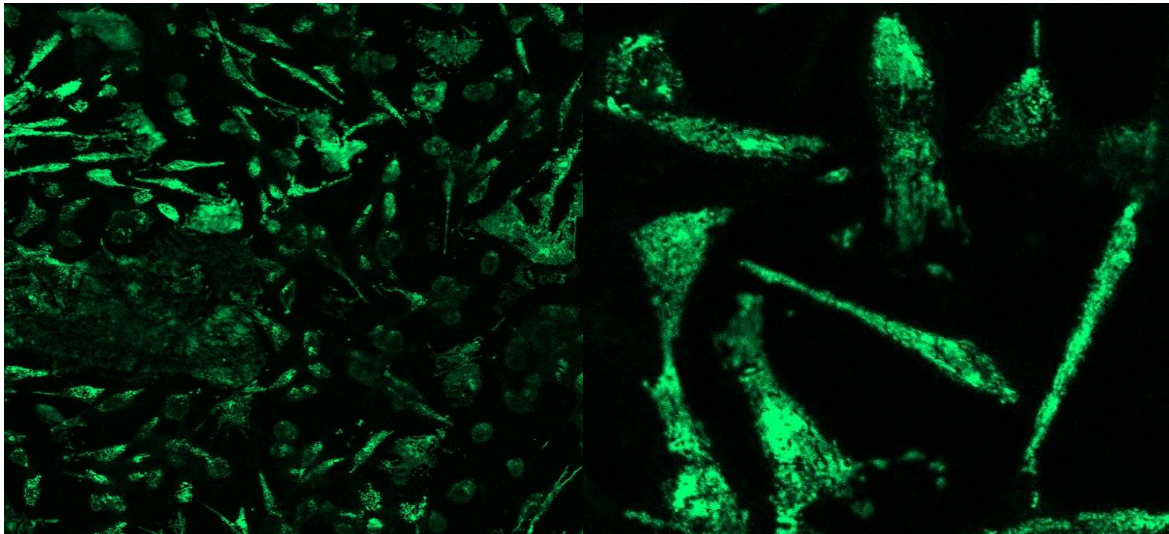
2.3 Immunocytokemi

Vi börjar med att tillsätta den primära antikroppen(anti-myc 1:200 i PBS) och inkuberar sedan provet. Rengör därefter proverna med PBS och tillsätt den sekundära antikroppen(Alexa 488 anti-rabbit 1:500 i PBS) och låter proverna stå i en timme. Sedan tar vi ut vår mikroplatta och rengör återigen med PBS och tillsätter tillsist vectashield för att proverna inte ska förlora sin fluorescerande förmåga. (13)

3. Resultat/iakttagelser

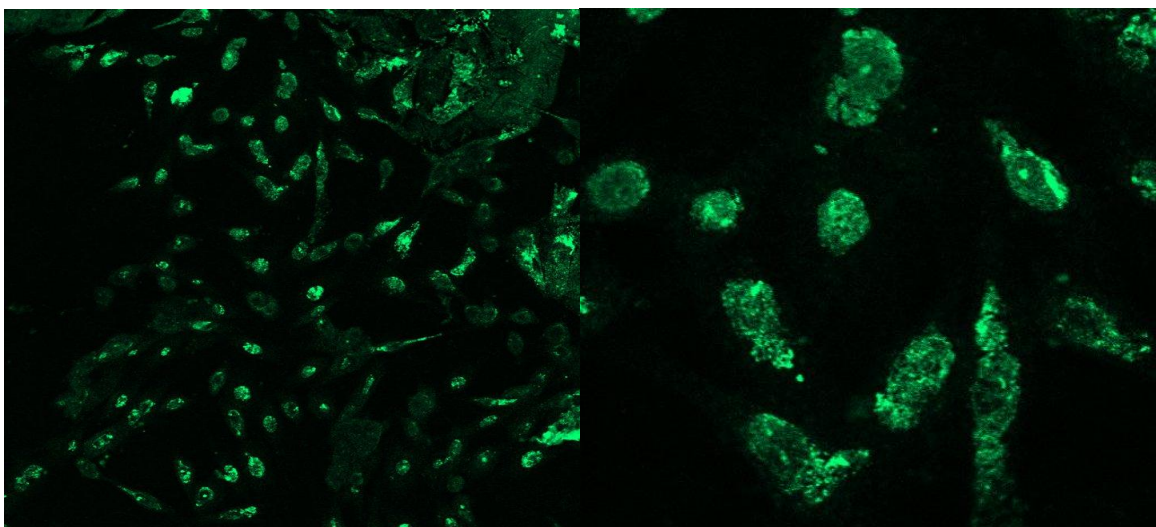
Vi fick vårt resultat i form av bilder från ett konfokalmikroskop (LSM 510 meta Zeiss, 488 nanometer) där man kan se fluorescensen som de myc-taggade GLUT-4 ute vid cellmembranen avger. Det innebär att ju starkare det gröna ljuset är desto fler glukostransportörer har aktiverats och förflyttats till cellmembranet och därför kan vi tolka bilderna vi får.

3.1 Isoprenalin



6: *Flourosensen som avges från muskelceller efter stimulering med isoprenalin. Till vänster med förstoringen 20x och till höger med 63x*

3.2 Shikonin



7: *Flourosensen som avges från muskelceller efter stimulering med shikonin. Till vänster med förstoringen 20x och till höger med 63x*

4. Slutsats

4.1 Diskussion

Målet med vårt projekt har varit att utreda huruvida det är möjligt öka muskelcellers glukosupptag genom att använda andra vägar än insulinvägen såsom adrenerga agonister och shikonin.

Våra resultat tyder på att både isoprenalinet och shikoninet tycks aktiverat koncentrationen GLUT-4 vid cellmembranen vilket syns på bilderna i form av grönt ljus. Vi ser också att dessa substanser har stor verkan på muskelcellerna vilket syns då man jämför med resultatet som fås vid stimulering med insulin eller basal¹ Detta visar att det med stor säkerhet finns flera metoder att aktivera glukotransportörerna där man inte använder sig av insulinvägen. De övriga proverna (insulin och basal) gav inga resultat alls och vi kan därför inte använda oss av dem i undersökningen.

Om det visar sig att någon av de substanser vi har använt i försöken skulle vara lämpliga som en medicin så skulle det vara ett steg mot att hjälpa miljoner människor till ett bättre liv. Diabetes skulle då inte längre vara ett lika stort problem för vår folkhälsa, både nationellt och globalt. En sådan upptäckt skulle såklart inte bara påverka den allmänna hälsan utan också påverka oss ekonomisk eftersom vi då inte längre behöver använda lika stora resurser till de som lider av denna sjukdom.

Trots det är jag av åsikten att behandlingar med enbart mediciner är fel väg att gå. Självklart behöver patienterna något som kan lindra men jag tror att en medicin kan få många att tappa fokus från en i övrigt hälsosam livsstil vilket är något som har stor påverkan för diabetessjuka. I många fall är det just livsstilen som lett till diabetes och min åsikt är att det är bättre att fokusera på orsaken till en sjukdom än att bara försöka lindra symptomen. Därför tycker jag att en medicin mot diabetes ska användas sparsamt och i kombination med ändrade kostvanor och motion, detta för att både lindra patientens problem och samtidigt bekämpa själva orsaken till sjukdomen.

¹ Bilder på flouoscensen som fås vid sådana stimuleringar vid andra försök finns dock bifogade i en bilaga.

4.2 Felkällor

Men även om det nu är så att vi har lyckats öka cellernas glukosupptag så behöver det inte betyda att det kan vara en medicin för diabetes typ-2. Främst för att vi gjort våra försök på celler som härstammar från råttor samt att vi inte vet hur dessa substanser påverkar vår kropp i övrigt, som eventuellt farliga biverkningar. Dessutom måste man undersöka hur stor mängd av substanserna det behövs för att de ska ge någon effekt samt om det är ekonomiskt möjligt att använda dessa som medicin.

Eftersom vi bara har haft tid att göra ett försök så finns det många möjliga felkällor. Den första är just att vi bara har gjort ett försök, hade vi gjort fler prover är det möjligt att vi hade fått helt andra resultat än de vi fick nu. Våra prover bestod dessutom av väldigt många celler, en stor del av dessa dog därför och det är möjligt att dessa har påverkat resultatet.

Våra försök med insulin misslyckades helt. Vi i gruppen var inte säkra på varför men en rimlig teori är att insulinet var gammalt eller dåligt. Vi misstänker att det var orsaken eftersom båda proverna med insulin var helt förstörda. Därför kan vi inte heller se skillnaden mellan insulin och de andra drogerna. Vi kan alltså inte göra en adekvat bedömning gällande hur bra de andra drogerna verkar relativt insulinet. Inte heller provet med basal gav något resultat vilket vi tror beror på att det var för hög andel celler i provet vilket gjorde att de dog.

5. Avtackande

I första hand vill jag rikta mina tack till två personer som gjorde min tid på forskningskolan möjlig samt så otroligt bra och intressant. Dels min kemilärare Eva Allard, som fick mig att söka, samt min mycket inspirerande handledare Robert Csikasz som under två veckor lärde mig mer än jag trodde var möjligt. Inte nog med att det var lärorikt, dessa två veckor gav mig dessutom en unik möjlighet att få insyn i forskarvärlden och uppleva hur det är att arbeta på lab.

Vidare vill jag även tacka Agneta Norén och Stockholms Universitet för att de anordnar forskningskolan.

6. Citerade arbeten

1. FASS. *Metoformin Actavis*. [Online] [Citat: den 19 12 2011.]
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produkt.jsp?NplID=19960927000041&DocTypeID=3&UserTypeID=0.
2. Nationalencyklopedin. *Cell*. [Online] [Citat: den 19 12 2011.]
<http://www.ne.se/lang/cell/142408>.
3. Nationalencyklopedin. *Receptor*. [Online] <http://www.ne.se/lang/receptor>.
4. Nationalencyklopedin. *Peptid*. [Online] <http://www.ne.se/lang/peptid>.
5. Nationalencyklopedin. *Protein*. [Online]
http://www.ne.se/lang/proteiner?i_h_word=glukostransport%C3%B6rer.
6. **Oberg AI, Yassin K, Csikasz RI, Dehvari N, Shabalina IG, Hutchinson DS, Wilcke M, Ostenson CG, Bengtsson T.** Shikonin increases glucose uptake in skeletal muscle cells and improves plasma glucose levels in diabetic goto-kakizaki rats.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>. [Online] [Citat: den 26 07 2011.]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144218/?tool=pubmed>.
7. Nationalencyklopedin. *Diabetes*. [Online] [Citat: den 4 09 2011.]
http://www.ne.se/school/diabetes/typ-2-diabetes?i_h_word=diabetes+typ+2.
8. Nationalencyklopedin. *Insulin*. [Online] [Citat: den 19 6 2011.] www.ne.se.
9. Drugs.com. *Isoprenaline*. [Online] [Citat: den 19 6 2011.]
<http://www.drugs.com/pro/isuprel.html>.
10. Solunetti. *Immunocyto kemi*. [Online] [Citat: den 20 12 2011.]
<http://www.solunetti.fi/se/solubiologia/immunosytokemia/2/>.
11. Solunetti. *Flourescensmikroskopi*. [Online] [Citat: den 07 01 2012.]
<http://www.solunetti.fi/se/solubiologia/fluoresenssimikroskopia/2/>.
12. Biologiska institutionen Lunds Universitet. *Konfokalmikroskopi*. [Online] [Citat: den 19 12 2011.] <http://www.lu.se/o.o.i.s/29577>.

13. Vecor Labs. *VECTASHIELD*. [Online] [Citat: den 08 01 2012.]

<http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=279>.

14. **Kiyomi Nigorikawa, Kyoko Yoshikawa, Tomo Sasaki, Eiji Iida, Mariko Tsukamoto, Hitomi Murakami, Tomohiko Maehama, Kaoru Hazeki, Osamu Hazeki.** A

Naphthoquinone Derivative, Shikonin, Has Insulin-Like Actions by Inhibiting Both Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 and Tyrosine Phosphatases.

Molecular Pharmacology. [Online] [Citat: den 24 06 2011.]

<http://molpharm.aspetjournals.org/content/70/3/1143.full>.

15. Betareceptorer. *Nationalencyklopedin*. [Online] [Citat: den 04 07 2011.]

<http://www.ne.se/lang/betareceptorer>.

6.1 Bilder:

Figur 1(GLUT-4): <http://www.dolcera.com/wiki/images/Image12.jpeg>

Figur 2(Direkt och indirekt immunocytochemi):

http://www.solunetti.fi/tiedostot/kuvat_solubiologia/Tutkimus/piirroksia/antibody_leimaus_2p.gif

Figur 3(Inkubator): Sara Scheibenpflug

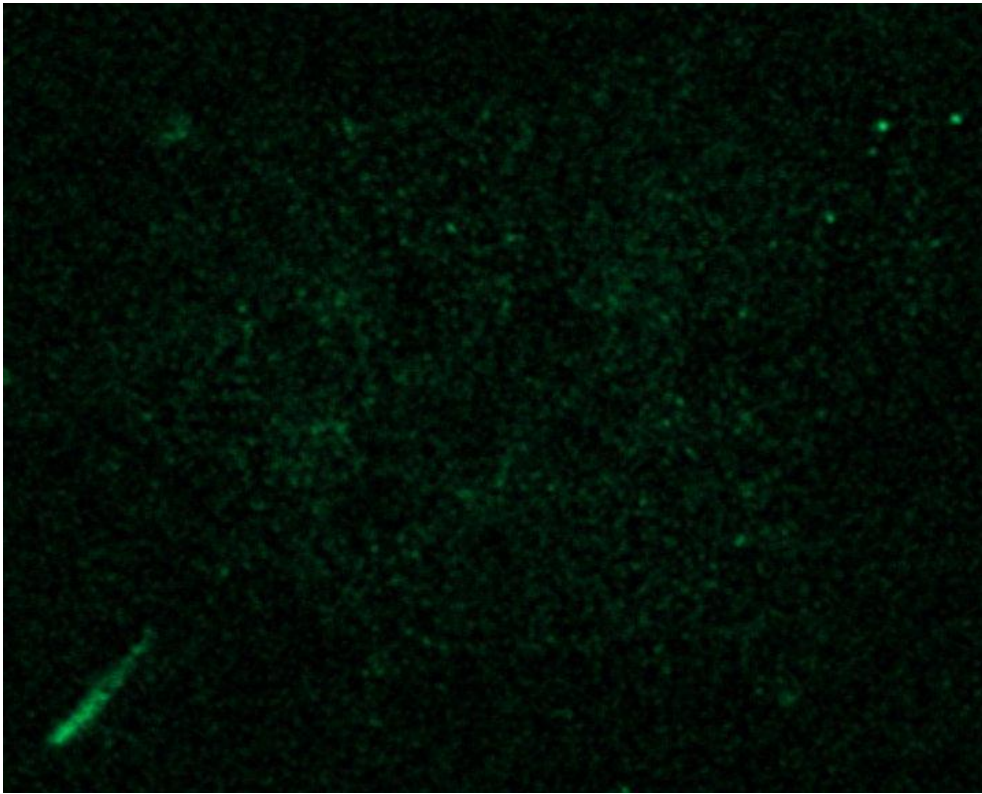
Figur 4(Medium): Sara Scheibenpflug

Figur 5(Microplatta): <http://www.scientistlive.com/media/images/porvairpr346-image.jpg>

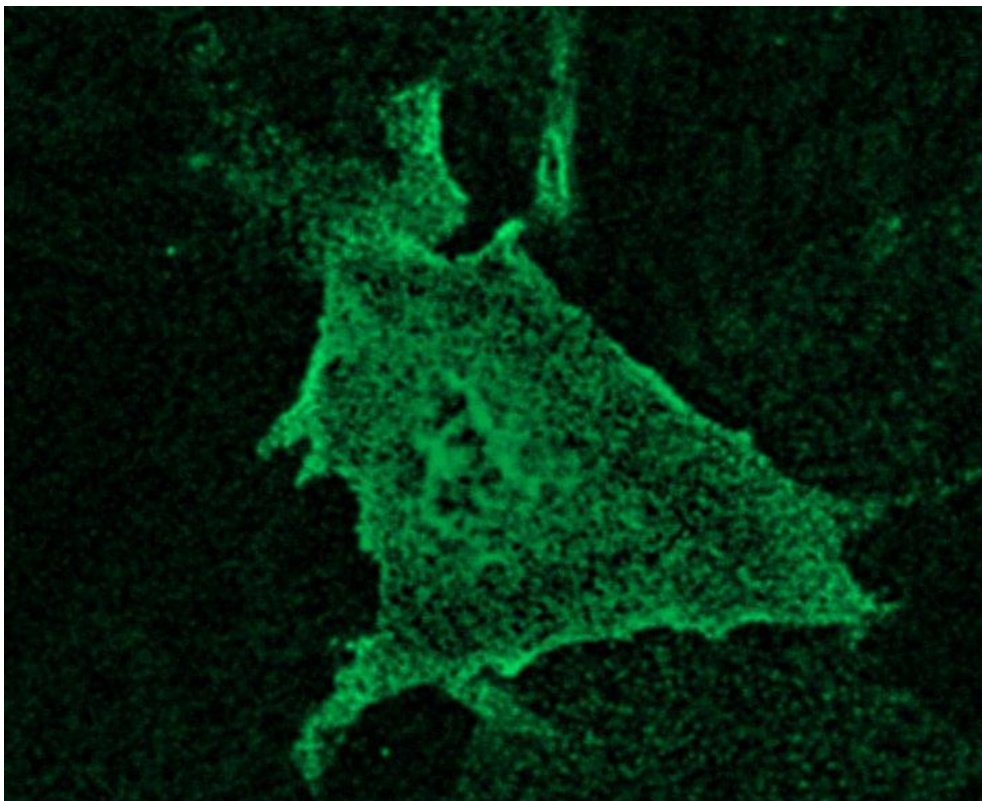
Figur 6(isoprenalin): Sara Scheibenpflug

Figur 7(shikonin): Sara Scheibenpflug

7. Bilaga 1



8. *Flouoscens efter stimulering med basal. 63x förstoring.*



9. *Flouoscens efter stimulering med insulin. 63x förstoring.*