UMEÅ UNIVERSITET

BIOMEDICINSK
ANALYTIKERPROGRAMMET

Reglering av sfingomyelincykeln i olika skelettmuskler under dietinducerade förhållanden

Thea Zakrisson

Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp
VT 2024

Institutionen för Klinisk mikrobiologi
Biomedicinsk analytikerprogrammet

UMEÅ UNIVERSITET

Examensarbete, 15 hp
Kursansvarig: Urban Hellman
urban.hellman@umu.se

Regulation of The Sphingomyelin Cycle in Various Skeletal Muscles under Diet-induced Conditions

Handledare

Mikael Flockhart, Institutionen för folkhälsa och klinisk medicin

Läraropponent:	Helena Lindgren
Examinator:	Urban Hellman
Datum för godkännande:	2024 06 13

Abstrakt

Typ 2 diabetes är ett globalt folkhälsoproblem som karakteriseras av insulinresistens i cellerna, men mekanismerna som inducerar insulinresistens är ej klarlagda. En sannolik mekanism vid överviktsrelaterad insulinresistens är ökad lipidackumulering i skelettmuskulaturen. Specifika bioaktiva sfingomyelin och ceramider, vars närvaro anses påverka insulinsignaleringen, har en betydande roll. Utöver detta har skelettmuskulaturens sammansättning av typ I- och typ II-muskelfibrer visats påverka insulinkänslighet. Syftet var att studera om de enzymer som reglerar sfingomyelin- och ceramidnivåer åtskildes mellan möss givna en högfettsdiet och de givna kontrolldiet, samt att undersöka om skillnader förekom mellan skelettmuskler med olika muskelfibertypsdistribution. I studien ingick skelettmusklerna soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL) och vastus lateralis (Vas). Enzymer involverade i regleringen av ceramid- och sfingomyelinnivåer mättes med western blot. Tydliga skillnader avseende proteinmängd mellan muskeltyperna erhölls, men däremot inte mellan lågfetts- och högfettsdiet grupperna. Uttrycket av sphingomyelin syntase (SGMS) 1 och sphingomyelin phosphodiesterase (SMPD) 1 var högre i Sol jämfört med Vas och EDL, medan uttrycket av SGMS2 och SMPD4 var högre i Vas än i Sol och EDL. Uttrycket av SMPD3 åtskildes inte markant mellan muskeltyperna. Konklusionen var att uttrycket av de huvudansvariga enzymen i sfingomyelin/ceramidcykeln varierade mellan olika skelettmuskler, men att uttrycket inte påverkades av övervikt och insulinresistens.

Nyckelord

Typ 2 diabetes, insulinresistens, sfingomyelincykeln, ceramider, skelettmuskulatur, muskelfiberdistribution, western blot.

Introduktion

Typ 2 diabetes är en allvarlig och växande hälsoutmaning som har en omfattande inverkan på hälso- och sjukvårdsystemet runt om i världen. Det estimerades att den globala prevalensen för diabetes år 2014 översteg 400 miljoner varav 95 % av fallen utgjordes av typ 2 diabetes. Sjukdomen karaktäriseras av hyperglykemi, till följd av otillräcklig insulinproduktion från bukspottskörteln eller insulinresistens, vilket innebär en nedsatt insulinkänslighet i kroppens celler. Typ 2 diabetes induceras genom en kombination av genetiska predispositioner och miljöfaktorer, inklusive fetma, fysisk inaktivitet och ohälsosamma kostvanor. Sjukdomen medför en ökad risk för bland annat kardiovaskulära sjukdomar samt njursjukdomar. Under 2019 uppskattades diabetes och njursjukdomar till följd av diabetes orsakat 2 miljoner dödsfall. Dessutom estimerades hyperglykemi ha orsakat 20% av hjärt-kärldödsfall (1).

Trots stora forskningsinsatser saknas fortfarande en fullständig förståelse gällande de mekanismer som inducerar insulinresistens samt den efterföljande utvecklingen av typ 2 diabetes. En trolig mekanism är ökad ackumulering av bioaktiva lipidarter som ceramider i skelettmuskulaturen (2). Vid fetma kan fettvävnaden frigöra ett överskott av cirkulerande fria fettsyror (FFA), vilket orsakar ektopisk inlagring i olika vävnader och organ, inklusive skelettmuskulaturen (3). Ektopiska FFAs kan därefter metaboliseras till varierande lipidarter som ceramider, genom en process som kallas sfingomyelincykeln, vilken är en del av sfingolipidmetabolismen (Fig. 1). Denna process grundas i bildning av bland annat ceramider i cellers endoplasmatiska retikulum (ER), vilka transporteras vidare via ceramide transfer protein till Golgi-apparaten. Där genereras sfingomyelin (SM) genom att fosfokolin överförs från fosfatidylkolin till ceramid, en process som utförs av sphingomyelin syntase (SGMS) (4).

Det finns huvudsakligen två SGMS-isoformer som uttrycks i kroppens celler; SGMS1 som är lokaliserad i Golgi-apparaten, och SGMS2 som främst förekommer vid plasmamembranet (PM) (Fig. 1). I PM lokaliseras ceramider som metaboliseras till SM via SGMS2 och bildar därigenom en SM-rik mikrodomän som reglerar signaltransduktion. Å andra sidan förekommer även sfingomyelinaser som hydrolyserar SM tillbaka till ceramider (4). Sfingomyelinaser som är involverade i patofysiologi kan delas in i två huvudgrupper, vilka inkluderar sura och neutrala sfingomyelinaser (5). Neutrala sfingomyelinaser har identifierats i ER, Golgi-apparaten och PM och innefattar bland annat sphingomyelin phosphodiesterase (SMPD) 3 och 4 medan sura sfingomyelinaser främst är lokaliserade i lysosomer och omfattar bland annat SMPD 1 (5–8). När sfingomyelinaser genererar ceramider i PM bildas en kaskad av bioaktiva lipider som styr cellsignalering. Även fast vissa delar av sfingolipidmetabolismen är relativt väl karaktäriserad, såsom biosyntesen av SM och ceramid, finns det fortfarande en hel del kvar att utforska (4). Hur bland annat SGMS och SMPD påverkas vid tillstånd av fetma är en av flera aspekter som bör studeras ytterligare.

Skelettmuskler är den största vävnaden för glukosupptag i kroppen. En nedsatt insulinkänslighet i skelettmuskulatur är därför en viktig indikator för hela kroppens insulinkänslighet. Ektopisk inlagring av ceramider och SM i skelettmuskulaturen betraktas påverka insulinsignaleringen och följaktligen

glukosupptaget i celler (9). Ceramider kan tex inhibera akt/protein kinas B-signalvägen och på så sätt minska glukosupptaget men det finns flera andra mekanismer (10). Utöver en ökad ackumulering av ceramider har det även påvisats att muskelfibersammansättningen har en betydande roll för utveckling av insulinresistens i skelettmuskler (11). Insulinresistens kan induceras i skelettmuskulatur genom att tilldela en diet med högt fettinnehåll under flera veckor eller månader. Detta har främst utförts på gnagare i forskningssyfte för att undersöka de cellulära mekanismerna bakom insulinresistens och typ 2 diabetes (12).

Skelettmuskulaturen är en heterogen vävnad bestående av olika typer av muskelfibrer med varierande metabola egenskaper (11). Muskelfibrer delas generellt upp i typ I- och typ II-fibrer, även benämnt långsamma respektive snabba muskelfibrer. Muskelfibrer klassificeras oftast baserat på den dominerande typen av myosin heavy chain (MYHC)-isoform som uttrycks, vilka hos gnagare inkluderar typerna I, IIa, IIb och IIx medan hos människor uttrycks MYHC-isoformerna typ I, IIa och IIx (13). Typ I muskelfibrer har en hög kapacitet för lagring och användning av ceramider på grund av deras höga mitokondrieinnehåll. De är även kända för sin resistens mot trötthet och förlitar sig på mitokondriell oxidativ fosforylering för bildandet av adenosintrifosfat (ATP). Typ II muskelfibrer är i stället konfigurerade för att använda glukos som primärt substrat för ATP-generering, och har ett lägre mitokondrieinnehåll. Typ IIb använder sig av glykolys för ATP-bildning, medan IIa och IIx använder både glykolys och mitokondriell oxidativ fosforylering. Detta resulterar i att dessa muskelfibrer erhåller sämre oxidativ kapacitet än typ I-muskelfibrer och har därmed kortare tid till utmattning (14). Nyligen har det framkommit att mänskliga försökspersoner med en hög andel typ II-muskelfibrer uppvisar sämre insulinkänslighet i jämförelse med individer med en typ I dominant muskelfiberdistribution, vilket indikerar att fibertypsdistribution direkt kan påverka en individs insulinkänslighet (15). Skelettmusklerna Soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL) och vastus lateralis (Vas) har varierande fibertypssammansättning. Soleus definieras som typ I-dominant, EDL som intermediär och Vas som typ II-dominant (Personlig kommunikation med Mikael Flockhart, Institutionen för folkhälsa och klinisk medicin, Umeå universitet).

Western blot är en molekylärbiologisk metod som används för kvalitativ eller semikvantitativ identifiering av specifika proteiner (16). Det är en teknik som varit av avsevärd betydelse inom biokemisk forskning under en lång tidsperiod. På senare tid har tillämpningen av western blot utvidgats till att omfatta studier av skelettmuskulatur, med avsikt att erhålla en djupare förståelse för muskelns fysiologi och patofysiologi (17).

Syftet var att undersöka om nivåerna av de enzymer som är involverade i sfingomyelincykeln åtskildes mellan möss givna högfettsdiet och given kontrolldiet med lågt fettinnehåll, samt om skillnader förekom mellan skelettmuskler med olika fibertypsdistribution.

Material och metoder

Skelettmuskler från möss

Provmaterialet var från första generations (F1) möss av hankön (A25-2023) som avlades genom att para CBA/CaCrl-möss av hankön (stam #609, Charles River Laboratories, Saffran Walden, Storbritannien) med C57BL/6J-möss av honkön (stam #000664, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Vid tio veckors ålder uppdelades F1-mössen randomiserat i två grupper, varav en grupp (n=8) tilldelades en kontrolldiet (lågfettsdiet, LFD) (CD, #1314, Altromin Spezialfutter GmbH & Co, Tyskland) och till den andra gruppen (n=10) gavs en högfettsdiet (HFD, 21,92 kJ/g och 60 E % fett, D12492, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ). Mössen hade fri tillgång till vatten och förvarades i en kontrollerad miljö med en 12:12h ljus/mörkercykel vid 22 °C och 50 % luftfuktighet. Mössens kroppsvikt mättes från start respektive vid nio veckor och en ökning i kroppsmassa observerades endast hos de möss som blivit behandlade med HFD. Det verifierades även att mössen givna en HFD var insulinresistenta med metoden homeostatic model assesment – insulin resistance. Efter nio veckors utfodring avlivades mössen och skelettmusklerna Sol, EDL och Vas isolerades. Vävnaderna rengjordes från blodkärl och blod, snabbfrystes i flytande kväve och lagrades vid -80 °C fram till analys.

Homogenisering av våt muskel

Det adderades tre rostfria 3,2 mm stålkulor (Next Advance, Troy, NY) och 25 µl homogeniseringslösning (2 mM hepes, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl2, 1 % Triton X-100, 50 mM β-glycerolphosphate, 2 mM dithiothreitol, 1x protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 1x phosphatase inhibitor cocktail (P-2850; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), pH 7,4) per mg muskel i respektive prov. Proverna homogeniserades med TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Tyskland) och placerades därefter på skakbord i 30 min vid 4 °C. Proverna centrifugerades vid 10 000 x g i tio min vid 4 °C och supernatanterna avsedda för western blot analys överfördes till nya rör och frystes in vid -80 °C. Pelleten som skulle användas för vidare analys med silver staining, tvättades med milli-Q vatten (MQ) och resuspenderades därefter med 500 µL MQ. Kvarvarande bindvävsmassa avlägsnades manuellt innan proverna centrifugerades, 10 000 x g i tio min vid 4 °C. Tvätt, resuspendering och centrifugering upprepades återigen och sedan löstes pelleten upp i 30 µl homogeniseringslösning per mg muskel. Dessa prover frystes sedan in vid -80 °C.

Proteinkoncentrationsbestämning

Proverna avsedda för western blot späddes 1:10 med ultrarent vatten, proverna avsedda för silver staining späddes ej. Proverna, Bovine Serum Albumin standarderna 1–6 (Thermo Fisher Scientific) och kontrollerna MQ och homogeniseringslösning tillsattes i triplikat på 96-brunnsplatta. Därefter adderades Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) till vardera brunn. Plattan placerades på skakbord i fem min innan absorbansen (abs) avlästes vid 660 nm med Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Medelvärdet för respektive triplikats abs-värden beräknades och därefter subtraherades abs-medelvärdet för kontrollerna från provernas abs-medelvärde. Proteinkoncentrationen i proverna bestämdes genom standardkurvans ekvation och R-värdet 0,99. Proverna till western blot bereddes genom att blanda 4x Laemmli Sample

Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA), 2-Mercaptoethanol (Bio-rad) och homogeniseringslösning med protein från muskel (90 % Laemmli, 10 % Mercaptoethanol, 10 µg protein). Silver staining proverna bereddes på samma sätt men med en mindre mängd protein (90 % Laemmli, 10 % Mercaptoethanol, 1 µg protein). Alla prover denaturerades därefter i fem min vid 95 °C.

Detektion av total protein följt av Western blot

Proteinerna separerades på 7,5 % Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel (Bio-Rad) genom elektrofores på 300V i 30 min och överfördes till Midi PVDF membran (Trans-blot Turbo Midi PVDF Transfer Packs, Bio-Rad) med Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad). För detektion av alla proteiner blottade till membranet, användes Pierce Reversible Protein Stain Kit för memcode infärgning och metoden utfördes enligt företagets protokoll (Thermo Fisher Scientific). Proteinerna på membranen visualiserades och framkallades med ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad). Innan vidare analys med immunodetektion avfärgades membranen med en lösning som bestod av lika mängd eraser (Pierce Reversible Protein Stain Kit) och metanol i 10–20 min. För att behandla membranen med separata antikroppar skars membranen mellan 35–150 kDa.

Vid immunodetektion blockerades membranen med blocklösning (5 % mjölkpulver, 1x TBS) under 60 min vid 4 °C. Membranen inkuberades sedan med rabbit anti-mus polyklonal primär antikropp specifik för antigen SGMS2 (PA5-26744), SMPD3 (PA5-117447), SMPD4 (PA5-110401) (Invitrogen, Waltman, MA), SGMS1 (19050-1-AP) eller SMPD1 (14609-1-AP) (Proteintech, Rosemont, IL), spädd enligt tillverkarnas instruktioner i mjölklösning (2,5 % mjölkpulver, 1x TBS, 0,1 % Tween 20), över natt på vickbräda vid 4 °C. Därefter tvättades membranen med mjölklösning i 2x1 min, följt av 3x5 min. Membranen inkuberades med sekundär antikropp HRP konjugerad anti-rabbit kappa-IgG (#7074, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), spädd 1/10 000 i mjölklösning, på vickbräda i en tim vid rumstemperatur. Efter inkubering tvättades membranen med mjölklösning i 2x1 min, följt av 3x15 min och sedan med tvättlösning (1x TBS) i 4x5 min. Bilder av membranen framkallades med Chemidoc Imaging System (Bio-rad).

För att kvantifiera mängden av respektive protein användes Image Lab Software (Bio-Rad). Först mättes bandintensiteten av total protein mellan 35–100 kDa efter memcode infärgning. Därefter mättes intensiteten av respektive inbundet protein efter immunodetektion. Kvoten mellan dessa beräknades; immunodetektion/memcode (intensitet x mm^2).

Statistik

Vid jämförelsen mellan muskeltyperna Sol, EDL och Vas användes repeated measures one-way ANOVA med Tukey post hoc test för att undersöka eventuella signifikanta skillnader mellan grupperna. De statistiska analyserna och skapande av figurer gjordes i Graph Pad prisma 10.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Ett p-värde på $<0,05$ ansågs statistiskt signifikant. Resultaten presenterades som medel ± standardavvikelse.

Etiska överväganden

Djurförsöken som beskrevs i denna studie utfördes enligt Riktlinjer för skötsel och användning av försöksdjur och godkändes av Djurprövningsnämnden vid Norra Norrlands Hovrätt i Umeå (diarienummer: A 4–219).

Resultat

Mängd SGMS i olika muskeltyper

Membranen färgades genom memcode för normalisering av proverna. En jämn färgning erhölls med minimalt antal luftbubblor som ej störde resultaten (Fig. 2). Efter immunodetektion med antikroppar riktade mot SGMS1 observerades proteinband vid 50 kDa för samtliga membran (Fig. 3A). Inga betydande skillnader avseende uttryck av SGMS förekom vid jämförelse mellan dietgrupperna (Fig. 3). Vid jämförelse mellan muskeltyperna erhölls ett ökat uttryck av SGMS1 i Sol inom respektive dietgrupp. En signifikant ökning av SGMS1-uttryck erhölls i Sol jämfört med EDL respektive Vas inom LFD-gruppen (n=8) (p <0,01) (Fig. 3A). Inga signifikanta skillnader observerades däremot mellan EDL och Vas. För mössen behandlade med HFD (n=10) påvisades inga signifikanta skillnader mellan muskeltyperna (Fig. 3A).

Proteinband uppkom vid 50 kDa för samtliga membran efter immunodetektion med antikroppar riktade mot SGMS2 (Fig. 3B). Vid jämförelse mellan muskeltyperna påvisades ett ökat uttryck av SGMS2 i Vas jämfört med EDL och Sol inom respektive dietgrupp. Signifikant ökning avseende uttryck av SGMS2 observerades i Vas i jämförelse med Sol inom respektive dietgrupp (p <0,001), men inga signifikanta skillnader framkom mellan Vas och EDL. En signifikant ökning av SGMS2-uttryck erhölls även i EDL vid jämförelse med Sol inom dietgrupperna (p <0,001) (Fig. 3B).

Mängd SMPD i olika muskeltyper

Efter immunodetektion påvisades proteinband vid 70 kDa för samtliga membran som inkuberades med antikroppar riktade mot SMPD1 (Fig. 4A). Inga markanta skillnader gällande uttryck av SMPD förekom vid jämförelse mellan dietgrupperna (Fig. 4). Vid jämförelse mellan muskeltyperna observerades ett ökat uttryck av SMPD1 i Sol inom båda dietgrupper (Fig. 4A). För LFD behandlade möss (n=8) framkom en signifikant ökning av SMPD1 i Sol jämfört med EDL respektive Vas (p <0,001). En signifikant ökning av SMPD1-uttryck erhölls även i EDL vid jämförelse med Vas (p <0,05). För mössen behandlade med HFD (n=10) förekom signifikant ökning av SMPD1 i Sol jämfört med EDL samt Vas (p <0,01). Det påvisades även en signifikant ökning avseende SMPD1-uttryck i EDL i jämförelse med Vas (p <0,05) (Fig. 4A).

Det observerades proteinband vid 60 kDa för samtliga membran efter immunodetektion med antikroppar riktade mot SMPD3 (Fig. 4B). För LFD behandlade möss erhölls en signifikant ökning avseende SMPD3-uttryck i Vas vid jämförelse med Sol (p <0,01). Utöver detta resultat förekom inga signifikanta skillnader mellan muskeltyperna inom de olika dietgrupperna (Fig. 4B).

Efter immunodetektion med antikroppar riktade mot SMPD4 detekterades proteinband vid 95 kDa för de flesta membran (Fig. 4C). Vid jämförelse mellan muskeltyperna observerades ett ökat uttryck av SMPD4 i Vas inom LFD (n=6) respektive HFD (n=6). En signifikant ökning av SMPD4 framkom i Vas i jämförelse med EDL samt Sol inom dietgrupperna (p <0,05) (Fig. 4C).

Diskussion

Ackumulering av ceramider i skelettmuskulaturen betraktas som en bakomliggande mekanism till insulinresistens under diabetes typ 2 (2), däremot saknas kunskap om vad som bidrar till ackumuleringen. Skelettmuskulaturen är en vävnad med hög heterogenitet bestående av olika muskelfibertyper, vilket bidrar till varierande metabola egenskaper (11). I studien undersöktes därmed proteiner involverade i sfingomyelincykeln, vilken är en regulator till ceramidackumulering (4). Specifikt undersöktes proteiner i skelettmuskler med kända variationer avseende fibertypssammansättning under dietinducerade förhållanden. Soleus, EDL och Vas är skelettmuskler som kan användas för att representera oxidativa, intermediära respektive glykolytiska muskelfibrer (personlig kommunikation M. Flockhart). De utvalda proteiner som detekterades med western blot var SGMS1, SGMS2, SMPD1, SMPD3 och SMPD4 eftersom dessa är centralt involverade i sfingomyelincykeln (4).

I en tidigare studie påvisades en ökad ackumulering av ceramider i Sol och EDL hos gnagare som tilldelats en fettrik kost jämfört med de som givits kontrolldiet (18). Den studien var dock inte riktad mot proteinerna involverade i sfingomyelincykeln och därmed påvisades ingen direkt koppling mellan fettrikkost, proteinerna som ingår i sfingomyelincykeln och ceramidackumulering. Resultaten i denna studie visade inga skillnader avseende proteinuttryck vid jämförelse mellan dietgrupperna, vilket ej var förväntat. Detta på grund av att en ökad kroppsvikt tenderar att orsaka en ökad ceramidackumulering (18). Eftersom mössen kontrollvägdes vid nio veckor och att stor viktskillnad mellan LFD och HFD behandlade mössen observerades, var brist på viktskillnad inte en möjlig orsak till det lika uttrycket av proteinerna. Därför överfördes fokuset till att muskelfibersammansättningen var den betydande faktorn.

Från immunodetektionen observerades proteinband som överensstämde med respektive proteins molekylvikt, vilket var förväntat. En observation var att det förekom skillnader gällande proteinuttryck vid jämförelse mellan Sol och Vas, från möss behandlade med LFD, för samtliga utvalda proteiner. Eftersom Sol främst domineras av typ I-muskelfibrer och Vas huvudsakligen av typ II-muskelfibrer formulerades hypotesen att muskelfibersammansättningen var en bidragande faktor till de signifikanta skillnaderna mellan muskeltyperna. Enligt tidigare studier uppvisar mänskliga försökspersoner med en hög andel typ II-muskelfibrer ökad insulinresistens i jämförelse med individer som har en typ I dominant muskelfiberdistribution (15). Utifrån detta samt att ökad insulinresistens associeras med en ökad ansamling ceramider i skelettmuskulaturen (2), var arbetshypotesen att en ökning av sfingomyelinaser i muskler med dominant typ II fibertypssammansättning bör observeras, eftersom sfingomyelinaser genererar ceramider från SM (4). Detta är delvis i kontrast med resultaten från denna studie som påvisade att proteinmängden av sfingomyelinase SMPD4 var högre i Vas än i Sol. Uttrycket av SMPD1 var i stället högre i Sol och SMPD3 skiljde inte markant vid jämförelse mellan muskeltyperna, vilket inte överensstämde med hypotesen. Eftersom dessa resultat är helt nya fynd inom området krävs ytterligare studier för att förstå innebörden av dem.

Det förekom få skillnader gällande mängden av de respektive proteinerna vid jämförelse mellan Vas och EDL. Denna observation indikerade på en liknande reglering av de studerade proteinerna i typ II dominanta Vas och intermediära EDL, vilket inte var förvånande baserat på muskeltypernas förväntade fibertypsdistribution, vilket var 20% respektive 40% typ I-fibrer (personlig kommunikation M. Flockhart). Proteinmängden uppmätt i EDL från möss som behandlats med LFD placerades intermediärt mellan Sol och Vas för samtliga proteiner, vilket korrelerade till den förväntade muskelfibersammansättningen i EDL, 40% typ I-fibrer jämfört med 60% och 20% i Sol respektive Vas (personlig kommunikation M. Flockhart).

Vid jämförelse mellan Sol och EDL från möss behandlade med LFD erhölls däremot fler signifikanta skillnader avseende proteinmängden för samtliga proteiner, än vid jämförelsen mellan Vas och EDL. Tidigare studier har visat att EDL i gnagare uttrycker fler subtyp-IIb muskelfibrer (19), subtypen som använder glykolys som primärt metabolt mode, jämfört med subtyp-IIa som använder både glykolys och oxidativ fosforylering (14). Eftersom Vas definieras som den mest glykolytiska av dessa tre muskeltyper (personlig kommunikation M. Flockhart), var en möjlig förklaring att EDL och Vas innehöll muskelfibrer med mer liknande metabola egenskaper än EDL och Sol.

Western blot är en effektiv metod för småskaliga proteinanalyser och anses vara enkel, kostnadseffektiv och ger data som är relativt enkla att tolka (20). Western blot har blivit en alltmer mångsidig metod och används numera i större utsträckning (17). Eftersom western blot-analysen innefattar flera steg medför detta en stor risk för felkällor, vilka potentiellt kan leda till missvisande och varierande resultat. För att minimera dessa variationer och säkerställa pålitliga resultat bör flera aspekter av analysen standardiseras (21). I denna studie användes därför ett redan testat metodprotokoll som vid tidigare användning hade tillhandahållit tydliga resultat. Men det uppkom ändå felkällor under arbetes gång. En del membran erhöll otydliga band efter transfer och behövde köras om. De flesta av de primära antikroppar band in till flera proteiner vid immunodetektion och då användes molekylviktstandarden för att fastställa rätt protein.

Resultaten från denna studie kommer undersökas vidare i humant material för att säkerställa relevans till sjukdom och framför allt insulinresistens. Nästkommande studier ska undersöka om regulatorerna SGMS och SMPD direkt kan påverka glukosupptaget i muskeln genom att modifiera friska humana muskelcellkulturer. Detta kommer att utföras genom att ”tysta ner” uttrycket av SGMS och SMPD via transfektion av celler. Inlagring av ceramider samt glukosupptag jämförs därefter i celler som uttrycker SGMS och SMPD och i celler där uttrycket av dessa proteiner tystas. Experimentet kommer medföra kunskap avseende om dessa processer är förändrade som ett resultat av sjukdomen eller om de aktivt medierar sjukdom.

Konklusionen var att skelettmuskler med varierande muskelfiberdistribution uppvisade skillnader avseende nivåer av enzymer involverade i sfingomyelincykeln, men inga tydliga effekter medfördes efter högfettsinducerad insulinresistens i skelettmuskulaturen.

Tack tillägnas

Jag vill tacka Mikael Flockhart för bra handledning och Elin Chorell för att jag fick möjligheten att vara en del av hennes forskargrupp samt Helena Edlunds grupp som stått för musmaterialet. Jag vill även tacka Vetenskapsrådet och Diabetesfonden som finansierat huvudprojektet som denna studie är en del av.

Referenser

1. Världshälsoorganisationen. Diabetes. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes (2024-04-03)

2. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. Prog Lipid Res. 2006;45(1):42-72. Doi:10.1016/j.plipres.2005.11.002

3. Bandet CL, Tan-Chen S, Bourron O, Le Stunff H, Hajduch E. Sphingolipid metabolism: new insight into ceramide-induced lipotoxicity in muscle cells. Int J Mol Sci. 2019;20(3):479-505. Doi:10.3390/ijms20030479

4. Taniguchi M, Okazaki T. Role of ceramide/sphingomyelin (SM) balance regulated through "SM cycle" in cancer. Cell Signal. 2021;87:110119. Doi:10.1016/j.cellsig.2021.110119

5. Pavoine C, Pecker F. Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. Cardiovasc Res. 2009;82(2):175-183. Doi:10.1093/cvr/cvp030

6. National Library of Medicine. SMPD3, sphingomyelin phosphodiesterase 3 (human), Gene ID: 55512. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55512 (2024-05-15)

7. National Library of Medicine. SMPD4, sphingomyelin phosphodiesterase 4 (human), Gene ID: 55627. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55627 (2024-05-15)

8. National Library of Medicine. SMPD1, sphingomyelin phosphodiesterase 1 (human), Gene ID: 6609. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6609 (2024-05-15)

9. Perreault L, Newsom SA, Strauss A *et al*. Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influence insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle. JCI Insight. 2018;3(3):e96805. Doi:10.1172/jci.insight.96805

10. Balram A, Thapa S, Chatterjee S. Glycosphingolipids in diabetes, oxidative stress, and cardiovascular disease: prevention in experimental animal models. Int J Mol Sci. 2022;23(23):15442. Doi:10.3390/ijms232315442

11. Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1900;116:1-76. Doi:10.1007/3540528806_3

12. Pataky MW, Wang H, Yu CS *et al*. High-fat diet-induced insulin resistance in single skeletal muscle fibers is fiber type selective. Sci Rep. 2017;7(1):13642. Doi:10.1038/s41598-017-12682-z

13. Talbot J, Maves L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2016;5(4):518-534. Doi:10.1002/wdev.23

14. Ciapaite J, van den Berg SA, Houten SM, Nicolay K, van Dijk KW, Jeneson JA. Fiber-type-specific sensitivities and phenotypic adaptations to dietary at overload differentially impact fast- versus slow-twitch muscle contractile function in C57BL/6J mice. J Nutr Biochem. 2015;26(2):155-164. Doi:10.1016/j.jnutbio.2014.09.014

15. Blackwood SJ, Horwath O, Moberg M *et al.* Extreme variations in muscle fiber composition enable detection of insulin resistance and excessive insulin secretion. J Clin Endocrinol Metab. 2022;107(7):e2729-e2737. Doi:10.1210/clinem/dgac221

16. Hnasko TS, Hnasko RM. The western blot. Methods Mol Biol. 2015;1318:87-96. Doi:10.1007/978-1-4939-2742-5_9

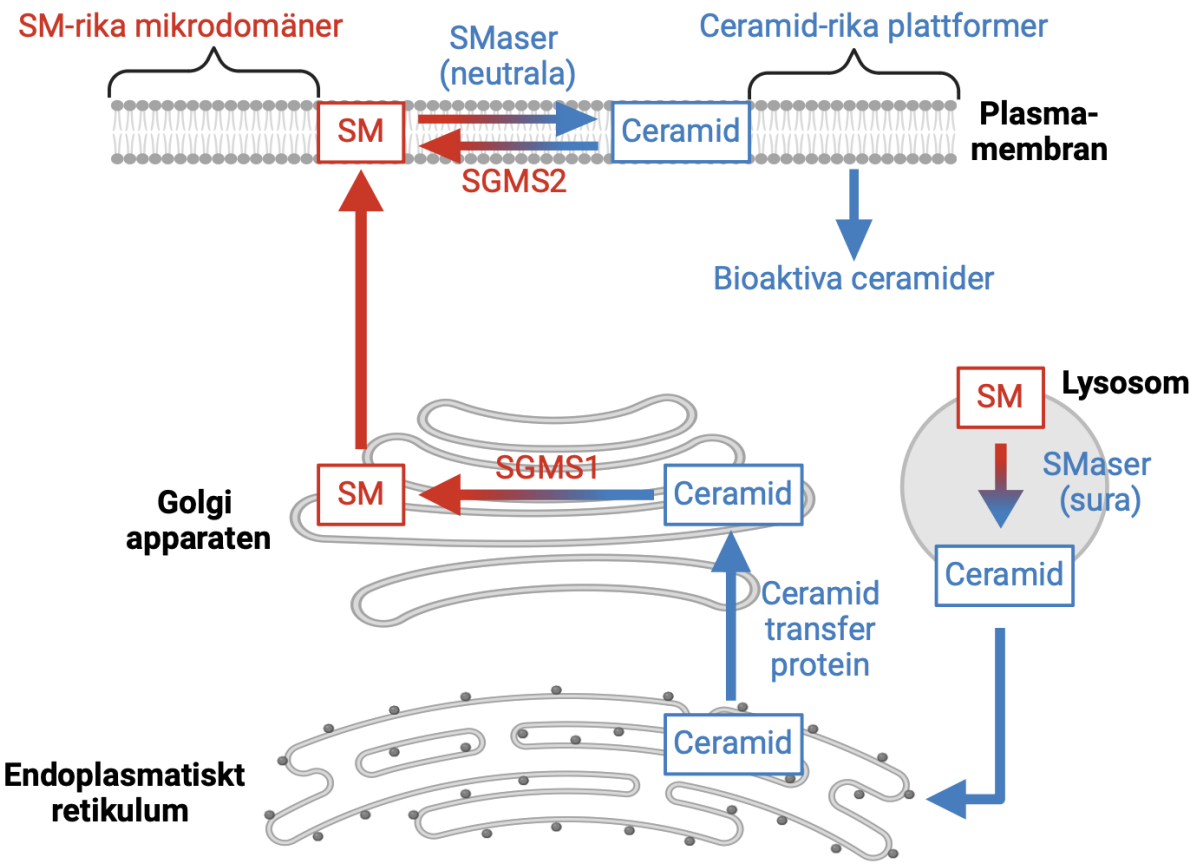
17. Bass JJ, Wilkinsin DJ, Rankin D et al. An overview of technical considerations for western blotting applications to physiological research. Scand J Med Sci Sports. 2017;27(1):4-25. Doi:10.1111/sms.12702

18. Jani S, Da Eira D, Hadday I, et al. Distinct mechanisms involving diacylglycerol, ceramides, and inflammation underlie insulin resistance in oxidative and glycolytic muscles from high fat-fed rats. Sci Rep. 2021;11(1):19160. Doi:10.1038/s41598-021-98819-7

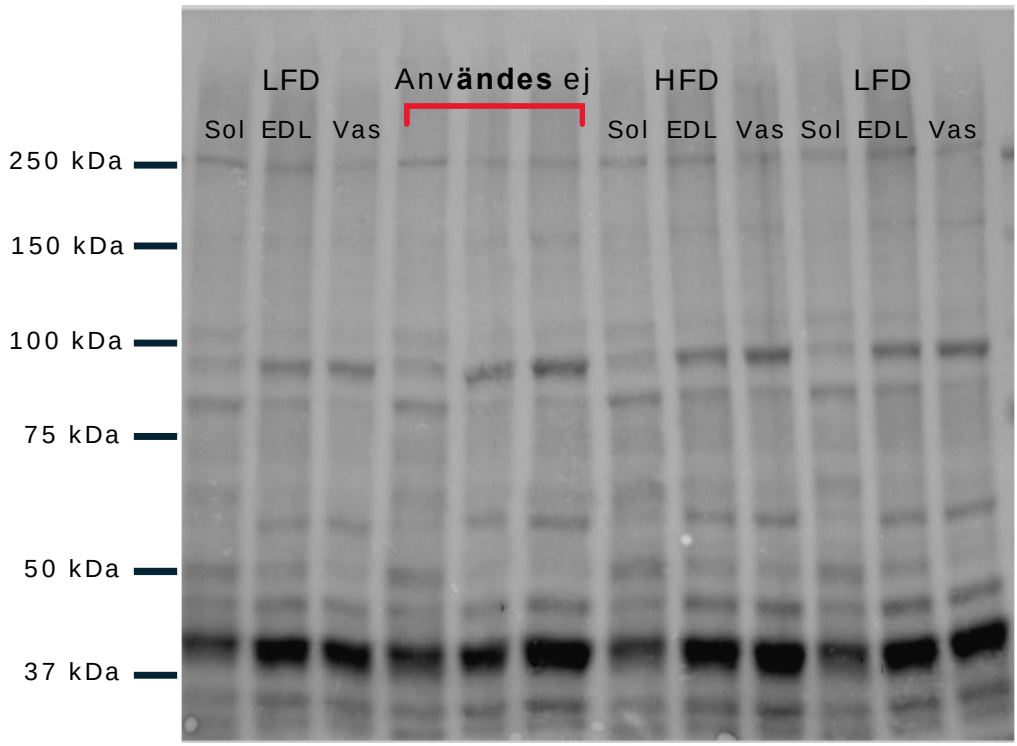
19. Soukup T, Zacharová G, Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred lewis rats. Acta Histochem. 2002;104(4):399-405. Doi:10.1078/0065-1281-00660

20. Gorr TA, Vogel J. Western blotting revisited: critical perusal of underappreciated technical issues. Proteomics Clin Appl. 2015;9(3-4):396-405. Doi:10.1002/prca.201400118

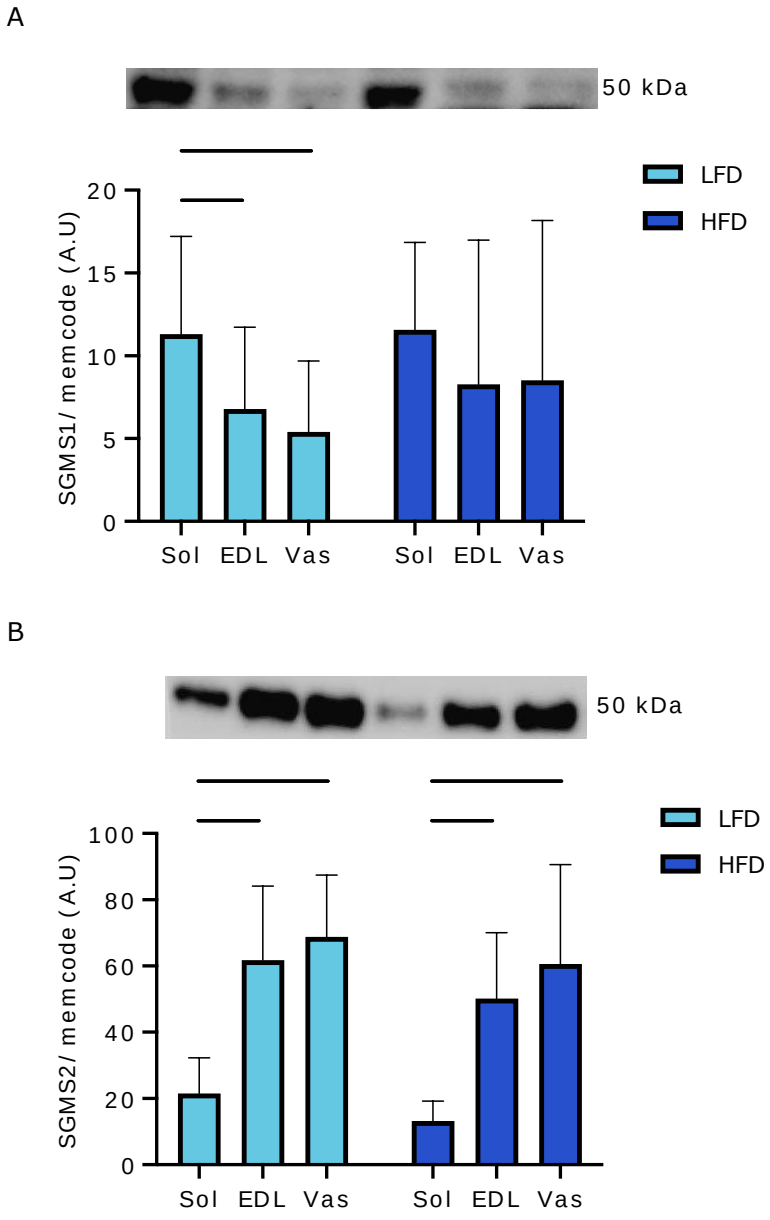
21. Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation western blotting techniques. Expert Rev Proteomics. 2017;14(11):1037-1053. Doi:10.1080/14789450.2017.13881



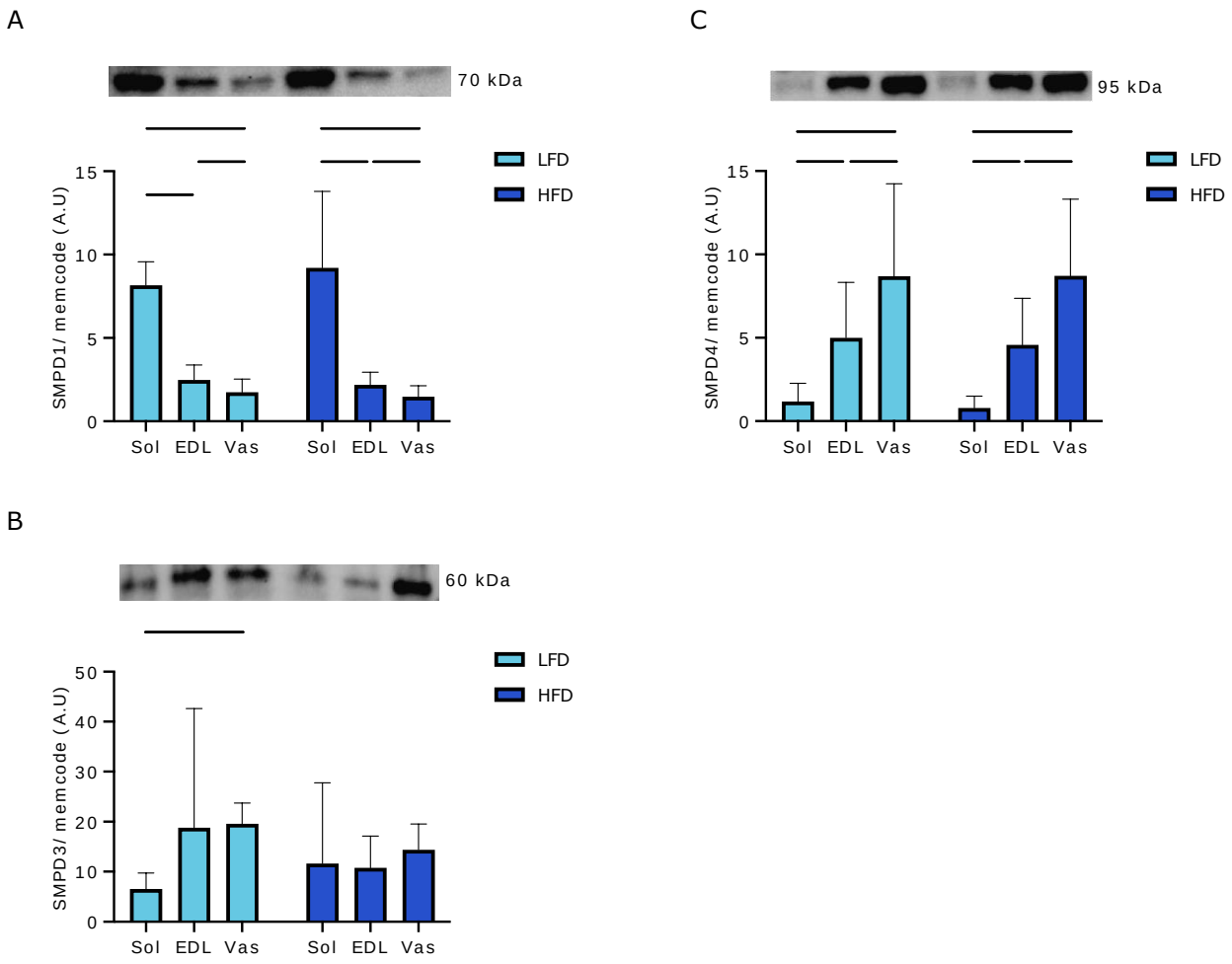
Figur 1. Översiktlig bild av sfingomyelincykeln samt dess involverade enzymer; sphingomyelin syntase (SGMS) och sfingomyelinaser (SMaser). Enzymerna katalyserar reaktioner mellan sfingomyelin (SM) och ceramider och omvänt.



Figur 2. Total proteinmängd undersöktes genom western blot i muskeltyperna soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL) och vastus lateralis (Vas) från möss givna lågfettsdiet (LFD) eller högfettsdiet (HFD). Ovan visas en representativ bild av ett membran infärgad genom memcode för att illustrera laddningskontrollen. För att matcha uppställningarna i stapeldiagrammen är memcode-bilden spegelvänd.



Figur 3. Proteinmängd undersöktes genom western blot i muskeltyperna soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL) och vastus lateralis (Vas) från möss givna lågfettsdiet (LFD) eller högfettsdiet (HFD). Mängden av protein A) sphingomyelin synthase 1 (SGMS1) och B) sphingomyelin synthase 2 (SGMS2) analyserades. Alla proteinuttryck normaliserades mot den totala laddningen av protein mellan 35–100 kDa; immunodetektion/memcode (intensitet x mm²). För att matcha uppställningarna i stapeldiagrammen är alla blottar spegelvända. Alla värden uttrycks som medel ± standardavvikelse. I figur (A, B) n=8 i LFD och n=10 i HFD. Grupp- och muskelskillnader analyserades med repeated measures one-way ANOVA och Tukey post hoc test (*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001).



Figur 4. Proteinmängd undersöktes genom western blot i muskeltyperna soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL) och vastus lateralis (Vas) från möss givna lågfettsdiet (LFD) eller högfettsdiet (HFD). Mängden av protein A) sphingomyelin phosphodiesterase 1 (SMPD1), B) sphingomyelin phosphodiesterase 3 (SMPD3) och C) sphingomyelin phosphodiesterase 4 (SMPD4) analyserades. Alla proteinuttryck normaliserades mot den totala laddningen av protein mellan 35–100 kDa; immunodetektion/memcode (intensitet x mm^2). För att matcha uppställningarna i stapeldiagrammen är alla blottar spegelvända. Alla värden uttrycks som medel ± standardavvikelse. I figur (A, B) n=8 i LFD och n=10 i HFD, medan i figur (C) n=6 i båda grupper. Grupp- och muskelskillnader analyserades med repeated measures one-way ANOVA och Tukey post hoc test (*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001).