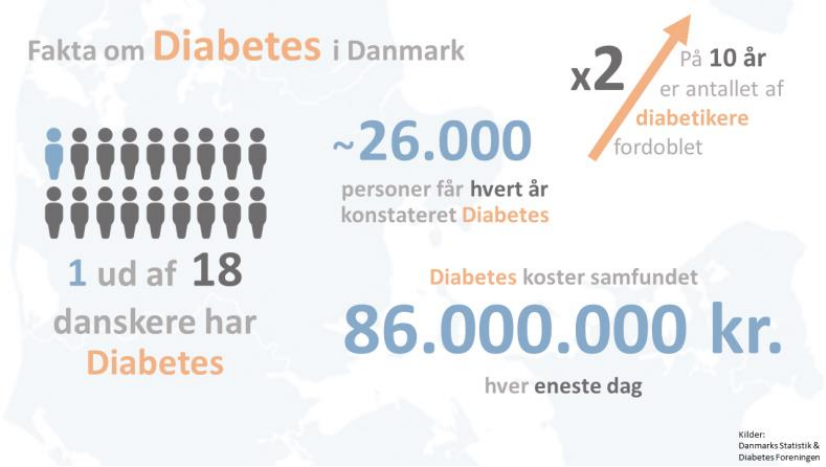
Projektforløb om diabetes

Teoretisk materiale om diabetes kombineret med øvelser i Det Virtuelle Laboratorium



Kære elever

Velkommen til Biotech Academy's projektforløb om diabetes. Med projektet håber vi på at give jer et kreativt indspark i den almindelige undervisning. Projektet skal hjælpe jer til at forstå diabetes og de underliggende komplicerede biokemiske processer - alt sammen på en effektiv og anderledes måde end det I måske er vant til. Projektet er udformet med en masse spændende materiale, som kobles med bioteknologiske øvelser i Det Virtuelle Laboratorium. Forhåbentlig vil dette projektforløb give jer endnu mere mod på at udforske de fantastiske muligheder som moderne bioteknologi kan give til vores verden.

Målet med forløbet, er at give jer et indblik i hvordan diabetes påvirker kroppen, samt hvordan sygdommen kan diagnosticeres og behandles, ved at kigge på teorien fra flere forskellige vinkler. Forløbet vil være centreret omkring bioteknologiske øvelser i Det Virtuelle Laboratorium. Før I går i laboratoriet, er det selvfølgelig vigtigt, at I forstår den bagvedliggende teori. Vi har samlet det nødvendige materiale, som vi opfordrer jer til aktivt at bruge. Flere elementer i materialet, såsom flowcharts og rapporter, vil give jer en forsmag på, hvordan man arbejder når man går på universitetet og videre ude i industrien.

Diabetes er en folkesygdom - I Danmark er 320.000 diagnosticeret med diabetes og dette forventes at stige voldsomt i løbet af de næste mange år. Bare i Danmark bruger vi hvert år enorme summer penge på diabetespatienter og deres følgesygdomme (32 milliarder kroner om året, svarende til 86 mio. hver dag) (Diabetes Foreningen). Hvis patienterne diagnosticeres og behandles tidligt og godt, kan denne udgift sænkes betydeligt. Endnu vigtigere er det selvfølgelig, at patienterne kan leve længere og med væsentligt bedre livskvalitet uden de mange følgesygdomme, som kommer, hvis ikke sygdommen er velreguleret. Desuden vil diabetes i fremtiden blive et stort problem i udviklingslande, hvor der i højere grad udvikles livsstilssygdomme, som for eksempel diabetes. Derfor er viden om diabetes enormt vigtigt, for at kunne løse disse voksende problemer i fremtiden.

Vi håber i vil tage godt imod projektet og lære en masse om bioteknologi og ikke mindst diabetes.

God fornøjelse!

Indholdsfortegnelse

Opbygningen af projektforløbet 4
Del 1 – Genetisk test for forøget diabetesrisiko 5
Introduktion 5
Teori 5
Bugspytkirtlen 5
Glykogen og glykogenmetabolisme 8
Insulinudskillelse og blodsukkerregulering 10
Insulins effekt på kroppens celler 14
Quiz 16
Øvelse, vejledning og flowchart 18
Centrifuge 18
Gelelektroforese 19
PCR 20
Øvelsesvejledning 22
Flowchart 23
Rapportering 26
Det har du lært 26
Del 2 – insulinfølsomhed 27
Introduktion 27
Teori 27
Diagnostik af diabetes 27
Diabetes Mellitus type 1 (DMT1) 30
Diabetes Mellitus type 2 (DMT2) 32
Sekundære former for diabetes 36
Hvad har i lært? 37
Quiz 38
Øvelse og vejledning 39
Blodprøve 39
Glukosemeter 40
Vortex 40
Øvelsesvejledning 40
Spørgsmål til øvelsesvejledning 41
Databehandling og rapportering 42
Det har du lært 43
Del 3 – insulinproduktion 44
Introduktion 44
Teori 44
Behandling af type 1 Diabetes 44
Behandling af type 2 diabetes 47
Cellefabrikker 52
Quiz 56
Øvelse, vejledning og flowchart 57
Elektroporator 57
Fermentor og Chromatograf 58
Vejledning 58
Flowchart 59
Rapportering og databehandling 61
Det har du lært 61

10 korte om diabetes

1. Diabetes (i gamle dage kaldet sukkersyge) er en sygdom, hvor blodets indhold af sukker (glukose) er højere end det normale.
2. Ubehandlet diabetes kan være dødeligt og det forhøjede blodsukker kan give alvorlige og invaliderende følgesygdomme.
3. Diabetes skyldes ændret produktion eller virkning af hormonet insulin, som styrer optaget af blodsukker til kroppens celler og andre metaboliske processer.
4. Type 1 diabetes er en autoimmun sygdom (kroppens immunsystem angriber sine egne celler), der ofte konstateres hos unge mennesker, og skyldes at kroppen ikke selv er kan producere insulin. Sygdommen kan være arvelig.
5. Type 2 diabetes (også kaldet gammelmandssukkersyge), skyldes flere ting, men primært at man har nedsat følsomhed overfor insulin. Sygdommen skyldes ofte forkert livsstil og konstateres, som navnet antyder, ofte hos ældre mennesker. Dog ses den hyppigere og hyppigere hos yngre mennesker.
6. Det konstante forhøjede blodsukker er et problem, da sukkeret transporteres rundt med blodet til alle organer, og kan give skader og følgesygdomme på især øjne, nyrer og nervesystemet.
7. Typiske symptomer på diabetes er: tørst, træthed, hyppig vandladning, nedsat appetit og vægttab.
8. For diabetikere er det vigtigt at kontrollere diæten, da især kulhydrater kan give pludselige stigninger i blodsukker.
9. Diabetes behandles forskelligt alt efter typen. Typisk behandling omfatter insulin, insulinresistens-nedsættende medicin og livsstilsændringer.
10. Har man sin diabetes godt kontrolleret kan man næsten helt forhindre udviklingen af følgesygdomme.

Opbygningen af projektforløbet

Projektforløbet består af 3 dele. Under hver del er der underelementer såsom teori, quiz, databehandling etc. Disse tilgås i venstre side, ved at trykke på enten Del 1, Del 2 eller Del 3. Alt teori bygger på Biotech Academy's diabetesprojekt.
Det anbefales, at man som minimum laver Del 1. Denne kan efterfølges af enten Del 2 eller Del 3 eller begge dele.

- Del 1 - Genetisk test for forøget diabetesrisiko
- Del 2 - Insulinfølsomhed
- Del 3 - Insulinproduktion

Hele opbygningen kan ses her:

Del 1 - Genetisk test for forøget diabetesrisiko	Del 2 - Insulinfølsomhed	Del 3 - Insulinproduktion
Fokus: Laboratorieudstyr, genetisk diagnostik, grundlæggende teori om diabetes	**Fokus: Fysiologi, databehandling, fortolkning af resultater**	**Fokus: Bioteknologisk værktøjer, medicin og behandling**
Introduktion	Introduktion	Introduktion
Teori	Teori	Teori
Quiz	Quiz	Quiz
Øvelsesvejledning og flowchart	Øvelsesvejledning	Øvelsesvejledning og flowchart
Øvelse: "Genetisk test for forøget diabetesrisiko"	Øvelse: "Insulinfølsomhed"	Øvelse: "Insulinproduktion"
Rapportering	Databehandling og rapportering	Databehandling og rapportering

En særlig tak til:
Diabetes Academy
Kamille-Amalie Bahn, Simon Glerup Kristensen og Thomas Irgens Hansen
Peter Rugbjerg
Claus Borre og Christian Maaløv Andreasen
Helen Clausen

Held og lykke med projektet ☺
Skriv gerne til os! Vi vil rigtig gerne have ris/ros og gode ideer

Del 1 – Genetisk test for forøget diabetesrisiko

Introduktion

Et af bioteknologiens mange anvendelsesområder er indenfor diagnostik. Det er i dag muligt at få sekventeret næsten hele ens genom for blot 1500 kr., og dermed få svar på en masse spørgsmål omkring ens sundhed - måske også nogle man ikke har lyst til at kende svaret på, hvilket kan skabe et etisk dilemma. Også diabetes kan aflæses ud fra genetikken. Især en kendt mutation i et specifikt gen, HNF1A, vil i de fleste tilfælde medføre den relativt sjældne diabetes type MODY. HNF1A-genet koder for en transskriptionsfaktor, som er involveret i reguleringen af mange lever- og pankreasspecifikke gener. Derfor vil et ikke-funktionelt HNF1A-gen resultere en lavere insulinkoncentration, med diabetes til følge.

En relativ enkel metode til at undersøge et specifikt gen for en kendt mutation er, at oprense DNA, opformere det udvalgte gen med PCR ved at bruge en primer, der passer til netop sekvensen af det valgte gen (inklusiv mutation), og så bruge gelelektroforese til at detektere tilstedeværelsen af genet. I denne øvelse skal i diagnosticere en mus ved hjælp af netop denne metode. Husk på at præcis dette også kan bruges på mennesker og kan bruges til at teste for en lang række andre sygdomme.

Teori

Kapitlerne ”Fysiologien og anatomien bag diabetes”, ”Funktionen af glukose i kroppen” og ”Hormoner, insulin og blodsukkerregulering” kan læses, men som minimum læses underkapitlerne:

- Bugspytkirtlen
- Glykogen og glykogenmetabolisme
- Insulinudskillelse og blodsukkerregulering
- Insulins effekt på kroppens celler

Bugspytkirtlen

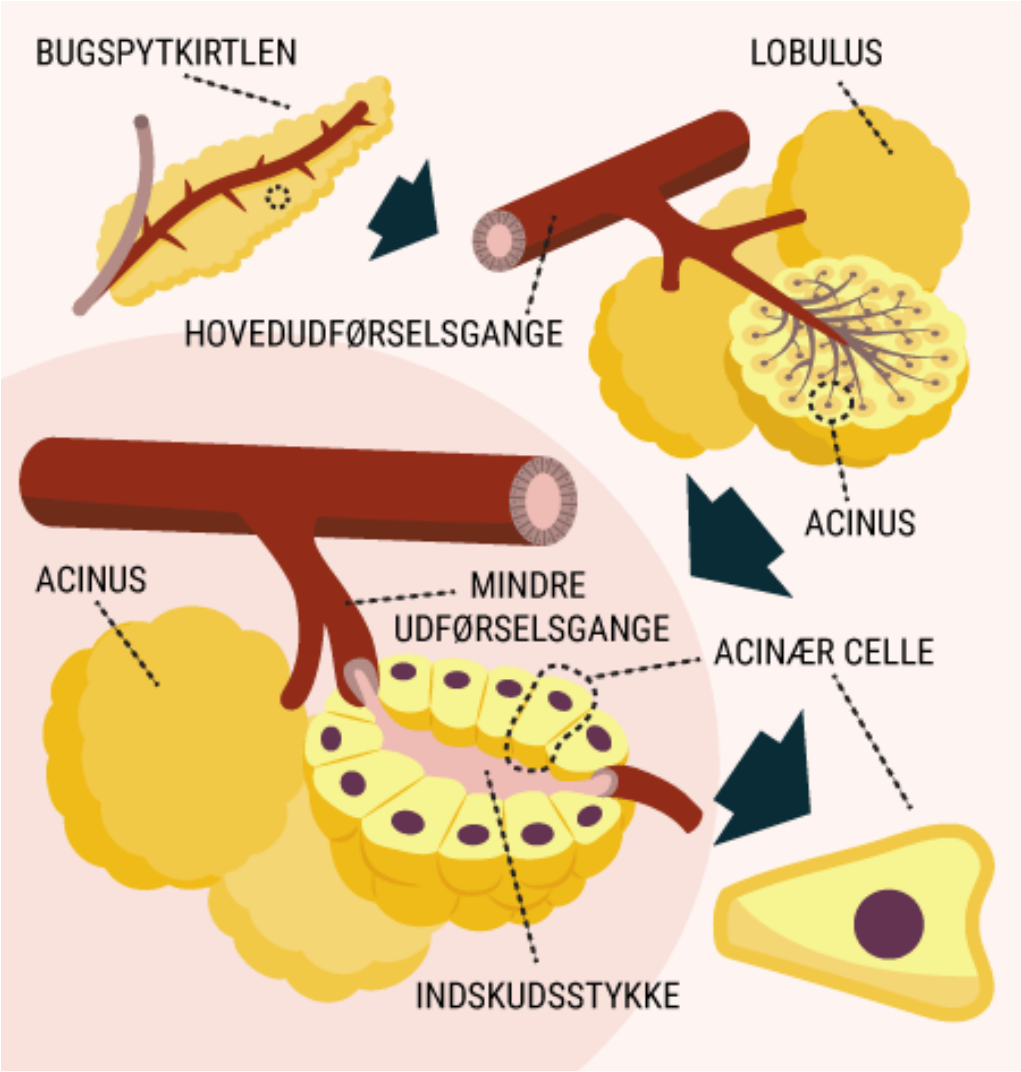
Bugspytkirtlen, *pancreas*, hvis navn stammer fra græsk og ”pan” betyder ”al”, mens ”kreas” betyder ”kød”, fordi man oprindeligt troede, kirtlen kun bestod af en klump celler. Man kendte ikke til dets udførselsgange til tarmen. Kirtlen er ca. 15 cm langt, tungeformet, vejer gennemsnitligt 100 gram og ligger op mod abdomens bagvæg. Bugspytkirtlen munder som galdevejene ud i det første stykke af tyndtarmen i en åbning ind til tarmen kaldt *papilla duodeni major*.

Bugspytkirtlen har både en endokrin og en eksokrin funktion

Endokrin funktion	**Eksokrin funktion**
En samling af kirtler i et endokrint organ, som udskiller hormoner direkte til blodet, hvorefter de bæres til målorganer, som de kan påvirke.	Kirtler som producerer sekreter, der udskilles gennem kanaler til epiteloverfladen. Eksempler på eksokrine kirtler er spyt-, sved-

Eksempler på endokrine organer er hypofysen, bugspytkirtlerne, testiklerne og ovarierne.	og mælkekirtler.

Den eksokrine del af kirtlen består af acinære celler, som hvert døgn producerer ca. 1500 mL pancreassaft. Acinært væv består af specialiserede proteinsyntetiserende celler, der udskiller fordøjelsesproteiner samt en plasmalignende væske, som er rig på NaCl. Når cellerne ikke stimuleres, foregår der kun en lav sekretion. Hver acinus bestående af acinære celler har en udførselsgang, som når helt ind i centrum af acinus og her betegnes indskudsstykker, der udmunder i større gange, som igen tømmer sig i hovedudførselsgangen (se *figur* 6).



Figur 6. Her ses bugspytkirtlens, pancreas', anatomiske opbygning. Ansamlinger af acinære celler danner tilsammen en acinus. Flere acini danner en "lobulus". Udførselsgangene fra flere acini tømmes ud i større gange, som igen samles og tømmes ud i bugspytkirtlens hovedudførselsgang.

Men hvorfor er bugspytkirtlen så vigtig en kirtel?

Pancreassaften består dels af forskellige enzymer, som nedbryder størstedelen af føden, dels af en masse bicarbonationer, som neutraliserer mavesyren, så tarmen ikke tager skade. Enzymerne, som udskilles, kommer udelukkende fra de acinære celler. Der findes mange forskellige slags enzymer, se tabellen nedenfor.

Navn	**Funktion**
Trypsin, chymotrypsin og carboxypeptidaser	Nedbryder proteiner til aminosyrer
Ribonuklease og deoxyribenuklease	Spalter nukleoproteiner
Pancreasamylase	Hydrolyserer stivelse, glykogen og størstedelen af øvrige kylhydrater til disakkarider
Pancreaslipase	Hydrolyserer triacylglyceroler til glycerol og fedtsyrer
Cholesterolesterase	Spalter cholesterolestre

Alle disse enzymer er med til at tillade passage af molekylerne over tarmepitelet, så vi på den måde kan absorbere og bruge energien og de livsvigtige vitaminer og salte, som vi får gennem føden. Reguleringen af hele denne eksokrine sekretion foregår hormonelt ved regulering fra sekretin og cholecystokinin samt delvist ved stimulering af nerverne.

Den endokrine del består af små cellegrupper beliggende i det eksokrine væv. Disse ansamlinger af celler kaldes *langerhanske øer* og kan bestå af alt fra helt få til flere hundrede celler. I det endokrine væv findes i alt fem forskellige celletyper; alfa-celler, beta-celler, delta-celler, gamma-celler og epsilon-celler, som har hver deres funktion. Ca. 20% af cellerne er alfa-celler og udskiller glukagon. Beta-cellerne udgør ca. 70% og producerer insulin. Delta-cellerne udskiller somatostatin og udgør 5-10% af samlede antal celler. Kun få procent af cellerne udgøres af gamma- og epsilon-celler, som dog spiller en mindre rolle i forbindelse med diabetes.

ENDOKRINE CELLER	
Navn	Produktion og funktion
Alfa-celler	Udskiller glukagon, som binder til receptorer på levercellerne og medfører nedbrydning af glykogen til glukose, som frigives, så blodsukkeret stiger.
Beta-celler	Udskiller insulin, som har mange funktioner, men den vigtigste er, at den er nødvendig for, at glukose kan transporteres gennem cellemembraner ind i fedt- og muskelceller.
Delta-celler	Udskiller somatostatin, som hæmmer udskillelsen fra alfa-, beta- og gamma-celler.

De vigtigste hormoner i denne sammenhæng er glukagon og insulin. Insulin er et lille proteinmolekyle, som spiller en afgørende rolle i flere metaboliske processer. Insulin øger de anabolske processer i lever, muskler og fedtvæv ved at stimulere dannelsen af protein, glykogen og fedtsyrer. Insulins vigtigste funktion er dog at sørge for, at glukose kan transporteres gennem cellemembraner i fedt- og muskelceller, så kroppens celler kan få energi (se artiklen "Hormoner, insulin og blodsukkerregulering"). Glukagon er et lille polypeptid, som på mange måder virker stik modsat insulin. Glukagon binder til en receptor på levercellerne. Bindingen medfører nedbrydning af glykogen til glukose, som frigives til blodet, hvorved blodsukkeret stiger. Somatostatin udskilles ved stimulation fra bl.a. højt blodsukker og virker i bugspytkirtlen ved at hæmme udskillelse fra alfa-, beta- og gamma-cellerne.

Mens den acinære vævsmængde er nogenlunde den samme hele livet, kan mængden af det endokrine væv øges. Forskning tyder på, at antallet af de insulin-producerende beta-celler øges i forhold til glukoseomsætning og behov; dette vil blive uddybet i kommende artikler.

Vidste I at et stort alkoholforbrug gennem mange år kan føre til kronisk betændelse i bugspytkirtlen? Betændelsestilstanden kan ødelægge kirtlen og medføre diabetes.

Glykogen og glykogenmetabolisme

Når kroppen har rigeligt med energi og et overskud af sukker, har den mulighed for at lagre det i lange kæder af sammenhængende kulhydrat kaldet glykogen. Glykogen har en meget tæt struktur, der gør at store mængder glukose kan lagres på relativt lidt plads, indtil kroppen skal bruge energien derfra.

Glykogenlagring

1. Leveren: Glykogenlageret i leveren udgør omkring 8-10% af leverens vægt. Det har en vigtig funktion, da det er med til at stabilisere blodsukkeret. Hvis blodsukkeret er lavt, kan signalhormoner som fx glukagon mobilisere glykogenet fra leveren og frisætte sukker til blodbanen, så blodsukkeret igen stiger. Dette lager er helt tømt efter omkring 12-18 timers faste.

2. Muskler: 2% af musklers vægt udgøres af oplagret glykogen. Her sørger glykogenet for, at musklerne får den nødvendige energi, når de belastes under arbejde. Lagret her tømmes først efter længere tids anstrengelse.

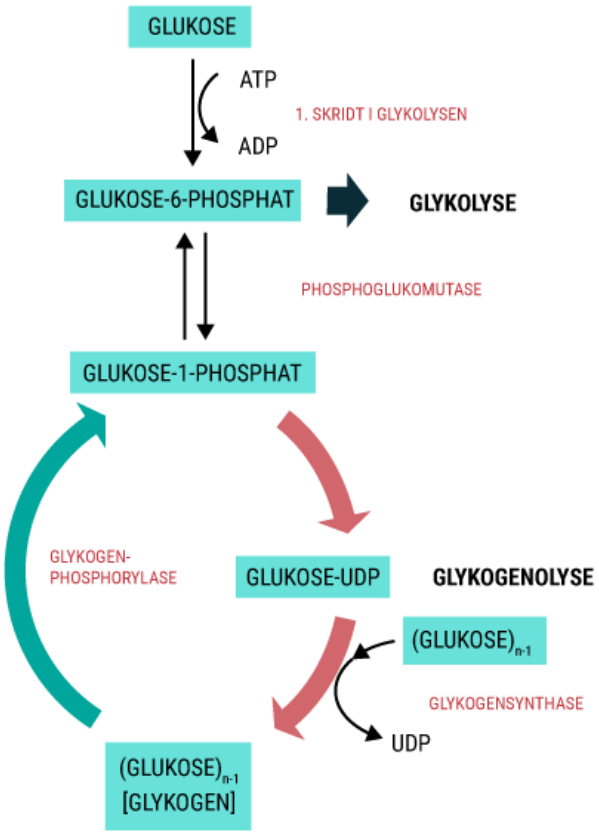
Faktaboks om abdominalt fedt og diabetes
Man skal passe på med at indtage for store mængder energiholdig føde, for man risikerer, at det lagres uhensigtsmæssigt. En af de store risikofaktorer for udviklingen af diabetes er nemlig abdominalt fedt – det såkaldte bildæk. Forskning har endnu ikke afklaret nøjagtigt, hvorfor der er en forskel på at være fed omkring livet ift. på underekstremiteterne, men der er en fysiologisk forskel: Fedt i underekstremiteterne, som giver pæreformen, lagres typisk umiddelbart under huden. Fedt omkring livet og i maveregionen sidder en del dybere og omkranser vores organer. Der er også vist en sammenhæng mellem mængden af abdominalt fedt og nedsat følsomhed for insulin, hvilket minder om den tilstand, der ses ved egentlig diabetes.

For at forstå glykogenmetabolismen, skal kort gennemgås de flg. tre begreber:

1. Glykogenese: Dannelsen af glykogen fra glukose
2. Glykogenolyse: Nedbrydelse af glykogen til glukose-1-phosphat (til energiproduktion)
3. Glukoneogenese: Dannelsen af glukose eller glykogen fra andre substrater end kulhydrater.

Glykogenese og glykogenolyse

Disse processer foregår i lever- og muskelcellers cytoplasma. Glykogenesen drives af enzymet glykogensynthase, mens glykogenolysen drives af enzymet glykogen phosphorylase. *Figur 14* viser disse kemiske processer i overblik.



Figur 14. *De kemiske reaktioner og drivende enzymer i både glykogenesen (glykogensynthase) og glykolysen (glykogenphosphorylase).*

Glykogenese

Glykogenesen er betegnelsen for den række af kemiske reaktioner, der omdanner glukose til glykogen. Fordelen ved at lagre glukose på denne måde er, at glykogenmolekylet er meget mere kompakt og kan rumme flere tusind glukosemolekyler – det er faktisk kroppens eneste måde at opbevare glukose på, udover i blodet, hvor der ikke kan være særligt store mængder. Dette medfører, som det fremgår af ovenstående figur, at glukose bliver lavet til *glucose-6-phosphat* **(G-6-P)***,* som igen laves til *glucose-1-phosphat* **(G-1-P)**. Dette omdannes til *glukose-UDP* (et mellemprodukt i glykogenesen), og herfra er der det sidste trin fra *glukose-UDP* til *glykogen*. Det sidste trin er katalyseret af enzymet *glykogensynthase* **(GS)**, som kan påvirkes af hormonerne

insulin og glukagon. Insulin øger aktiviteten af GS og hjælper med oplagringen af glukose i vores celler, mens glukagon hæmmer den.

Glykogenolyse
Husk fra før, at glykogenolysen er kroppens måde at få frigivet glukose, der har været lagret som glykogen. Det finder sted i depoter i muskler og lever, men på forskellig vis afhængigt af hvor:

Glykogenolyse i leveren medfører, at den nedbryder glykogen og frigiver det til blodet som glukose (*se artiklen "Hormoner, insulin og blodsukkerregulering"*), hvorved blodsukkerniveauet øges. Musklerne mangler det enzym (*glukose-6-phosphatase*), der omdanner *glukose-6-phosphat* (**G-6-P**) til glukose. I stedet kan musklerne lade G-6-P indgå direkte i glykolysen, der tidligere er blevet gennemgået. Ved denne proces forsyner musklerne sig selv med energi.

Glukoneogenese
Glukoneogenesen er kroppens geniale sidste udvej, hvis den mangler energi og glukose til forbrænding, men er løbet tør for kulhydrater eller glykogen. Typisk aktiveres glukoneogenesen efter fasteperioder på over 18 timer, hvor kroppen har udtømt både leverens og musklernes glykogendepoter. Processen foregår i levercellernes cytosol, hvor en række organiske affaldsstoffer kan laves om til produkter, der kan indgå i enten blot glykolysen eller hele glukoseoxidationsprocessen.

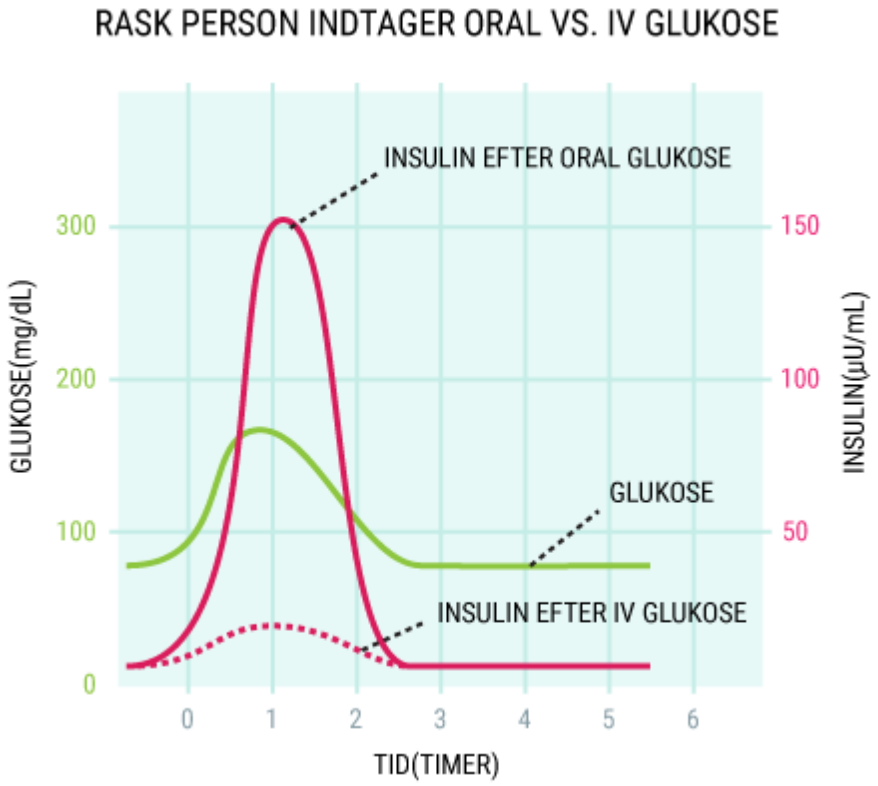
Herunder fremgår de forskellige materialer, kroppen kan anvende til glukoneogenese:

1. **Laktat:** Laktat er et affaldsprodukt fra den anaerobe glykolyse og dannes derfor i de røde blodceller, der ikke har mitokondrier. Desuden dannes laktat i skeletmuskulaturen under hårdt arbejde, hvor aerob oxidation af glukose ikke er tilstrækkeligt. Laktat føres med blodet til leveren, hvor det først omdannes til produkter, der kan indgå i glykolysen eller glukoseoxidationen.
2. **Glycerol:** Glycerol er et affaldsprodukt fra fedtforbrænding. Det kan ikke anvendes direkte, men det kan i leveren omdannes til et andet materiale, der igen kan indgå i glykoneogenesen.
3. **Aminosyrer:** Efter lang tids faste er aminosyrer fra proteiner den primære kilde til glukose.

Insulinudskillelse og blodsukkerregulering

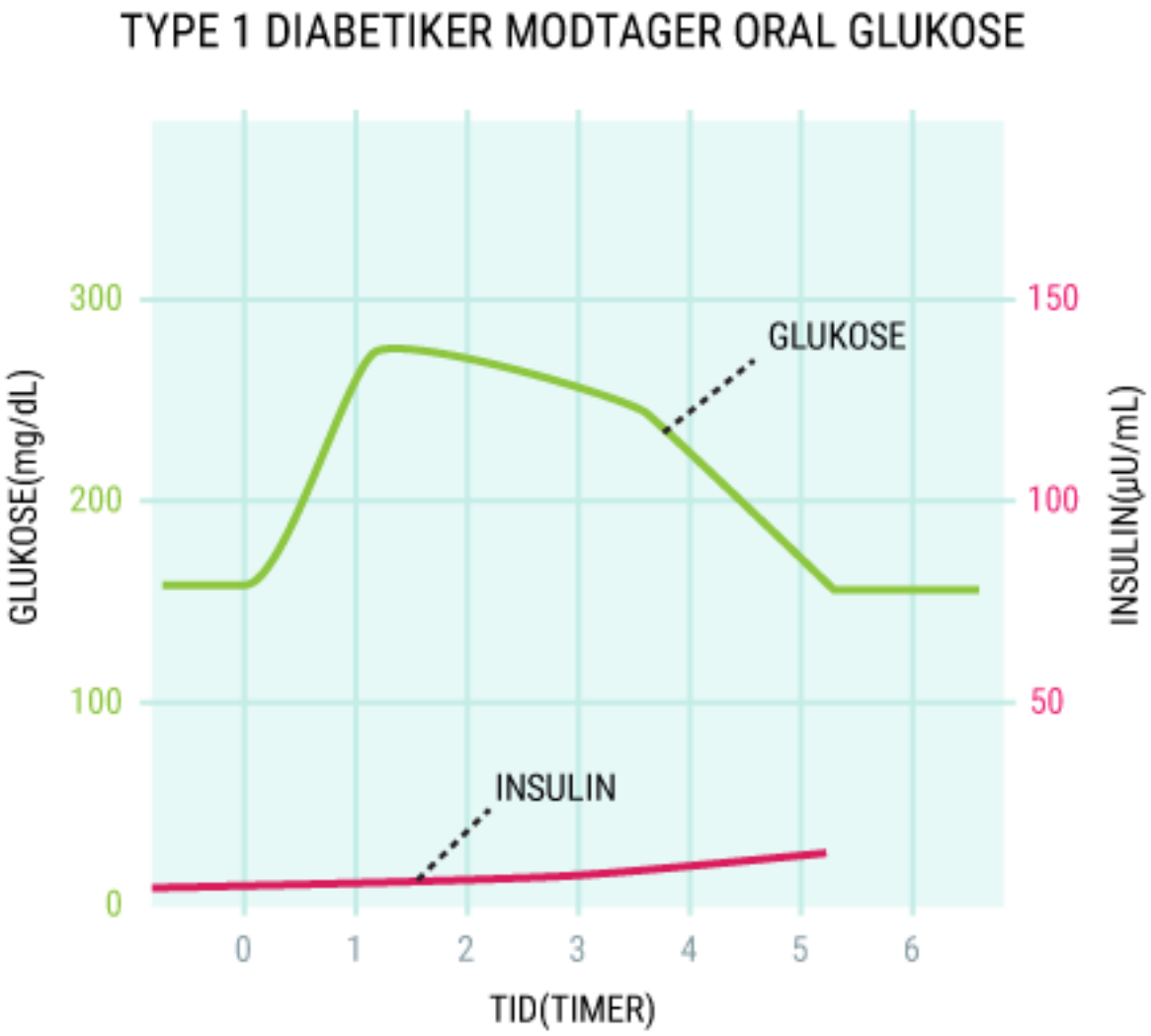
I "Fysiologien og anatomien bag diabetes" blev I kort introduceret til bugspytkirtlens sekretion af insulin samt virkningen heraf. Menneskekroppen består af 10^{14} celler, og om glukose kan komme ind i cellen eller ej, afhænger af hvilken GLUT-transporter cellen har. Der findes i alt 12 forskellige GLUT-transportere hos mennesket. GLUT4-transporteren er afhængig af insulin, og det betyder, at når cellen har en GLUT4-transporter, skal der være insulin til stede, for at cellen kan optage glukosen. GLUT4-transporteren findes primært i tværstribet muskulatur (hjertemuskulatur og skeletmuskulatur) og i fedtvæv. Dvs. at disse væv er afhængige af insulin for at kunne fungere. Men frigivelsen af insulin er mere kompleks end som så og er påvirket af flere mekanismer. Hos et raskt menneske vil blodsukkeret som regel ligge på 4-5 mmol/L efter en nats faste, mens det vil stige efter et måltid. Dog vil det ikke, selv ved store og sukkerholdige måltider, stige til over 11

mmol/L. Hvis den raske krop registrerer et fald i blodsukkeret på bare 20%, vil insulinfrigivelsen blive sænket markant for altid at undgå *hypoglykæmi* (for lavt blodsukker). På den måde vil det altså være fødeindtag eller faste, som har den største indflydelse på ændringerne i blodsukkeret hos raske individer. Det er dog ikke kun blodsukkeret, der afgør, hvor meget insulin, der frigives. Det har nemlig også en stor betydning, om glukosen indtages oralt (gennem munden) eller sprøjtes direkte ind i blodet. Hvis glukosen indtages oralt, vil det nemlig medføre en langt højere insulinsekretion, idet inkretiner som fx gastrisk inhibitorisk polypeptid (GIP), glukagonlignende peptid-1 (GLP-1) og CCK udskilles i tarmen ved fødeindtag og forstærker insulinfrigivelsen (se *figur 18*). Inkretinerne er særligt spændende inden for forskning, da mekanismen kan udnyttes, når der skal udvikles medicin til diabetikere.



Figur 18. *Grafen illustrerer, at når en rask person indtager et måltid med glukose, vil blodsukkeret (den grønne graf) stige langsomt. Som respons på dette vil beta-cellerne i bugspytkirtlen frigive insulin, så insulinens koncentration (den røde graf) stiger markant. Hvis glukosen gives ind i blodet, vil insulinen stige en smule men ikke nær så meget, som ved oralt indtag (den punkterede røde graf). Dette skyldes inkretineffekten, som kan udnyttes i medicinalindustrien til udvikling af diabetesmedicin.*
Vær opmærksom på, at blodsukkeret i denne figur er opgivet i mg/dL. En lidt forenklet måde at omregne blodsukkeret fra mg/dL til mmol/L er: mmol/l = mg/dL/18
Det maksimale blodsukker i denne figur er ca. 170 mg/dL, hvilket svarer til et blodsukker på ca. 9,4 mmol/L.

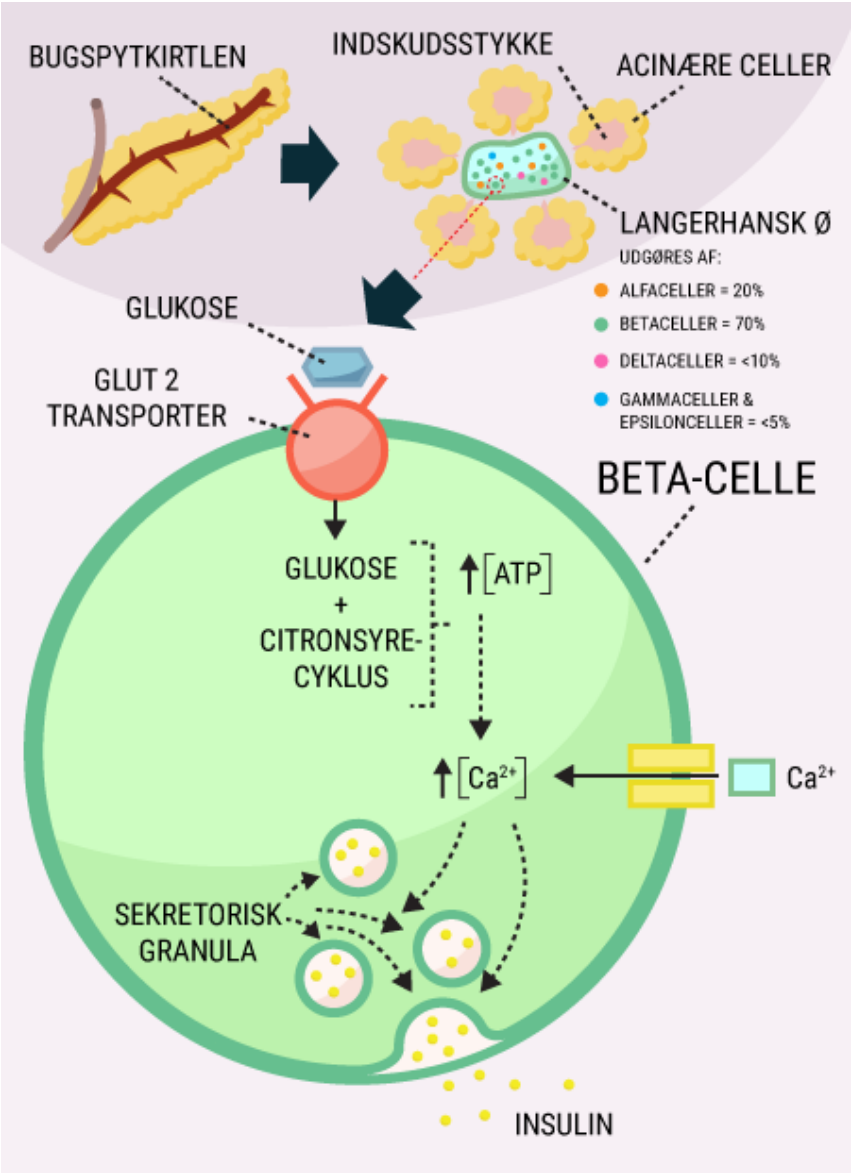
Hos en patient med type 1 diabetes vil destruktionen af de langerhanske øer enten medføre lille eller slet ingen insulinstigning efter fødeindtag, mens blodsukkeret vil stige voldsomt og i lang tid have et højt niveau, selvom den givne mængde glukose er den samme (se figur 19).



Figur 19. *Type 1 diabetiker indtager oral glukose.*

Men hvordan kan glukosen påvirke frigivelsen af insulin i beta-cellen hos det raske individ?

På celleniveau sker frigivelsen af insulin ved, at et glukosemolekyle via en GLUT2-transporter transporteres ind i cellen. Når glukosen kommer ind i beta-cellen, vil glukosemetabolismen øget, og dette fører til en øget mængde frit ATP (læs mere i "Funktionen af glukose i kroppen"). Den frie mængde ATP vil via nogle processer depolarisere cellen, dvs. ophæve den spændingsforskel, som ellers forekommer over cellevæggen. Depolariseringen åbner nogle spændingsafhængige calcium-kanaler i plasmamembranen, så calcium nu strømmer ind. Den øgende mængde calcium medfører frigivelse af de sekretoriske granula (små sække inde i cellen), som indeholder insulin. Således vil blodets insulinindhold stige, når plasmaglukosen stiger (se figur 20).



Figur 20. *Her ses mekanismen bag insulinfrigivelse ved øget blodsukker. Glukose når beta-cellen i bugspytkirtlen via en GLUT2-transporter. Når blodsukkeret stiger, vil øget intracellulært ATP medføre øget calcium-influx i cellen. Den øgede mængde calcium vil påvirke de sekretoriske granula til at frigive insulin fra beta-cellen.*

De tidligere nævnte hormoner insulin og glukagon, som produceres i og frigives fra bugspytkirtlen, har modsatrettede effekter og har til opgave at hhv. op- og nedregulere blodsukkeret. Når blodsukkeret er højt, fremmer insulin de anabolske processer i muskler, lever og fedtvæv ved at stimulere glykogen-, protein- og fedtsyre-syntese. Samtidig sørger insulin for, at glukose kan transporteres over cellemembranen via GLUT-transportere og dermed både ernære cellerne og sænke blodsukkeret.

Glukagon virker modsatrettet ved at igangsætte glykogenolyse (nedbrydning fra glykogen til glukose), som herefter kan øge blodsukkeret. Desuden stimulerer glukagon glukoneogenesen (nydannelse af glukose) og lipolyse (nedbrydning af fedt til frie fedtsyrer) og skaffer på denne måde tilgængelig energi, ligesom den hæmmer glykolysen (nedbrydning af glukose), så der kan opnås et normalt blodsukker. Ved hele tiden at måle og regulere og derfra frigive hhv. glukagon og

insulin, kan kroppen sørge for, at blodsukkeret hverken bliver for højt eller for lavt. Når blodsukkeret stiger, frigives insulin, mens glukagon frigives, når blodsukkeret falder.

Insulins effekt på kroppens celler

Som tidligere nævnt virker insulin ved at øge de anabolske processer i muskler, lever og fedtvæv, men måden, det sker på i de forskellige væv er lidt forskellig. Helt overordnet sker der det, at insulin binder til insulinreceptorer på leverceller (*hepatocytter*), muskelceller *(myocytter)* og fedtceller *(adipocytter)*. Efter insulins binding til insulinreceptoren, vil forskellige intracellulære processer (aktiviteter inde i cellen) igangsættes, alt efter hvilken celle det er. Helt grundlæggende vil insulin øge opbygningen af de forskellige energilagre, vi har i kroppen fx ved at påvirke glukoseoptag og –lagring, så glukose kan opbevares som glykogen. Insulin vil være med til at øge proteinsyntesen, ligesom den samtidig vil hæmme proteolyse, altså nedbrydningen af proteiner. Højt plasmainsulin vil øge dannelsen af triglycerider i leveren, som herefter kan opbevare triglyceriderne eller sende dem gennem blodet til fedt- og muskelvæv, som senere, ved behov, kan oxidere triglyceriderne og dermed frigive energi. Imens plasmainsulinen er høj, er det kulhydraterne, der skal bruges, og lipolyse og lipidoxidation (nedbrydning af fedt) hæmmes derfor.

Men hvad er det helt præcist insulin gør, som er så vigtigt for vores opretholdelse af liv?

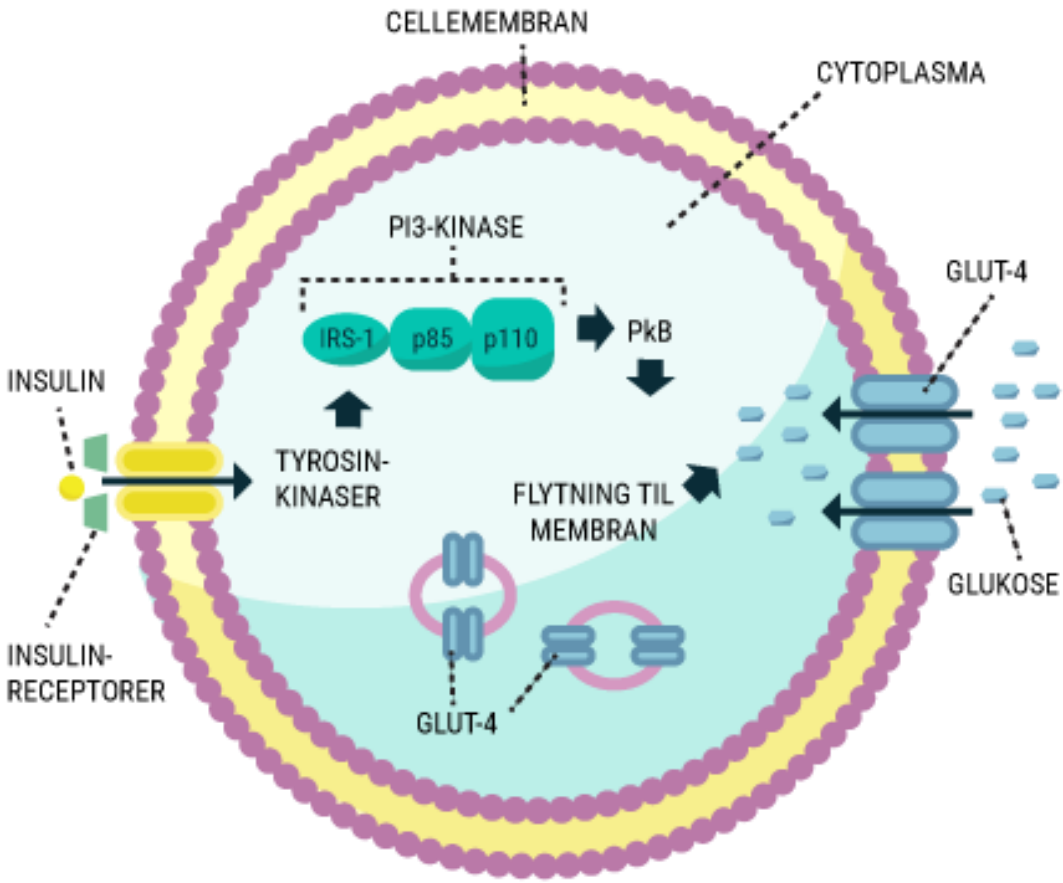
Som nævnt tidligere, er det hjerte- og skeletmuskulatur samt fedtceller, der er afhængige af GLUT4-transportere. Tilsammen står disse tre celletyper for ca. 2/3 af alle celler i menneskekroppen, og mens muskelcellerne bl.a. står for vores bevægelse og vejrtrækning, er fedtcellerne vigtige, fordi de kan opbevare vores indtagne energi til senere brug. Et højt insulinniveau i blodet vil medføre binding af et insulinmolekyle til insulinreceptoren i fx en muskelcelle, og det fører til en ændring i den intracellulære del af insulinreceptoren. Herefter sker der en række intracellulære processer, som gør, at mængden af GLUT-transportere opreguleres, og enzymet *glykogen synthase kinase* inaktiveres, så der dannes mere glykogen i cellen (figur 22).

Dybdegående forklaring af insulins virkning

Et højt insulinniveau i blodet vil medføre binding af et insulinmolekyle til insulinreceptoren i fx en muskelcelle, og det fører til en ændring i den intracellulære del af insulinreceptoren. Denne ændring i insulinreceptoren fører til en kaskadereaktion, som starter med aktivering af tyrosinkinaserne. Tyrosinkinaserne kan herefter fosforylere enzymerne MAP-kinase, som igangsætter cellevækst og genekspression, og PI3-kinase, hvis vigtigste funktion er vist i figur 22, nemlig at sende GLUT4-trasportere til cellemembranen. Det sker ved, at enzymet PI3K katalyserer reaktionen:

$$PIP2 + ATP \rightarrow PIP3 + ADP$$

PIP3 vil herefter aktivere protein kinase B (PkB), som faciliterer vesikelfusion. På denne måde transporteres GLUT4-transportere, som ellers ligger i vesikler i cellen, til cellemembranen, så glukosen kan komme ind i cellen (se *figur 22*). Ydermere sørger PkB også for inaktivering af glykogen synthase kinase (GSK), så der i sidste ende kan dannes mere glykogen i cellen. Dette hænger sammen med det øgede antal GLUT4-transportere og dermed øget mængde glukose i cellen, som skal oplagres i form af glykogen.



Figur 22. *Figuren viser, hvordan insulin muliggør glukoseoptagelse i fx en muskelcelle. Når insulin binder til insulinreceptoren, ændres dens struktur, og tyrosinkinaserne aktiveres. Tyrosinkinaserne sørger for at aktivere enzymet PI3-kinase, som katalyserer dannelsen af PkB. PkB sender derefter GLUT4-indeholdende vesikler til cellemembranen. Et større antal GLUT4-transportere i membranen øger cellens glukoseoptag og giver dermed cellen energi samtidig med, at den sænker blodsukkeret.*

Leverceller (hepatocytter)
Ovenstående mekanisme med GLUT4-transportere foregår som sagt i den tværstribede muskulatur og i fedtcellerne, men i levercellerne foregår processen lidt anderledes. Levercellerne har nemlig ikke GLUT4-transportere, som er afhængige af insulin, men i stedet GLUT2-transportere.

Når insulin stiger, tvinges leveren til at optage glukose fra blodet og enten omdanne det til glykogen ved glykogenese eller nedbryde det til pyruvat. Dette stof er en nødvendig byggesten for at kunne opbevare glukose som fedt. Et højt blodsukker vil øge dannelsen af fedt, triglycerider, i leveren. Leveren har herefter to muligheder med det nydannede fedt; den kan enten opbevare triglyceriderne i leveren eller – hvis der er rigtig meget fedt – sende dem gennem blodet til hhv. fedt- og muskelvæv. I fedt- og muskelvæv kan fedtet nedbrydes ved oxidation, så energien kan bruges, hvis der er brug for det. Insulin virker dog også ved at sænke oxidationen af fedt, som normalt frigiver ATP til forbrænding. På den måde tvinger insulin leveren såvel som andre væv til at forbrænde kulhydraterne og nedbringe blodsukkeret.

Quiz

1. Hvad vil det sige at bugspytkirtlen har en endokrin funktion?
    a. At bugspytkirtlen nedbryder makromolekyler såsom kulhydrater og proteiner.
    b. At bugspytkirtlen er et organ der udskiller hormoner, som for eksempel insulin og glukagon, til blodet.
    c. At bugspytkirtlen indeholder acinære celler som udskiller sekreter som for eksempel pancreassaft.

2. Hvilke celletyper i det endokrine væv (de langerhanske øer) står for produktionen af insulin og glukagon?
    a. Alfa- og Betaceller i de langerhanske øer producerer henholdsvis glukagon og insulin.
    b. Deltacellerne i de langerhanske øer producerer både somatostatin, insulin og glukagon.
    c. Alle celler i det endokrine væv producerer insulin og glukagon.

3. Insulin er:
    a. Et lille proteinmolekyle der øger anabolske processer i kroppen og stimulerer dannelsen af glykogen.
    b. Et lille proteinmolekyle der sammen med glukagon opregulerer de katabolske processer i kroppen
    c. En neurotransmitter der sammen med dopamin stimulerer velvære i hjernen

4. Hvilken rolle spiller insulin på glykogensynthase (GS)?
    a. Insulin er en kompetetiv inhibitor til glykogensynthase og nedregulerer derfor mængden af produceret glykogen i cellerne
    b. Insulin øger aktiviteten af glykogensynthase og øger derfor oplagringen af glukose i form af glykogen i cellerne
    c. Insulins target receptor er GLUT4-transporteren og ikke glykogensynthase. Derfor har insulin ingen indflydelse på GS.

5. Hvad er glykogenese?
    a. Glykogenese er reaktionen hvorved glykogen bliver omdannet til glukose.
    b. Glykogenese er processen hvorved kroppen omstilles fra at forbrænde fedt til at forbrænde glykogen.
    c. Glykogenese er den række af kemiske reaktioner der omdanner mange glucosemolekyler til det mere kompakte glykogen.

6. Glukose...:
    a. Bliver nedbrudt og danner ATP i en proces kaldet respiration, og frigiver derved energi til kroppens celler.
    b. Er et C6-kulhydrat som kan findes både i lineær og ringsluttet form.
    c. Findes hovedsageligt i blodet som blodsukker, men kan oplagres som glykogen i lever- og muskelceller.
    d. Alle tre nævnte svar er korrekte.

7. Glukagon:
    a. Bliver udskilt i højere koncentration ved høj koncentration af blodsukker
    b. Hæmmer glykogenolysen og stimulerer samtidig de anabolske processer som protein- og fedtsyresyntese.
    c. Igangsætter glykogenolyse (som glykogen til glucose) samt stimulerer glukoneogenesen (nydannelse af glukose fra for eksempel laktat og aminosyrer).

8. Hvad er forskellen i insulinudskillelse ved oral/intravenøs indtagelse af glukose?
    a. Grundet inkretineffekten vil intravenøs indtagelse øge insulinkoncentration markant.
    b. Grundet inkretineffekten vil oral indtagelse øge insulinkoncentration markant.
    c. Der er ingen forskel, da insulin udskilles på baggrund af glukosemængden.

9. GLUT4-transporteren er:
    a. En insulinafhængig transporter primært fundet i hjerte- og skeletmuskulatur som transporterer glukose over cellemembranen
    b. En membrantransporter som sørger for at insulin kan udskilles fra de langerhanske øer
    c. En glukoseafhængig transporter på muskelceller som transporterer glukagon ind i cellerne

10. Hvordan stimulerer øget glukoseniveau insulinudskillelsen i B-celler?
    a. Glukose fungerer som en non-kompetitiv inhibitor til et insulinnedbrydende enzym. Derfor vil insulin ikke blive nedbrudt og udskillelsen vil øges
    b. Glukose binder til den udadgående insulinkanal. Herved åbnes membrankanalen og insulin fra cellens cytoplasma diffunderer ud i blodet.
    c. Når glukoseniveauet i cellen stiger, vil metabolismen i cellen stige og derved øge mængden af ATP. Dette vil medføre at spændingsforskellen over cellemembranen ophæves, hvorved calciumkanaler åbnes. Den øgede mængde calcium vil da medføre frigivelse af insulin.

11. Hvordan påvirker insulin kroppens celler, ud over at stimulere dannelsen af glykogen?
    a. Højt insulinniveau øger også proteinsyntese og triglyceridsyntesen.
    b. Højt insulinniveau mindsker chancen for hjertekarsygdomme, da det øger koncentrationen af blodsukker.
    c. Højt insulinniveau stimulerer brugen af aminosyrer som energikilde, som alternativ til glukose.
    d. Alle tre nævnte svar er korrekte.

12. Bindingen af insulin til insulinreceptor…:
    a. Vil inaktivere insulinreceptoren, som samtidig fungerer som en glukosekanal, hvorved cellen ikke har adgang til glukose til forbrænding
    b. Vil starte en kaskadereaktion i cellen som resulterer i en øget mængde GLUT-transportere, samt at enzymet glykogen synthase kinase hæmmes.
    c. Vil igangsætte en intracellulær reaktion som vil medføre øget fedt- og proteinforbrænding.

d. Alle tre nævnte svar er korrekte.

13. Hvad er insulins effekt i leveren?
    a. Høj insulinkoncentration vil øge mængden af GLUT-4 transportere og derved resultere i højere glukoseoptag i levercellerne.
    b. Leverceller har ingen insulinafhængige transportere og vil derfor ikke påvirkes af insulinkoncentrationen.
    c. Ved højt insulinniveau tvinges levercellerne til at optage glukose, som de kan nedbryde til pyruvat og herefter lagre glukosen som fedt.

Øvelse, vejledning og flowchart

Genetiske undersøgelser er brugt som værktøj til at undersøge gener der er arvet fra ens forældre. Du har sikkert hørt at politiet bruger genetiske undersøgelser til at opklare forbrydelser, men de bruges også til identificere sygdomme og præ-disponeringer for sygdomme, såsom diabetes. I dette forsøg skal du teste en mus for tilstedeværelsen af en kendt mutation i et specifikt gen (HNF1A), som resulterer i den sjældne diabetes type 2 variant MODY. Den specifikke punktmutation der her bliver undersøgt, vil resultere i en dysfunktionel HNF1A transskriptionsfaktor. Da sekvensen af genet og mutationen er kendt, er det muligt at detektere mutationen ved specielt designede primere.

Som det første inden man går i laboratoriet, bør øvelsesvejledning læses og forstås:

Bemærk - Øvelsesvejledningen er af en højere detaljegrad end den øvelsesvejledning I finder i Det Virtuelle Laboratorium. Dette er for at gøre forsøget mere virkelighedsnært.

Inden du går i laboratoriet, er det en god idé at få en forståelse for nogle af de instrumenter, som der anvendes. Disse instrumenter er ligeledes meget anvendte inden for bioteknologi generelt. I denne øvelse anvendes centrifuge, PCR og gelelektroforese. Læs mere om instrumenterne på de følgende sider:

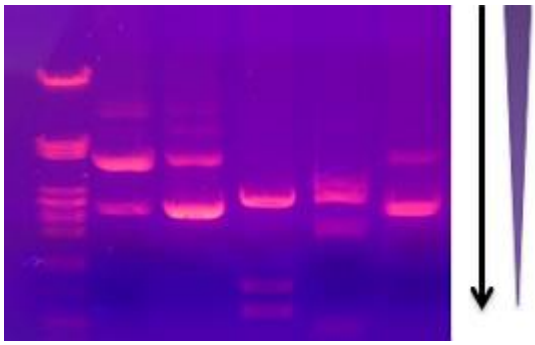
Centrifuge

En centrifuge er en maskine, som anvender centrifugalkraften til at adskille indholdet i en væske alt efter indholdets massefylde. Man vil typisk have en opløsning i et eppendorfrør, hvilket herefter placeres i centrifugen. Her skal man huske en såkaldt "modvægt", hvilket er en tilsvarende opløsning, som placeres overfor. Dette skaber balance i centrifugen og man undgår en potentiel meget farlig situation, idet centrifuger kan udsætte en opløsning for mange tusinde g. En almindelig person kan udsættes for 6 g før vedkommende mister bevidstheden.
Den enorme cirkulære kraft i centrifugen presser tungere partikler eller stoffer væk fra centrum og mod bunden af eppendorfrøret, mens lettere partikler vil blive trukket mod toppen. Herved kan eksempelvis DNA eller bestemt celler ekstraheres.

Gelelektroforese

Gelelektroforese er en adskillelsesteknik, der kan bruges til at separere forskelligt DNA eller protein i en gel (se gel i figur 2). Det gør det bl.a. muligt at måle enten antallet af basepar i en DNA-prøve eller længden af forskellige proteiner forholdsvis præcist (se figur 1).

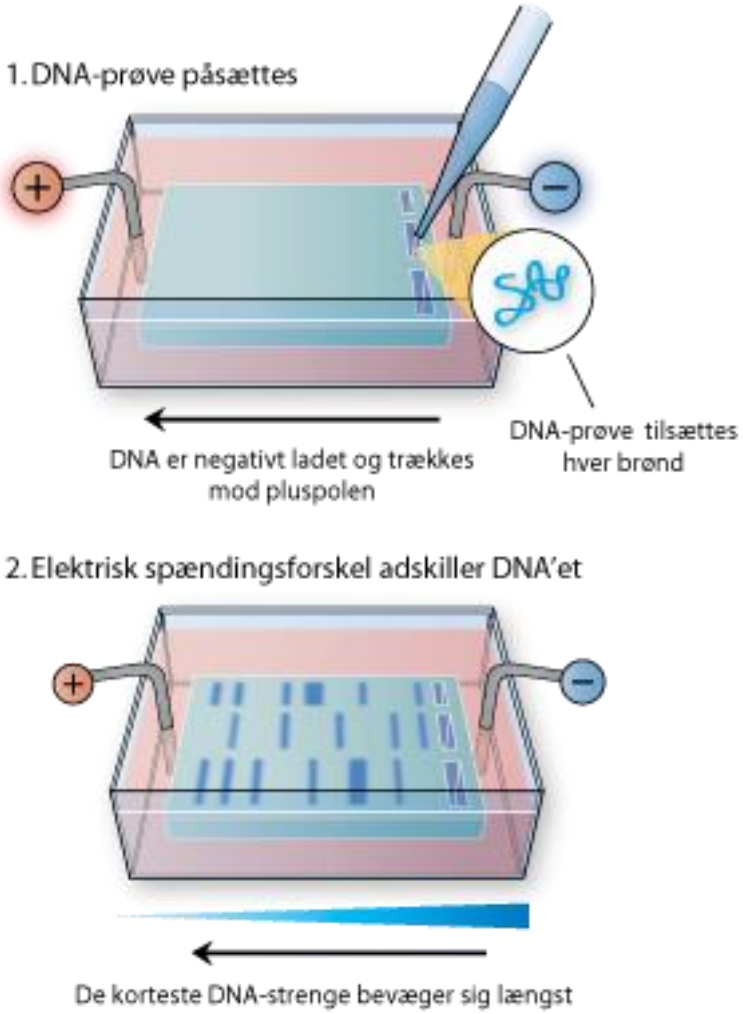
Adskillelse af forskellig DNA og proteiner er også nyttigt til oprensning fra en prøve. Fx kan man mindske risikoen for at bruge fejldannet DNA ved gensplejsning med DNA, man selv har fremstillet, hvor der samtidig er blevet dannet andre længder DNA end det korrekte; man adskiller simpelthen de forskellige længder og skærer den rigtige længde ud af gelen. Gelelektroforese bruges derfor ofte på flere forskellige stadier i udviklingen af en ny genmodificeret organisme.



***Figur 1**. Resultat af gelelektroforese med DNA. Hver lodrette bane er en DNA-prøve, der er løbet fra toppen mod bunden. DNA'et er adskilt i de forskellige længder i lysende bånd, så de korteste er løbet længst ned gennem gelen. (Foto: Mnolf, GFDL).*

I gelelektroforese af DNA udnyttes den negative ladning, som DNA har, til at adskille DNA af forskellig længde i en prøve. Den negative ladning stammer fra phosphatgrupperne i hvert nukleotid af DNA'et. De geler, der bruges, er faste og gennemsigtige. De støbes ud fra en opløsning af nogle særlige molekyler fx agarose.

DNA-prøven tilsættes i en brønd (fordybning) for enden af en gel, og der tilsluttes derefter elektrisk spændingsforskel. Herved skabes en frastødende negativ pol ved DNA-prøven og en tiltrækkende, positiv pol i den anden side af gelen (figur 2). DNA'et vil nu trække gennem gelen mod den positive side. De mikroskopiske huller i gelen gør bevægelsen sværere for DNA'et, jo længere det er. Derfor løber de korte DNA-molekyler hurtigere igennem end de længere.
Efter en gelelektroforese vil DNA'et derfor ligge sorteret i forskellige bånd efter antal basepar (alle, der er 600 basepar, ligger fx lige oven i hinanden).
Flere forskellige stoffer kan gøre DNA'et synligt for fotografering. Ofte brugt er det kræftfremkaldende ethidiumbromid, som binder sig til DNA'et, der herved bliver synligt i ultraviolet lys, som bruges ved fotograferingen af den færdige gel. Man kan køre flere prøver ved siden af hinanden i en gelelektroforese, hvor den yderste typisk vil være en markør, der indeholder nogle allerede kendte længder, så man kan sammenligne med prøverne.



Figur 2. *Princippet i DNA gelelektroforese, hvor de forskellige størrelser DNA adskilles i en gel. Gelen ligger i et kar med en buffer-væske.*

PCR

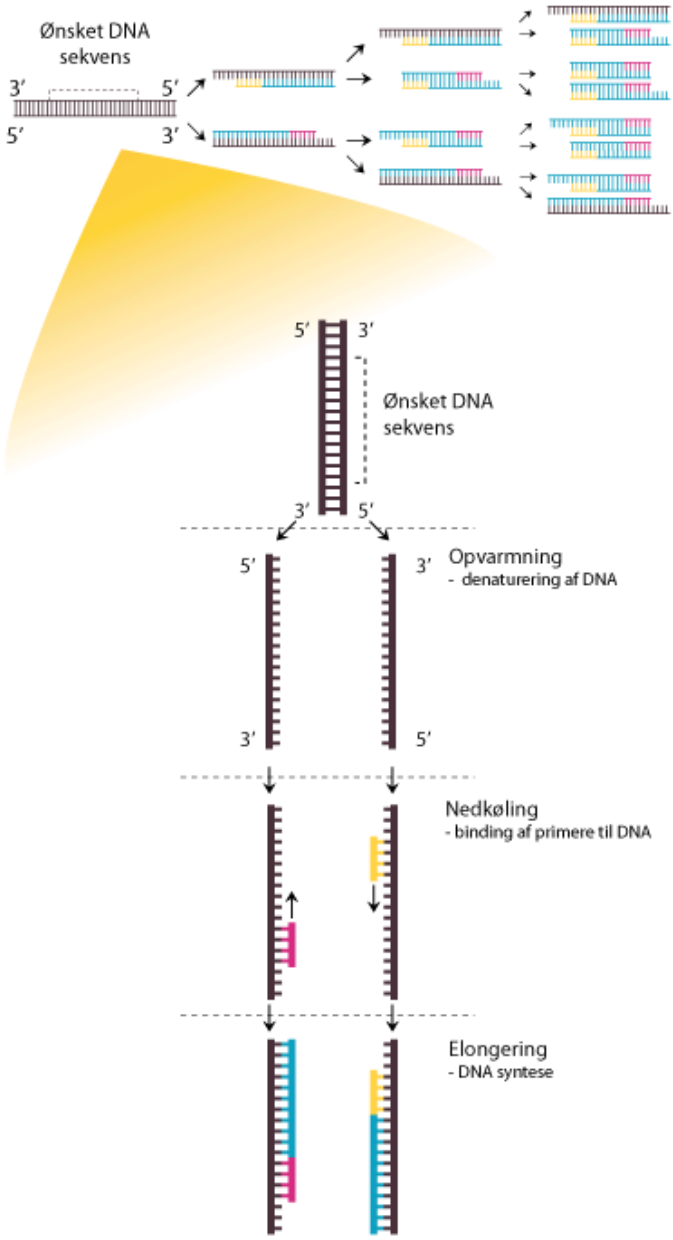
PCR *(Polymerase Chain Reaction)* er en af de mest udbredte molekylærbiologiske teknikker i dag og er helt uundværlig i mange situationer. PCR udnytter et af naturens egne enzymer, DNA-polymerase, til at opkopiere en bestemt DNA-sekvens i en række gentagne cyklusser. Med PCR er det altså nemt og hurtigt at skabe millioner af kopier af så lidt som én DNA-streng.
Ideen med PCR er som nævnt at foretage et antal gentagne cyklusser, hvor en udvalgt DNA-sekvens kopieres i hver cyklus og dermed principielt fordobles i antal for hver gang. Ligesom i naturen kan DNA-polymerase kun kopiere DNA, hvis der er korte såkaldte *primer*-sekvenser af **komplementær** DNA til stede. Primerne binder til DNA'et der, hvor kopieringen skal begynde.

To DNA-strenge er **komplementære** med hinanden, hvis de kan baseparre. Fx:
3'-ATGCAATAG-5'
5'-TACGTTATC-3'

Primere: DNA har som bekendt to strenge, der løber i hver sin **retning** (3' til 5' og 5' til 3'). Derfor vil DNA-polymerase i PCR også kopiere de to strenge i hver sin modsatte retning. Dette indebærer,

at der skal bruges to forskellige primere - én til start af kopiering i hver retning. DNA-polymerase bygger nemlig udelukkende en ny streng op i retningen fra 5' til 3'. Den streng, enzymet bruger som skabelon, skal altså gå modsat, dvs. fra 3' til 5' (se figur 1).

> En DNA-streng siges at have en **retning**, da hvert nukleotid har en 3'- og en 5'-ende. Fordi nukleotiderne altid sættes sammen 3'-5', vil hver DNA-streng også have en 3'- og en 5'-ende.



Figur 1. *Opkopieringen af en DNA-sekvens med PCR ved tilsætning af primere (gul og rød), der binder til startstedet for kopieringen på hver af de to DNA-strenge. Binding af primere afgør hvilken DNA-sekvens, der skal opkopieres fra den tilgængelige skabelon-DNA.*

Faserne i en PCR-cyklus: Hver cyklus er delt op i tre forskellige faser, der har hver deres temperatur og varighed (se figur 1).

1. **Opvarmning (denaturering af DNA) - Initiering**
   Det dobbeltstrengede DNA, der skal bruges som skabelon i reaktionen, skal først denatureres ved høj temperatur (ca. 95 oC) nogle sekunder.
2. **Nedkøling (binding af primere til DNA) - Anealing**
   Temperaturen sænkes til omkring 60 oC, hvor de tilsatte primere vil kunne binde til startstederne på det enkeltstrengede DNA.
3. **Elongering** (dannelse af de nye, komplementære DNA-strenge)
   Temperaturen hæves til 72 oC, hvor DNA-polymerase binder til primerne ved startstederne og bygger videre på de nye, komplementære DNA-strenge. DNA-polymerasen fortsætter, så længe temperaturen ikke hæves, og så længe der stadig er skabelon-DNA til rådighed. Varigheden af trinnet beregnes derfor, så cyklussen først genstarter, når hele den interessante DNA-sekvens er forlænget (elongeret).
   En PCR med 30 cyklusser varer gerne 2-3 timer.

Man kan desuden danne "kunstigt" DNA til gensplejsninger ved hjælp af PCR. Dette DNA er især brugt hvis man ønsker at gensplejse en organisme. Ved hjælp af særlige primere kan det desuden lade sig gøre at sætte to stykker DNA sammen fx et protein og grønt fluorescerende protein (GFP). På den måde bliver proteinet selvlysende, og man kan se det inde i cellen. Denne metode til sammensætning af DNA kaldes fusions-PCR og forklares ikke nærmere her.

Øvelsesvejledning

Materialer

- Mus med/uden diabetes
- Kanyle
- eppendorfrør
- Lysisbuffer
- Saltvand
- PCR-rør
- PCR-mix (nukleotider og Taq-polymerase)
- HNF1A primer
- Blå farve (bromfenolblåt)
- Gel
- DNA molekylvægtsmarkør

Metode

1 Udtag en blodprøve m. kanyle fra musen.
2 Overfør 4 ml af blodet til et eppendorfrør og centrifuger i 2 minutter ved 10000 g. NB husk at afbalancere centrifugen med et andet eppendorfrør.
3 Efter at indholdet i røret er blevet separeret udtages det hvide lag med “buffy coat” hvori de hvide blodlegemer befinder sig og overføres til et nyt eppendorfrør.
4 Røret med hvide blodceller opvarmes i varmeblok til 60 grader hvorefter 200 µl lysisbuffer og derefter 500 µl saltvand tilsættes. Herved **lyseres cellerne.**

5 Centrifuger de lyserede celler ved 10000 g i 2 min. for at skille cellerester fra DNA.
6 10 µl af **supernatanten**, som indeholder fritflydende DNA, overføres til et nyt PCR-rør og sættes på is for at forhindre at prøven ødelægges.
7 Til PCR-røret tilsættes 80 µl PCR-mix som indeholder Taq-polymerase og nukleotider. Desuden tilsættes 5 µl HNF1A primer.
8 PCR-røret inkuberes i PCR-maskinen ved følgende program:
    a. Cellelysis 95 grader 5 min
    b. Denaturering 95 grader 1 min
    c. Annealing 50 grader 1 min
    d. Elongering 70 grader 3 min
    e. 30 cykler af b-d
9 µl blå farve tilsættes nu til prøven og blandes ved forsigtigt at pipettere op og ned.
10 En forstøbt gel påsættes på gelelektroforesemaskinen og i den første brønd tilsættes 15 µl DNA-molekylvægtsmarkør. Til den næste brønd tilsættes 15 µl af den farvede prøve. NB brug altid handsker da gelen indeholder ethidiumbromid, som er kræftfremkaldende.
11 Tænd gelelektroforesen ved 110 V og lad den køre i 30 min.
12 Gelen kan nu undersøges ved UV-lys.

Cellelysis betyder at cellens membran sprænger, for eksempel resultat af osmotisk tryk, og cellen derfor dør

Supernatant: Efter centrifugering vil der i røret ofte findes to dele. Supernatanten er det flydende væske, mens pellet er det faste materiale der har lagt sig på bunden af røret.

Flowchart

Efter at have læst øvelsesvejledningen, anbefales det at du udfylder et flowchart.

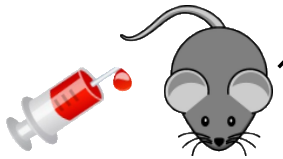
1. Hvad er g-kraft og hvor mange g udsættes cellerne for i centrifugen? Sammenlign med hvad et menneske kan udsættes for.
    - G-kraft er et mål for den acceleration en person eller en genstand udsættes for. Cellerne udsættes 10.000 g i centrifugen. Til sammenligning kan en normal, sund person overleve op til 6g før man besvimer.
2. Hvad er vigtigt at huske når man centrifugerer og hvorfor?
    - Det er vigtigt at afbalancere centrifugen, da vægten ellers vil blive fordelt skævt. Da centrifugen kan køre over 10.000 omdrejninger i minuttet, kan den mindste ustabilitet medfører at den spinner skævt og ude af kontrol. Afbalancering kan ske ved at sætte et eppendorfrør med samme vægt over for ens prøve.
3. Hvorfor bruges Taq-polymerase i PCR fremfor almindelig DNA polymerase?
    - For at denature DNA dobbeltstrengen skal temperaturen hæves til over 90 grader. Dette medfører dog også i denaturering af almindelig DNA polymerase, hvorfor enzymet ikke vil være funktionelt længere. Derfor bruges Taq-polymerase fra der termofile bakterie *Termus aquaticus,* da dette enzym er stabilt ved høje temperaturer.
4. Hvorfor er det vigtigt at bruge netop HNF1A primeren med den undersøgte mutation i?
    - Ved at bruge en primer der passer til et stykke på HNF1A-genet sikrer man sig at det er dette gen der bliver opformeret ved PCR. En primer med mutationen vil kun

kunne binde til genet hvis dette også indeholder mutationen. Derved sikrer man sig genet kun bliver amplificeret hvis det indeholder mutationen.

5. Hvor mange DNA-strenge fås efter 30 PCR-cyklusser, hvis man starter med et enkelt stykke DNA?
    - Cirka en milliard: 2^{30}= 1.073.741.824
6. Hvorfor er det vigtigt at have handsker på når man arbejder med gelen? Hvilken ladning har DNA og hvorfor?
    - Der er tilsat ethidiumbromid til gelen som binder til DNA'et for at synliggøre det. Netop ethidiumbromids egenskab til at binde til DNA, gør det desværre også kræftfremkaldende.
    - DNA er negativt ladet, da fosfatgrupperne i DNA'ets backbone er er negative.

Herefter er du klar til at gennemføre øvelsen "Genetisk test for forøget diabetesrisiko". Find denne i Det Virtuelle Laboratorie.

Øvelse 1 - Genetisk test

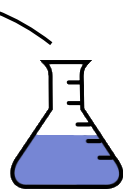


Centrifuge

1. Lag
Blod Plasma
2. Lag
Buffy Coat
3. Lag
Røde Blodceller

Lag nr. **2** overføres

Varmeblok



Lysis Buffer

Saltvand

Centrifuge

1. Lag
Supernantant
2. Lag
Pellet

Lag nr. **1** overføres

PCR mix

HFN1A primer

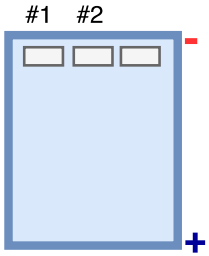
PCR program

1. Cellelysis ved **95** °C i **5** min
2. **Denaturering** ved 95 °C i 1 min
3. Annealing ved **50** °C i **1** min
4. **Elongering** ved 70 °C i 3 min
5. 30 cykler af b-d

PCR

Blå farve

Farvet prøve i brønd nr. **2**



DNA molekylevægts-markør i brønd nr. **1**

Svar på følgende spørgsmål findes over dette flowchart

1. Hvad er g-kraft og hvor mange g udsættes cellerne for i centrifugen? Sammenlign med hvad et menneske kan udsættes for.
2. Hvad er vigtigt at huske når man centrifugerer og hvorfor?
3. Hvorfor bruges Taq-polymerase i PCR fremfor almindelig DNA polymerase?
4. Hvorfor er det vigtigt at bruge netop HNF1A primeren med den undersøgte mutation i?
5. Hvor mange DNA-strenge fås efter 30 PCR-cyklusser, hvis man starter med et enkelt stykke DNA?
6. Hvorfor er det vigtigt at have handsker på når man arbejder med gelen? Hvilken ladning har DNA og hvorfor?

Rapportering

Lav en minirapport ved at svare på følgende spørgsmål:

1. I en af banerne var der et bånd der lyste tydeligt op. Hvad indikerer dette bånd og hvilken mus tilhørte den?
    - Prøven fra den diabetiske mus vil ses på gelen. Dette skyldes at DNA'et er blevet amplificeret via PCR, hvilket er sket da primeren har bundet til genfragmentet med mutationen.
2. Den undersøgte punktmutation ændrer blandt andet GAA til TAA i DNA-sekvensen. Hvorfor resulterer denne ændring i et ikke-funktionelt protein?
    - GAA koder for aminosyreren glutaminsyre, mens TAA er et stopcodon. Translationen vil altså terminere før proteinet er syntetiseret færdigt.
3. Hvorfor vil et knockout af en transkriptionsfaktor der initierer transkriptionen af insulin medfører diabetes?
    - Transkriptionsfaktoren binder til promoter-området på genet, og initierer herved transkriptionen af genet ved at binde RNA-polymerase. Hvis ikke transkriptionsfaktoren kan binde vil transkriptionen ikke forløbe. Da der ikke vil blive dannet noget mRNA, vil der heller ikke blive syntetiseret noget protein. Da der her er tale om genet for insulin, vil personen da ikke være i stand til at producere insulin, hvilket medfører diabetes.

Det har du lært

Du burde nu have en grundlæggende viden om diabetes på et molekylært og mikrobiologisk niveau, samt forstå hvilken rolle kulhydrater spiller i kroppen og forstå sammenhængen mellem glukose, glykogen, insulin og glukagon. Du burde også have fået en forståelse for, hvordan kroppens fysiologi (især omkring bugspytkirtlen) og diabetes hænger sammen. Desuden har du lært om MODY-diabetes, som skyldes en genetisk fejl og hvordan man kan bruge bioteknologiske værktøjer, som for eksempel polymerase chain reaction og gelelektroforese, til at tjekke personer for tilstedeværelsen af en specifik mutation.

Vigtige begreber: **Insulin, glukagon, beta-celler, blodsukker, glykogen, GLUT-transporter, MODY, PCR, centrifuge, gelelektroforese, mutation.**

Del 2 – insulinfølsomhed

Introduktion

Efter at have diagnosticeret ved hjælp af genetik, er det nu tid til at se på hvordan diabetes egentlig påvirker kroppen (især blodsukker og insulinniveauet), når først sygdommen "er i udbrud". Først måles glukose- og insulinkoncentration i blodet på hhv. en rask og syg mus for at se hvordan disse vekselvirker på hinanden. Faktisk måler mange hundrede tusinde mennesker hver dag deres blodsukkerniveauet, for at beregne mængden af insulin de skal have tilført, præcis ligesom i dette forsøg. Dette er desuden en af flere metoder, til at diagnosticere diabetespatienter. Desuden skal i måle hvor følsomme musene er overfor insulin og herved kigge på om de måske har udviklet insulinresistens og diabetes type II som følge deraf. Efter forsøget bør i have en god forståelse for hvordan insulin og glukose påvirker hinanden, samt hvordan begge molekyler spiller en afgørende rolle i diabetes. Desuden vil i lære om forskellen på forskellige typer af diabetes.

Teori

Diagnostik af diabetes

Læger kan diagnosticere diabetes hos en person ud fra en kombination af symptomer og et afslørende blodsukkerniveau. Bagefter kan lægen begynde jagten på grunden til, at patientens blodsukker er dårligt reguleret. Dårligt reguleret blodsukker medfører nogle meget typiske symptomer:

Træthed, fordi diabetes medfører, at glukosen i blodet ikke kan transporteres ind i de arbejdende celler. Når cellerne mangler energi (i form af glukose), er de ikke i stand til at udføre samme mængde arbejde.

Polyuri, som betyder at man producerer store mængder urin. Når blodsukkeret bliver højt nok, kan det ikke undgå at blive filtreret fra i nyrerne og ender dermed i urinen. Glukosen har her en osmotisk effekt, og trækker vand med ud. Det betyder, at der i sidste ende kommer store mængder glukoseholdigt urin ud.

Tørst, da forøgelse i blodsukker også medfører forhøjet osmolaritet i blodet. Osmolaritet er et kemisk begreb for antal mol osmotisk aktive partikler per liter opløsning. Fx sukkermolekyler per liter vandig opløsning. I menneskets tørstcenter i hjernens hypothalamus registrerer tørstceller blodets osmotiske tryk. Når blodets osmolaritet stiger, tolker disse tørstceller det som væskemangel, og får hjernen til at tro, at man er tørstig. Samtidig har man naturligvis også temmelig store væsketab via den ekstra mængde urin, man danner, når man har diabetes.

Vægttab, på grund af kroppens dårligere evne til at transportere glukose fra blodet og ind i cellerne, er diabetikere i mindre grad i stand til at lagre sukker fra kosten i leveren og musklerne. En diabetiker får simpelthen mindre ud af sine måltider.

Symptomerne foroven kan indikere, at patienten har diabetes. Men diabetes er en diagnose, man i dag stiller ud fra koncentrationen af hæmoglobin A1c (*HbA1c*) i patientens blod eller

enkeltmålinger af meget højt blodsukker. HbA1c er en type af hæmoglobin i kroppens erytrocytter (røde blodlegemer), som glukose binder til. Koncentrationen af HbA1c er derfor et mål for patientens blodglukosekoncentration over de sidste 120 dage, som er en erytrocyts gennemsnitlige levetid. Intervallet for denne koncentration for raske mennesker er **31-41 mmol/mol** (type HbA1c-hæmoglobin per mol af normalt hæmoglobin). Mængden af HbA1c vil være forhøjet hos patienter med diabetes, og i 2011 anbefalede WHO, at diagnosen for diabetes blev sat ved **>48 mmol/mol**. Yderligere er HbA1c niveauer mellem 41 og 48 mmol/mol lig med en "prædiabetisk" tilstand. Disse patienter har høj risiko for at udvikle diabetes senere i livet. Blodprøveanalyse af HbA1c kan dog ikke bruges, hvis patienten også har en sygdom, der påvirker hvor lang tid erytrocytterne lever. Denne levetidsforskel findes fx hos patienter med visse blodsygdomme.

Hæmoglobin er et protein i kroppens røde blodlegemer. Hæmoglobin er nødvendigt, for at blodcellerne kan binde ilt, og derpå transportere det fra lungerne og ud til kroppens andre celler. Hæmoglobin indeholder jern, som også er grunden til at blod er rødt.

I disse tvivlstilfælde kan lægen bruge en anden metode til at vurdere, hvorvidt patienten har problemer med blodsukkerreguleringen. Denne metode indebærer, at blodets glukoseniveauer bliver målt, både efter faste og 2 timer efter indtagelse af 75 gram glukose. Denne undersøgelse kaldes Oral Glukose Tolerance Test (OGTT), og kan stadig bruges diagnostisk for diabetes. Undersøgelsen med måling af HbA1c har den fordel, at patienterne ikke behøver at faste inden undersøgelsen, og lægen blot skal bruge en blodprøve. Herunder vises, hvad niveauerne af blodglukose skal være, for at diabetes bliver diagnosticeret. Diabetes diagnosen kræver at patienten har mere end én måling af blodglukose eller Hba1c i diabetisk niveau.

TEST	SUKKERKONCENTRATION I BLODET
Blodglukosekoncentration efter faste	>/= 7 mmol / L
eller blodglukosekoncentration 2 timer efter indtag af 75 g glukose	>/= 11,1 mmol / L
eller tilfældig blodprøve, hvis patienten har symptomer	>/= 11,1 mmol / L

Efter diabetes er blevet diagnosticeret, er man nødt til at finde sygdommens årsag, da behandlingerne er afhængige af diabetestypen. Et dysreguleret (dårligt reguleret) blodsukker, kan som sagt skyldes mange ting.
Den langt hyppigste årsag til diabetes, er patienternes *livsstil*. Diabetes Mellitus Type 2, som er den "erhvervede" form, står stadig for 80% af al diabetes i Danmark. Forskning har vist at, faktorer som overvægt, for fed "energi-rig" kost og manglende motion forøger risikoen for at udvikle bestemte former for diabetes. I disse tilfælde mener man, at kroppens celler udvikler grader af *insulinresistens*, hvilket beskrives senere i denne artikel. Diabetikerens *genetik* kan også spille en rolle for dysregulering af blodsukkeret, se senere. De sidste par år er forskere også begyndt at kigge på *tarmenes mikrobiom* og på hvordan gode og skadelige bakterier i tarmen hver især påvirker diabetespatienterne. Det har vist sig, at mikrobiomet kan spille en temmelig stor betydning for udviklingen af sygdommen, men præsenterer også muligheder i behandlingen af nogle typer diabetes.

Mikrobiomet er en betegnelse for alle de levende organismer, som bor på og inden i os mennesker, som ikke er vores egne celler. Det dækker blandt andet over hudbakterier, men vigtigere for diabetespatienter også organismer i tarmen. Læs mere på biotechacademy.dk

Diabetisk ketoacidose

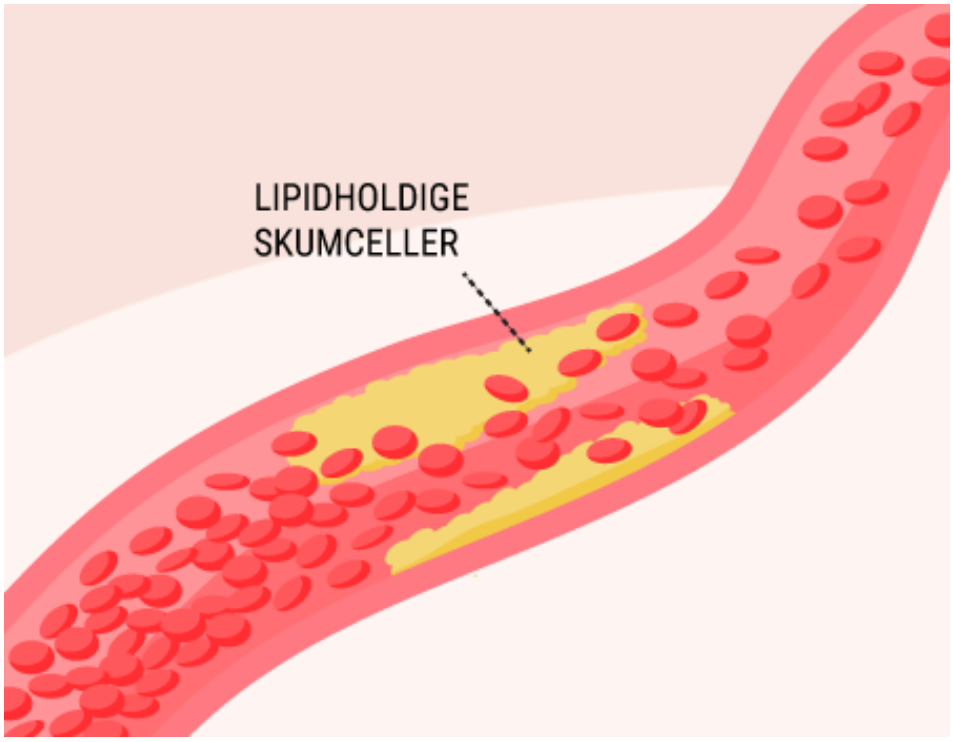
Insulinkrævende diabetes kan være akut livsfarligt, fordi dårligt reguleret blodsukker bl.a. kan medføre en livstruende tilstand med *diabetisk ketoacidose***.** Cellerne skal bruge glukose i deres energikrævende processer. Hvis cellerne ikke kan få adgang til glukose, begynder cellerne at forbrænde andre energikilder, især fedt fra kroppens depoter. Under normale forhold bliver frigørelsen af fedtsyrer hæmmet af insulin ude i fedtcellerne (adipocytterne). Derfor stiger mængden af fede syrer i blodet ved insulinmangel. Ved høje koncentrationer af frie fede syrer i blodet, går leveren i gang med at lave *ketonstoffer* (acetoacetat og D-3-hydroxybutyrat). De bliver lavet fra fedtstoffer og aminosyrer og anvendes især af muskelceller og hjerneceller. Der er energi nok i ketonstofferne, men hvis koncentrationen af ketonstoffer i blodet er for høj i for lang tid, så begynder blodets pH at falde uden for hvad der er normalt. En tilstand der kaldes acidose. Dette er en meget farlig tilstand, da alle kroppens funktioner er indstillet til at fungere optimalt ved pH i intervallet 7,35-7,45. Patienter med ketoacidose får kvalme, kaster op, vil være uklare i hovedet og har en risiko for at gå i koma på grund af den lave pH. Man kan faktisk mærke den acetone-agtige lugt af neglelakfjerner i udåndingsluften hos patienter med ketoacidose.

Hjerte-kar-sygdomme

På længere sigt giver diabetes, ud over de symptomer, der allerede er nævnt, forøget risiko for en tidlig død, blandt andet pga. *hjerte-kar-sygdomme*. Typisk vil disse patienter også have forhøjede niveauer af fedt i blodet. Hvis man samtidig har forhøjet blodtryk, har man kraftig forøget risiko for at få åreforkalkning. Det er fordi, man over tid får fedtfyldte immunceller, der lægger sig som belægninger, såkaldte ”plaques” inde i blodkarrene (se figur 23). De immunceller, der bl.a. står for at fjerne fedt og kolesterol fra blodet, hedder *makrofager* og fungerer som immunsystemets skraldemænd**.** Efter optagelsen af fedt kalder man disse makrofager for *skumceller***.** Makrofager er som udgangspunkt immunceller med mange smarte funktioner, der er med til at bekæmpe infektioner og hele sår. De er nødvendige for at lukke små rifter, som opstår i blodkarrenes vægge, når man har forhøjet blodtryk. Men hvis det er store, fedtfyldte skumceller, der sætter sig i karvæggen, så risikerer man dannelsen af plaques. Så bliver helingen præget af lag med fedt og skumceller. Over tid forkalker disse plaques og blodkarrets diameter indsnævres og påvirker blodcirkulationen flow.

De fleste langsigtede skader opstår også på grund af det kronisk forhøjede blodsukkers skadelige effekt på de mindste kar i kroppen. Denne nedbrydning kalder man for *mikroangiopati*. Skader på de små kar, medfører at de celler, som karrene forsyner, ikke får den nødvendige næring og derfor lider en stille død. Især de små kar i øjnene er følsomme, så diabetespatientens øjne får ikke den nødvendige næring. Det kan ende med *blindhed.* Nyrernes små kar, som er nødvendig for nyrens filtrationsevne, bliver også ødelagt og diabetespatienterne kan få tiltagende *nyresvigt.* Nerveceller særligt i hænder og fødder får ikke nok blod til at kunne vedligeholdes, og diabetes-patienterne mister noget af følesansen. Denne tilstand kalder man *diabetisk neuropati.* Patienter med diabetisk neuropati får nemt sår under fødderne, fordi de ikke mærker fx sten i skoen eller andre små sår. Grunden til, at nerverne virker dårligt, er et dårligt blodomløb i fødderne. På grund af den dårlige blodforsyning heler deres sår også dårligt, idet de nødvendige celler fra immunsystemet

transporteres rundt med blodet. Derfor bliver sårene ofte kroniske og kan give problemer med infektioner. Det kan være nødvendigt at amputere foden eller tæerne, fordi kroppen ikke selv kan hele såret.



Figur 23. *Dannelse af plaques i blodkar, medfører nedsat blodtilførsel, og dermed skade i kroppens væv.*

De vigtigste typer af diabetes i Danmark, vil vi gennemgå i de næste afsnit.

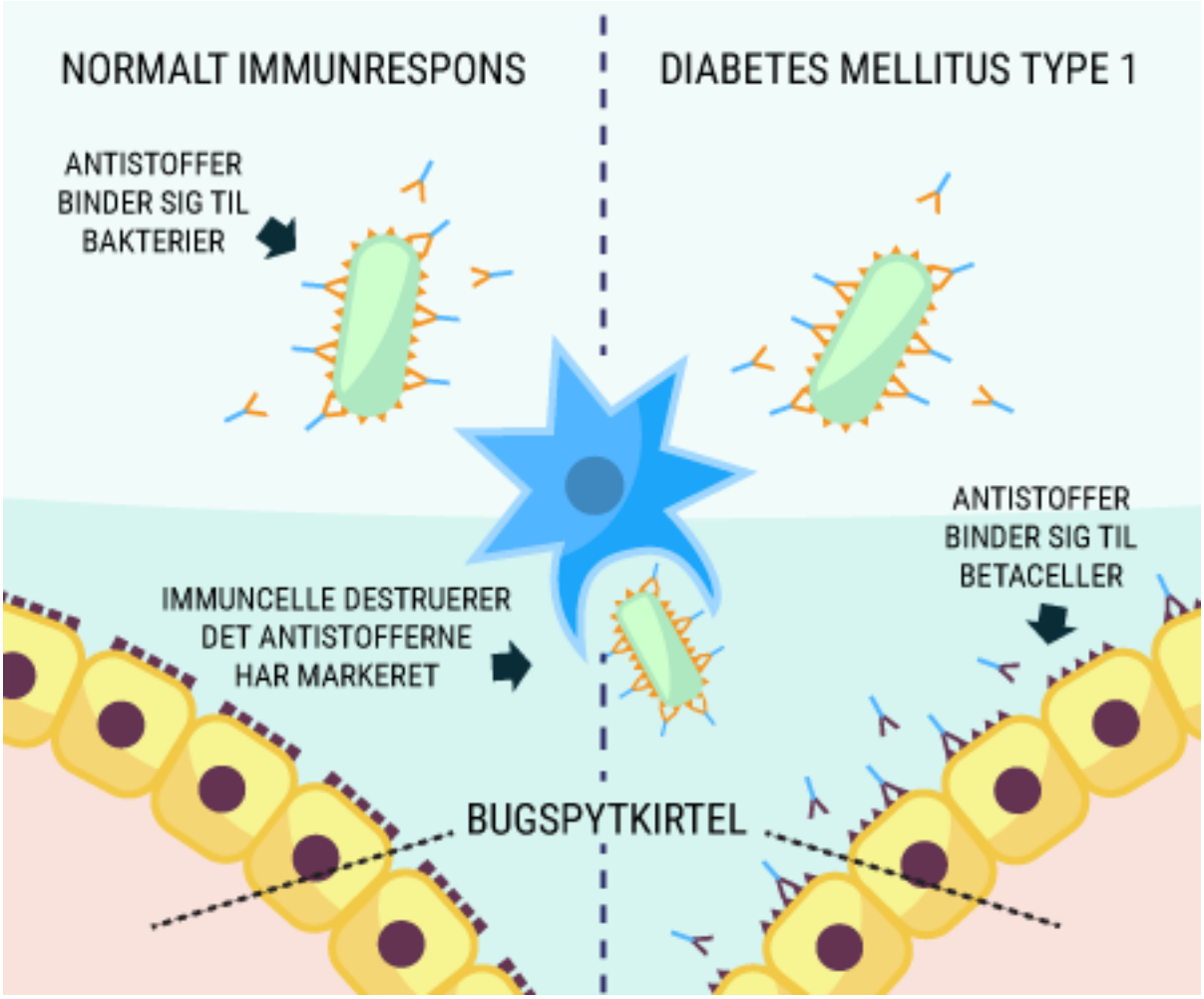
Diabetes Mellitus type 1 (DMT1)

Diabetes Mellitus type 1. Ca. 10% af diabetestilfældene i Danmark skyldes type 1 diabetes. Denne type er også hyppigst set hos unge, der ikke nødvendigvis er overvægtige. Her er årsagen til et dårlig reguleret blodsukker en autoimmun sygdom, hvor kroppens immunceller selektivt går til angreb på kroppens egne beta-celler i de langerhanske øer i bugspytkirtlen. Det medfører en tiltagende destruktion af de insulinproducerende beta-celler og dermed en dysregulering af blodglukosen, fordi der simpelthen ikke er noget insulin til at regulere glukoseoptaget i cellerne.

Antistoffer er vigtige molekyler, som immunsystemet danner, for hurtigt at gå til modangreb mod et ”ikke-selv”, man allerede har mødt. ”Ikke-selv” som genererer antistoffer, kalder man for antigener.

Kroppens immunsystem tolker i disse autoimmune tilstande simpelthen fejlagtigt nogle ”almindelige” molekyler som værende skadelige, dvs. kategoriserer kroppens egne stoffer som **antigener.** Immunsystemet yder jo normalt en service, da det kan vurdere om et stof eller en organisme hører til i kroppen; om stoffet er ”selv” eller er ”ikke-selv”, for eksempel en influenzavirus. Under normale omstændigheder vil ”non-self” angribes af bl.a. immunsystemets

celler. Når et immuncelle-angreb går i gang, frigives der også immuncelleaktiverende molekyler. Disse virker ved at forstærke immunsystemets respons og kaldes ”cytokiner” (blandt andet Tumor Necrosis Factor alfa og Gamma-Interferon). Læs mere i Biotech Academy undervisningsprojektet om Immunforsvaret.



Figur 24. *Ved DMT1 nedbryder kroppens immunceller ens egne beta-celler, som kroppen fejlagtigt selv har dannet antistoffer mod.*

De nedbrudte dele fra ”non-self” transporteres til en lymfeknude i nærheden. Her kan de fremmede dele blive præsenteret som et antigen, som kroppens immunceller kan lære at genkende, huske og reagere på. Hvis de modne immunceller senere støder på dette antigen igen fx ude i kroppens væv, vil de blive ude i vævet og rekruttere immunceller, der kan hjælpe med at destruere det skadelige fx bakterier i kroppen.

Ved DMT1 er det ikke åbenlyst, hvad der starter den autoimmune reaktion. Patienterne har næsten altid genvariationer, der disponerer – altså forøger risikoen – for autoimmunitet. Oftest starter kroppen selv den autoimmune reaktion, men autoimmune reaktioner kan også startes af en ukendt miljøfaktor.

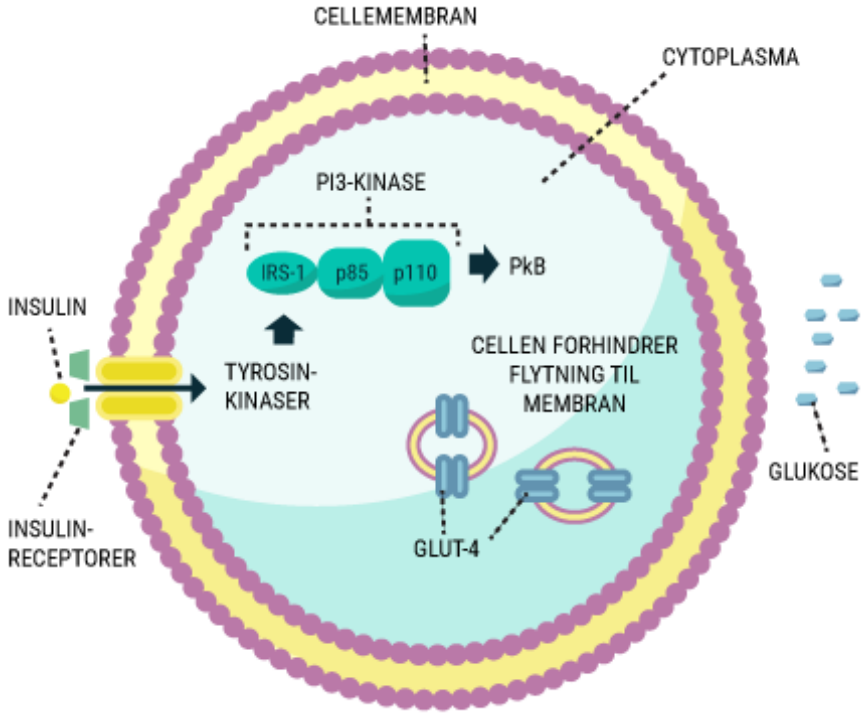
Det kan for eksempel være noget kemi i en fødevare eller en almindelig virus. Så vil immuncellerne reagere på det ”ikke-selv” molekyle, de skal reagerer på. Dette molekyle kan ligne noget fra patientens egne beta-celler i bugspytkirtlen, og patienternes immunsystem begynder fejlagtigt at angribe sine egne beta-celler, som var de ”ikke-selv”. Der er også mange teorier om at virusinfektioner, kan starte den autoimmune reaktion, men det er ikke tydeligt eftervist. Når immunsystemet producerer antistoffer mod kroppens egne celler, kalder man dem autoantistoffer.

Man har, ved at analysere DNA hos patienter med DMT1, vist, at op mod 96% af DMT1-patienterne danner antistoffer mod én eller flere af tre vigtige beta-cellespecifikke molekyler. Patienter med DMT1 danner altså antistoffer mod enzymer i deres egne beta-celler, fx glutaminsyredecarboxylase (GAD) eller tyrosinphosphatase (IA-2), men også mod andre molekyler fx hormonet insulin (IAA).

Genkoden for mange af disse autoimmune antistoffer, er lokaliseret til alleller på det 6. kromosom, som man kan undersøge ved hjælp af den metode, I også skal prøve i Det Virtuelle Laboratorium. Det har også vist sig, at mange raske danskere har disse genotyper uden at være syge. Man siger derfor at genotypen har lav penetrans, fordi man ikke nødvendigvis bliver syg af at have genotypen. Ud over at DMT1 kan starte ”uforklarligt” (idiopatisk), forsøger man at klarlægge andre faktorer, der kan starte dette autoimmune respons. Det gør man, bl.a., fordi man ser en sæsonvariation (der er flest, der debuterer i vintermånederne med DMT1), og man mistænker som sagt vira, fødevarekomponenter og andre kemiske forbindelser som årsager til det autoimmune respons hos patienter med DMT1.

Diabetes Mellitus type 2 (DMT2)

DMT2 eller det nu umoderne navn ”gammelmandssukkersyge” står for 80% af diabetestilfældene i Danmark og er derfor den allerhyppigste form. Årsagerne til udviklingen af DMT2 er helt overvejende *overvægt* med for *energitæt mad* og for *lav fysisk aktivitet.* Lidt forsimplet, er der en uoverensstemmelse mellem sammensætningen og mængden af kost, og hvor stort energiforbrug man har. Som resultat af patienternes kost og livsstil, har deres beta-celler dannet ekstra meget insulin igennem lang tid, for at holde trit med det høje glukoseniveau i blodet. Samtidig har patienterne sat deres andre celler, især muskelceller og fedtceller, på overarbejde med at optage den ekstra glukose og lagre den. Det ender med at cellerne i kroppen udvikler *insulinresistens.* Cellerne får nemlig rigeligt med energi, og derfor nedreguleres transporten af de insulinafhængige glukosetransportere (GLUT4) til deres cellemembran, hvor de skal være for at fungere. Det betyder at absorptionen af glukose via GLUT4-transporteren ind i især lever og fedtcellerne fungerer dårligere, og blodsukkeret forbliver forhøjet.



Figur 25. Insulinresistens i kroppens celler hæmmer transporten af GLUT4 til cellemembranen, så glukoseniveauet i blodet forbliver højt.

Ved insulinresistens falder niveauet af blodglukose altså langsommere end hos raske. Det betyder at beta-cellerne ikke stopper med at danne ekstra insulin, indtil man har tvunget det sidste glukose ind i de celler, som skal lagre glukosen. Dette er mindre problematisk, så længe der bliver dannet nok insulin til at blodsukkeret på et tidspunkt normaliseres. Faktisk har langt de fleste overvægtige en grad af insulinresistens med forhøjede niveauer af insulin i blodet (hyperinsulinæmi), uden at de nødvendigvis har DMT2. Man antager at DMT2 udvikles, når beta-cellerne ikke længere er i stand til at producere insulin nok til at kompensere for insulinresistensen. Det kan skyldes, både at aktiviteten i beta-cellerne falder, eller at der bliver færre af dem. Noget der typisk sker, hvis man ikke gør noget ved sin livsstil.

Beta-cellernes dårlige funktion hænger også sammen med, at patienter med DMT2 ofte får forstyrrelser i deres glukagonregulering. Glukagonet aktiverer, leverens nedbrydning af glykogen til glukose, som bliver udskilt i blodet, for at få blodsukkeret til at stige. Glukagonet varetager en vigtig funktion, der giver cellerne den nødvendige energi, når man er mellem måltiderne.

Men hos nogle diabetespatienter falder glukagon ikke i forbindelse med måltider, som det skal. Derfor stiger blodsukkeret hos disse patienter selvom, det i forvejen er højt på grund af maden. Dette medfører yderligere dannelse af insulin fra beta-cellerne. Over længere tid vil kroppens celler blive insulinresistente fordi glukose- og insulinniveauet konstant ligger højt. Det kalder man for *glukosetoxicitet.*

Endelig vil adipocytterne (fedtcellerne) også reagere på forhøjede niveauer af glukagon. De vil nedbryde fedt til frie fedtsyrer, som bliver udskilt i blodet. Høje niveauer af frie fedtsyrer, vil føre til en ophobning af fedt i celler, der ikke er i stand til at lagre fedt. Det kalder man for **lipotoxicitet**,

og det forhindrer typisk cellerne i deres primære opgaver. Dette bliver fx problematisk, når beta-cellerne ikke længere kan producere insulin på grund af lipotoxiciteten.

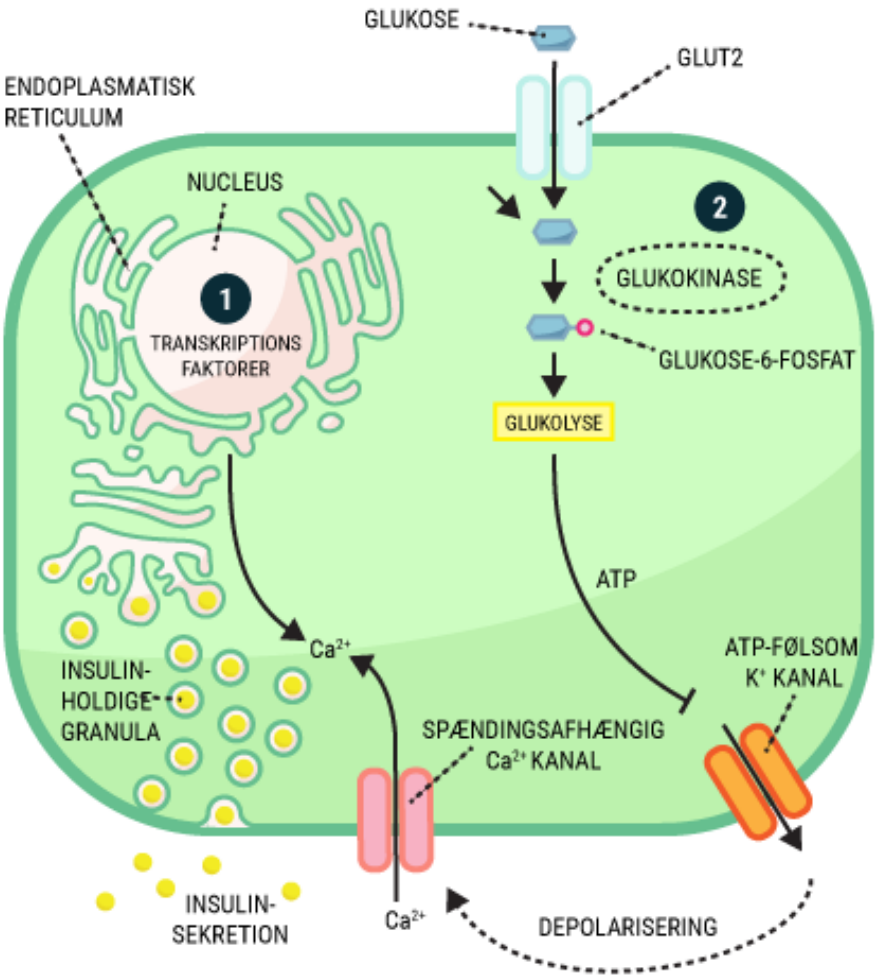
De forhøjede niveauer af glukose og fedtsyrer i blodet har som nævnt, mange dårlige følgevirkninger på kroppens celler. Hvis det varer længe nok, påvirker det også beta-cellerne, som bliver dårligere til at producere insulin. Typisk bliver de mindre eller også går de til grunde, og så bliver kroppen endnu dårligere til at regulere blodsukkeret.

Forskning viser også at, insulin virker dårligere, hvis kroppen er i en *inflammations/betændelsestilstand.* Immunsystemet frigiver signalstoffer (cytokiner) i betændelsestilstande, som skal hjælpe med at aktivere andre immunceller. Disse cytokiner vekselvirker også uhensigtsmæssigt med insulinen og insulinens receptorer på cellerne, så insulinen virker dårligere. Grunden til denne inflammationstilstand er stadig uklart. Man mener, at store mænger fedt især i bugen, aktiverer immunsystemet. Fedtcellerne (adipocytterne) kan blive stressede, og ved stress i lang tid går fedtcellerne til grunde. Resterne fra de ødelagte fedtceller aktiverer immunsystemet, så der opstår en betændelsestilstand. Denne betændelsestilstand opstår, når immuncellerne skal fjerne celleresterne. Som beskrevet senere spiller bakterierne i tarmene (mikrobiomet) også en stor rolle for inflammationstilstande, hvad man efterhånden tillægger en større og større betydning hos patienter med DMT2.

Oprindeligt blev DMT2 kaldt ”Gammelmandsukkersyge”, fordi tilstanden nærmest kun blev set hos ældre overvægtige. Størstedelen af patienterne (70-80%) er stadig i denne gruppe. Men efterhånden ser man også DMT2 med især nedsat og utilstrækkelig insulinsekretion fra beta-cellerne hos normalvægtige, og også hos unge (ca. 20% af DMT2 tilfældene).

Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) og Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)

Der findes en ”Diabetes Mellitus Type 1½” *LADA,* som står for ca. 10% af alle diabetestilfælde**.** Disse patienter har i første omgang symptomer og livsstil, der tyder på en erhvervet form for diabetes (altså DMT2). Men når de bliver undersøgt, kan man måle at immunsystemet danner autoantistoffer mod beta-cellerne. Derfor bevæger patienterne sig mod en tilstand, der også ligner DMT1 med en tiltagende nedbrydning af kroppens egne beta-celler.



Figur 26. *Insulinfrigivelse i en rask betacelle. Glukosen i blodet bliver optaget gennem GLUT2 (der er en insulin-uafhængig kanal). Glykolysen omdanner glukosen til ATP, der hæmmer nogle specifikke ATP-følsomme kalium-kanaler i cellemembranen. Dermed bliver de spændingsafhængige calciumkanaler aktiveret, da cellen nu ophober positive kalium-ioner. Herved strømmer calcium ind i cellen. Calcium er nødvendige for at transportere granula med insulin ud til celleoverfladen, hvor insulinen bliver frigivet til blodet.*

En anden genetisk form af diabetes er *MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young)*. Det er en arvelig tilstand, som står for ca. 5% af alle diabetestilfælde. Der findes flere forskellige typer af MODY. Patienterne kan have en mutation i transkriptionsfaktorerne (1 i figur 26). Transkriptionsfaktorer er proteiner, der findes i cellens kerne (nucleus). De er nødvendige for, at cellens DNA bliver aflæst korrekt. DNA indeholder blandt andet beta-cellens opskrift på insulin, og en fejl i transkriptionsfaktorerne medfører altså, at cellen ikke kan danne insulin.

Hos patienter med en specifik type af MODY (MODY2) er det en mutation i glukokinasen, der medfører en manglende insulinfrigivelse (2 i figur 26). Glukokinasen er nødvendig for at omdanne den optagede glukose til glukose-6-phosphat. Hvis der ikke bliver dannet ATP, bliver der i sidste ende ikke frigivet noget insulin, på trods af at beta-cellen stimuleres med glukose fra blodet.

Sekundære former for diabetes

Der er også de *sekundære former* for diabetes. Beta-cellerne og deres evne til at udskille insulin, og dermed den hormonelle regulering af blodsukkeret, kan blive påvirket, hvis man bliver opereret i bugspytkirtlen. Enten fordi man opererer dele af bugspytkirtlen ud på grund af cancer, eller fordi bugspytkirtlen bliver skadet. Diabetes kan også opstå, hvis beta-cellerne bliver fjernet eller ødelagt, noget som fx også kan ske ved svære infektioner (pancreatitis). En anden slags diabetes ses hos gravide. Ca. 3-4% udvikler diabetes efter 20. graviditetsuge, men sygdommen forsvinder typisk efter barnets fødsel. Man kalder dette fænomen Gestationel Diabetes Mellitus (*GDM*). Man mener denne type opstår både, som resultat af den gravide krops hormonelle forandringer, kroppens forøgede energibehov på grund af fosteret og på grund af tiltagende insulinresistens hos den gravide. På trods af at sygdommen forsvinder bagefter, har disse kvinder en forøget risiko for at udvikle diabetes senere i livet.

Behandlingen af de forskellige diabetesformer beskrives i næste artikel. Da mange patienter har diabetes, og derfor har et stort behov for kontakt til sundhedsvæsenet, er det en meget ressourcekrævende sygdom. Derfor bliver der også lavet meget forskning i, hvordan den kan behandles. Noget af den nyeste diabetesforskning beskæftiger sig med kroppens mikrobiom og dets rolle i forskellige typer diabetes.

Mikrobiomet er betegnelsen for alle de organismer, der lever med et menneske som vært. Man har bakterier og andre organismer mange steder, for eksempel på huden og i mavetarmkanalen. Nogle af disse organismer er skadelige for mennesket, og kan være med til at give sygdom. Andre af disse organismer kan beskytte dig mod sygdom, og har altså en gavnlig effekt. Mennesket består faktisk af 10 gange flere bakterieceller, end egentlige menneskeceller. Og hvis man lægger alle de forskellige bakteriers genomer sammen, koder de for 150 gange flere gener end en menneskecelle gør. Man har derfor refereret til disse bakterier, som kroppens ”glemte” organ. Man har i lang tid vidst, at mikroorganismer betød noget for sygdomme og infektioner, men i dag ved man, at bakterier også kan gøre noget godt for helbredet. Mikrobiomet påvirkes naturligvis af, hvad vi spiser. Samtidig har mikrobiomet også betydning for aktivering af kroppens immunsystem, ikke kun i mavetarmkanalen, men også i resten af kroppen. I den forbindelse, spiller mikrobiomet også en stor rolle i forbindelse med overvægt og diabetes.

Probiotika er defineret som ”levende organismer, der har en gunstig effekt på værtens helbred, når det gives i passende mængder.” Man kan altså transplantere ”gode” bakterier, til folk som har en dårligere tarmflora. Men man har også fundet ud af, at de forskellige bakterietyper foretrækker forskellige energikilder, så man kan også selv give probiotika gode vækstbetingelser, hvis man tilpasser sin kost. Dette er beskrevet i undervisningsprojektet Sundhedsfremmende bioaktiv kost her på hjemmesiden.

De bakterier, der foretrækker lange komplekse kulhydratkæder, har oftest en bedre effekt på kroppen end de bakterier, der foretrækker diæter med meget fedtindhold. Det betyder også at overvægtige personer, sandsynligvis også har en overvægt af ufavorable tarmbakterier på grund af kosten.
Man har faktisk allerede i laboratorier givet ”sunde” mus en grad af insulinresistens, ved at ændre på deres tarmflora. Man har også lavet forsøg, hvor diabetespatienter kunne behandles med mindre doser medicin, efter en god tarmflora var blevet oprettet.

Det hænger sammen med, at man efterhånden har fået bevist nogle af de ”gode” effekter, en sund tarmflora har: *Tarmvæggen* er oftest mindre gennemtrængelig (permeabel) hos folk, der spiser fiberrig kost på grund af, at probiotika ikke skader tarmepitelet, som andre bakterier gør. Gennemtrængelighed i tarmen har betydning for, hvor meget *endotoxin* der kan kommer ind i kroppen fra tarmkanalen. Endotoxin (som er et lipopolysakkarid) er en bestanddel fra visse bakteriers cellevæg. Dette stof aktiverer immunsystemet og starter en inflammationstilstand i kroppen, når det kommer ind i blodet. Som I ved nu, spiller inflammationstilstande i kroppen en stor betydning, når det gælder effekten af insulin og blodsukkerreguleringen. Endelig producerer nogle ”gode” bakterier også kortkædede fedtsyrer, som kaldes *Short Chain Fatty Acids* (SCFA). Man har bevist, at DMT2-patienter har færre SCFA-producerende bakterier i tarmen, end raske personer har. SCFA påvirker L-cellerne i tarmepitelet og giver en øget frigivelse af hormonerne GLP-1 og PYY. Begge hormoner mindsker appetitten, og GLP-1 øger også beta-cellernes frigivelse af insulin, når blodsukkeret er forhøjet. Forskningen i, hvordan mikrobiomet ellers spiller en rolle for sundheden, er stadig i fuld gang.

Kendskab til sygdommen og behandlingen er vigtig, fordi diabetes er en folkesygdom, både i Danmark og i resten af verden. I år 2012 havde 320.000 danskere en diabetesdiagnose. Samtidig var der 200.000 danskere, der ikke var klar over, at de havde diabetes. Ud over denne halve million var det anslået at 750.000 danskere havde en tilstand af prædiabetes med risiko for at udvikle diabetes senere på grund af deres livsstil og/eller genetik. På verdensplan er omtrent 420 millioner diagnosticeret med diabetes. Disse tal ser i øvrigt kun ud til at stige.

Hvad har i lært?

I har nu lært om de symptomer, personer med dysreguleret blodsukker typisk har, inden de får diagnosen diabetes. Symptomer som tørst, træthed, vægttab og polyuri. Samtidig har I læst, at diagnosen for diabetes bliver stillet ud fra patientens niveauer af hæmoglobin A1c i blodet (over 48 mmol/mol) eller ved blodsukkermålinger hos lægen. Årsagerne til et dysreguleret blodsukker er som beskrevet mange, og både patienternes livsstil, genotype og andre faktorer spiller ind. Kroppens inflammationstilstand er også vigtig for, hvor godt insulinen virker på cellerne, og i den forbindelse spiller både mængden af fedtvæv og tarmenes bakteriesammensætning en rolle. Helt essentielt får man diabetes, når glukosen ikke kan transporteres ind i kroppens celler. Årsagen til, at blodsukkeret ikke kan normaliseres, kan både skyldes en autoimmun sygdom, som ødelægger beta-cellerne (type 1), erhvervet insulinresistens (type 2) og de mere sjældne genetiske variationer (MODY og LADA). Et dårligt reguleret blodsukker kan have nogle meget alvorlige følgesygdomme, som hjerte-kar-sygdomme med blindhed og nyreproblemer, kroniske sår og eventuelt diabetisk ketoacidose med koma og død til følge.

Quiz

1. Hvorfor kan koncentrationen af Hæmoglobin A1c (HbA1c) bruges til at diagnosticere patienten for diabetes?
    a. Niveauet af HbA1c afspejler middelplasmaglukose gennem de sidste 2-3 måneder og et højt Hb1Ac niveau indikerer derfor diabetiske tilstande.
    b. Insulin frigiver HbA1c, hvilket derfor er et pejlemærke for om insulinudskillelsen er normal.
    c. Hvis personen er diabetisk, vil HbA1c niveauet være meget lavt grundet forkert større oplagring af glukose.

2. Hvorfor er diabetisk ketoacidose livsfarligt?
    a. Ved diabetisk ketoacidose vil blodsukkeret falde så meget at der ikke længere er energi nok til cellerne i kroppen, som derfor dør.
    b. Når kroppen ikke kan forbrænde glukose, men bruger fedtsyrer i stedet, vil disse blive nedbrudt til ketoner. Ketoner er toksiske over for kroppens celler, da de virker som inhibitorer for mange enzymer.
    c. Når kroppen ikke kan forbrænde glukose, men bruger fedtsyrer i stedet, stiger koncentrationen af ketonstoffer, som er et mellemprodukt af forbrænding. Ketonstofferne får pH i blodet til at falde til under de cirka 7,4 hvor alle kroppens processer fungerer optimalt.

3. Diabetes type I er…
    a. En livsstilsygdom, som skyldes at kroppens celler er blevet immun over insulin, grundet et overindtag af energi gennem længere tid.
    b. En sygdom der primært rammer ældre personer, da beta-cellerne mister deres evne til at producere insulin.
    c. En autoimmun sygdom, hvor kroppens immunforsvar angriber de insulin-producerende beta-celler, og derved resulterer i en dysregulering af blodglukosen.

4. Hvornår kan man konstatere diabetes hos en patient?
    a. Når HbA1c koncentrationen er under 48 mmol/mol.
    b. Ved en glukosekoncentration på over 7 mmol/L efter faste.
    c. Ved glukosekoncentration over 5 mmol/L 2 timer efter indtagelse af 75 g glukose.

5. For lavt aktivitetsniveau og for energiholdig kost kan:
    a. Resultere i diabetes type II, da muskel- og fedtceller har optaget for meget glukose over længere tid og derved har udviklet insulinresistens.
    b. Resultere i diabetes type I, da det skader immunsystemet og derved bidrager til inflammatoriske tilstande.
    c. Reducere produktionen af insulin, da højt energiindtag resulterer i højt glukagonniveau.

6. Hvilket af følgende udsagn om diabetes type II er forkert?
    a. Ved DMT2 er glukagonudskillelsen dårlig reguleret, så blodglukoseniveauet ikke falder.

   b. Et højere glukagonniveau vil medvirke til at fedtcellerne udskiller for mange frie fedtsyrer til blodet i en tilstand kaldet lipotoxicitet.
   c. Ved DMT2 reagerer cellerne for kraftigt på insulin og optager derfor for meget glukose hvilket resulterer i hyperglykæmi.
7. Hvordan kan man forestille sig at man kan behandle DMT 1?
   a. Vaccinere med antistoffer mod beta-celler.
   b. Give patienten insulin.
   c. Tilføre insulinproducerende beta-celler til patienten.
8. Hvorfor kan det være gavnligt at visse tarmbakterier producerer Short Chain Fatty Acids (SCFA)?
   a. SCFA mindsker appetitten og øger insulinproduktionen ved at stimulerer frigivelsen af hormonerne GLP-1 og PYY.
   b. SCFA genkendes af de samme receptorer, som genkender insulin, og stimulerer derfor optagelsen af glukose.
   c. SCFA binder til de antistoffer som patienter med DMT1 normalt danner mod beta-cellerne, og modvirker derfor et autoimmunt respons.
9. Hvilken funktion udfører bakterier IKKE i menneskekroppen?
   a. Forårsager sygdomme.
   b. Hjælper til at nedbryde vores kost.
   c. Hjælper til translation af RNA til protein.
   d. Medhjælper til at aktivere immunsystemet.

Øvelse og vejledning

Laboratoriet har modtaget to mus, hvoraf den ene skulle være diabetisk. Det er nu din opgave at påvise, at den ene af de to mus har diabetes gennem en række forskellige forsøg. Du skal tage blodprøver, undersøge musenes insulinfølsomhed ved en glukosetolerance test og en insulinfølsomhedstest.

Blodprøve

Blodprøver er blod udtaget fra en vene, som er de blodårer, der fører tilbage til hjertet. Blodet kan undersøges for sammensætning af salte, enzymer, hormoner og proteiner, og i et vist omfang genetisk materiale. Herudover kan man undersøge celletyper og cellemængder. Blodet består af:

- **Celler:** Røde og hvide blodlegemer samt blodplader.
- **Plasma:** Den væske som cellerne befinder sig i. Væsken består fortrinsvis af vand samt sukker, salte, enzymer og proteiner, særligt de såkaldte koagulationsfaktorer (størkningsfaktorer), der får plasmaet (og dermed blodet) til at størkne.
- **Serum:** Den del af plasmaet, som er tilbage og ikke størkner.

Blodet kan ved infektioner også indeholde bakterier, som kan påvises ved en bloddyrkning. Blodprøver udtages i dag normalt fra blodårerne i albuebøjningen, ved at føre en nål gennem huden. Nålen er forbundet til et sterilt glas med undertryk, som sørger for at blodet suges ud. Dette resulterer i et fuldstændig lukket system, med mindst mulig chance for infektion. Desuden undgår personen der udtager blodprøven at komme i direkte kontakt med potentielt smitsomt biomateriale.

Glukosemeter

Der findes flere måde at måle blodsukkerniveau (koncentrationen af glukose i blodet) på. En af de mest almindelige, som bruges dagligt af mange diabetikere, er en elektrokemisk metode. Denne fungerer ved, at der placeres en lille mængde blod på en såkaldt "glukosestick", som indeholder enzymet glukose oxidase. Dette enzym oxiderer glukose til glukonolaktone (og enzymet bliver desuden reoxideret af et overskud af ferricyanid, så det kan fungerer igen). Samtidig udsender glukosemetret en elektrisk ladning i den ene ende. Da glukonolaktone kan lede strøm, vil den ladning der overføres til den anden ende af glukosemetret være proportional med mængden af glukose i prøven og glukosemetret bruger da en algoritme til at udregne glukosekoncentrationen, baseret på den målte elektriske strøm.

Vortex

En vortex er et meget almindeligt og simpelt instrument i laboratoriet og bruges til at blande væsker. Dette er nødvendigt i mange tilfælde. Arbejder man med kemiske stoffer eller enzymatiske assays er det vigtigt at stofferne bliver mixet ordentlig, enten for at sikre at reaktionen forløber ensartet, eller at en fortynding er jævn. Det samme gælder i mikrobiologi, hvor det sommetider er nødvendigt at vortexe cellerne for at undgå sammenklumpning. Efter centrifugering, kan vortex også bruges for at få "resuspenderet" bundfaldet i mediet igen. Vær dog opmærksom på at visse celler kan tage skade af for kraftig vortex.

Øvelsesvejledning

Del 2.a Blodprøve

Materialer

- Rask mus
- Diabetisk mus
- 2 x 1 ml Kanyle
- 2 x Reagensglas med låg (sterilt)
- Pakke med stix til blodsukkermåling

Metoder

1. Markér reagensglas med R og D (Rask og Diabetisk)
2. Placér en rask mus i buret og lad den løbe i 5 min.
3. Tag derefter en 500 µl blodprøve med kanyle og overfør til reagensglas R
4. Påsæt låg på reagensglas
5. Vortex blodprøve forsigtigt i 30 sek.
6. Dyp en stix i prøven og indsæt i blodprøve/insulin måleren.
7. Start med en nulprøve. Notér glukose og insulinniveau.
8. Foretag trin 2-6 med en diabetisk mus
9. Notér glukose insulin niveau ud fra blodprøven.

Del 2.b Glukose tolerance test

Materialer

- Rask mus
- Diabetisk mus
- Koncentreret sukkeropløsning 0.3 mol/L
- 26 x 1 ml kanyle

- 26 x Reagensglas
- Pakke med stix til blodsukkermåling

Metoder

1 Marker tidspunkter på reagensglas 0, 10,..., 50, 60 samt om det er R eller D (Rask eller Diabetisk)
2 Sæt den raske mus i buret og lad den løbe i 5 min.
3 Giv musen 10 ml koncentreret sukkeropløsning fra den blå flaske.
4 Tag 50 µl blodprøve med kanylen til tiden 0, altså straks efter musen har fået sukkeropløsning. Derefter tages blodprøven hvert 10 min. i 60 min. eller indtil der er sket en fordobling i blodsukkerniveauet.
5 Vortex blodprøver forsigtigt i 30 sek.
6 Dyp en stix i en prøve og indsæt i blodprøve/insulin måleren. Start med en nulprøve.
7 Eksporter data til Excel
8 Foretag trin 1-6 med den diabetiske mus

Del 2.c Insulinfølsomhedstest

Materialer

- Rask mus
- Diabetisk mus
- Koncentreret sukkeropløsning 0.3 mol/L
- Insulin Opløsning 100 enheder/ml
- 26 x 1 ml kanyle
- 26 x Reagensglas
- Pakke med stix til blodsukkermåling

Metoder

1 Placer den diabetiske mus i buret og lad den løbe i 5 min.
2 Marker tidspunkter på reagensglas 0, 5, 10,..., 50, 55, 60 samt om det er R eller D (Rask eller Diabetisk)
3 Tag 50 µl blodprøve med kanylen til tiden 0.
4 Straks efter gives musen insulin indsprøjtning
5 Tag blodprøver hvert 5. min med kanyle og overfør til det respektive reagensglas.
6 Omgående dyppes en stix i reagensglasset indsættes i blodprøve/insulin måleren.
7 Blodsukkeret skal forsøges at blive holdt på 5 mmol/L. Giv musen koncentreret sukkeropløsning ud fra målingen. Det anbefales, at der giver 200 µl pr. 0.1 mmol/L målingen er under 5 mmol. Der gives 100 µl pr. 0.1 mmol/L målingen er over. 5 mmol/L.
8 Eksporter data til Excel.
9 Foretag trin 1-7 med den raske mus. I trin 6 skal mængden af koncentreret glukose halveres.

Spørgsmål til øvelsesvejledning

1. Hvorfor kan det være en god idé at anvende vortex?
    - En vortex anvendes når man har væsker, som skal blandes. Det er en god idé at blande væsker inden man udtager prøver, da man herved minimere bundfald og evt. faser i væskerne.
2. Hvorfor er det vigtigt at skifte til en ny kanyle hver gang man tager en ny blodprøve?

    - Man er nød til at anvende nye kanyler, da det skal være sterile forhold. Desuden kan der sidder rester fra tidligere prøver, hvilket kan påvirke resultaterne.
3. Hvis man giver musen 20 ml af den koncentrerede sukkeropløsning. Hvad er stofmængden så?
    - Den koncentrerede sukkeropløsning har en koncentration på 0.3 mol/L
    - Hvis man giver 20 ml af dette, svarer det til en stofmængde på $0.3\frac{mol}{L} * 20 * 10^{-3}L = 0.006\,mol$, da $n = C * V$.
4. Såfremt man skal overføre 50 µl, hvor mange ml svarer dette til?
    - µl svarer til 10^{-6} L, og ml svarer til 10^{-3} L , altså svarer µl til 10^{-3} ml, hvilket derfor betyder, at der overføres $50 * 10^{-3}\,ml = 0.05\,ml$.
5. Og hvilken Gilson pipette vil du anvende: 20, 100 eller 1000?
    - Man vil anvende Gilson pipette 100, da man overører 50 µl, og Gilson pipetter måler i µl.

Du er nu klar til at gennemføre øvelsen "Insulinfølsomhed" i Det Virtuelle Laboratorium.

Databehandling og rapportering

Lav en minirapport ved at svare på følgende spørgsmål til de forskellige dele af øvelsen og inkluder svar på spørgsmål til øvelsesvejledningen. Til del 2.b og 2.c kan excel-skabelonen fra hjemmesiden med fordel bruges.
Husk at være opmærksom på om dit databehandlingsprogram bruger komma (dansk) eller punktum (engelsk) som decimalseparator. Da Det Virtuelle Laboratorie bruger punktum, findes der en guide til at lave dette om i skabelonen.

Del 2.a:

1. Hvad er forskellen på insulin- og glukoseniveau mellem den raske og syge mus og hvorfor?
    - Insulinniveauet i den raske mus er højere end hos den diabetiske mus. Omvendt, så er blodsukkerniveauet lavere hos den raske mus end hos den diabetiske mus. Dette skyldes at der er tale om at der er tale om en mus med type 1 diabetes, som ikke er i stand til at danne insulin, og derfor heller ikke optager glukosen og omdanner det til glykogen.
2. Antag at musen har fastet og grænseværdierne for at diagnosticere mus for diabetiske er de samme som for mennesker. Kan du på baggrund af blodprøverne konkludere om musene er diabetiske?
    - Ja, den diabetiske mus har en blodsukkerkoncentration på omkring 11 mmol/L, mens den raske har omkring 5 mmol/L. Ifølge tabellen i teorien, kan man diagnosticere diabetes ved et blodsukkerniveau over 7 mmol/L ved faste. Det er altså tydeligt at den ene mus er diabetisk og den anden ikke er det.
3. Hvorfor er glukose- og insulinkoncentrationen omvendt proportionale?
    - Det er det, fordi glukose kun kan optages i cellerne når der er insulin tilstede. Altså des flere insulinmolekyler, jo mindre sukker vil der være i blodet og omvendt.

Del 2.b:

Indsæt data fra øvelsesdel 2.b. Redegør for kurvernes forløb og forklar hvorfor der er forskel på dem. Kom for eksempel ind på følgende:

1. Hvorfor er blodsukkeret ved start forskelligt?

    - Det er det, fordi den diabetiske mus ikke har insulin, som kan få glukosen overført til cellerne fra blodet. Altså vil denne have en noget højere koncentration af glukose i blodet.
2. Hvorfor falder den raske mus blodsukker hurtigere igen?
    - Den raske mus kan danne insulin, som overføres til blodet, hvorved glukose kan optages.

Del 2.c:

Indsæt data fra øvelsesdel 2.c i excel-skabelonen. Redegør for kurvernes forløb og forklar hvorfor der er forskel på dem.

1. Hvilken mus kræver størst tilførsel af glukose for at opretholde en blodsukkerkoncentration på 5 mmol/L? Hvorfor?
    - Det gør den raske mus. Her falder blodsukkerniveauet hurtigere, da der produceres insulin, hvilket får cellerne til at optage glukosen fra blodet og stimulerer dannelsen af glykogen

Det har du lært

Du har nu lært om forskellen på de forskellige typer af diabetes. Du burde nu både kunne redegøre for årsagerne og konsekvenserne af diabetes type 1 og 2, samt vide hvordan vores mikrobiom kan spille en rolle i forbindelse med sygdommen. Desuden har du lært hvordan man ud fra enkelte blodprøver, samt kontinuerte målinger, kan sige noget om patientens tilstand, ved at analysere data både kvantitativt og kvalitativt. Du burde desuden have fået en endnu bedre forståelse for hvordan insulin påvirker blodsukkeret.

Vigtige begreber: **blodsukker, type 1 og 2, autoimmun, insulinresistens, mikrobiom, blodprøve**

Del 3 – insulinproduktion

Introduktion

Du har nu diagnosticeret diabetes på flere forskellige måder, men hvad gør man, hvis først man har fået konstateret diabetes? En af behandlingsformerne er at få tilført insulin. Som nævnt er insulin et naturligt hormon, men med 382 millioner diabetikere verden over, skal der produceres meget! Dette er hvad Novo Nordisk har tjent godt på de sidste mange år. De har udnyttet bioteknologien til at lave rekombinante produktionsorganismer der producerer insulin. Disse organismer (for eksempel gærceller) har fået indsat et gen, der koder for insulin, og kan derefter dyrkes og producere insulin, der kan bruges som diabetesmedicin. Dette er præcis hvad denne øvelse går ud på: at genmodificere en organisme til at produceret et værdifuldt stof. Overvej i øvrigt de mange muligheder for at producere andre værdifulde stoffer på denne måde.

Teori

Behandling af type 1 Diabetes

Det er tidligere beskrevet, at *diabetes mellitus type 1 (DMT1)* har en blandet ætiologi (årsag(er) til sygdommens udvikling), dvs. at den skyldes både genetisk arv og miljøpåvirkning. Som også beskrevet er selve sygdommen en autoimmun proces, hvor kroppens immunforsvar bliver fejlaktiveret og kommer til at angribe kroppen selv. I behandlingen af DMT1 skelner man mellem symptomatisk og kurativ (helbredende) behandling. Ved den symptomatiske behandling afhjælper man kroppens insulinmangel, som er sygdommens skadesmekanisme. En sådan symptomatisk behandling fortsætter resten af patientens levetid.

Ved den kurative behandling forsøger man enten at erstatte den insulinproduktion, som er gået tabt, eller man prøver at hæmme kroppens immunforsvar, så det ikke kan gå til angreb på bugspytkirtlen og yderligere forværre tilstanden.

Præventivt

Da årsagerne til udvikling af DMT1 ikke er helt forståede endnu, er det svært at opstille en række entydige tiltag, man kan gøre for at undgå sygdommens udvikling. Sund kost og motion menes dog at være gavnlige.

Medicinsk behandling

Medicin er grundpillen i behandlingen af DMT1. Da sygdommen netop skyldes ødelæggelser i pancreas' evne til at danne insulin, er man nødt til udefra at forsyne kroppen med dette hormon.

Som tidligere beskrevet i artiklen "Typer af diabetes" om selve sygdommene, diagnosticeres diabetes ud fra blodglukoseniveauet målt enten i fastetilstand eller efter måltidsindtagelse. Netop blodglukoseniveauet er derfor også den primære parameter, man søger at kontrollere. Det er derfor vigtigt at måle og holde niveauet under et vist niveau. Specifikt måler man koncentrationen af HbA1c i blodet. HbA1c er et udtryk for, hvor mange af kroppens røde blodceller, der er blevet påvirket af ens sukkersyge. Da denne påvirkning sker langsomt, og da de røde blodcellers levetid i gennemsnit er 120 dage, kan tallet bruges som et udtryk for blodglukoseniveau over længere tid

(hvis man fx har haft for højt blodglukose i to måneder, vil HbA1c afspejle dette). De gængse behandlingsmål for DMT1 ses her:

BEHANDLINGSMÅL FOR DMT1
Blodglukose før måltider: 4-7 mmol/L 1-2 timer efter måltiderne: 4-10 mmol/L
HbA1c under 7,5 % (58 mmol/L)
0-2 milde episoder med hypoglykæmi om ugen
Undgå alvorlig hypoglykæmi

Som det også er nævnt i artiklen ”Typer af diabetes” om typer af diabetes, kan HbA1c bruges til at beskrive gennemsnitsblodglukoseniveauet over en længere periode. Derfor vil et lavt tal her tyde på, at tilstanden er velbehandlet.

Hvordan bruges insulin til medicinsk behandling?

Den medicinske behandling for DMT1 er fortrinsvis insulin, der gives meden sprøjte (se *figur 27*) enten i musklerne eller i fedtvævet under huden (oftest i maveregionen). (fun fact: Insulinmængder angives i ”internationale enheder” (IE), hvor 1 IE er defineret ved den mængde insulin, der skal til for at sænke blodglukoseniveauet i en fastende kanin med 2,5 mmol/L. Når en diabetiker indtager 10 g kulhydrat, er der behov for 1 IE insulin).

Figur 27. *En FlexPen bruges af diabetikeren til injektion af insulin. Læs mere FlexPen ved at klikke på billedet. Kilde: Novo Nordisk A/S*

Der findes en enormt lang række af insulinpræparater, men det, der er vigtigst at skelne mellem, er hvor hurtigt effekten af insulinet indtræder, og hvor længe den holder. På baggrund af dette inddeles insulinpræparater typisk i:

1 Hurtigt virkende insulin
2 Middelhurtigt (intermediært) virkende insulin

3 Kombination af hurtigt og intermediært virkende insulin
4 Langtidsvirkende insulin

Man vil som diabetiker bruge en kombination af de ovenstående præparater. Typisk vil man bruge et langtidsvirkende præparat som basalinsulin om morgenen; dette holder ens insulinniveau oppe på et naturligt grundniveau i løbet af dagen.

Da man som type-1 diabetiker ikke er i stand til at øge insulinniveauet efter fødeindtag, er det dog vigtigt, at man supplerer med hurtigtvirkende insulin umiddelbart før måltider; dvs. før hvert af de tre store måltider, men også gerne inden mellemmåltider, da insulinindtaget på den måde minder mest om den raske krops reaktion. Vigtigst er dog, at blodglukoseniveauet holdes jævnt over dagen, hvorfor det anbefales, at diabetikere måler deres blodglukose mindst 4-7 gange om dagen.

Insulinbehovet varierer fra person til person, men en tommelfingerregel er 0,6-0,7 IE/kg kropsvægt, hvor 50-60 % gives som langtidsvirkende, og 40-50 % gives som hurtigt virkende inden måltider.

Figur 28. En insulinpumpe ses her koblet direkte til patientens mave. Læs mere om insulin pumpen (NovoRapid) her. Kilde: Novo Nordisk A/S

En **insulinpumpe** (se *figur 28*) er en anden metode til behandling med insulin. I stedet for at skulle stikke sig selv med en insulinpen, får diabetikeren en lille slange koblet til maven. Slangen er forbundet til selve insulinpumpen, der ud over at holde øje med diabetikerens blodglukoseniveau giver en basalinfusion af langtidsvirkende insulin. Den kan programmeres til at levere hurtigtvirkende insulin enten på faste tidspunkter, eller når brugeren selv vælger det.

Livsstil
Kost: Medicinsk behandling af DMT1 kan stå alene, men behandlingen er langt mere effektiv, hvis den suppleres med en sund livsstil og kost. Ved i kosten af fjerne simple kulhydrater i form af fx slik, chips, sodavand o.l. og erstatte dem med komplekse kulhydrater fra grøntsager, mørkt brød m.m., vil blodsukkerets stigning være langsommere og lettere at kontrollere. Desuden anbefales det, at kulhydrater fra brød, kartofler, ris, pasta, mælkeprodukter og frugter noteres, og at man holder indtagelsen til omkring 40-60 gram for et hovedmåltid og 10-20 gram for et mellemmåltid.

Motion: Ligesom for så mange andre sygdomme, er motion enormt nyttigt. De generelle anbefalinger gælder også for diabetikere, men for DMT1 gælder det, at for 0,5-1 times motion sænkes insulinbehovet med omkring 2-4 IE. Der er dog en ret stor og meget kompleks individuel variation i effekten.

Kirurgisk
Ved DMT1 skyldes sygdommen, at et indre organ er holdt op med at fungere, som det skal. Kirurgisk behandling er derfor ikke ligeså oplagt som at sætte nogle skruer i en brækket arm, give den en skinne på og så vente seks uger, til den er helet. Faktisk er der kun to kirurgiske

procedurer, man jævnligt forsøger sig med, når det kommer til DMT1 – og den ene er stadig på eksperimentalstadiet.

Pancreastransplantation: Ved denne transplantation indsætter man en rask og funktionel pancreas i patienten med DMT1. For at være kandidat til at modtage en rask pancreas, er der mange krav, patienten skal leve op til:

- Ingen sygehistorie med cancer eller HIV
- Ingen pågående infektioner
- Ingen lungesygdomme
- Ingen fedme
- Ingen hjerte-kar-sygdomme
- Ingen misbrug af alkohol, tobak, narkotika.

Selve operationen medfører en række risici, som ses ved alle transplantationer: Infektion, blødning, afstødning af organet, lækage fra organet eller fra sammensyningen efter operationen. For at undgå afstødning, skal patienten tage medicin resten af livet.

Dog er chancen for en succesfuld operation og et godt forløb stort: 95 % af pancreastransplanterede overlever første år, og der ses kun organafstødning hos 1 % pr. år. Efter en succesfuld transplantation kan patienten delvist eller helt undvære sin insulin, da organet overtager insulinproduktionen.

Beta-celletransplantation: Den insulinudskillende del af pancreas består af små grupper af beta-celler. De kaldes langerhanske øer, og det er dem, der ødelægges af autoimmune processer, når man har DMT1.

Hvis man har en donorpancreas, kan man i stedet for at indoperere hele organet, operere de aktive betaceller ind. Det er en langt mindre invasiv (mindre voldsom) og risikabel procedure, og effekten er udmærket. Patienten skal dog stadig tage medicin resten af livet for at forhindre, at cellerne afstødes, og sygdommen genopstår eller forværres. En hæmsko ved operationen er, at man endnu ikke laver den mange steder, og at det er svært at få fat på en donorpancreas.
Som nævnt i introduktionen af afsnittet, er man nu også begyndt at eksperimentere med såkaldt immunmodulerende terapi, hvor man forsøger at hæmme kroppens immunforsvar, så det ikke kan gå til angreb på sig selv. Disse forsøg er stadig i de tidlige stadier, men hvis de viser sig at være en succes, har man altså en potentiel kurativ behandling, der kan forhindre tidlig diabetes i at udvikle sig.

Behandling af type 2 diabetes

Diabetes mellitus type 2 (DMT2) er ligesom DMT1 betinget af både arv og miljø. Dog kan sygdommens debut i langt højere grad forhindres end ved DMT1, hvis man kontrollerer det miljø, man som disponeret person udsættes for. Man plejede at kalde DMT2 for gammelmandssukkersyge, fordi sygdommen oftest sås hos ældre mænd, der efter at være gået på pension levede ”det gode liv” og fik lidt for meget fed mad, alkohol og en stor vom. I dag giver denne beskrivelse dog ikke længere mening, da også unge menneskers livsstil ofte er så uhensigtsmæssig, at folk af begge køn helt ned i 30 års alderen får konstateret sygdommen.

Præventivt
Hvis man i forvejen har anlæg (genetiske forhold) for at udvikle DMT2, er der en række store syndere, man kan undgå. De store risikomomenter er fysisk inaktivitet, for stort fødeindtag, og for meget alkohol. Derfor kan man også for at minimere risikoen for sygdomsdebut ved at sørge for at motionere 0,5-1 time dagligt, spise sundt, undgå rygning, følge Sundhedsstyrelsens anbefalinger for alkoholindtag (højst 14 og 7 genstande for hhv. mænd og kvinder og max 5 af gangen) samt holde sit BMI inden for ens køns normalområde (18,5-24,9).

Livsstil
Livsstil og livsstilsændringer er et af de vigtigste og mest effektive redskaber, man har til at behandle sin DMT2.

Vægttab: Mange patienter med DMT2 er overvægtige med en karakteristisk æbleformet kropsstruktur, dvs. med meget abdominalt fedt. Som nævnt i artiklen om kroppen og glukose, ”Funktionen af glukose i kroppen” bidrager dette fedt til og forværrer DMT2. Derfor er vægttab – om end enormt svært for den enkelte patient – noget af det mest effektive, man kan gøre, for at behandle tilstanden. Man tilstræber, at disse patienter har et dagligt kalorieunderskud på omkring 6-800 kalorier, hvilket er realistisk, hvis patienten er målrettet og følges under regelmæssige lægekontroller, så motivationen holdes oppe.

Fordelene ved vægttabet er markante og ses allerede ved små vægttab fra 2-5 kg. Den gavnlige effekt består bl.a. i, at blodtrykket sænkes, insulinen virker bedre pga. nedsat insulinresistens, patienten får en bedre fordeling af fedtsyrer med mindre af det farlige kolesterol. Hvis diabetikeren stopper sit vægttab før idealvægten er ramt, eller begynder at tage på igen, ophører den gavnlige effekt. Ny forskning har imidlertid vist, at det måske ikke så meget er den egentlige vægtreduktion, som det er den øgede fysiske aktivitet og de bedre kostvaner, der giver den gavnlige effekt.

Motion: Motion er som nævnt også meget vigtig. Man anbefaler 0,5-1 times motion fire gange om ugen. Motion øger insulinfølsomheden (husk at problemet i DMT2 er, at kroppen ikke længere reagerer tilstrækkeligt på insulin, selvom der er høje koncentrationer af det). Effekten af bare en halv times regelmæssig motion er så stor, at det medfører et fald i HbA1c (der, som I husker, repræsenterer det gennemsnitlige blodglukoseniveau over tid) på 0,6 til 0,7%.

Diabetikere, som er fysisk aktive, vil desuden få lettere ved at fastholde et vægttab og en øget livskvalitet generelt på grund af den bedre fysiske form.

Rygning: At ryge påvirker ikke direkte diabetesen, men da rygning kan give syge lunger, der medfører dårligere oxygenoptag og stive kar, der giver dårligt blodkredsløb, er det en kæmpe belastning. Disse faktorer vil gøre det svært at være fysisk aktiv i forbindelse med vægttab eller generel sundhed. Desuden er en af komplikationerne ved DMT1 og -2, at man får dårlige blodkar og blodforsyning, hvilket rygning kun vil forværre.

Medicinsk
Den medicinske behandling af DMT2 stiler efter at sænke blodglukoseniveauet og holde det stabilt der. Man bruger HbA1c som markør for succesfuld behandling. For nydiagnosticerede diabetikere prøver man med antidiabetisk medicin at holde HbA1c under 48 mmol/l. Efter nogle år med sygdommen, hvor tilstanden ofte forværres, accepterer man et tal omkring 53-58 mmol/l, afhængig af hvilken patient, man har med at gøre.

Der findes forskellige lægemidler, som kan benyttes til behandling af type 2 diabetes, og alle virker ved på forskellige måder enten ved at stimulere insulinsekretionen eller øge insulinfølsomheden i lever og muskler. Sulfonylurinstof stimulerer insulinsekretionen, Metformin forbedrer insulinfølsomheden særligt i leveren, mens glitazoner øger insulinfølsomheden i muskulaturen. Desuden kan man udnytte inkretinerne.

Metformin: Metformin er hjørnestenen i den medicinske behandling af DMT2. Enten som det eneste medikament i det tidlige forløb af sygdommen, eller som en del af en kombinationsbehandling, hvis det ikke er tilstrækkeligt alene.

Metformin virker flere steder og er især vigtigt i:
1 Leveren, hvor stoffet hæmmer glukoseproduktionen ved glykogenolyse, glukoneogenese og fedtsyreforbrænding.
2 Tarmsystemet, hvor stoffet hæmmer optagelsen af monosakkarider og øger den anaerobe glukoseforbrænding.
3 Skeletmuskulaturen, hvor stoffet sænker insulinresistensen og øger den insulinbetingede glukoseoptagelse samt øger glykogenesen og hæmmer fedtsyreforbrænding.

Metformin virker altså ved at sænke blodglukoseniveauet og ved at undgå hyperglykæmi (for højt blodsukker). Desuden medfører behandlingen ofte et lille vægttab, hvilket som nævnt ovenfor bidrager til den overordnede diabetestilstand. En kæmpe fordel ved metformin er, at stoffet ikke kan medføre hypoglykæmi, hvilket betyder for lavt blodsukker.

GLP-1: Som I måske husker fra tidligere, vil glukosen, når den indtages oralt, medføre en højere insulinsekretion pga. inkretinerne, der frigives fra tarmen. Især inkretinet GLP-1 bliver ”udnyttet” i medicinalindustrien, fordi GLP-1’s funktion er at stimulere insulinsekretionen og hæmme glukagonfrisætningen. Den medicin, som udnytter inkretinerne sørger for, at øge koncentrationen af GLP-1-hormonet i blodbanen. På den måde vil blodsukkeret falde, fordi leverens glukoseproduktion hæmmes, og fordi musklernes glukoseoptag øges. Hvis koncentrationen af GLP-1 er høj nok, vil det også forsinke, at mavesækken tømmes, hvilket vil føre til en lavere glukosestigning. Ud over den vigtige rolle for insulinfrigivelsen, er GLP-1 også med til at regulere appetitten, hvilket betyder, at mange patienter, som behandles med GLP-1 i høje doser, også vil opleve et vægttab. Effekten på glukagon- og insulinfrisætning kræver dog kun små doser. Udfordringen i forbindelse med GLP-1-behandling har været, at hormonet kun har en halveringstid på 1-2 minutter, fordi det nedbrydes af enzymet DPP-4. Det har betydet at man i lægemiddelindustrien har arbejdet med at ændre på GLP-1, så stoffet blev resistent over for enzymet DPP-4, og derved får forlænget sin halveringstid. Ligeledes har man arbejdet med at hæmme DPP-4 vha. såkaldte DPP-4-hæmmere, så GLP-1 ligeledes cirkulerer i længere tid i blodbanen.

Sulfunylurinstof: Sulfunylurinstof (SU) er meget udbredte i behandlingen af diabetes. De virker ved at stimulere patientens betaceller til at være mere effektive med øget sekretion af insulin.

Glitazoner: Glitazoner er en gruppe af langsomtvirkende antidiabetika, der virker ved at sænke insulinresistensen efter 6-8 ugers behandling. Virkningsmekanismen for glitazoner er på nogle punkter stadig ukendt, men en del af årsagsmekanismen må være at øge den insulinstimulerede glukoseoptagelse i musklerne og at hæmme leverens glukosefrigørelse. Stoffet virker især hos diabetikere, der også er overvægtige, fordi det har en fordelagtig effekt på lipidprofilen, dvs., at stoffet sænker mængden af farligt kolesterol.

DPP-4-hæmmere: Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) er et enzym, der nedbryder inkretinet GLP-1. Som I ved, stimulerer GLP-1 insulinfrigivelsen, så et højt GLP-1-niveau er ønskværdigt for en diabetiker, der har et utilstrækkeligt insulinrespons. Ved at behandle med DPP-4-hæmmere, kan man delvis inaktivere enzymet, hvorfor koncentrationen af inkretinet GLP-1 stiger, og der sker en større insulinfrigivelse. Desuden hæmmer stoffet glukagonsekretionen i leveren, hvilket forhindrer frigivelse af glukose til blodet.

SGLT-2-hæmmere: SGLT-2 er et transportprotein i nyrerne, som er ansvarligt for at reabsorbere glukose fra urinen til blodet. Ved at hæmme denne transporter, kan man udskille glukosen via urinen (sukkerholdig urin, såkaldt glykosuri) og dermed sænke blodglukoseniveauet. Denne gruppe af antidiabetika er for nyligt blevet påvist at nedsætte den hjerte-kar-sygdomsmæssige risikoprofil i diabetes.

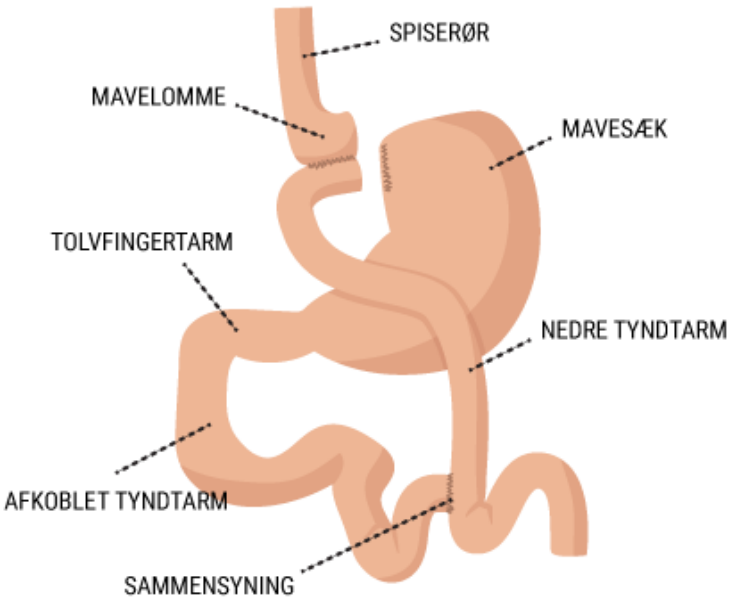
Insulin: I den komplicerede DMT2, hvor insulinresistensen er total, eller pancreas har mistet sin funktion, overgår man til at behandle som DMT1, da kroppens egenproduktion af insulin er ophørt. Insulinbehandlingen er her nøjagtigt som anført ved DMT1, bortset fra at man samtidig giver metformin.

FAKTABOKS: MEDIKAMENTER TIL BEHANDLING AF DMT2	
STOF	FUNKTION
GLP-1 (GLP-1-receptor-agonist)	• Øger insulinsekretion • Hæmmer glukagonsekretion • Øger antal betaceller • Hæmmer appetitten • Hæmmer ventrikeltømning
Metformin	• Sænker insulinresistens i lever • Sænker insulinresistens i muskler
Sulfunylurinstof	• Øger insulinsekretion • Sænker insulinresistens
Glitazoner	• Sænker insulinresistens i lever • Sænker insulinresistens i muskler • Øger antal betaceller
DPP-4-hæmmere	• Øger insulinsekretion • Hæmmer glukagonsekretion

	• Øger antal betaceller
SGLT-2-hæmmere	• Hæmmer nyrens reabsorption af glukose

Det medicinske behandlingsregime af DMT2
Et behandlingsregime er den generelle retningslinje, der vejleder lægen i behandlingen af en given sygdom. For DMT2 starter man med at justere patientens livsstil for at se, om dette er tilstrækkeligt til at justere blodsukkeret. Dernæst tilføjes Metformin. Hvis dette er utilstrækkeligt, tilføjer man et af de ovennævnte medikamenter til behandlingen (GLP-1-analoger, glitazoner, DPP-4-hæmmere eller SGLT-2-hæmmere). Hvis dette stadig ikke er tilstrækkeligt, tilføjer man to eller tre af de ovenstående. Såfremt intet virker, er man nødsaget til at behandle med insulin som ved DMT1 samt med Metformin.

Kirurgisk
Der findes ikke en egentligt kirurgisk behandling af DMT2, men man har mange gange observeret, at tilstanden er spontant kureret efter fedmeoperationer. Specielt bypassoperation af meget fede personer, hvor man gør deres mavesække mindre og omgår (bypasser) en del af deres fordøjelsessystem, har vist sig at være effektivt (se *figur 29*).



GASTRISK BYPASS

Figur 29. *Her ses tarmens struktur efter en gastrisk bypass operation. Bemærk at der stadig findes en lille rest af mavesækken, "mavelommen", hvor patienten kan have en lille smule føde ad gangen.*

Man ved endnu ikke nøjagtigt, hvordan mekanismen fungerer, men man ser, at patienternes insulinniveau og respons på insulin bedres i løbet af få dage efter operation, altså langt før vægttabet, som jo er det egentlige mål med operationen, begynder at finde sted.

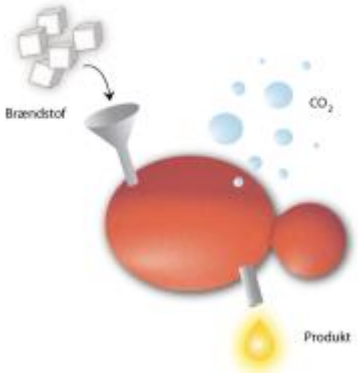
Ud over vægttabet menes det, at et nedsat fødeindtag kan bidrage til ændringen i sygdomsstatus, samt at føden fordøjes og optages mindre, da hele duodenum (tolvfingertarmen) og dele af jejunum (tyndtarmen) springes over. Desuden menes den gruppe af hormoner, der kaldes inkretiner også at have en stor effekt. Efter en gastric bypass operation, stiger niveauet af inkretiner, som frigives efter fødeindtag, med op til fem gange. Inkretinerne stimulerer desuden insulinfrigivelsen, og derfor ophører roden til diabetes type 2.
Grundet operationens pris, belastning og omfang tilbydes den dog ikke til type 2 diabetikere, medmindre de også er svært overvægtige.

Cellefabrikker

Naturen råder over mange spændende biologiske stoffer og proteiner, der kan være meget nyttige fx som medicin eller som miljøvenlige enzymer. Det er bare ikke altid muligt at udvinde store nok mængder fra naturlige planter eller organismer, og derfor bliver cellefabrikker interessante. Cellefabrikker dannes grundlægges ved at flytte de gener, der instruerer en celle i et interessant stof, over til en mikroorganisme. Mikroorganismen producerer derefter det værdifulde stof, fx insulin, både sikkert og i store mængder.

Celler er eksperter i at producere biologiske stoffer
Genteknologi kan bruges til at omdanne en mikroorganisme til en **cellefabrik**, som kan producere store mængder af et værdifuldt, fremmed stof. Et stof, der måske har medicinske eller miljømæssige fordele, eller som er forbedret af forskere i forhold til et naturligt stof.

De celler, der bruges som cellefabrikker, er for det meste gensplejsede med gener fra en fremmed organisme, som naturligt fremstiller det ønskede stof. Disse gener kan også aflæses af den nye celle som en instruktion til at danne stoffet. Generne koder nemlig for de ansvarlige enzymer.



Figur 1 *En cellefabrik omdanner simple næringsstoffer som fx glukose til værdifulde produkter.*

Cellefabrikker kan være attraktive af flere årsager. Måske bliver stoffet (produktet) kun naturligt produceret i meget små mængder af en organisme, der lever under nogle ekstreme forhold, som ikke er mulige at efterligne. Eller måske producerer fabrikker stoffet ud fra kemikalier baseret på olie og ved høje reaktionstemperaturer, hvilket heller ikke altid er økonomisk fordelagtigt eller miljøvenligt.
Hvis det som alternativ kan lykkes at designe en cellefabrik, så producerer den stofferne mod, at cellerne bliver passet med omrøring, så de får ilt, samt at de er i en lun temperatur og får næring som fx glukose og salte. Penicillin produceres fx af en cellefabrik (en svamp). Lige siden penicillins opdagelse til medicin i 1930'erne har kemikere været interesserede i

at finde en kemisk metode til at producere det populære antibiotikum. Men det er aldrig lykkes dem at gøre det mere effektivt end cellefabrikkerne, som sidenhen er blevet forbedret yderligere med hjælp af genteknologi.

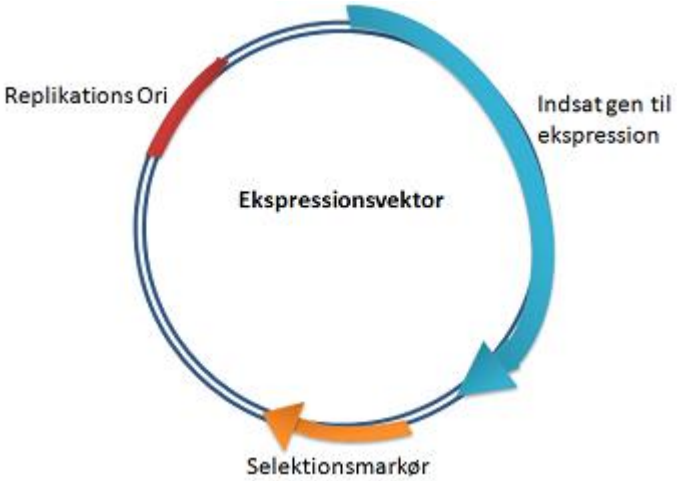
Genet for produktet bliver i cellen **transkripteret** fra DNA til mRNA, som videre translateres til et protein som om, det var cellens eget. Man kan derfor få skabt både kompliceret foldede proteiner af naturens sande eksperter i proteinsyntese og vigtige biologiske stoffer som fx penicillin.

Nogle gange er cellefabrikkerne endda den eneste virkelige mulighed, hvis det ønskede produkt fx er et protein, man selv har udviklet eller forbedret. Der er mange forskellige organismer at vælge imellem, når man skal designe sin cellefabrik og det er vigtigt at overveje deres fordele og ulemper. De mindre prokaryote organismer, som for eksempel bakterier, har den fordel, at de er simple og hurtige at arbejde med. Men prokaryoter har ikke det nødvendige indre maskineri til at foretage avancerede, afsluttende ændringer i det protein, som de skal producere. Fx kan de mangle evnen til at folde proteinets vigtige tredimensionelle struktur korrekt eller tilføje sukker-grupper til proteinet (glykosylering), som kan være vigtige for fx medicinske proteiners funktion. I cellefabrikker, hvor man kan nøjes med en prokaryot organisme, kan valget fx falde på bakterierne *Escherichia coli* eller *Bacillus subtilis,* der er simple og nemme arbejdsorganismer. I andre tilfælde vil man i stedet vælge en eukaryot organisme, hvis man skal producere et mere avanceret molekyle. Her bliver bagegæren *Saccharomyces cerevisiae* ofte brugt, da den også er nem at arbejde med genetisk, og dens indre reaktioner er meget velkendte.

Gevinsten ved cellefabrikker
Cellefabrikkernes arbejde kaldes også rekombinant produktion, fordi de anvendte organismer har en ændret genetisk 'kombination'.
Rekombinant produktion i cellefabrikker har haft en stor betydning fra midten af 1980'erne. Teknologien betyder fx, at det i dag ikke længere er nødvendigt at udvinde insulin til behandling af sukkersyge fra slagtede svin eller køers bugspytkirtler. I dag produceres insulin af cellefabrikker i store tanke. Insulin fra køer og svin ligner oven i købet ikke humant insulin helt og kan derfor bl.a. give allergiske reaktioner.
Takket være cellefabrikker er det heller ikke nødvendigt at udtrække væksthormon fra menneskehjerner til børn med vækstmangel; insulin og væksthormon er i dag to af mange proteiner, som gensplejsede mikroorganismer producerer rent og sikkert (se flere eksempler i marginen).

Hvordan ser genet ud?
Genets proteinkodende område (fra start-codon til stop-codon) er ikke nok til at få cellen til at producere det kodede protein. Før området skal der både være et element der aktiverer transkriptionen (promoter) og et element der aktiverer translationen (ribosom bindingssite/RBS). Desuden skal der også være et efterfølgende element, der stopper transkriptionen (terminator - translationen stopper af sig selv ved stopcodon)
For nemt at kunne koble et nyt gen sammen med disse nødvendige hjælpesekvenser, eksisterer der en række forskellige, færdiglavede **ekspressionsvektorer.** De er cirkulære DNA-sekvenser (plasmider) og indeholder netop de nødvendige, ekstra sekvenser, der passer sammen med den valgte produktionsorganisme og produktet for at give en god produktion af genets protein (udtryk af gen).Genet skal derfor blot sættes ind i ekspressionsvektoren (figur 2).

I det virtuelle laboratorium skal du selv designe det DNA, der skal indsættes i ekspressionsvektoren, og indsætte de forskellige regulerende hjælpesekvenser.



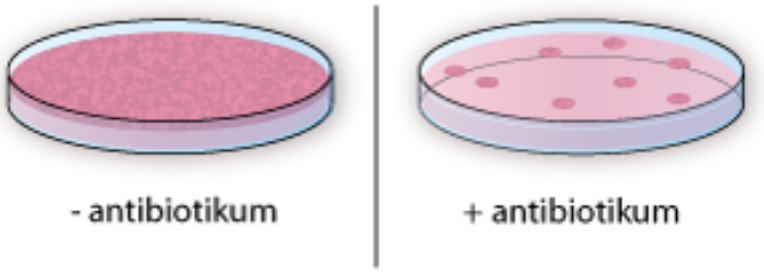
Figur 2 *En ekspressionsvektor er et cirkulært DNA (plasmid), der indeholder de nødvendige dele til at udtrykke et ønsket gen i en given celle (ekspression). Det blå element dækker både over genet og de regulerende sekvenser, såsom promoter, RBS og terminator. Selektionsmarkøren beskrives i næste afsnit. Replikations ori er nødvendig for, at ekspressionsvektoren kopieres til cellens datterceller.*

Kort fortalt: Det gen, som ønskes brugt, skal aktiveres i cellen, og derfor skal det ledsages af nogle regulerende DNA-sekvenser. Sekvenserne sidder allerede i ekspressionsvektorer, som derfor ofte bliver brugt til at ledsage det ønskede gen.

Er gensplejsningen lykkedes?
Kun meget få celler vil rent faktisk ende med at optage DNA'et efter en gensplejsning. For at undgå at komme til at udvælge en af de upåvirkede celler, når der arbejdes videre, efterfølges transformationen af en **selektion** (udvælgelse).

Selektionen betyder, at kun de få, gensplejsede celler kan overleve.

Ved selektion bruges et selektionsgen, som også sidder i ekspressionsvektoren (figur 2). Selektionsgenet giver de korrekt transformerede organismer en overlevelsesfordel, fx resistens over for et antibiotikum. I en selektion med antibiotikum kan organismerne udplades på en petriskål med et antibiotikumholdigt medium. Her vil kun de transformerede celler kunne vokse videre. Hvis en cellekoloni vokser frem, er den derfor højst sandsynligt gensplejset (figur 3).



Figur 3 *Kun de gensplejsede celler vil kunne gro på næringsplade med antibiotikum, fordi de har opnået et resistensgen i gensplejsningen*

Nogle gange er selektionsgener ikke kun nødvendige for at udvælge en transformeret celle, men også for at tvinge cellen til at beholde DNA'et bagefter. Det hænder nemlig, at ikke alle celler under de næste celledelinger får en kopi af ekspressionsvektoren med. Det kan ske, hvis det indsatte DNA ikke er sat fast som en del af **kromosomerne**, men sidder i en ekspressionsvektor, som repliceres (kopieres) uafhængigt af kromosomerne. Cellerne uden vektoren gror gerne hurtigere, fordi de ikke skal tynges af at producere produkter, som for cellen blot er ligegyldigt protein. De vil derfor begynde at udkonkurrere de langsommere, gensplejsede celler.

Cellerne kan tvinges til at fastholde DNA'et ved at fortsætte tilsætningen af **antibiotikum**. Her dør de celler, som måtte have tabt DNA'et (og dermed selektionsgenet).

Som nævnt kan DNA'et indsættes direkte i et kromosom i cellen som alternativ til at indsætte DNA'et i en ekspressionsvektor. Når DNA'et først sidder i kromosomet, er der ikke den samme risiko for, at DNA'et forsvinder igen. I cellefabrikker i industrien er dette bl.a. ønskeligt for at undgå brugen af antibiotika. Ekspressionsvektorer bruges især gerne i de indledende forsøg, mens indsætning af DNA'et på cellens kromosom mere bruges til færdige cellefabrikker.

En genetisk variant af en organisme kaldes en stamme, transformant eller mutant. De nye gener i stammen gør den (forhåbentlig) til en effektiv, kommende cellefabrik. Det kan bekræftes endeligt, om det nye DNA er sat ind som planlagt, ved at foretage en **DNA-sekventering** af det område af kromosomerne, der skulle ændres.

Kort fortalt: Det er sjældent lige til at se på en celle, om den har optaget det DNA, man har villet gensplejse ind i den. Derfor skal man bruge selektion til at udvælge de korrekt gensplejsede celler. For at være helt sikker kan man desuden vælge at aflæse selve DNA'et, hvilket kaldes **sekventering.**

Kort, fiktivt eksempel: De fleste celler overlevede ikke elektroporatorens elektriske felt, men en lille del ser ud til at kunne vokse i et medium med antibiotikum. Dette betyder, at disse celler nu formentlig har det nye gen, fordi det blev indsat sammen med et gen for antibiokaresistens i en ekspressionsvektor.

Quiz

1. Hvorfor er det endnu vigtigere for diabetikere at fokusere på at spise "langsomme" kulhydrater såsom grøntsager og mørkt brød?
    a. Da komplekse kulhydrater allerede er lange polysaccharider og derfor behøver cellerne ikke insulin for at lagre dem som glykogen.
    b. Da de ikke indeholder ren glukose og derfor ikke vil påvirke blodsukkeret.
    c. Da de nedbrydes langsommere vil det være nemmere at kontrollere blodsukkeret kunstigt.

2. Hvilket udsagn om behandling af diabetes type I er sandt:
    a. Ved symptomatisk behandling forsøger man at lave et kirurgisk indgreb og derved kurere patienten helt.
    b. Kurativ behandling har til formål helt at fjerne sygdommen, så patienter ikke længere er afhængig af behandling.
    c. I modsætning til DMT2 er Diabetes type 1 meget afhængig af livstil og behandles derfor bedst præventivt.
    d. Alle tre nævnte svar er sande.

3. Metformin bruges til behandling af diabetes type II da:
    a. Det øger udskillelsen af insulin i leverens beta-celler.
    b. Det øger den aerobe forbrænding i hele kroppen og fører til vægttab.
    c. Det øger insulinfølsomheden samt modvirker højt blodsukker ved at hæmme glukoseproduktion.

4. Hvordan virker DPP-4-hæmmere i behandling af diabetes type II?
    a. Da DPP-4 nedbryder GLP-1 (som stimulerer insulinsekretion), ønsker man at inhibere DPP-4 for at øge niveauet af GLP-1 og derved insulinudskillelse.
    b. Da DPP-4-hæmmere nedregulere transkriptionen af glukoseproducerende gener, resulterer de i lavere blodsukker.
    c. Da DPP-4, sammen med glukagon, styrer udskillelsen af glukagon, ønsker man at mindske koncentrationen for at nedregulere glukagonudskillelsen.

5. Diabetes type 2 behandles bedst ved:
    a. Livsstilsændringer.
    b. Medicinere for at øge insulinfølsomheden.
    c. Stimulere insulinsekretionen.
    d. En kombination af de tre andre svarmuligheder.

6. Hvad kaldes gensekvensen mellem start- og stopcodon?
    a. Proteinkodende område.
    b. Translationssekvensen.
    c. Genet findes kun mellem start- og stopcodon

7. Hvad er kravet for en selektionsmarkør?
    a. Den skal sørge for at man kan dyrke udelukkende muterede celler når man selektere.

b. Den skal farve cellen, så den kan skelnes fra de andre, når mutanterne dyrkes.
c. Den skal sørge for at muterede celler vokser hurtigere så de udkonkurrerer ikke-muterede celler.

8. Hvilken af følgende er IKKE en fordel ved cellefabrikker?
    a. Man kan producere humant insulin i rekombinante celler og behøver derfor ikke oprense det i små mængder fra menneskehjerner.
    b. Cellefabrikker producerer produktet naturligt uden at anvende et substrat (som for eksempel glucose), og produktionen er derfor meget billigere.
    c. Man kan producere meget mere avancerede stoffer end man kan med syntetisk kemi.

9. Hvad er funktionen af en promoter?
    a. Promoteren kan binde til ribosomers small unit og starter derved translationen.
    b. Promoteren genkendes af transkriptionsfaktorer eller RNA-polymerasen og starter transkriptionen af DNA'et.
    c. Promoteren sikrer sig at det rekombinante DNA man har indsat i en celle, sætter sig korrekt på kromosomet.

10. Hvorfor er *Saccharomyces cerevisiae* (bagegær) et godt valg til at producere insulin?
    a. Eukaryoter vokser generelt hurtigere end prokaryoter
    b. Da *Saccharomyces cerevisiae* er en svamp, er den fototrof og kan derfor bruge sollys som energikilde i stedet for glukose.
    c. Da det er en eukaryot organisme, har den evnen til at producere, folde og modificere insulin, som er et relativt avanceret molekyle.
    d. Alle tre nævnte svar er korrekte.

Øvelse, vejledning og flowchart

Et modificeret insulingen, der forventes at kunne anvendes til behandling af type-1 diabetes, er blevet udviklet. Det er din opgave at producere den nye insulintype og teste effekten på en laboratoriemus.
Inden du går i laboratoriet, er det en god idé at få en forståelse for nogle af de instrumenter, som anvendes. Disse instrumenter er ligeledes meget anvendte inden for bioteknologi generelt. I denne øvelse anvendes bruges Fermentor, Chromotograph og Elektroporator.

Elektroporator

Transformation er indsættelsen af fremmed DNA i en celle, som det fx sker ved gensplejsning. I denne øvelse designer man et insulingen, som gærcellerne skal optage og derefter udtrykke. For at gærcellerne kan optage plasmidet, anvendes netop elektroporatoren til at katalysere transformationen.
De fleste celler vil normalt ikke optage DNA fra omgivelserne, og flere metoder til transformation består derfor i at gøre deres membran permeabel (gennemtrængelig) for DNA. Det er meget forskelligt, hvilke metoder der virker på de enkelte organismer. Hvis en celle er i stand til at optage DNA, kaldes den en "kompetent celle".

En metode er at anvende elektroporation. Det er en nem og hurtig metode, hvor en blanding af DNA og celler udsættes for et kortvarigt elektrisk felt i en elektroporator. Herved bliver cellemembranen permeabel, og nogle af cellerne vil derved optage DNA'et og blive transformerede. Cellerne vil efterfølgende være skrøbelige og skal derfor håndteres skånsomt, indtil de er "kommet sig".

Fermentor og Chromatograf

Fermentering er den produktionsproces, der forløber, når der dyrkes mikroorganismer, som fx cellefabrikker. Processen kaldes også gæring (selv hvis cellen ikke er gær). Fermenteringer i industriel storskala eller mindre laboratorieskala foregår efter samme princip, nemlig at forsøge at skabe ideelle betingelser for cellerne. Her kan man studere cellernes opførsel, heriblandt vækst og udskillelse/optag af stoffer.
I denne øvelse er formålet at få udtrykt mest muligt produkt, nemlig insulin, hvor forhold som pH og temperatur kan justeres.
Fermenteringerne foregår i lukkede tanke, der kaldes fermentorer. Til dem kan der tilsættes sterilt medium og luft, samt udtages prøver m.m.. En kraftig omrører sikrer tilførsel af O2 i hele blandingen. Målere følger udviklingen i pH, temperatur og CO2-gas, et biprodukt bl.a. ved organismens respiration. Afhængigt af målingerne, justeres der automatisk op eller ned for fx kølelegemerne, så de optimale betingelser fastholdes. Selv små forbedringer har ofte betydning for udbyttet. Den næring, der bruges, afhænger af cellefabrikken, men kan fx være glucose og diverse næringssalte.
Chromatographen måler udbyttet af fermentoren. Den måler mængderne af substrat, produkt og biomasse.

Vejledning

Materialer

- Eppendorfrør med 0.2 ml plasmidopløsning (På plasmidet er der 2 gener: en insulinanalog, samt genet for antibiotika B resistens)
- Eppendorfrør med 0.5 ml opløsning af gærceller (Renkultur: Saccharomyces cerevisiae - Denne stamme vokser bedst mellem 32 og 39 grader og har pH-optimum omkring 6)
- Agarplade med antibiotika B
- Reagensglas med 2 ml vækstmedie (LB-medie) samt Antibiotika B
- Drigalskispatel

Metoder

1. 100 µl plasmidopløsning, tilsættes til opløsningen af gærceller. NB Husk at arbejde sterilt!
2. Ryst forsigtigt blandingen. Vortex vil være for kraftigt.
3. Overfør blanding til elektroporatoren og tænd for denne.
4. Udplad de nu genmodificerede gærceller, ved at først overføre 100 µl på en agarplade med antibiotika B og derefter anvende din drigalskispatel. Husk at fordel grundigt, indtil der er modstand på din spatel.
5. Inkuber pladen ved 37 grader natten over.
6. En enkelt koloni fra pladen overføres til et reagensglas med vækstmedie og antibiotika B og inkuberes ved 37 grader natten over.

7. Hele blandingen overføres med en steril kanyle til en fermentor.
8. Fermentoren startes med de valgte temperatur og pH-indstillinger.
9. Efter fermenteringen kan insulinen oprenses.
10. Effekten kan nu testes ved indsprøjtning med kanyle i rask eller diabetisk mus.

Flowchart

Efter at have læst øvelsesvejledningen, anbefales det at du udfylder et flowchart.

Svar på spørgsmål fra flowchart:

1. Hvorfor kan det være en god idé at inkorporere et resistensgen i plasmidet?
    a. Ved at gøre cellerne resistente, for eksempel overfor antibiotika B, er det muligt at selektere for alle de celler der har modtaget plasmidet ved at dyrke kulturen i medie med antibiotika (antibiotikaet dræber de celler uden plasmid og resistensgen).

2. Hvorfor er det en god idé at have bunsenbrænderen tændt?
    a. Bunsenbrænderen hjælper mod uønsket vækst, ved at skabe opadgående luftstrømme, som forhindrer mikroorganismer i at falde ned i prøven.

3. Hvilken reaktion forventer i at se i musens blodsukker såfremt det producerede insulin virker?
    a. Blodsukkeret vil falde, da insulinen stimulerer produktionen af glykogen.

4. Hvad sker der med cellerne i elektroporatoren?
    a. Cellerne bliver udsat for et elektrochok, hvilket gør deres membran permeabel, således at plasmidet kan trænge ind i cellen.

5. Hvad forventer i vil ske med mængden af biomasse (antallet af organismer), produkt og substrat under fermenteringen?
    a. Biomassekoncentrationen vil stige, da cellerne vil vokse eksponentielt. Derfor vil cellerne også opbruge substratet løbende, dels til at danne biomasse og vokse, og dels til at producere produktet insulin.

Øvelse 3 - Insulinproduktion

Design plasmidet
(indsæt tal) 3 4 2 8 10 2 9 10 1

1. Terminator
2. Start codon
3. Promoter
4. Ribosome Binding Site
5. Antibiotika A
6. Grønt Fluorescerende Protein
7. Lipase
8. Antibiotika B
9. Insulin analog
10. Stop codon

Organisnme nr. 1

1. Gær
2. Bakterier
3. Alger

Elektroporator

Genmodificeret celler

Husk
Sterilteknik

Antibiotikum B

Inkuber ved 37 °C natten over

Overfør genmodificeret gærceller

Inokulering

Fermentor
Optimal pH 6
Optimal °C 32-39

Svar på følgende spørgsmål findes over dette flowchart

1. Hvorfor kan det være en god idé at indsætte et resistensgen i plasmidet?
2. Hvorfor er det en god ide at have bunsenbrænderen tændt?
3. Hvilken reaktion forventer I at se i musens blodsukker, såfremt det producerede insulin virker?
4. Hvad sker der med cellerne i elektroporatoren?
5. Hvad forventer I vil ske med mængden af biomasse (antallet af organismer), produkt og substrat under fermenteringen?

Rapportering og databehandling

Plot data og forklar grafen - Du kan med fordel anvende excel-skabelonen fra hjemmesiden. **Husk** at være opmærksom på om dit databehandlingsprogram bruger komma (dansk) eller punktum (engelsk) som decimalseparator. Da Det Virtuelle Laboratorie bruger punktum, findes der en guide til at lave dette om i skabelonen.
Svar desuden på følgende spørgsmål:

1. Hvorfor er man interesseret i at have høj biomasse (udover at have høj produktkoncentration)?
    a. Biomasse er et udtrykt for koncentrationen af organismer i fermentoren. Da det er organismerne der producerer insulin, vil mængden af produceret insulin være proportional med mængden af biomasse (for det meste).
2. Hvilket substrat kunne man forestille sig der blev brugt i denne proces?
    a. Glukose. Alternativt kan *S. cerivisiae* også gro på maltose eller trehalose.
3. Hvilke vækstbetingelser vist sig at være bedst for produktion?
    a. Temperatur mellem 32 og 39 grader og pH mellem 5 og 7
4. Hvilken reaktion forventes at se i musens blodsukker såfremt det producere insulin virker og hvorfor?
    a. Blodsukkerkoncentrationen falder, da insulinet vil stimulere dannelsen af glykogen.
5. Stemte dette overens med hvad i observerede i det virtuelle laboratorie?
    a. Ja
6. Nævn tre andre organismer der kan bruges som produktionsorganismer ud over gær.
    a. Mange muligheder: *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Aspergillus,* Chinese Hamster Ovary celler (CHO)
7. Nævn tre andre værdifulde stoffer i kunne forestille jer kunne produceres ved denne metode.
    a. Mange muligheder: Medicin (Paclitaxal), smagstoffer (stevia), biobrændsel (ethanol), duftstoffer (patchoulol)

Det har du lært

Efter at have gennemarbejdet del 3 burde du vide hvordan forskellige typer af diabetes behandles, både med hensyn til kost, insulintilskud og hvordan andre medikamenter kan bruges. Desuden bør du have en forståelse for hvordan og hvorfor man bruger organismer som cellefabrikker til at producere medicin og andre værdifulde stoffer i industrien. Herunder bør der kunne redegøres for hvordan et gen er opbygget, hvad en selektionsmarkør er, samt hvordan fermenteringen forløber, når organismen er modificeret.

Vigtige begreber: **cellefabrik, symptomatisk/kurativ behandling, promoter, selektionsmarkør, *Saccharomyces cerevisiae,* metformin, genmodifikation**