

# Målinger av respirasjon i vevshomogenat fra hjerte – normalisering av data

MED-3950 Femteårsoppgaven  
Profesjonsstudiet i medisin ved UiT Norges Arktiske Universitet



**Kandidat:**

Line Rossvoll  
MK 11

**Veileder:**

Ellen Aasum  
Professor

**Biveileder:**

Trine Lund  
Overingeniør

**Kardiovaskulær forskningsgruppe  
Institutt for Medisinsk Biologi, Det Helsevitenskapelige Fakultet  
Tromsø, våren 2015**

## Innhold

Oppsummering.....	3
Arbeidsprosessen .....	4
Introduksjon .....	5
Mål .....	6
Teori.....	7
Mitokondrier .....	7
Elektrontransportsystemet .....	7
Oksidativ fosforylering .....	8
Respirasjonsmålinger .....	9
Metoder.....	11
Homogenisering av mitokondrier .....	11
Respirasjonsmålinger .....	11
Bestemmelse av vevsvekt .....	13
Bestemmelse av citrat syntaseaktivitet .....	14
Bestemmelse av proteinmengde .....	15
Statistikk.....	15
Materiale .....	17
Datasett.....	17
Resultater og diskusjon .....	18
Korrelasjon mellom vekt, CS-aktivitet og protein.....	18
Sammenligning av normaliserte respirasjonshastigheter innad datasettene .....	21
Sammenligning av normaliserte respirasjonshastigheter mellom datasettene .....	22
Korrelasjon mellom CS-aktivitet i homogenat og kammer.....	24
Begrensninger og betraktninger .....	25
Konklusjon .....	26
Referanser .....	27
Vedlegg.....	28
Arbeidsløsninger .....	28

## Oppsummering

Funksjonen til mitokondrier angis ofte i form av analyser av mitokondrienes respirasjonshastighet ved å måle forbruket deres av oksygen. Siden respirasjonshastighetene som måles er avhengig av mengde mitokondrier, er det viktig å finne en metode som kan angi mengden mitokondrier i materialet hvor respirasjonshastigheten måles. Den absolutte respirasjonshastigheten vi måler kan dermed normaliseres mot et mål som representerer mengden mitokondrier. Dette vil være nødvendig dersom vi vil sammenligne mitokondriefunksjonen mellom ulike grupper.

Formålet med denne oppgaven var derfor å undersøke ulike metoder for normalisering av respirasjonsdata i homogenat fra hjertemuskelatur. Vi undersøkte i all hovedsak tre ulike måter for normalisering; vekt på vevsmengde, proteinmengde og citrat syntaseaktivitet i homogenatet. Disse metodene ble forsøkt brukt på fire ulike datasett. Vi undersøkte korrelasjonen mellom de ulike normaliseringsmetodene, om de ulike metodene reduserte spredningen innad i datasettene og hvordan normalisering endrer forholdet mellom de ulike datasettene. Til slutt ville vi også undersøke hvordan citrat syntaseaktivitet målt i en prøve fra homogenatet var korrelert med prøver tatt fra respirasjonskammeret etter fortykning med buffer.

I motsetning til hva vi hadde forventet, var det ingen av metodene som er klart bedre enn andre til å redusere spredningen innad i datasettene. Det kan likevel se ut som om citrat syntaseaktivitet er noe bedre egnet sammenlignet med de to andre metodene som ble evaluert i denne oppgaven. Vi oppdaget at bestemmelse av proteinmengde bare kunne analyseres på homogenat som ikke er fortyknet med for mye buffer. Når proteinmengden blir for lav klarer ikke vi å kvantifisere mengden med valgt analysemetode. Prøver for proteinanalyse kan derfor ikke tas direkte fra respirasjonskammerene, men må tas fra homogenatet. Prøver for citrat syntaseanalyse kan derimot tas både fra kammer og fra homogenat da vi så en klar korrelasjon mellom citrat syntaseaktivitet i kamrene og i homogenatet.

## Arbeidsprosessen

Sommeren 2014 anskaffet kardiovaskulær forskningsgruppe en ny vevshomogenisator. Denne ble anskaffet for å kunne lage homogenat av vevsbiter fra hjertemuskulatur slik at vi kunne gjøre funksjonsundersøkelser av mitokondrier. Frem til nå er det gjennomført flere ulike forsøksserier der denne teknikken er brukt, og det var et ønske om å sammenstille data fra disse seriene for å øke vår forståelse og kompetanse i forhold til hvordan disse dataene på en best mulig måte kan presenteres.

Blant seriene som er kjørt er det én serie der jeg selv har vært ansvarlig for gjennomføringen av alle analyser og målinger rundt mitokondriefunksjonen. Jeg begynte forberedelsene av denne serien i august 2014 ved først å øve meg på homogeniseringen av hjertevevet, samt innarbeide protokollene for å måle mitokondriefunksjonen. Begge prosesser krever erfaring og det er derfor helt avgjørende å få prøvd ut disse før selve forsøket skulle starte. Mitokondriefunksjonen fra 55 ulike hjerter ble undersøkt fra september til desember 2014. Dette er tidkrevende protokoller slik at vi fikk kun kjørt ett eller to hjerter per dag. Av disse har jeg inkludert 18 kontrollhjerter i denne femteårsoppgaven.

I tillegg til data fra det overnevnte prosjektet, har vi også valgt å bruke data fra tre andre prosjekter. Dette har vi gjort for å få mer data og sammenligne metodene på, samt for å se om de ulike metodene egner seg bedre på enkelte protokoller enn andre. Dette er forsøk som jeg ikke har hatt noen direkte rolle i, men hvor jeg har behandlet aktuelle data for å se på hvordan metoden har utviklet seg siden den første serien som jeg selv gjennomførte.

Etter at respirasjonsmålingene er gjort har vi tatt prøver av homogenatet for analyse av citrat syntaseaktivitet og proteinkonsentrasjon. Disse analysene ble utført i tidsrommet februar til april 2015. Dette er målinger som i seg selv ikke tar lang tid, men det krever en del forberedelser i forbindelse med optimalisering av metoder, samt en del tid på analyse av data. Dette er også arbeid jeg har hatt ansvar for, men med god hjelp på opplæring og etterarbeid av data fra andre i avdelingen.

Siste halvdel av april samt hele mai har vært brukt til å gjøre beregninger, statistiske analyser og skrive på oppgaven.

I følge prosjektbeskrivelsen som ble innlevert tidligere i år, skulle vi også undersøke om mitokondrielt DNA var en egnet metode for å normalisere respirasjonsdata. Dette ble derimot ikke inkludert i denne oppgaven. Utstyret for å gjøre analysene kom litt for sent til oss, og optimalisering av metoden tok lengre tid enn vi hadde sett for oss. Vi var derfor nødt til å ekskludere dette fra oppgaven, men håper å få gjort dette ved en senere anledning.

## Introduksjon

Mitokondriene er cellenes energikraftverk, og deres funksjon kan måles ved å studere mitokondriell respirasjon (oksygenforbruket) i isolerte mitokondrier, vevshomogenat og permeabiliserte fibre eller celler. Det er fordeler og ulemper ved alle disse metodene hvor noen av disse er oppsummert i Tabell 1.

**Tabell 1** Fordeler og ulemper ved ulike preparater i forbindelse med funksjonsmålinger av mitokondrier.

	Fordeler	Ulemper
Vevshomogenat	Ikke tidkrevende forarbeid Krever liten vevsmengde Kort diffusjonslengde for oksygen	Ikke alle respirasjonsprotokoller kan kjøres på homogenat
Isolerte mitokondrier	Kort diffusjonslengde for oksygen	Krever større vevsmengde Isoleringen er tidkrevende Krever erfaring
Permeabiliserte fibre/celler	Mitokondrier er i deres naturlige miljø Krever liten vevsmengde Ikke veldig tidkrevende forarbeid	Krever erfaring Lengre diffusjonslengde for oksygen

I vår forskningsgruppe har vi tidligere primært brukt isolerte mitokondrier fra hjertevev. Dette krever imidlertid relativt mye vev, arbeidsprosessen er tidkrevende og det er mange trinn i prosessen som øker muligheten for å gjøre feil. Derfor kreves det at en opparbeider seg en del erfaring før en starter med forsøkene. På bakgrunn av dette ble det kjøpt inn en ny homogenisator som var tenkt å kunne brukes som et supplement og/eller erstatning for isolerte mitokondrier. Selv om homogenisering av vev er en kjent og mye brukt metode, er fordelene med dette nye utstyret at det i mindre grad er brukerpåvirket sammenlignet med om en bruker en stavhomogenisator som var benyttet tidligere. Protokollen for homogenisering krever en mye mindre mengde vev og er mer standardisert enn protokollen for isolering. I tillegg er den ikke like tidkrevende og ikke like teknisk utfordrende som isoleringsprotokollen.

Studier som er gjort er primært fra levervev, og det er få studier der en har brukt homogenat fra hjertevev som er organet det jobbes mest med på Kardiiovaskulær forskningsgruppe. Dette gir oss noen utfordringer i henhold til homogeniseringen da lever- og hjertevev er ganske ulike.

Mitokondriefunksjonen blir målt i form av respirasjonshastigheter og det er ønskelig å etablere en metode for å normalisere respirasjonshastighetene. Siden respirasjonshastigheten som måles i kamrene er avhengig av mengde mitokondrier som er tilsatt, er det viktig å finne en metode som kan angi hvor mye mitokondrier det faktisk er tilsatt i kamrene. Kun på denne måten kan resultater mellom prøver fra ulike hjertet sammenlignes på en riktig måte.

Det er vanlig å normalisere mot vekten av hjertevevet som blir brukt til å lage homogenatet. For prøver fra lever vil dette være en relativt grei metode, men da hjertevev er et mer fibrøst vev var vi bekymret for at dette ikke er en god metode. Vi har sett at det ofte ligger igjen vevsbiter etter homogeniseringen, og at denne mengden synes å variere fra prøve til prøve.

## Mål

Hovedmålet med denne oppgaven er å undersøke ulike metoder for normalisering av respirasjonsdata i homogenat fra hjertemuskulatur. Vi vil i denne oppgaven vurdere tre ulike metoder for normalisering av respirasjonshastighet:

1. *Vekt*: En kjent mengde vevsbit fra hjertet homogeniseres til en løsning som vi måler mitokondriefunksjon på.
2. *Citrat syntase (CS) aktivitet*: CS er et enzym som befinner seg i mitokondriens matriks. Vi vil måle CS-aktiviteten i løsningen med det vevshomogenatet som vi har målt respirasjonen på, og brukes ofte som et mål på mengde mitokondrier i homogenatet.
3. *Proteinmengde*: Vi vil måle total mengde protein i løsningen med det vevshomogenatet som vi har målt respirasjonen på.

For å evaluere disse metodene vil vi først se på korrelasjonen mellom disse parameterne (CS-aktivitet, vevsvekt og protein) i prøver fra fire ulike datasett. Vi vil også se på de maksimale respirasjonshastighetene etter normalisering mot disse metodene for å se om noen av metodene kan samle dataene bedre enn andre.

Et annet delmål med oppgaven er å sammenligne respirasjonshastighetene fra ulike datasett etter normalisering for å vurdere respirasjonshastighetene mellom datasettene etter normalisering med metodene over.

Til slutt ønsker vi å finne ut om prøver for CS-målingene tatt direkte fra homogenatet som lages, korrelerer godt med prøvene som ble tatt fra kammeret under respirasjonsmålingene.

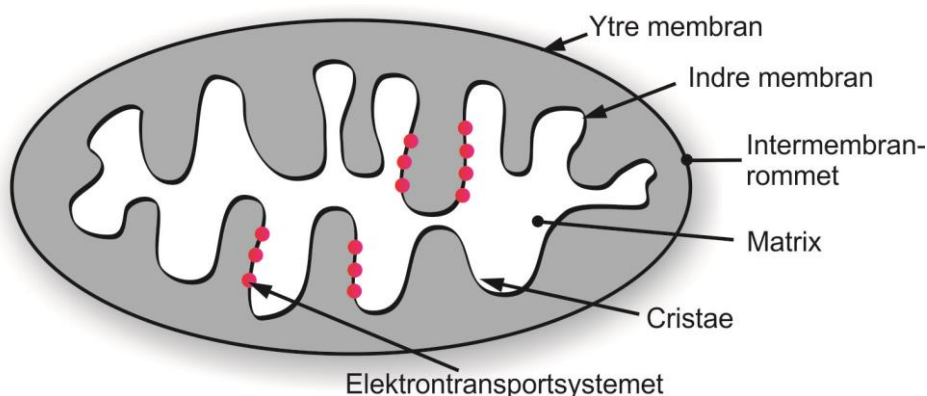
## Teori

### Mitokondrier

Mitokondrier er organeller som finnes i de aller fleste eukaryote celler og det er her adenosintrifosfat (ATP) dannes. ATP er et energirikt molekyl, og det er derfor mitokondriene også kalles for «cellens energikraftverk». I tillegg til å være essensielle i dannelsen av energi, er mitokondriene involvert i flere andre viktige prosesser som blant annet celledifferensiering, celledød, vedlikeholde cellesyklusen og cellevekst.

Hjertet er en muskel som kontinuerlig må jobbe og som aldri får hvile. Som følge av dette har hjertevevet et enormt energibehov i forhold til annet vev. Hele 30 kilogram ATP produseres i hjertet hos mennesket hver dag, noe som tilsvarer omtrent 100 ganger sin egen vekt (1). For å kunne produsere nok energi er hjertet avhengig av nok mitokondrier. Antall mitokondrier varierer i stor grad mellom celletypene. Erytrocyttene har for eksempel ingen mitokondrier, mens en kardiomyocyt kan ha opptil 7000 mitokondrier (2). I kardiomyocytene opptar mitokondriene omtrent 35 % av cellens totale volum, i motsetning til andre celler hvor de vanligvis opptar 20 % (2).

Mitokondrier (Figur 1) består av en ytre og en indre membran med et intermembranrom mellom disse membranene. Matrix er rommet som ligger innenfor den indre membranen. Den indre membranen har et større areal enn den ytre membranen og er derfor har dermed mange folder som kalles cristae. En kardiomyocyt vil ha mange flere cristae enn andre celler, noe som betyr at den indre membranen er større enn i andre celler. Siden det er nettopp på den indre membranen at elektrontransportsystemet befinner seg og hvor energi blir dannet, vil kardiomyocytene måtte trenge en større indre membranoverflate enn andre celler for å dekke sitt enorme energibehov.

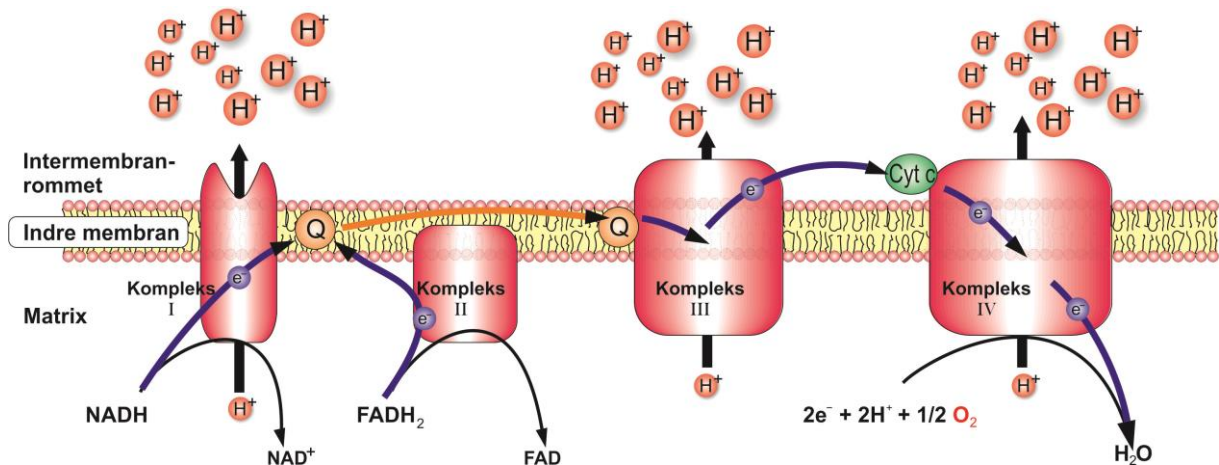


**Figur 1** Skjematiske tegning av en mitokondrie.

### Elektrontransportsystemet

Siste trinnet i dannelsen av energi, uavhengig om det er fett, karbohydrater eller proteiner som brytes ned, er elektrontransportsystemet (Figur 2). Ved nedbrytningen av næringsstoffer dannes det reduserte koenzymene som NADH og FADH<sub>2</sub>. Disse avgir elektronene sine, og i en koblet prosess

dannes ATP fra  $ADP + P_i$  ved hjelp av ATPase. Prosessen har fått navnet oksidativ fosforylering. Alt dette skjer på den indre membranen i cellens mitokondrier ved hjelp av en rekke enzymkomplekser.



**Figur 2** Skjematisk oversikt over elektrontransportsystemet.

I kompleks I overføres to elektroner fra NADH til et lipidløselig bæremolekyl Q. Samtidig pumperes fire protoner over til intermembranrommet. Det oppstår da en protongradient over den indre membranen.

I kompleks II overføres elektroner fra  $FADH_2$  over til Q. I motsetning til kompleks I pumperes det ingen protoner over membranen i kompleks II.

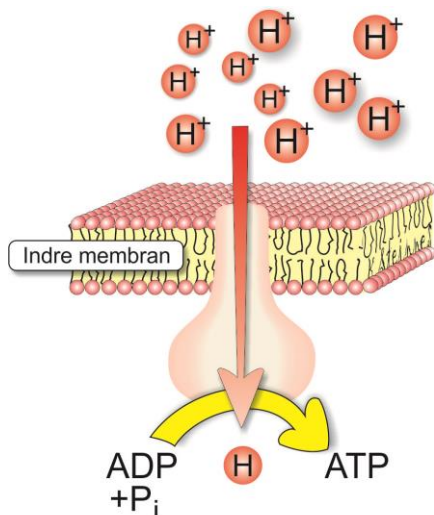
I kompleks III overfører Q elektroner til cytokrom C som er en vannløselig elektronbærer i intermembranrommet. Også her pumperes protoner over membranen.

I kompleks IV overføres elektroner fra cytokrom C til  $O_2$ , og  $H_2O$  blir produsert. Protoner pumperes over membranen.

### Oksidativ fosforylering

Elektrontransportsystemet og oksidativ fosforylering er tett koblet via protongradienten som oppstår over den indre membranen. Protongradienten gir en elektrokjemisk gradient som driver ATPasen (Figur 3) som i likhet med elektrontransportsystemet også befinner seg på den indre membranen i mitokondriene. ATPasen har en komponent som fungerer som en ionekanal som frakter protonene tilbake til matrix. Denne ionestrømmen frigjør energi som driver ATPasen til å danne ATP fra ADP og en fosfatgruppe,  $P_i$ . Det er verdt å merke seg at ATPasen er avhengig av ADP for å gå rundt. Uten ADP blir ikke protoner fra intermembranrommet tilbakeført til matrix, slik at det bygges opp en protongradient i intermembranrommet. Når det blir for høy protonkonsentrasjon vil den elektrokjemiske gradienten og motstanden bli så stor at kompleksene i elektrontransportsystemet ikke lenger klarer å pumpe over protoner. Elektronoverføringen stopper dermed opp.





**Figur 3** Skjematiske oversikt over en ATPase.

### Respirasjonsmålinger

For å vurdere mitokondrienes funksjon kan forbruket av oksygen etter tilsetning av ulike substrater og ADP måles. Dette er en teknikk som er brukt i mange tiår hvor et respirometer med en elektrode (som regel en Clark-elektrode) måler mengden oksygen som er i en løsning. Metoden går ut på at det tilsettes en mitokondrielløsning i et lufttett kammer med kontinuerlig måling av oksygenkonsentrasjonen. Etterhvert som det tilsettes substrater, hemmere og ADP, endres oksygenkonsentrasjonen som følge av at mitokondriene respirerer.

I litteraturen er det mange måter å beskrive mitokondrienes respirasjon på. I denne oppgaven brukes uttrykk Chance og Williams først beskrev i 1955 (3). Dette er uttrykk som beskriver hvilket stadium respirasjonen befinner seg på avhengig om substrat og/eller ADP er tilsatt mitokondrieblandingen i kammeret.

- I *state 1* er det kun mitokondrier i kammeret. Det er tilsatt verken ADP eller reduserte substrater, og mitokondriene forbruker ikke noe oksygen ettersom elektrontransportsystemet ikke går.
- I *state 2* er det tilsatt ett eller flere substrat, som for eksempel malat, pyruvat, glutamat og succinat. En eventuell lekkasje av protoner over membranen vil kunne bidra til å gi en liten respirasjon i denne fasen.
- I *state 3* er det i tillegg tilsatt store mengder ADP+P<sub>i</sub>. Mitokondriene respirer på høyt nivå og bruker masse oksygen.
- *State 4* er stadiet som kommer etter *state 3* når tilsatt ADP er brukt opp og omdannet til ATP. Respirasjonen går ned igjen, men ikke helt ned til *state 2* da det foregår en viss revers ATPase-aktivitet. Det vil si at ATP spaltes til ADP+P<sub>i</sub> samtidig som protoner pumpes over membranen.

*Mitokondriell kapasitet* måles når det tilsettes en høy mengde ADP sammen med substrater. Respirasjonshastigheten i *state 3* er således et mål på mitokondriell kapasitet og indikerer hvor raskt mitokondriene klarer å produsere ATP.

*Elektronkjedekapasitet* kan måles når det er tilsatt FCCP. FCCP er en frikobler som gjør at protoner strømmer tilbake til matrix uten å måtte gå gjennom ATPasen. ATPasen er ikke en del av elektrontransportsystemet selv om den er med i oksidativ fosforylering, slik at når ATPasen frikobles kan kapasiteten til elektrontransportsystemet måles uavhengig av ATPasens kapasitet. Mitokondriell kapasitet inkluderer derimot kapasiteten til både elektrontransportkjeden og ATPasen.

Dersom mitokondriell kapasitet og elektrontransportkjedens kapasitet er godt koblet vil ikke tilsetning av FCCP føre til stor økning i respirasjonen. Men dersom respirasjonen øker mye ved tilsetning av FCCP tyder det på at mitokondriens kapasitet og elektrontransportkjedens kapasitet ikke er godt koblet, og ATPasen er en begrensende faktor i dannelse av ATP.

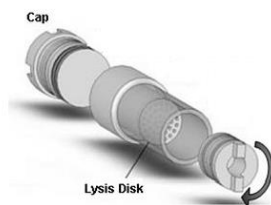
## Metoder

### Homogenisering av mitokondrier

Umiddelbart etter perfusjon legges hjertene i en bufferløsning (A1) på is, og resten av protokollen foregår på is. Vi har tidligere sett at hjertene kan oppbevares i denne løsningen opptil 4-6 timer før man observerer nedsatt funksjon i form av redusert respirasjon. En bit av hjertet veies (10-15 mg). Den gitte vevsbiten legges i 0,5 ml A1 i en liten glasskål og det benyttes en skalpell for å dele den opp i biter på omtrent 1x1 mm. Det tilsettes 50 µl trypsin (5 mg/ml), og prøven settes på risting. Etter 10 minutter risting pipetteres væsken bort, og preparatet skylles med 2 ml A1 to ganger for å få vasket bort trypsinet.



For selve homogeniseringen er det brukt et PBI-Shredder HRR-sett fra Oroboros Instruments (**Error! Reference source not found.**). Ved hjelp av en PBI-Shredder, et metallstativ og spesielle tuber kan vevsprøver homogeniseres på en standardisert måte. Vevsprøven ligger i små tuber sammen med 0,5 ml A1 bufferløsning. Tubene plasseres i et avkjølt metallstativ som er oppbevart i fryser på -20 °C. PBI-Shredderen plasseres over metallstativet og ønsket trykk stilles inn. PBI-Shredderen fungerer ved at den legger trykk på samtidig som en del av tuben vris oppå vevsbiten. Dette fører til at vevsbiten sammen med væske presses gjennom et filter i tuben, og man sitter igjen med et homogenat bestående av vevsbiten og buffer. Ved bruk av dette apparatet elimineres mulig feil som kan oppstå når man selv legger trykk på vevet uten noen form for mekaniske innstillinger.



I disse forsøkene har vi homogenisert i 12 sekunder på trykkinnstilling 1. Løsningen av A1 med de små vevsbitene pipetteres så ut over i 10 ml MiRO5 som så blir oppbevart på is resten av forsøket.

**Figur 4** PBI-Shredder og HRR-sett (4).

### Respirasjonsmålinger

Nylig ble det lansert et respirometer som kan måle svært små endringer i oksygenmengde i forhold til de eldre respirometrene. Dette ble derfor kalt et høysensitivt respirometer, og produseres av firmaet Oroboros. I denne oppgaven er det benyttet en Oroboros Oxygraph-2k (Figur 5). Dette er et apparat som har to kamre som blir oksygentette når en såkalt stopper plasseres i hvert kammer. I hvert av disse kamrene er det en oksygensensor som kontinuerlig måler konsentrasjonen av oksygen i løsningen. I bunnen er det en magnetrører som sørger for at mitokondriene og oksygenet i løsningen i kamrene fordeles jevnt. Ved hjelp av Hamiltonsprøyter tilsettes ulike reagenser til kamrene. I tillegg til at oksygensensoren måler oksygenkonsentrasjonen, beregnes også hastigheten for oksygenforbruket i kamrene ved hjelp av DatLab-software tilhørende oksygraferen. Dette vises som to ulike grafer på en tilkoblet dataskjerm (Figur 6).



**Figur 5** Oroboros Oxygraph-2k (5).

2,3 ml av homogenatet tilsettes begge kamrene på oxygrafen. Stopperne står oppe i tre minutter for å oksygenere løsningene før de skrues helt på plass, og kamrene er da lufttette. Overflødig væske suges opp fra stopperne.

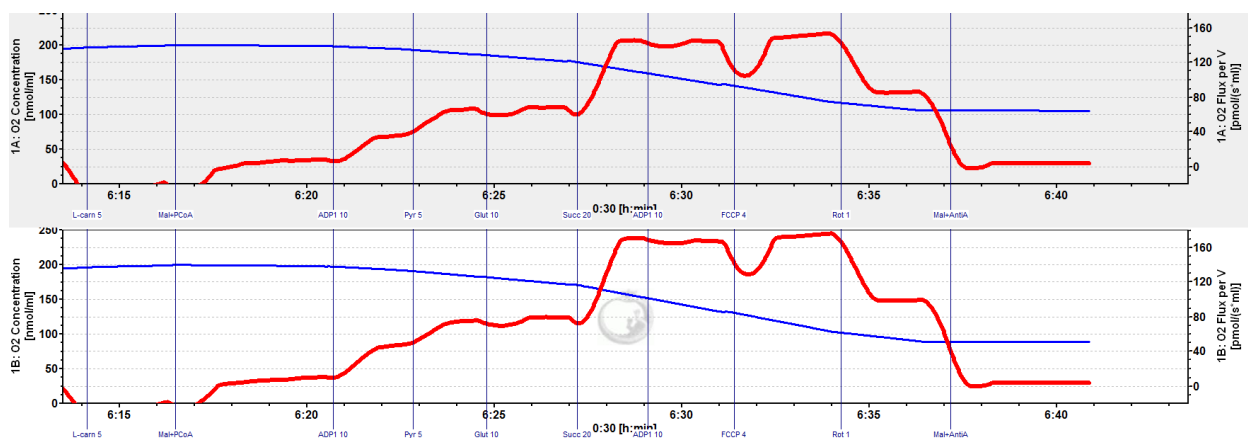
DatLab viser et nåtidsbilde av oksygenkonsentrasjonen og hastigheten som oksygen forbrukes (Figur 6). Etter tilsetting av substrater skal den røde linjen stabiliseres før neste substrat tilsettes. I dette forsøket ble det kjørt en «substrate-uncoupler-inhibitor titration» (SUIT)-protokoll (**Error! Reference source not found.**). Med en slik protokoll kan vi studere effektiviteten av de ulike kompleksene, mitokondriell kapasitet og elektronkjedekapasitet.

Først tilsettes ADP som er et substrat til ATPasen slik at denne kan pumpe protoner tilbake til matrix etter hvert som elektrontransportsystemet pumper protoner over i intermembranrommet. Deretter tilsettes substratene malat, pyruvat og glutamat som går inn i kompleks I, før succinat tilsettes. Succinat er et substrat som går inn i kompleks II. Respirasjonshastigheten etter at malat, pyruvat og glutamat er tilsatt, indikerer dermed respirasjonen til mitokondriene når det gis substrater som går inn i kompleks I. Når succinat i tillegg er tilsatt, indikerer respirasjonshastigheten mitokondrienes respirasjon når både kompleks I og kompleks II mottar substrater. For å bestemme hvor mye kompleks II-substrater bidrar med alene, beregnes differansen mellom respirasjonshastigheten for både kompleks I og II og respirasjonshastigheten for kompleks I alene.

ADP tilsettes på nytt en tid ut i protokollen for å sikre at ATPasen fremdeles har nok substrat å ta av. Deretter tilsettes FCCP som frikobler ATPasen, og dette er den høyeste respirasjonshastigheten vi kan oppnå. Når hemmerne rotenon, malonat og antimycin A er tilsatt, er alle komplekser bortsett fra kompleks IV hemmet. Når alle andre komplekser er hemmet, kan ikke kompleks IV holde i gang elektrontransportsystemet alene, og respirasjonen er tilnærmet lik null. Det eneste som kan gi noe respirasjon er at mitokondrienes membran er lekk eller at det foregår en viss revers ATPase-aktivitet.

**Tabell 2** Forenklet SUI-protokoll.

Substrat	Mengde	Funksjon	Hva undersøker vi?
ADP	10 $\mu$ l	Aktiverer ATPase	
Malat + pyruvat + glutamat	5 + 5 + 10 $\mu$ l	Aktiverer KI	Kompleks I
Succinat	20 $\mu$ l	Aktiverer KII	Kompleks I + II
ADP	10 $\mu$ l	Aktiverer ATPase	Mitokondriell kapasitet
FCCP	4 $\mu$ l	Frikobler ATPase	Elektronkjedekapasitet
Rotenon	1 $\mu$ l	Hemmer KI	Kompleks II, III og IV
Malonat + Antimycin A	5 + 1 $\mu$ l	Hemmer KII og KIII	Kompleks IV



**Figur 6** SUI-protokoll fra et av våre forsøk. Blå linje representerer oksygenkonsentrasjonen, mens rød linje representerer hastigheten oksygenet forbrukes, og er den tidsderiverte av konsentrasjonskurven.

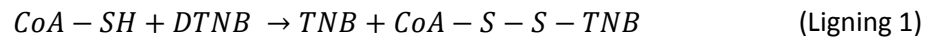
### Bestemmelse av vevsvekt

Før hver homogenisering er en gitt vevsbit veid. Mens hjertevevet ligger i A1 bufferløsning på is, klippes det av en bit tilsvarende 9-25 mg. Vevsbiten rulles forsiktig over et papir for å få av overflødig væske før den veies. Restene av vevsbiten som ligger igjen i shreddartuben etter homogenisering er også veid i noen forsøksserier. Tidligere er det benyttet differansen mellom disse to vektene som har angitt hvor mye av det innevide vevet som faktisk ble homogenisert. Erfaring viser imidlertid at vekten på restvevet er såpass lav at målingene blir relativt unøyaktige. En del av vevet henger dessuten godt igjen i shreddartuben, slik at det blir vanskelig å få en nøyaktig verdi på hvor mye vev som faktisk er homogenisert. Derfor er det i denne oppgaven brukt vekten fra det innevide vevet som angitt vekt.

### Bestemmelse av citrat syntaseaktivitet

Citrat syntase (CS) er et enzym som inngår i sitronsyresyklusen hvor det omdanner Acetyl CoA og oxalacetat til citrat og koenzym A. Enzymet befinner seg i mitokondriens matrix. Derfor blir CS ofte brukt som en kvantitativ markør for innholdet av intakte mitokondrier. CS-aktiviteten antas å være konstant per mitokondrie (6).

Analysemetoden som er brukt i disse forsøkene benytter en annen kjemisk reaksjon som også katalyseres av citrat syntase (Ligning 1). Produktet (TNB) av denne reaksjonen detekteres av et spektrofotometer.



Det ble brukt en plate med 96 brønner. Hver brønn tilsettes 4  $\mu\text{l}$  mitokondrieløsning samt 196  $\mu\text{l}$  reaksjonsmix som består av DTNB, Acetyl CoA, oxalacetat,  $\text{H}_2\text{O}$ , Triton-X. Platen med brønnene settes umiddelbart inn i spektrofotometeret for avlesning og økning i absorbans registreres ved 412 nm. Spektrofotometeret måler absorbansen i brønnene hvert 15. sekund over to minutter. Siden enzymet kontinuerlig katalyserer reaksjonen, vil absorbansen øke for hver måling som tas. Disse målingene vil kunne gi en lineær linje med tid på X-aksen og absorbans på Y-aksen. Stigningstallet til denne linjen gir en indikasjon på økning av absorbans per tidsenhet.

Spesifikk aktivitet av citrat syntase kan deretter beregnes ved hjelp av Ligning 2.

$$v = \frac{r_A}{l \cdot \epsilon_B \cdot V_B} \cdot \frac{V_{\text{Brønn}}}{V_{\text{sample}}} \quad (\text{Ligning 2})$$

- $v$  spesifikk aktivitet av CS, IU
- $r_A$   $dA/dt$ , delta endring i absorbans per tidsenhet
- $l$  lengde av brønn = 0,625 cm
- $\epsilon_B$  ekstinksjonskoeffisient til TNB ved 412 nm = 13,6
- $V_B$  støkiometrisk verdi for TNB = 1
- $V_{\text{Brønn}}$  brønnens volum = 200  $\mu\text{l}$
- $V_{\text{sample}}$  prøvens volum = 4  $\mu\text{l}$

Basert på CS-aktiviteten i homogenatet, kan CS-aktiviteten i kamrene beregnes ut i fra mengde homogenat som er tilsatt og fortynnet i kamrene. I denne oppgaven er det dermed den beregnede CS-aktiviteten i kamrene som er oppgitt.

I alle datasettene er det målt CS-aktivitet fra homogenatet før det er tilsatt kamrene. I datasett C er det i tillegg gjort CS-analyser fra kamrene under forsøket for å se hvor mye vev som faktisk er kommet med i kamrene. Dette datasettet er derfor brukt til å undersøke hvordan den beregnede CS-aktiviteten i kamrene korrelerer med den faktiske CS-aktiviteten i kamrene. Dette vil være interessant for å se om man i senere forsøk bør ta prøver for CS-analyse direkte fra kamrene, eller om det holder å ta prøver fra homogenatet.

## Bestemmelse av proteinmengde

Det er i dette forsøket benyttet Bradford Assay for proteinbestemmelse (7). Dette er en metode som bruker spektrofotometri for å bestemme en ukjent mengde protein i en løsning. Et fargestoff tilsettes løsningen som skal analyseres. Fargestoffet binder hovedsakelig til basiske og aromatiske aminosyrer, spesielt arginin, og skifter farge fra rød til blå når den binder et protein. Når fargestoffet er blått, detekteres det av spektrofotometeret ved 590 nm.

En ukjent proteinkonsentrasjon kan bestemmes ved hjelp av en standardkurve og Beers lov. Beers lov sier at absorbansen er proporsjonal med konsentrasjonen av et stoff. Dersom det lages en standardkurve med kjente proteinkonsentrasjoner på X-aksen plottet mot absorbansen som måles på Y-aksen, kan denne standardkurven brukes til å bestemme en ukjent proteinkonsentrasjon når absorbansen på løsningen er kjent.

Det ble brukt en plate med 96 brønner. Hver brønn ble tilsatt 10 µl av en fortynnet mitokondrieløsning. Deretter tilsettes det 200 µl av en forhåndskjøpt reaksjonsmix som inneholder fargestoff som binder til proteiner. Hele platen settes så inn i spektrofotometeret hvor det leses av absorbansen ved 590 nm.

Ved hjelp av standardkurven med kjente proteinkonsentrasjoner, ble proteinkonsentrasjonen i de ukjente prøvene med homogenat beregnet. Siden absorbansen (x) på X-aksen er kjent i prøvene med ukjent proteinkonsentrasjon, og siden stigningstallet (a) og y-interceptet (b) er kjent fra standardkurven, kan proteinkonsentrasjonen (y) beregnes ved hjelp av Ligning 3.

$$y = ax + b \quad (\text{Ligning 3})$$

<i>y</i>	<i>proteinkonsentrasjon</i>
<i>a</i>	<i>kurvens stigningstall</i>
<i>x</i>	<i>absorbans</i>
<i>b</i>	<i>kurvens y-intercept</i>

## Statistikk

For å se etter samvariasjon mellom to variabler, settes verdiene inn i et spredningsplott hvor hvert par av observasjoner er representert med et punkt. Punktene former en punktsky og punktskyens form og plassering angir samvariasjon.

I tillegg kan både Pearsons (Ligning 4) og Spearmans korrelasjonskoeffisient beregnes. Dette er to ulike mål på samvariasjon hvor Pearsons er best egnet ved lineær sammenheng, mens Spearmans er best egnet ved monoton sammenheng. Det er valgt å bruke Pearsons korrelasjonskoeffisient i denne oppgaven. P-verdien hentes direkte ut fra tabell basert på beregnet korrelasjonskoeffisient med et signifikansnivå på 0,05.

$$r_p = \frac{\sum(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{(n - 1) \cdot s_x \cdot s_y} \quad (\text{Ligning 4})$$

$r_p$	<i>Pearsons korrelasjonskoeffisient</i>
$x$	<i>målingspunkt i variabel 1</i>
$y$	<i>målingspunkt i variabel 2</i>
$\bar{x}$	<i>gjennomsnitt av variabel 1</i>
$\bar{y}$	<i>gjennomsnitt av variabel 2</i>
$n$	<i>antall målingspunkt</i>
$s_x$	<i>standardavvik til variabel 1</i>
$s_y$	<i>standardavvik til variabel 2</i>

For å gjøre en vurdering av hvilken effekt normalisering av respirasjonshastighetene har på spredningen av resultatene, presenteres enkeltverdiene i datasettene etter justering mot datasettets gjennomsnittsverdi sammen med  $\pm$  standardavvik.



## Materiale

### Datasett

I dette prosjektet er det brukt materiale fra fire ulike forsøk. På denne måten kan vi ikke bare se hvilken metode som egner seg best for normalisering, men også når vi bør bruke de ulike metodene. En oppsummering av datasettene er presentert under samt i Tabell 3.

**Tabell 3** De ulike datasettene som er benyttet i oppgaven. *Vevsmengde* er den innveide vekten, *MiR05* er mengden som vevet er fortynnet i, mens *tilsatt i kammer* viser hvor mye av homogenatet og hvor mye buffer som er tilsatt i kamrene under forsøkene.

Datasett	Dyr	Vevsmengde (mg)	MiR05 (ml)	Konsentrasjon i homogenat (mg/ml)	Tilsatt i kammer (homogenat+MiR05)	Konsentrasjon i kammer (mg/ml)
A	Mus	9-15	10,5	1,1	2,3 ml + 0	1,1
B	Mus	9-15	1	12	50 µl + 2,5 ml	0,25
C	Rotte	20-25	11	2	0,5 ml + 2,0 ml	0,4
D	Mus	15-25	1	20	50 µl + 2,5 ml	0,4

Datasett A: 9-15 mg vev fra musehjerte er homogenisert slik beskrevet tidligere. Homogenatet er til slutt fortynnet med 10,5 ml MiR05. Prøven er ikke ytterlig fortynnet ved tilsetning i respirasjonskammer. Dette er prøver fra normale musehjerter (C57Bl/6J) som er perfunderte før vevsprøven til respirasjonsmålingene er tatt.

Datasett B: 9-15 mg vev fra musehjerte er homogenisert slik beskrevet tidligere. Homogenatet er til slutt fortynnet med 1 ml MiR05. 50 µl av denne prøven ble tilsatt kammeret sammen med 2,5 ml MiR05. Dette er prøver fra villtype C57Bl/6J-mus og fra Nrf2 knockout C57Bl/6J-mus. Like før høsting av hjerter gjennomgikk noen av dyrene trening. Hjertene er ikke perfunderte før respirasjonsmålingene.

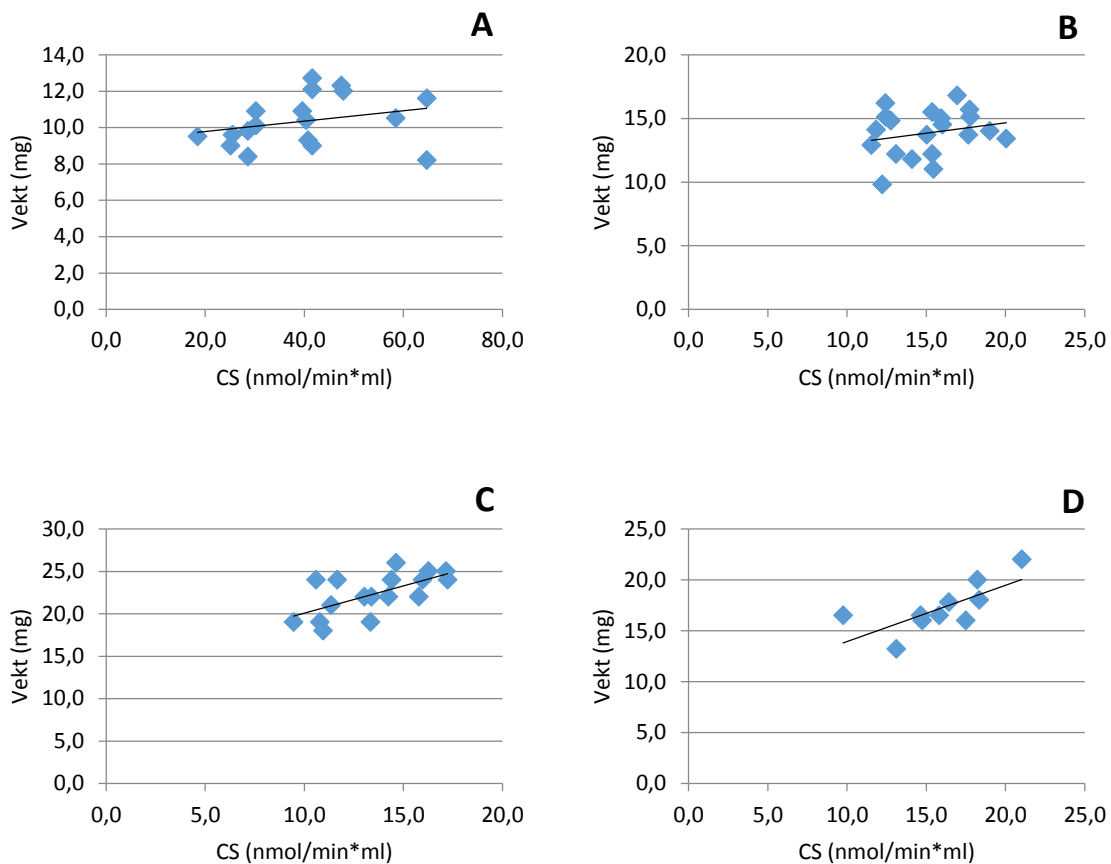
Datasett C: 20-25 mg vev fra rottehjerte er homogenisert slik beskrevet tidligere. Homogenatet er til slutt fortynnet med 11 ml MiR05. 0,5 ml av denne prøven ble tilsatt respirasjonskammeret sammen med 2,0 ml MiR05. Dette er Wistar-rotter som har fått ekstra fruktose tilsatt i drikkevannet. Det er både hanner og hunner med i datasettet, hvor noen av hunnene har fått fjernet eggstokkene. Hjertene er ikke perfunderte før respirasjonsmålingene.

Datasett D: 15-25 mg vev fra musehjerte er homogenisert slik beskrevet tidligere. Homogenatet er til slutt fortynnet med 1 ml MiR05. 50 µl av denne prøven ble tilsatt respirasjonskammeret sammen med 2,5 ml MiR05. Dette er db/db-mus med induisert diabetes type II hvor noen er behandlet med et spesielt peptid som skal aktivere kalsiumkanaler i hjertet, mens andre ikke er behandlet. Alle hjertene er perfunderte før respirasjonsmålingene.

## Resultater og diskusjon

### Korrelasjon mellom vekt, CS-aktivitet og protein

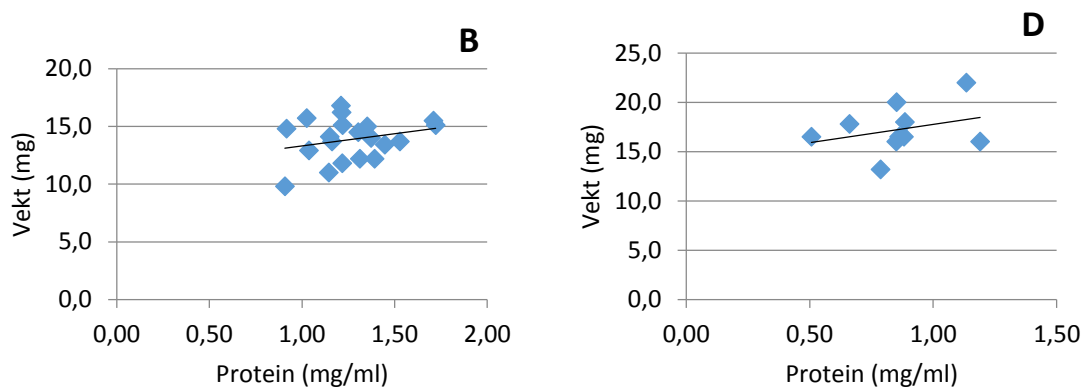
Siden vi mistenker at innveid vekt er et lite egnet mål på mengde vev som faktisk er i homogenatet, har vi ønsket å se om CS-aktivitet i homogenatet kan være bedre indikator på hvor mye vev som er homogenisert. Som et utgangspunkt for å vurdere dette så vi på sammenhengen mellom CS-aktivitet i homogenatet og den innveide vekten på vevet som er homogenisert i alle fire datasett (Figur 7).



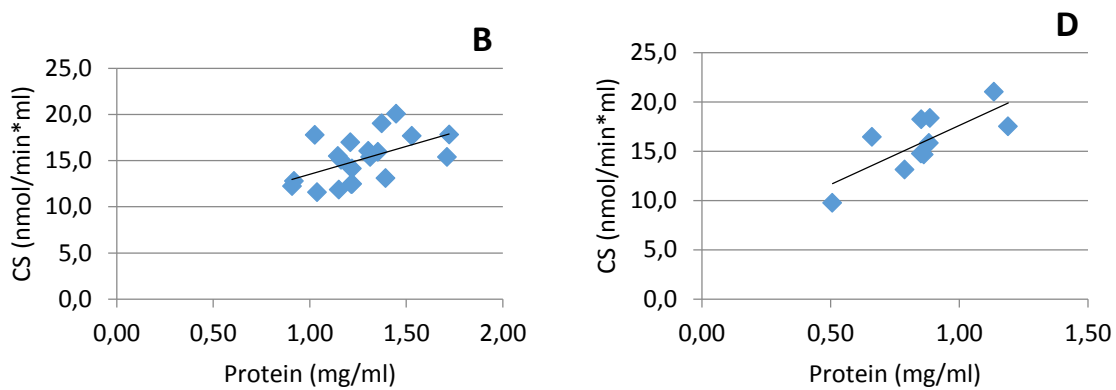
**Figur 7** CS-aktivitet plottet mot innveid vekt. Korrelasjonen er signifikant i datasett C og D.

Vi har også sett at mange bruker proteinanalyser for å indikere hvor mye mitokondrier det er i homogenatet. Slike proteinanalyser vil imidlertid måle all type protein, og ikke bare mitokondrielt protein. Vi ville likevel se om proteinmengden korrelerte godt med CS-aktivitet og vekt (Figur 8 og Figur 9).

Det viste seg at for prøvene i datasett A og C lot det seg ikke gjøre å kvantifisere proteinmengden i homogenatet. Dette var i de datasettene hvor homogenatet ble fortynnet ut med 10,5 og 11 ml MiR05. Metoden som ble benyttet for proteinbestemmelse klarer ikke å kvantifisere når proteinmengden blir så lav som i disse tilfellene. Dette skyldes at det også er proteiner (1 mg/ml) i bufferen som vi fortynner med, og metoden blir derfor mindre sensitiv for lave proteinkonsentrasjoner i prøvematerialet. Vi har derfor ikke kunne bestemt proteinmengden i datasett A og C. Det lot seg derimot kvantifisere i datasett B og D hvor homogenatet ble fortynnet ut med kun 1 ml MiR05.



**Figur 8** Proteinmengde i homogenatet plottet mot innveid vekt av vevet benyttet for å lage homogenatet. Ingen signifikant korrelasjon.



**Figur 9** Proteinmengde i homogenatet plottet mot CS-aktivitet i det samme homogenat. Korrelasjonen er signifikant på 0,05-nivå.

Tabell 4 viser den statistiske korrelasjonen av de ulike målene mot hverandre. Pearsons korrelasjonskoeffisient ( $r_p$ ) indikerer hvor godt datasettet samsvarer med en lineær modell. Jo nærmere 1  $r_p$  er, jo bedre lineært forhold er det mellom de to datasettene.

**Tabell 4** Verdier av Pearsons korrelasjonskoeffisient. \*signifikant på 0,05-nivå.

	CS	Protein
Vekt	A – 0,28 B – 0,23 C – 0,64* D – 0,72*	B – 0,26 D – 0,31
CS	-	B – 0,54* D – 0,76*

Vi fant overraskende nok en signifikant korrelasjon mellom CS-aktivitet og vekt i datasett C og D. Det betyr at vekt muligens ikke er en så dårlig indikator på mengde vev i homogenatet som vi på forhånd hadde trodd. I datasett C og D er vektene noe høyere enn i datasett A og B, samtidig som at det er større differanse mellom høyest og lavest vekt, noe som kan bidra til at korrelasjonskoeffisienten blir høyere.

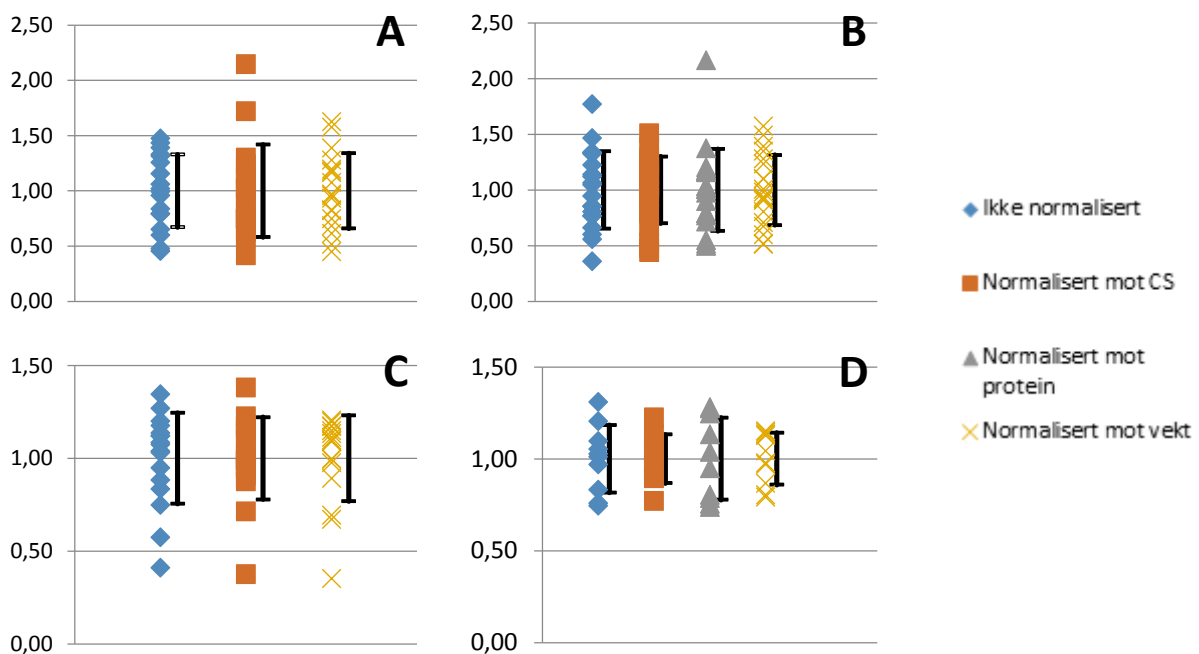
Vi har til nå antatt at prøvene i denne oppgaven har samme mitokondrielle tetthet. En eventuell forskjell i mitokondriell tetthet skal i teorien plukkes opp ved hjelp av analyser av CS-aktivitet i prøvene da CS-aktiviteten antas å være konstant i mitokondriene (6). Mistenker man en endring i mitokondriell tetthet mellom gruppene, kan en først undersøke mitokondriell tetthet ved å analysere CS-aktiviteten i en vevsprøve. En kan også velge å normalisere prøvene mot CS-aktivitet (8) som tar hensyn til mitokondriell tetthet. Først da kan man se om en eventuell forskjell i mitokondriell respirasjon mellom gruppene skyldes ulik tetthet av mitokondrier eller en faktisk endret mitokondriell funksjon.

Til tross for at proteinmengden inkluderer alle typer protein, og ikke bare mitokondrielt protein, er proteinmengde og CS-aktivitet også signifikant korrelert.

## Sammenligning av normaliserte respirasjonshastigheter innad datasettene

Som nevnt tidligere ønsker vi å normalisere respirasjonsdata mot den eller de metodene som samler dataene mest. For å vurdere hvordan metodene bidrar til å samle data, har vi i Figur 10 normalisert respirasjonshastighetene etter tilsetning av FCCP i hvert datasett mot de ulike metodene (vekt, CS-aktivitet og proteinmengde). Alle verdiene i figuren er justert mot datasettets gjennomsnittsverdi, og er dermed oppgitt som relative verdier for å bedre kunne sammenligne spredningen i en og samme figur.

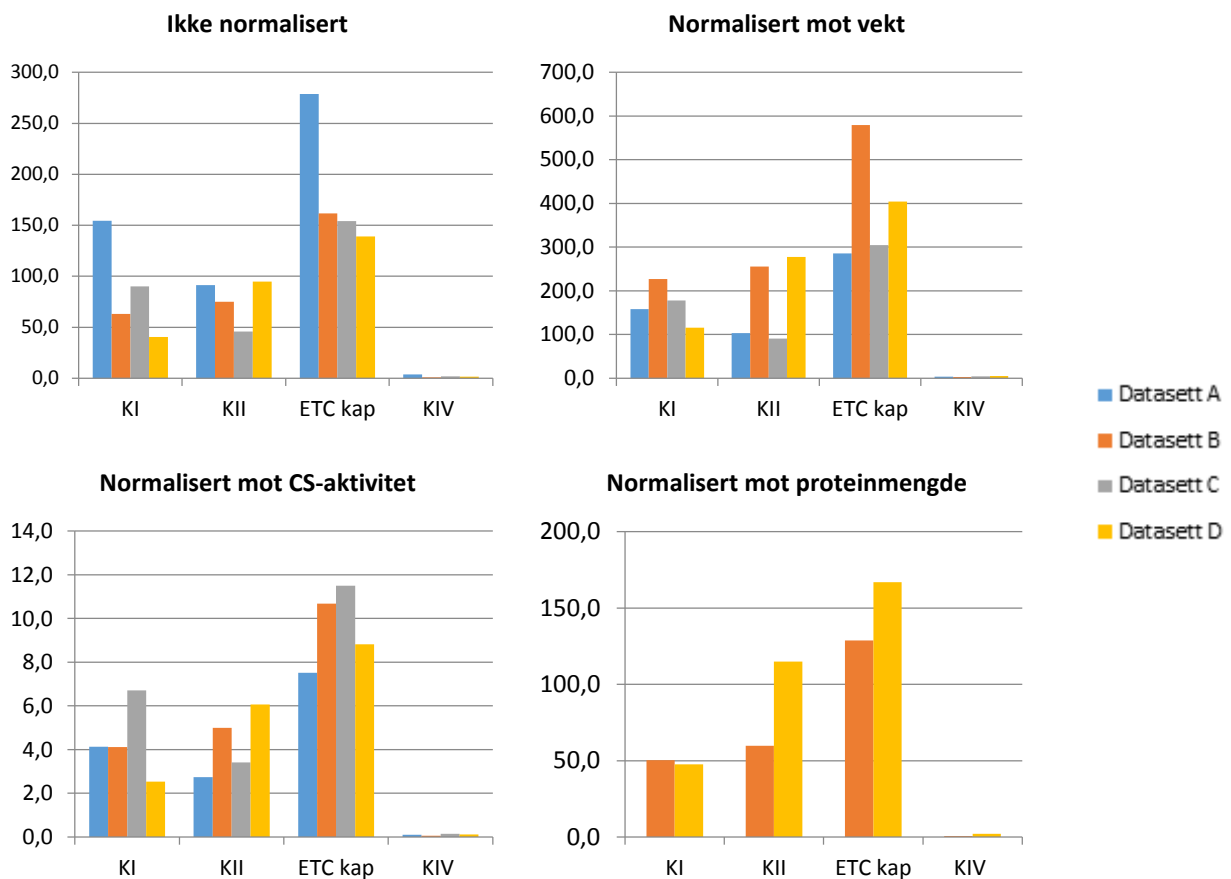
Normaliseringen ga mindre endring på spredningen av dataene enn forventet. Det kan tyde på at spredningen i respirasjonshastighetene innenfor hvert datasett ikke var så stor, slik at mitokondriemengde er rimelig lik fra prøve til prøve. Siden det også alltid vil være en variasjon i en analyse slik som for CS-aktivitet, proteinmengde og vekt, vil ikke nødvendigvis spredningen etter normalisering blir særlig mindre. Til tross for dette kan det se ut som en trend at CS-aktiviteten samler dataene mest.



**Figur 10** Respirasjonshastigheter fra elektronkjedens kapasitet etter tilsatt FCCP er først og fremst justert mot sin egen gjennomsnittsverdi og ikke normalisert mot noen annen parameter (blå markør). De oransje, gule og grå markørene indikerer samme respirasjonshastighet, men normalisert mot henholdsvis CS-aktivitet, vekt og proteinmengde.

## Sammenligning av normaliserte respirasjonshastigheter mellom datasettene

Ikke sjeldent er det nyttig å gjøre en sammenligning av ulike datasett. Normalisering vil kunne være en fordel da homogeniseringsprosedyren og materialet kan ha endret seg noe og dermed kan mengden mitokondrier tilsatt i kammeret være endret. De absolutte verdiene for respirasjonshastighet kan da ikke direkte sammenlignes, og vi gjorde derfor en sammenstilling av respirasjonshastighetene i våre datasett i forhold til hverandre. Figur 11 viser de ulike respirasjonshastighetene etter normalisering mot vekt, CS-aktivitet og proteinmengde.



**Figur 11** De ulike respirasjonshastighetene fra hvert datasett sammenlignet med hverandre etter normalisering mot vevsvekt, CS-aktivitet og proteinmengde. *KI*, *KII*, *ETC kap* og *KIV* representerer respirasjonshastighetene for henholdsvis kompleks I-substrater, kompleks II-substrater, elektronkjedekapasitet, og når alle kompleks bortsett fra kompleks IV er hemmet.

De ikke normaliserte verdiene viser at den absolutte respirasjonshastigheten var høyest i datasett A. Dette var som forventet da konsentrasjonen av vev i kammeret var høyest i dette datasettet.

Deretter er respirasjonshastighetene normalisert mot vekt og endring i datasettene forventes. Forholdet mellom datasettene endres derimot også når man sammenligner normalisering mot vekt og mot CS-aktivitet. Det er i all hovedsak datasett C som endrer seg. Dette kan komme av at prøvene fra datasett C (som er rotter i motsetning til mus i de andre datasettene) har en lavere mitokondriell tetthet. Slik at når man kun normaliserer mot vekt, fremstår respirasjonen i denne gruppen som lav. Når man derimot normaliserer mot CS-aktivitet og tar hensyn til mitokondriell tetthet vil man se at

respirasjonen blir bedre for denne gruppen. En lav mitokondrietetthet vil altså gi en dårlig respirasjon per vevsvekt, men en bedre respirasjon per mitokondrie og CS-aktivitet.

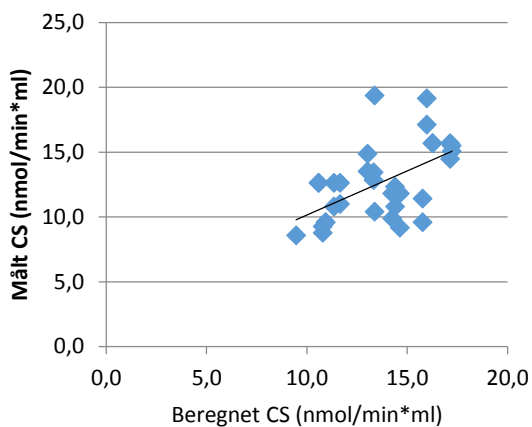
I litteraturen kan man finne at rotter har en lavere mitokondriell tetthet i hjertemuskulatur enn hva mus har (9; 10). Det er forklart ved at jo mindre dyr er, jo høyere hjertefrekvens har dyrene. Som følge av høyere hjertefrekvens, vil også energiforbruket øke i hjertet. Små dyr har i tillegg en høyere basalmetabolisme enn større dyr (11). For å dekke det økte energiforbruket, vil kardiomyocytene hos små dyr ha en høyere mitokondriell tetthet. Og dette kan være med på å forklare hvorfor vi så endring i forholdet mellom datasett C og de andre når vi normaliserer mot vekt og når vi normaliserer mot CS-aktivitet som tar hensyn til mitokondriell tetthet.

### Korrelasjon mellom CS-aktivitet i homogenat og kammer

Et annet spørsmål vi også stilte oss var hvordan CS-aktivitet i homogenatet korrelerer med CS-aktivitet i kamrene. I datasett C tok vi prøver fra homogenatet før det ble tilsatt i kamrene, samt en prøve direkte fra kamrene, og Figur 12 viser korrelasjonen mellom CS-aktivitet i homogenatet mot CS-aktiviteten som er målt i kamrene.

Vi fant en signifikant korrelasjon mellom CS-aktivitet i homogenatet og kamrene. Det kan tyde på at det er mulig å bruke både CS-aktivitet i homogenatet og CS-aktivitet i prøven fra kamrene i videre analyser.

Da det ikke er mye ekstra arbeid å ta en prøve direkte fra kammeret, vil jeg forslå at man like gjerne tar prøven for CS-aktivitet fra kamrene. Dette vil redusere muligheten for feil verdi for CS-aktivitet dersom det er gjort en feil i mengden homogenat som tilsettes kamrene. Det vil videre være en fordel å ta en separat prøve til CS-analyser slik at man slipper å tine og fryse homogenatet mange ganger dersom en ønsker å måle andre parametre fra homogenatet.



**Figur 12** CS-aktivitet i kamrene plottet mot CS-aktivitet i homogenat. Gir en Pearsons korrelasjonskoeffisient på 0,55 som gir en signifikant korrelasjon når signifikansnivå settes på 0,05.



## Begrensninger og betraktninger

En svakhet med denne oppgaven er at vi har brukt data fra flere ulike prosjekt. Noen av dyrene er i utgangspunktet ulike, og dyr fra de ulike prosjektene har gjennomgått ulike intervensjoner som muligens kan påvirke resultatene. Dersom en utelukkende ønsket å undersøke hvordan normaliseringen av data vil arte seg ved bruk av ulike parametre, kunne man tenke seg at det beste ville vært og først og fremst benytte data fra samme gruppe dyr. Vi ville på denne måten unngått usikkerhet i henhold til ulik mitokondriell tetthet i prøvene. I tillegg ville jeg ha tatt ulike vevsmengder fra samme hjerte for og lettere plukke opp sammenhenger.

Det er også viktig å være bevisst på at hjertes vanninnhold kan variere. Dersom et hjerte er mer ødematøst enn et annet, vil en normalisering mot blant annet vekt bli feil da den mitokondrielle tettheten i vevene er ulik. Hjertet som er mest ødematøst vil ha færre mitokondrier per mg vev. En normalisering mot CS-aktivitet vil i så fall være nødvendig for å plukke opp forskjeller i mitokondriell tetthet.

Verdt å merke seg er at noen av settene med hjerter er perfunderede, mens andre ikke er det før det ble laget homogenat. Vi tror at den mitokondrielle respirasjonen muligens kan påvirkes når hjertene perfunderes, og dette kunne også vært interessant og undersøkt videre. Det kan heller ikke utelukkes at det oppstår en del problemer under perfusjonen, slik at noen av hjertene blir mer eller mindre utsatt for ischemi. Dette vil kunne bidra til å øke variasjonen i mitokondriell respirasjon da en eventuell ischemisk periode er vist å føre til initialt økt respirasjon (12). Det er derfor viktig at en er klar over dette og at en tar hensyn til dette dersom en gjør perfusjoner og ønsker å måle mitokondrienes funksjon i dette vevet etterpå.

## Konklusjon

Erfaringen fra dette prosjektet viser at proteinmålinger kun kan gjøres på prøver fra homogenat som ikke fortynnes for mye. Analysekittet som er i bruk ved avdelingen klarer ikke å kvantifisere proteinmengden når den blir for lav. Det betyr også at det ikke kan tas prøver til proteinanalyse direkte fra kamrene da homogenatet der er fortynnet.

Det er ingen klare resultater på at noen av metodene evaluert samler resultatene bedre enn andre. Likevel ser det ut som om det kan være en trend til at CS-aktivitet gir minst spredning.

Selv om vi fant en korrelasjon mellom CS-aktivitet i homogenatet og i kamrene, vil vi i videre forsøk anbefale å ta prøver til CS-analyse direkte fra kamrene i stedet for fra homogenatet. Dermed får vi en mer nøyaktig normalisering av respirasjonen i hvert kammer.

Siden det ikke er noen tydelige tendenser for hvilken metode for normalisering som er best, anbefaler vi å bruke flere ulike metoder. Dersom man bruker flere metoder kan man lettere gå inn i datasettet og plukke ut eventuelle målinger det er grunnlag for og tro er feil grunnet feilkildene tilknyttet de ulike analysene. Videre er det med flere normaliseringsmetoder lettere å vurdere om det er endring i mitokondriell tetthet som gir opphav til forskjeller i respirasjonen mellom ulike prøver. Her vil kanskje kvantifisering av mitokondrielt DNA og genomisk DNA være en velegnet kandidat.

## Referanser

1. **Ferrari R, Censi S, Mastrorilli F et. al.** *Prognostic benefits of heart rate reduction in cardiovascular disease.* 5 (G10-14). Eur Heart J Supp, 2003.
2. **Dedkova EN, Blatter LA.** *Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes.* 52 (48-61). J Mol Cell Cardiol, 2012.
3. **Chance B, Williams GR.** *Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation.* 217 (409-27). J Biol Chem, 1955.
4. Oroboros Instruments. [Internett] [Sisert: 26 05 2015.] [http://www.bioblast.at/index.php/PBI-Shredder\\_HRR-Set](http://www.bioblast.at/index.php/PBI-Shredder_HRR-Set).
5. Oroboros Instruments. [Internett] [Sisert: 26 05 2015.] <http://wiki.orooboros.at/index.php/Oxygraph-2k>.
6. Laboratory Protocol: Citrate Synthase. *Oroboros Instruments.* [Internett] [Sisert: 27 05 2015.] [http://www-.bioblast.at/images/4/40/MiPNet17.04\\_CitrateSynthase.pdf](http://www-.bioblast.at/images/4/40/MiPNet17.04_CitrateSynthase.pdf).
7. BIO-RAD. [Internett] [Sisert: 26 05 2015.] [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9004.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf).
8. **Pham T, Loiselle D, Power A et. al.** *Mitochondrial inefficiencies and anoix ATP hydrolysis capacities in diabetic rat heart.* 307 (C499-C507). Am J Physiol Cell Physiol, 2014.
9. **Barth E, Stämmler G, Speiser B et.al.** *Ultrastructural Quantitation of Mitochondria and Myofilaments in Cardiac Muscle From 10 Different Animal Species Including Man.* 24 (669-681). J Mol Cell Cardiol, 1992.
10. **Schaper J, Meiser E, Stämmler G.** *Ultrastructural Morphometric Analysis og Myocardium from Dogs, Rats, Hamsters, Mice and from Humnan Hearts.* 56 (377-391). Circ Res, 1985.
11. **Speakman JR.** *Body size, energy metabolism and lifespan.* 208 (1717-1730). J Exp Biol, 2005.
12. **Veitch K, Hombroeckx A, Caucheteux D et.al.** *Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain.* 281 (709-715). Biochem J, 1992.

## Vedlegg

### Arbeidsløsninger

Homogenisering og respirasjonsmålinger		
<b>A1</b>	pH 7,4	85,6 g sucrose + 0,186 g Na <sub>2</sub> EDTA + 1,211 g Tris. Fillup to 1 l with a.d.
<b>MiR05</b>		0,190 g EGTA + 0,610 g MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O + 120 ml 0,5 M K-lactobionate + 2,502 g Taurine + 1,361 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 4,77 g HEPES + 37,65 g D-sucrose + 1 g BSA. Fill up to 1 l with a.d.

Proteinbestemmelse	
<b>Reaksjonsmix</b>	Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent #500-0205

Citrat syntasebestemmelse		
<b>Tris-HCl buffer</b>	1,0 M, pH8,1	2,4228 g Tris/20 ml a.d. Adjust to pH 8,1 with 37% HCl.
<b>Tris-HCl buffer</b>	0,1 M, pH 7,0	2 ml Tris-HCl buffer (1,0 M, pH 8,1) + 15 ml a.d. Adjust to pH 7,0 with concentrated HCl and fill up to 20 ml with a.d.
<b>Triethanolamine-HCl buffer + EDTA</b>	0,5 M, pH 8,0	8.06 g triethanolamine/100 ml a.d., adjust pH with 37% HCl ca 1 ml), add 186.1 mg EDTA
<b>Triton X-100</b>	10 %	add 90 ml a.d. to 10 g (ca. 10 ml) Triton X-100
<b>Triethanolamine-HCl buffer</b>	0,1 M, pH 8,0	1 ml of 0.5 M triethanolamine-HCl-buffer of pH 8.0 + 4 ml a.d.
<b>Oxalacetat</b>	10 mM, pH 8,0	6.6 mg oxaloacetate + 5 ml of 0,1 M triethanolamine- HCl-buffer pH 8.0.
<b>DTNB</b>	1,01 mM, pH 8,1	2 mg DTNB + 5 ml of 1M Tris-HCL-buffer pH 8.1. Protected from light.
<b>CS-standard</b>		As standard commercial citrate synthase is used. Dilute with 0,1 M Tris-HCl buffer, pH=7.0. Standard 1: Add 2 ul of CS standard to 998 ul of buffer. Standard 2: Add 100 µl of standard 1 to 300 µl buffer.
<b>Reaksjonsmix</b>		Pr reaction in ml (well()) H <sub>2</sub> O 0,195 OXALACETAT 0,0125 Acetyl CoA 0,00625 Triton x 100 0,00625 DTNB 0,025 (mix just before addition)