

Effekter av NSAIDs på mRNA ekspresjon av ADRP og EP2-reseptorer

Masteroppgave i farmakologi

Janan Ibrahim



Farmakologisk Institutt, Det medisinske fakultet og
Farmasøytisk Institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

Universitet i Oslo, Desember 2011

FORORD

Ved innlevering av denne master-oppgaven avsluttes min 3,5-årige farmasiutdanning på Universitetet i Oslo. Overgangen fra reseptar til provisor var veldig krevende, men også interessant. Først og fremst vil jeg takke Gud for å ha gitt meg styrke og mot til å gjøre ferdig dette studiet, noe jeg vil bruke videre til å hjelpe mine medmennesker gjennom.

Arbeidet med denne oppgaven har foregått i tidsrommet august 2010 til desember 2011 på Farmakologisk institutt ved Rikshospitalet. Det har vært en lang, spennende og krevende prosess. Oppgaven har vært under kontinuerlig veiledning av ekstern veileder professor Dagny Lise Sandnes. Tusen takk Dagny for å ha guidet meg gjennom hele prosessen, både i den praktiske delen og selve utformingen av oppgaven. Dette har vært utrolig moro. Jeg vil også takke min internveileder professor Hege Thoresen, for gjennomgang av oppgaven. Videre vil jeg takke John Ødegård for hjelp med det praktiske arbeidet. Samtidig vil jeg takke resten av forskningsgruppen og hele avdelingen for at jeg har fått være med.

En stor takk rettes til mine foreldre, Faiq Hamod og Sajedah Kahfi og til mine søsken, Haydar og Furat, som har vært interesserte, hjelpsomme og tålmodige gjennom hele studien. Takk for at dere har oppmuntret meg til å velge og fullføre dette studiet. Dere har vært til stor hjelp.

Jeg vil også takke alle mine medstudenter og venner for nydelig studietid, spesielt Behnaz Nekoukar som gjorde studietiden morsom og minnerik.

Bærum, november 2011

Janan Faiq Ibrahim Al-Yasiri

INNHold

FORORD	1
INNHold	2
FORKORTELSER	4
SAMMENDRAG	6
1. INNLEDNING	7
1.1. Kolorektal kreft	7
1.2. Cyklooksygenase	7
1.3. NSAIDs og kreft	8
1.4. Betydningen av COX-2 for kreftutvikling	9
1.5. Cox-uavhengige mekanismer	10
1.6. Peroxisom proliferator-aktivererte reseptorer (PPAR)	11
1.6.1. PPAR subtyper og deres funksjon	11
1.6.2. PPARs rolle i kreft	13
1.6.3. Effekten av NSAIDs på PPAR	14
1.7. Ligander brukt i denne oppgaven	14
1.8. Bakgrunn for oppgaven	16
1.9. Hensikt med oppgaven	16
2. MATERIALER	17
2.1. Kjemikalier	17
2.2. Medium	17
2.3. Primere	18
2.4. Kit til RNA- isolering	18
2.5. Kit til cDNA syntese	19
2.6. Løsninger	19
2.6.1. Løsninger til gelelektroforese	20
2.6.2. Løsninger til OD-måling	21
3. METODER	22
3.1. Dyrking og stimulering av celler	22
3.2. Høsting av celler og RNA- isolering	22
3.3. OD-måling	23
3.4. RNA- Gelelektroforese	23
3.5. cDNA syntese	24

3.5.1. <i>cDNA syntese med SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR</i>	25
3.5.2. <i>cDNA syntese med revers transkriptase (SuperScript III)</i>	26
3.6. Polymerase kjedereaksjon (PCR)	27
3.6.1. <i>Kontroll av primere</i>	28
3.6.2. <i>Kvantitativ RT-PCR</i>	29
3.7. Analyse av data	31
4. RESULTATER	33
4.1. Kontroll av RNA	33
4.2. Test av primere	33
4.3. Tidsavhengig effekt av rosiglitazon på ADRP-uttrykk	35
4.4. Doseavhengig effekt av rosiglitazon på ADRP-uttrykk	36
4.5. Effekt av GW 9662 på rosiglitazon-stimulert ADRP-ekspressjon	37
4.6. Effekt av sulindaksulfid på ADRP-uttrykk	38
4.7. Effekt av GW 9662 på sulindaksulfid-stimulert aktivering av ADRP	39
4.8. Effekt av diklofenak på ADRP-uttrykk i nærvær og fravær av GW 9662	40
4.9. Effekt av naproksen på ADRP-uttrykk i nærvær og fravær av GW 9662	41
4.10. Effekt av indometacin på ADRP-uttrykk i nærvær og fravær av GW 9662	42
4.11. Tidsavhengig effekt av rosiglitazon på ekspressjon av EP2-reseptor mRNA	43
4.12. Effekt av rosiglitazon og sulindaksulfid på EP2-uttrykk	44
5. DISKUSJON	45
5.1. Metodologiske aspekter	45
5.1.1. <i>Kontroll av RNA</i>	45
5.1.2. <i>Test av primere</i>	45
5.1.3. <i>Kontroll av qRT-PCR</i>	46
5.2. Effekt av rosiglitazon på ADRP-uttrykk	47
5.3. Effekt av NSAIDs på ADRP-uttrykk	48
5.4. Effekt av GW9662	49
5.5. Effekt av rosiglitazon på EP2-uttrykk	50
5.6. Effekt av sulindaksulfid på EP2-uttrykk	51
6. KONKLUSJON	52
7. REFERANSER	53

FORKORTELSER

15d-PGJ2	15-Deoksy-Delta-12,14-prostaglandin J2
15-PGDH	15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase
AC	Adenylyl cyklase
ADRP	Adipose differentiation-related protein
ANOVA	Analysis of Variance
AP-1	Aktivator protein-1
APC	Adenomatøs polyposis coli
ATF3	Aktiverende transkripsjonsfaktor 3
cAMP	Adenosin 3', 5' cyclisk monofosfat
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL-X _L	B-cell lymphoma-extra large
COX	Cyklooksxygenase
Ct	Threshold Cycle
DBD	DNA bindende domene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
dsDNA	Dobbeltrådet cDNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGR-1	Tidlig vekstresponsfaktor 1
ESE-1	Epithelial-specific ETS-1
FAP	Familiær adenomatøs polypose
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase
GW9662	2-klor-5-nitro benzanilid
IKK β	I κ B kinase β

JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
LBD	Ligand bindende domene
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MIQE	Minimum Information for Publication of qRT-PCR Experiments
NAG-1	NSAIDs-indusert gen 1
NF- κ B	Nukleær faktor kappaB
NSAID	Ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel
OD	Optisk tetthet
Oligo-DT	Oligo deoxy thymidin
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PG	Prostaglandin
PPAR	Peroksisom-proliferator-aktivert reseptor
PPRE	Peroksisom-proliferator-responsivt element
qRT-PCR	Kvantitativ Real time PCR
RLT	RNeasy Lysis Buffer
RT	Revers transkriptase
RXR	Retinsyrereseptor
RW1	RNeasy Wash Buffer
SEM	Standard error of the mean
Sp-1	Specificity protein 1
ssDNA	Enkeltrådet cDNA
TNF α	Tumor nekrose faktor alfa
TRIS	Tris-hydroksymetylaminometan
TXA2	Tromboksen A2
TZD	Tiazolidindion
VEGF	Vaskulær endotelial vekstfaktor

SAMMENDRAG

Det er økende eksperimentelle og kliniske holdepunkter for at NSAIDs og COX-2-hemmere kan beskytte mot kolorektal kreft. Mens den beskyttende effekten antas å skyldes hemmet prostaglandinsyntese, har det også vært foreslått at NSAIDs kan virke gjennom aktivering av PPAR γ , som er sterkt uttrykt i mange svulster, inkludert kolon. Tidligere studier har gitt holdepunkter for at reduksjon av EP2- eller EP4-stimulert cAMP-produksjon skyldes nedregulering av EP2 og EP4- reseptor ekspresjon, som kan være regulert av PPAR γ . I denne oppgaven er det forsøkt å belyse mulige effekter av NSAIDs på PPAR γ , ved å studere effekten av NSAIDs på ekspresjon av ADRP. Det er også undersøkt hvor egnet antagonisten GW9662 var til å hemme effekten av PPAR γ -agonisten rosiglitazon og NSAIDs. Til slutt er det undersøkt om NSAIDs og rosiglitazon nedregulerer EP2 reseptor mRNA.

HT29 celler ble stimulert med rosiglitazon eller utvalgte NSAIDs. I noen forsøk ble cellene i tillegg forbehandlet med GW9662. Etter RNA-isolering og cDNA syntese ble ADRP- og EP2 mRNA målt ved qRT-PCR. Resultatene viste at stimulering av ADRP-ekspresjon med rosiglitazon er både tids- og dose-avhengig. Det var signifikant forskjell i ekspresjonen etter 6 timers stimulering og ved konsentrasjoner høyere enn 10^{-7} M. I tillegg viste diklofenak, naproksen og sulindaksulfid signifikant stimulerende effekt på ADRP-ekspresjon. Derimot viste verken rosiglitazon eller de utvalgte NSAIDs noen effekt på EP2 mRNA. GW9662 hemmet rosiglitazon-stimulert ADRP-ekspresjon, men ikke effekten av de utvalgte NSAIDs. Resultatene tyder på at NSAIDs øker ADRP-ekspresjon via mekanismer uavhengige av PPAR γ . Nedreguleringen av PGE₂-stimulert cAMP-produksjon via NSAIDs og rosiglitazon, synes ikke å være mediert via nedregulering av EP2 reseptor mRNA.

1. INNLEDNING

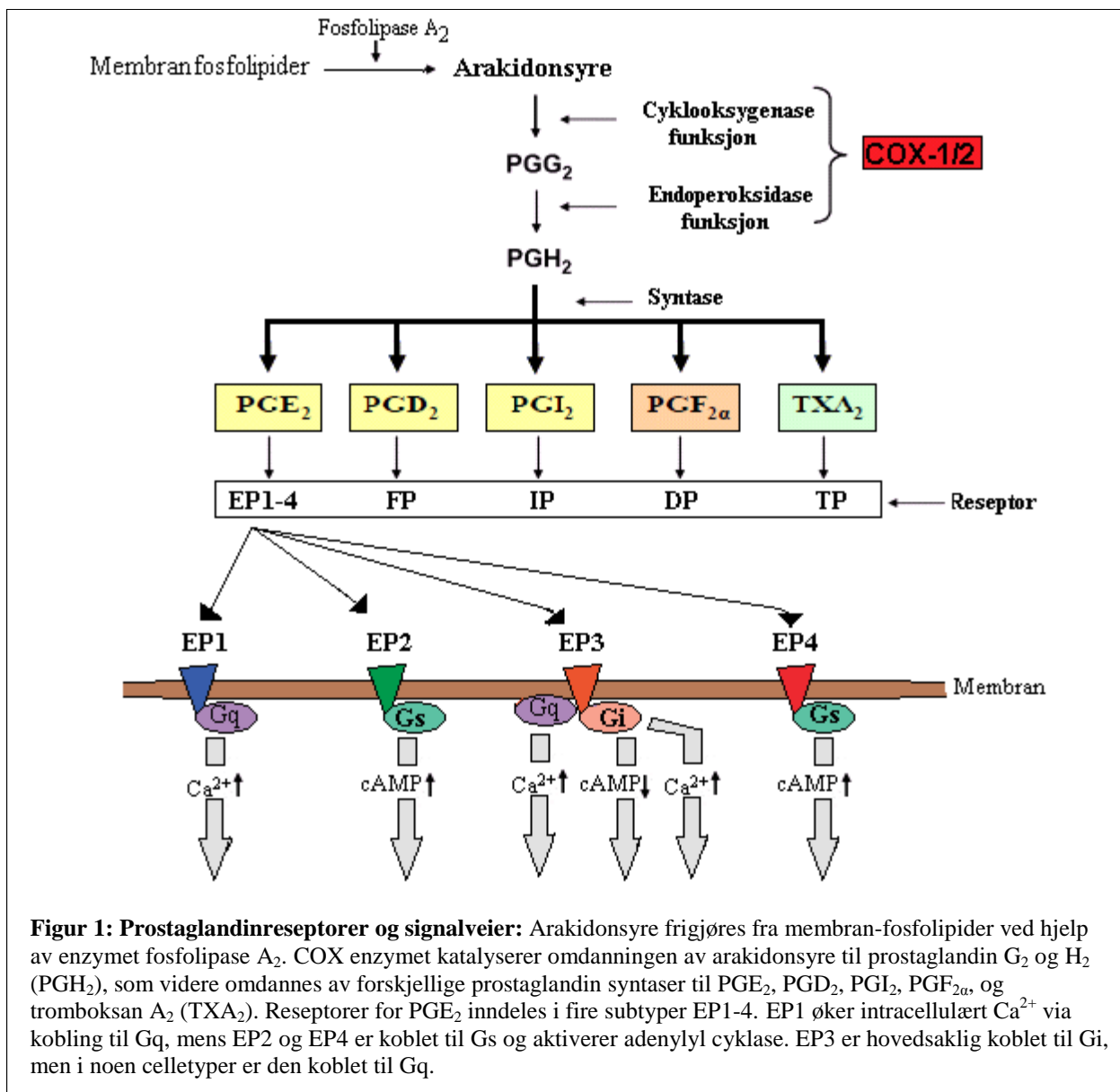
1.1. Kolorektal kreft

Kreft kjennetegnes ved ukontrollert vekst og spredning av celler forårsaket av mutasjoner i DNA. Kolorektal kreft er en kreftsvulst i tykktarmen eller endetarmen og er oftest adenokarsinom (ondartet svulst). Kolorektal kreft er en av de vanligste kreftformene på verdensbasis, og er i Norge den nest hyppigste kreftdiagnose både hos menn (etter prostatakreft) og hos kvinner (etter brystkreft) [1]. Frem til 2020 vil forekomsten øke med om lag 34 % hos begge kjønn. Årsaken til økningen er stort sett ukjent, men livsstil og kosthold er trolig medvirkende [1]. Det er også påvist at langvarig inflammatorisk tarmsykdom er assosiert med utvikling av kolorektal kreft [2].

Oppdages svulsten i tidlig fase er kirurgi den eneste kurative behandlingsmåten, men om lag 25 % av pasientene kan få tilbakefall av sykdommen [3]. For å hindre tilbakefall gis det tilleggsbehandling med cytostatika eller adjuvant kjemoterapi, da dette er vist å øke overlevelse [4].

1.2. Cyklooksygenase

Cyklooksygenaser (COX) er enzymer som katalyserer omdanningen av arakidonsyre til prostaglandin G₂ (PGG₂) og prostaglandin H₂ (PGH₂) (figur 1). PGH₂ omdannes deretter av syntaser til en rekke eikosanoider som inkluderer PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂, og tromboksan (TX) A₂ [5]. To cyklooksygenase isoformer er blitt identifisert, nemlig COX-1 og COX-2. COX-1 er konstitutivt uttrykt i de fleste vev, mens COX-2 induseres blant annet av vekstfaktorer og ved betennelsestilstander [5]. Prostaglandiner er involvert i ulike fysiologiske og patofysiologiske funksjoner, som eggøsning, implantasjon av det befruktete egg og induksjon av fødsel, beinmetabolisme, nervevekst og -utvikling, sårheling i gastrointestinaltraktus, regulering av væske- og elektrolytthomeostase i nyrene, regulering av kardonus og blodplateaggregering og immunreaksjoner [5]. Prostaglandiner virker primært via G-proteinkoblede membranreseptorer, som for PGE₂ inndeles i fire subtyper, EP1-4. EP1 øker den intracellulære Ca²⁺ konsentrasjonen, muligens via kobling til Gq, mens EP2 og EP4 er koblet til Gs og medierer effekten via adenylyl syklase/cAMP signalveien. EP3 reseptoren er hovedsaklig koblet til Gi, men i noen celletyper forsterker den EP2/EP4-indusert cAMP dannelsen via kobling til Gq og aktivering av fosfolipase C [6]. Det er også holdepunkter for at visse prostaglandiner kan virke på kjernereseptorer av typen PPAR (peroksisom-proliferator-aktiverede reseptorer) [7].



1.3. NSAIDs og kreft

Ikke-steroid antiinflammatoriske midler (NSAIDs) er en legemiddelgruppe som virker betennelsesdempende, febernedsettende og smertelindrende ved å hemme cyclooxygenase og dermed prostaglandinsyntesen [8]. Tradisjonelle NSAIDs hemmer både COX-1 og COX-2, men det finnes også selektive COX-2-hemmere på markedet.

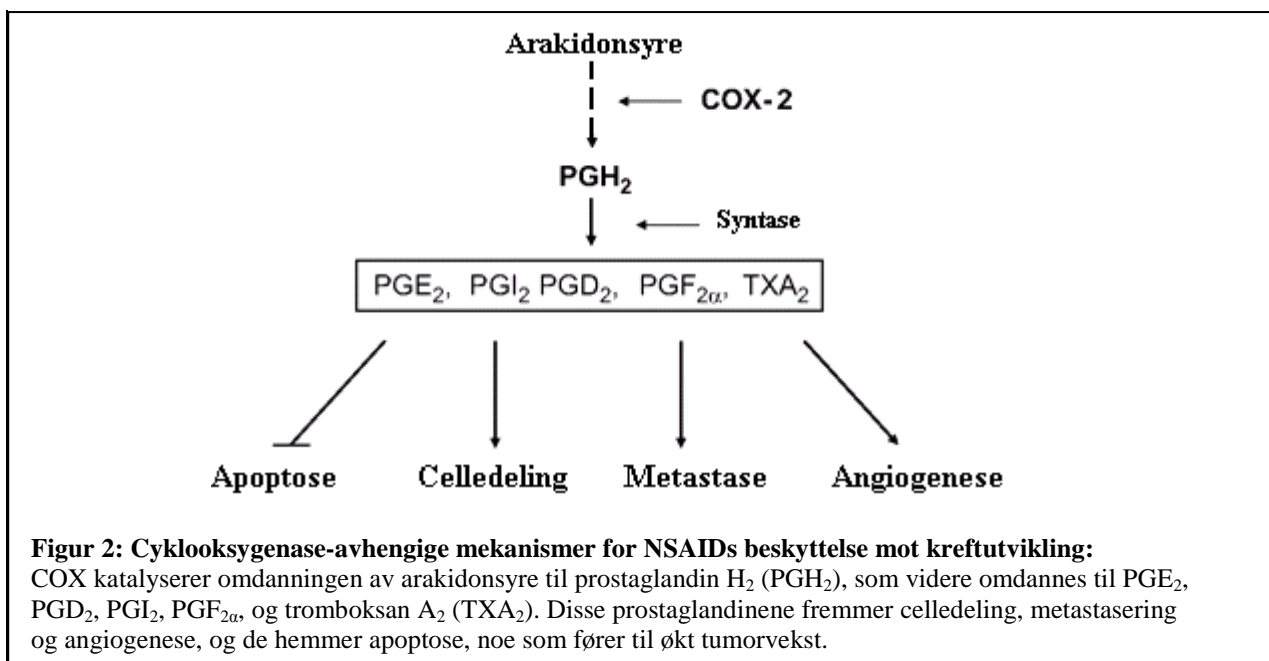
Det er økende eksperimentelle og kliniske holdepunkter for at NSAIDs og COX-2-hemmere kan beskytte mot kreft [9, 10]. Epidemiologiske studier har vist at regelmessig bruk av acetylsalicylsyre (Aspirin) og andre NSAIDs reduserer risikoen for å utvikle kolorektal kreft med 40-50 %, mens risiko for brystkreft, prostatakreft og lungekreft var redusert med ca 25 % [11].

En rekke dyreeksperimentelle studier i ulike modeller har entydig vist at NSAIDs hemmer vekst av kolorektale svulster [10, 12]. De sterkeste holdepunktene for en beskyttende effekt av NSAIDs mot kolorektal kreft kommer fra randomiserte kliniske studier. En randomisert, dobbelt-blindet, placebo-kontrollert klinisk studie i pasienter med familiær adenomatøs polypose (FAP), som har en mutasjon i tumor-suppressor genet APC, viste at behandling med sulindak reduserte både antall og størrelsen av polypper hos pasientene [13]. En studie med den selektive COX-2-hemmeren celecoxib viste en reduksjon i antall og størrelse av kolorektale polypper i FAP-pasienter med 31 % sammenlignet med placebo [14]. Det er også utført randomiserte kliniske studier som viste at celecoxib og COX-2 hemmeren rofecoxib reduserte forekomsten av sporadiske adenomer [15-17].

1.4. Betydningen av COX-2 for kreftutvikling

Det har vært foreslått at NSAIDs evne til å hemme COX-2 er forklaringen på at de beskytter mot kreft. Det er dokumentert at kolorektale svulster i både mennesker og dyr uttrykker høye nivåer av COX-2, mens normal tarmslimhinne har lavt, til ikke målbart COX-2 uttrykk [12, 18].

Flere rapporter har vist at overekspressjon av COX-2 stimulerer celleproliferasjon, migrasjon, invasjon og metastasering og hemmer apoptose [10, 12] (figur 2). COX-2 bidrar også til tumorprogresjon og angiogenese [10, 12].



Det er først og fremst prostaglandin E_2 som formidler COX-2 sin tumorfremmende funksjon ved kolorektal kreft. Flere rapporter har vist signifikant høyere nivå av PGE_2 i slimhinnen ved kolorektal kreft enn i normal tykktarmslimhinne [10, 12]. PGE_2 utøver sine biologiske effekter gjennom binding til EP1-EP4 reseptorene og det er holdepunkter for at EP-reseptorer, uttrykt i fibroblaster og endotelceller, i hvert fall delvis kan mediere de angiogenetiske og tumorfremmende effektene av COX-2 [12]. Stimulering av kreftceller med PGE_2 er vist å føre til en økning i celleproliferasjon og motilitet, en effekt som trolig skyldes aktivering av EP4 reseptorer, mens studier i mus med knockout av ulike EP-reseptorer eller behandling med reseptorspesifikke antagonister har vist at PGE_2 fremmer tumorigenese også ved å aktivere EP1 og EP2 reseptorer. Derimot ser det ut til at EP3 reseptorer heller har en beskyttende effekt [19-21].

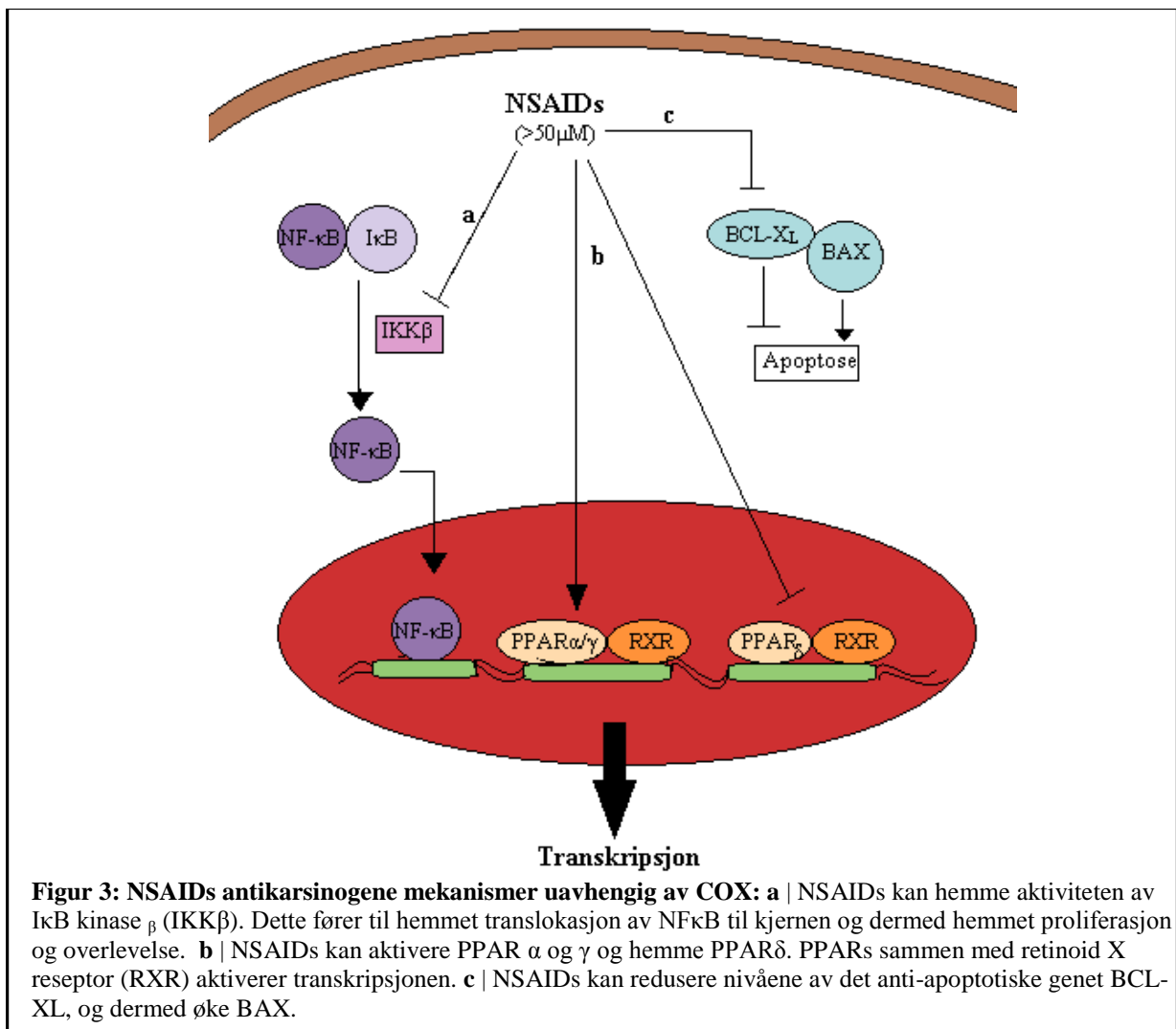
Monocytt og makrofager kan også syntetisere PGE_2 som vil kunne hemme T-celler og cytotoksiske NK-celler, som inngår i immunsystemets overvåking [22]. Prostaglandiner er også involvert i induksjon av angiogenese. PGE_2 induserer ekspresjon av angiogenetiske faktorer, særlig vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) via aktivering av proteinkinase A [23].

1.5. Cox-uavhengige mekanismer

Flere andre studier har vist at NSAIDs kan virke gjennom mekanismer som er uavhengige av deres evne til å hemme COX. De fleste av disse arbeidene har imidlertid vært utført ved relativt høye konsentrasjoner av legemidlene. Cellelinjer fra kolorektal kreft uten påvisbar COX-1 eller COX-2 aktivitet, har vist seg å gjennomgå apoptose i nærvær av høye doser av enten ikke-selektive eller COX-2-selektive hemmere [24].

Flere COX-2 uavhengige mekanismer er blitt foreslått. Noen av dem er omtalt i figur 3. Aspirin og natriumsalisylat er vist å hemme transkripsjonsfaktoren aktivator protein 1 (AP-1) [25] og nukleær transkripsjonsfaktor kappa B (NF- κ B) via hemming av I κ B kinase β [26]. Natriumsalisylat kan også indusere apoptose via aktivering av p38 MAP kinase, i tillegg til å hemme TNF α -indusert aktivering av c-Jun N-terminal kinase (JNK) [27]. Det er også funnet at NSAIDs reduserer nivået av det antiapoptiske genet BCL- X_L i cellelinjer fra kolorektal kreft og dermed økes syntesen av pro-apoptotiske genet BAX og fører til apoptose [28].

Et annet foreslått mål for NSAIDs er kjernereseptorer av typen PPAR. Indometacin, en ikke-selektiv COX-hemmer, har vist evne til å binde seg til og indukere aktiviteten til PPAR isoformene α og γ [29], mens sulindak har vist seg å binde seg til og hemme den DNA-bindende aktiviteten til PPAR δ [10]. I denne oppgaven er betydningen av PPAR undersøkt og derfor er det gitt en nærmere presentasjon av dem.



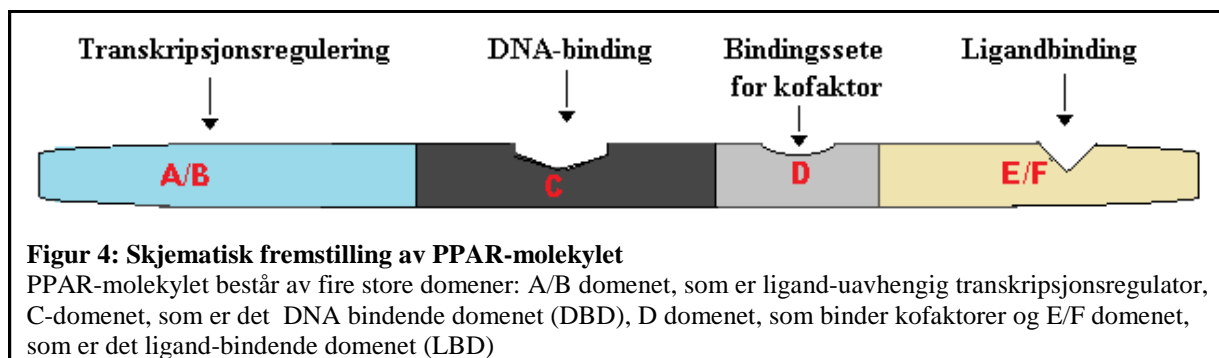
Figur 3: NSAIDs antikarsinogene mekanismer uavhengig av COX: a | NSAIDs kan hemme aktiviteten av I κ B kinase β (IKK β). Dette fører til hemmet translokasjon av NF κ B til kjernen og dermed hemmet proliferasjon og overlevelse. **b** | NSAIDs kan aktivere PPAR α og γ og hemme PPAR δ . PPARs sammen med retinoid X reseptor (RXR) aktiverer transkripsjonen. **c** | NSAIDs kan redusere nivåene av det anti-apoptotiske genet BCL-XL, og dermed øke BAX.

1.6. Peroxisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR)

1.6.1. PPAR subtyper og deres funksjon

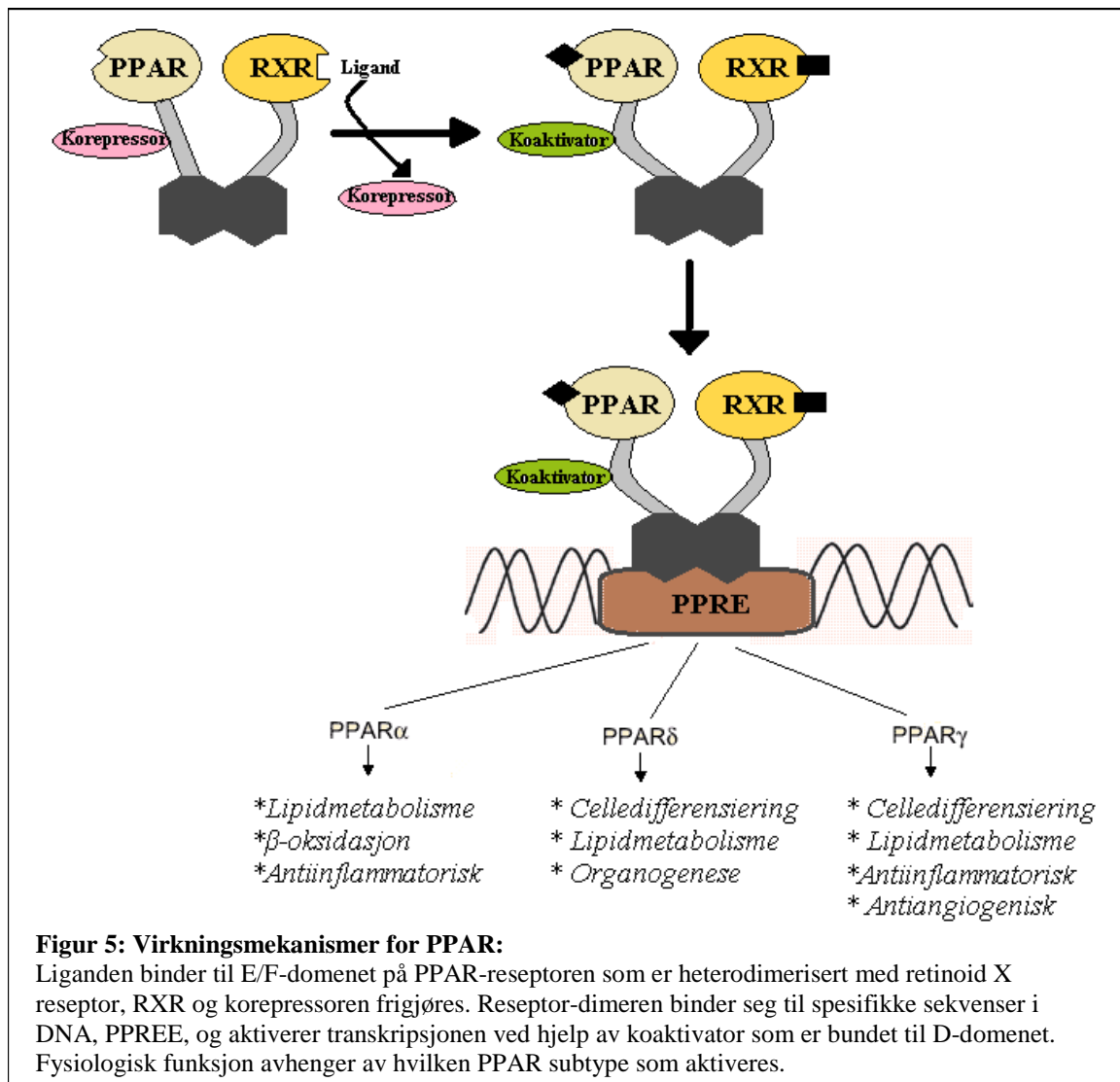
Peroxisom-proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) er ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer som er en del av kjernereseptor-familien, som blant andre omfatter retinsyre-reseptorer, tyroideahormon-reseptorer og steroidhormon-reseptorer [30]. PPAR alfa (α), gamma (γ) og delta (δ) er de tre undergruppene av PPAR-reseptorer som er blitt identifisert i mammalske celler. PPAR α er sterkt uttrykt i lever og brunt fett, og er også funnet i nyre,

hjerne og skjelettmuskulatur. PPAR γ er i hovedsak uttrykt i fettvev, og i mindre grad i tykktarmen. PPAR δ er uttrykket i de fleste vev, med høyest nivå i tarm, nyre, hjerne og hjerne [30]. I likhet med andre kjernereseptorer består de tre PPAR subtypene av fire store domener (figur 4): A/B domenet, som er ligand-uavhengig transkripsjonsregulator, C-domenet, som er det DNA bindende domenet (DBD), D domenet, som binder kofaktorer og E/F domenet, som er det ligand-bindende domenet (LBD) [30].



PPAR-reseptorene er heterodimerisert med reseptoren for 9-cis-retinsyre, RXR. I fravær av ligand er RXR-PPAR dimeren bundet til korepressor-proteiner som hindrer transkripsjonsaktivering. Ved binding av ligand skjer det en konformasjonsendring som fører til at korepressor frigjøres. Dermed vil reseptordimeren kunne binde seg direkte til spesifikke DNA-sekvenser, kalt peroksisom-proliferator responsive elementer (PPRE), og endre transkripsjon av spesifikke gener ved å rekruttere koaktivator-proteiner [30, 31] (figur 5).

Selv om de tre PPAR subtypene er strukturelt svært like, har de forskjellige fysiologiske funksjoner. De binder i ulik grad en rekke fettsyrer, fibrater, eikosanoider og antidiabetiske forbindelser som tiazolidindioner (TZD) [30]. Alle tre reseptorene er involvert i regulering av lipidmetabolisme. PPAR γ har i tillegg vist evne til å modulere kroppens respons på insulin, som er grunnlaget for tiazolidindionenes evne til å senke serum-glukose nivå [32]. PPAR er også involvert i mange sykdommer, som diabetes, fedme, åreforkalkning og betennelse [32]. Flere rapporter har vist at visse PPAR-agonister kan regulere gentranskripsjonen av adipose differentiation-related protein (ADRP). Et responsivt element, PPRE, er påvist på ADRP-genet som dermed kan binde PPAR [33]. ADRP-uttrykket i skjelettmuskulatur er vist å øke ved behandling med PPAR γ -agonister [34]. Det er også påvist at ADRP mRNA-uttrykket øker med PPAR γ aktivering i hepatocytter på en dose- og tidsavhengig måte [35].



1.6.2. PPARs rolle i kreft

PPAR γ er sterkt uttrykt i mange svulster, inkludert bryst, lunge, kolon, prostata, blære og magesekk [36]. I noen tilfeller av kolorektal kreft er det påvist en mutasjon i PPAR γ som fører til tap av funksjon, og det har vært foreslått at PPAR γ kan fungere som en tumorsuppressor for tykktarmskreft [37].

Mange studier i ulike typer tumorceller in vitro og in vivo har vist at PPAR γ -agonister kan ha en antineoplastisk effekt, med hemming av proliferasjon og angiogenese og stimulering av apoptose [30, 38]. Det er observert at PPAR γ -agonister hemmer vekst og induserer syntese av differensierings-markører i humane cellelinjer fra kolorektal kreft [39]. PPAR γ -agonister, som 15d-PGJ₂ og ciglitazon, har også vist seg å være potente hemmere av angiogenese, en prosess som er nødvendig for tumorvekst og metastase [40]. I tillegg har andre studier vist at PPAR γ -

agonister kan redusere PGE₂ produksjon og hemme uttrykket av EP₂ reseptorer og dermed hemme effekten av endogent eller eksogent tilført PGE₂ [41, 42].

PPAR δ er også vist å være oppregulert i kolorektal kreft. Gupta et al. viste at direkte aktivisering av PPAR δ -reseptorene in vivo i APC^{min} mus (en modell for FAP) ga en fem ganger økning i antall polypper og foreslo at polyppvekst påvirkes av PPAR δ -aktivisering [43]. I samme musemodell viste Wang et al. at eksogent tilført PGE₂ resulterte i økt forekomst av adenomer. Ved knockdown av PPAR δ ble effekten av PGE₂ borte. Videre fant forfatterne at PGE₂ indirekte aktiverte PPAR δ via fosforylering [44].

Samlet sett tyder studiene på at PPAR δ kan fremme celleproliferasjon, mens PPAR γ kan hemme cellevekst og indusere apoptose [30]. Under normale forhold vil PPAR δ og γ konkurrere om å heterodimerisere med RXR. I kreftceller kan denne balansen bli forskjøvet, og resultere i økt aktivitet av PPAR δ [30]. Hvis dette er riktig kan PPAR δ -antagonister eller PPAR γ -agonister brukes til forebygging eller behandling av kreft.

1.6.3. Effekten av NSAIDs på PPAR

Visse ikke-steroidale antiinflammatoriske legemidler som indometacin, ibuprofen, flufenaminsyre og fenoprofen er rapportert å være ligander for PPAR [38]. Ibuprofen, indometacin og piroksikam har vist seg å binde og aktivere både PPAR α og γ i makrofager [29]. I tillegg har Jaradat et al. vist en dose-avhengig aktivisering av PPAR γ med indometacin, S-naproxen, S-ibuprofen og R-ibuprofen i CV-1 celler [45]. Yamazaki et al. viste PPAR γ -aktivisering med indometacin, diklofenak og andre NSAIDs i synoviale-celler som var assosiert med en antiproliferativ og pro-apoptotisk respons [46]. Også i kolorektale celler hadde ikke-selektive NSAIDs som indometacin, ibuprofen, diklofenak, acetylsalisylsyre, og sulindaksulfid evnen til å binde seg til og aktivere PPAR γ . Derimot viste COX-2-spesifikke hemmere og en COX-1-spesifikk hemmer liten eller ingen binding til PPAR γ [47]. Eksperimenter har også vist at indometacin og ibuprofen stimulerer transkripsjon av ADRP-genet i tillegg til å øke nivået av ADRP mRNA i adipocytter [48].

1.7. Ligander brukt i denne oppgaven

Rosiglitazon

Rosiglitazon er en selektiv PPAR γ -agonist og tilhører legemiddelklassen tiazolidindioner (TZD), også kalt glitazoner. Den brukes i behandling av type 2 diabetes og senker

blodsukkeret ved å redusere insulinresistensen i fett-, muskel- og leverceller. I tillegg til effekter på glukose-homeostase, har TZD også anti-inflammatoriske egenskaper [8].

GW9662

GW9662 (2-klor-5-nitrobenzanilid) er en potent, selektiv og irreversibel hemmer av PPAR γ . GW9662 bindes også irreversibelt til PPAR α og PPAR δ , men med betydelig lavere affinitet og ved konsentrasjoner høyere enn det som kreves for hemming av PPAR γ [49].

Sulindaksulfid

Sulindak er et NSAID som kjemisk sett er et eddiksyrederivat og metaboliseres i leveren til den aktive substans sulindaksulfid [8]. Sulindak er vist å redusere dannelsen av cyklooksigenase-metabolitter, spesielt prostaglandin E₂, i tykktarmslimhinne og svulster, og å undertrykke utvikling av tykktarmskreft i forsøksdyr [50]. Sulindaksulfid har også vist en antiproliferativ effekt i HT-29 celler ved å hemme cellesyklus og inducere apoptotisk celledød [51]. Det er vist i flere studier at sulindaksulfid fungerer både som PPAR γ -agonist og PPAR δ -antagonist [52].

Diklofenak

Diklofenak er et fenyleddiksyrederivat NSAID som er svakt COX-2-selektivt [8].
Diklofenak har vist antiproliferativ effekt i humane cellelinjer fra kolorektal kreft [53].
Adamson og medarbeidere har vist at diklofenak har 50 ganger større affinitet for PPAR γ enn tidligere rapportert for andre NSAIDs og er en partiell agonist som kan hemme effekten av PPAR γ -agonister [54].

Naproksen

Naproksen er et NSAID som kjemisk sett er et propionsyrederivat. Det er en sterkere COX-1 hemmer enn mange andre NSAIDs [8] og er i tillegg en konsentrasjons-avhengig, selektiv aktivator av både PPAR α og PPAR γ isoformene [45]. Naproksen har vist en sterkere antiproliferative effekt i humane cellelinjer fra kolorektal kreft enn indometacin og ibuprofen [45].

Indometacin

Indometacin er et NSAID tilhørende gruppen av indol-eddiksyrederivater [8]. Indometacin har også en antiproliferativ effekt i humane cellelinjer fra kolorektal kreft [53]. Det kan også

binde og aktivere både PPAR α og PPAR γ . Lehmann viste i sin dose-respons analyse at indometacin aktiverer PPAR γ ved en konsentrasjon på 10^{-5} M og aktiverer PPAR α ved 10^{-4} M [29].

1.8. Bakgrunn for oppgaven

I tidligere master-oppgaver er effekten av rosiglitazon og NSAIDs studert med hensyn på aktivering av PPAR i luciferase-assays [55, 56], og PGE₂-stimulert cAMP-produksjon [55, 57]. Disse oppgavene ga holdepunktene for at EP2- eller EP4-stimulert cAMP-produksjon var redusert etter forbehandling av cellene med rosiglitazon og noen NSAIDs (HT29: EP2, HTC116: EP4). Publiserte data har også gitt holdepunkter for at både EP2 og EP4- reseptor ekspresjon kan være regulert av PPAR γ . Således viste Han & Roman at PPAR γ -ligander hemmer vekst av humane lungekarsinomceller ved å redusere uttrykket av EP2 reseptorer gjennom Erk signalering og PPAR γ -avhengige og -uavhengige veier [42]. Fujino og medarbeidere viste at indometacin reduserer PGE₂-stimulert cAMP produksjon ved å nedregulere EP2-reseptor mRNA-uttrykk i cellelinjer fra kolorektal kreft, en effekt som forfatterne tror kan være mediert via PPAR γ -aktivering, selv om det ikke ble direkte undersøkt [58]. Derimot fant Kambe og medarbeidere at uttrykket av EP4 undertrykkes av troglitazon og en del COX hemmere, på grunn av deres evne til å inducere fosforylering og dermed inaktivering av transkripsjonsfaktoren Sp-1 (specificity protein 1) som regulerer EP4 uttrykket [59]. I et senere arbeid fant de samme forfatterne at sulindaksulfid nedregulerer EP4 reseptor ekspresjon via en serie av signaler, som i tillegg til fosforylering og inaktivering av Sp-1 omfatter aktivering av ESE-1/EGR-1 signalveien og økning av de antitumorogene proteinene NAG-1 (NSAIDs aktivert gen 1) og ATF3 (aktiverende transkripsjonsfaktor 3) [60].

1.9. Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å forsøke å belyse mulige effekter av NSAIDs på PPAR γ . Dette ville gjøres ved å studere effekten av NSAIDs på ekspresjon av ADRP, et PPAR-regulert gen. Fordi antagonist GW9662 i tidligere forsøk ikke hadde vist klar effekt, var det også ønsket å undersøke hvor egnet GW9662 var til å hemme effekten av PPAR γ -agonisten rosiglitazon og NSAIDs. Deretter skulle det undersøkes om NSAIDs og rosiglitazon nedregulerer EP2 reseptor mRNA, og om denne effekten kunne hemmes av GW9662.

2. MATERIALER

2.1. Kjemikalier

- Dimetylsulfoksid (DMSO), merkaptoetanol, naproksennatrium og sulindaksulfid fra **Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA)**
- Rosiglitazon, diklofenaknatrium og GW9662 (2-klor-5-nitrobenzanilid) fra **Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)**
- Indometacin: Confortid® pulver til injeksjonsvæske ble innkjøpt på Rikshospitalets apotek og løst i den medfølgende ampulle med Aqua ad iniectabilia. Indometacin foreligger som natriumsalt i oppløsningen.
- SeaKem® LE Agarose og Nusieve® 3:1 Agarose fra **Lonza (Rockland, ME, USA)**
- Absolutt alkohol Prima, **Arcus produkter AS (Rodelokka, Oslo, Norge)**
- Nukleasefritt vann fra **Ambion (Austin, USA)**
- GelRed 10000x fra **Biotium (Hayward, CA, USA)**
- RN^{easy} Mini Kit (250) og RNase-Free DNase Set (50) fra **QIAGEN (Austin, Texas, USA)**
- SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, SuperScript® III Reverse Transcriptase, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX, Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG w/ROX, og 100 bp ladder fra **Invitrogen (Foster City, California, USA)**
- Thermo Scientific Solaris qPCR Gene Expression Assays fra **Thermo Scientific (Epsom, Surrey, UK)**
- Trypsin-EDTA (170 000 enheter trypsin/l, 200 mg/l EDTA) og L-glutamin (200 millimolar (fra **LONZA LTD (Sveits)**
- Tris-hydroksymetylaminometan (TRIS) fra **Calbiochem (San Diego, CA, USA)**
- Formamid fra **Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits.**

2.2. Medium

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) med 1 g/l glukose, uten glutamin fra **Lonza (Verviers, Belgia)**
- Pen-Strep (10 000 enheter/ml penicillin og 10 000 enheter/ml streptomycin) og hesteserum fra **Invitrogen Auckland (Grand Island, NY, USA)**

2.3. Primere

Primere til kvantitativ PCR-bestemmelse av EP2 mRNA og ADRP mRNA ble designet med programmet Pearl Primer og bestilt fra InVitrogen. Primere til bestemmelse av GAPDH og TaqMan probe var designet med programmet Primer Express. Det ble også kjøpt ferdig-designede EP2 primere sammen med MGB-probe fra Thermo Scientific som en del av PCR-kitet.

- EP2 egen-designet(forward): 5'-GTGTCATTCTCAACCTCATCC-3'
 - EP2 egen-designet (reverse): 5'-AAATCGTGAAAGGCAAGGAG-3'
 - EP2 (forward): 5'-GAGACTAATGCGTTCAGTCC-3'
 - EP2 (reverse): 5'-CAGCCTGTTTACTGGCA-3'
 - MGB-probe: 5'-GTTCTACACAGTCAGATGCC-3'
- } Thermo Scientific
- ADRP (forward): 5'-AGTCCGTCGATTTCTTTCTC-3'
 - ADRP (reverse): 5'-CTCTAGCTTCTGGATGATGG-3'
 - GAPDH (forward): 5'-CCAAGGTCATCCATGACAACCTT-3'
 - GAPDH (reverse): 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTT-3'
 - TaqMan Probe: 5'-CTCATGACCACAGTCCATGCCATCACT-3'

2.4. Kit til RNA- isolering

<i>RN'easy Mini Kit (250)</i>	
RN'easy Mini Spin Columns	250 stk
Collection Tubes	250 stk
Buffer RLT * Inneholder guanidine thiocyanate	220 mL
Buffer RW1	220 mL
Buffer RPE (konsentrert) * Må fortynnes med etanol (96–100 %)	55 mL
RNase-Free Water	50 mL

2.5. Kit til cDNA syntese

<i>SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR</i>	
RT Enzyme Mix * Inkludert SuperScript™ III RT og RNaseOUT™	500 µL
2X RT Reaction Mix * Inkludert oligo(dT) ₂₀ (2.5 µM), random hexamers (2.5 ng/µl), 10 mM MgCl ₂ , og dNTPs	2 × 1.25 mL
E. coli RNase H	250 µL

<i>SuperScript® III Reverse Transcriptase</i>	
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	50 µL
5X First-Strand Buffer * [250 mM Tris-HCl (pH 8.3 ved romtemperatur), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂]	1000 µL
0,1 M DTT	500 µL

2.6. Løsninger

Rosiglitazon stock-løsning ble laget i 96 % etanol og frosset ved -20°C i alikvoter på 25 µl. Ved bruk ble etanolen fjernet under en strøm av nitrogen-gass, og rosiglitazon ble løst i 1250 µl medium, til 1×10^{-4} M. Ønsket volum av 10^{-4} M rosiglitazon ble fortynnet i medium til 10 µM.

Sulindaksulfid stock-løsning med konsentrasjon 5×10^{-2} M ble laget i DMSO og frosset ved -20°C i alikvoter på 10 µl. Ved bruk ble 10 µl blandet med 990 µl medium til 5×10^{-4} M. Seks hundre µl av denne ble blandet med 29,4 ml medium, slik at endelig konsentrasjon ble 10 µM. Endelig konsentrasjon av DMSO ble dermed 0,02 %. Samme konsentrasjon av DMSO ble tilsatt kontrollmediet.

Diklofenaknatrium stock-løsning i en konsentrasjon på 1×10^{-1} M ble også laget i DMSO og frosset ned i alikvoter på 5 μ l. Ved bruk ble denne fortynnet med 995 μ l medium, til 5×10^{-4} M. For å få en endelig konsentrasjon på 100 μ M, ble 6 ml 5×10^{-4} M fortynnet med 24 ml medium. Endelig konsentrasjon av DMSO ble dermed 0,1 %, og kontrollmedium ble tilsatt samme konsentrasjon DMSO.

Naproxennatrium stock-løsning var 10^{-2} M i 0,9 % natriumklorid. Denne ble fortynnet videre i medium til endelig konsentrasjon 100 μ M.

Indometacin stock-løsning var $1,4 \times 10^{-2}$ M i aqua ad iniectabilia. Denne ble fortynnet videre med medium til endelig konsentrasjon 30 μ M.

GW9662 stock-løsning var 5×10^{-2} M i DMSO. Ti μ l av denne ble fortynnet med 240 μ l DMSO og 250 μ l 0,9 % natriumklorid til 10^{-3} M. Førti μ l av denne ble tilsatt til 4 ml medium, slik at endelig konsentrasjon ble 10 μ M. Kontrollprøver ble tilsatt DMSO til endelig konsentrasjon 0,5 %.

2.6.1. Løsninger til gelelektroforese

RNA loadingbuffer: 50 % glycerol, 1 millimolar EDTA (pH 8,0), 0,25 % bromfenolblått, 0,25 % xylen cyanol FF

DNA loadingbuffer (6X): 15 % Ficoll 400 med orange G.

50xTAE – buffer, pH = 8.0	
Tris Base	242 g
Iseddik	57,1 mL
0,5 M EDTA (pH = 8.0)	100 mL
H ₂ O	Ad 1000 mL

1xTAE – buffer	
0,04 M Tris/acetat	} 50xTAE – buffer fortynnes 1:50
0,001 M EDTA	
50xTAE – buffer	40 mL
H ₂ O	Ad 2000 mL

<i>Agarosegel</i>	1 %	2 %
Agarosepulver	1,5 g	3,0 g
1xTAE – buffer	150 mL	
GelRed 10000x	15 µL	

2.6.2. Løsning til OD-måling

<i>TE-buffer (10 mM), pH = 7,4</i>	
1 M Tris-Cl (pH = 7,5)	10 mL
500 mM EDTA (pH = 8,0)	2 mL
H ₂ O	Ad 1000 mL

3. METODER

Felles for alle metodene var bruk av sterile/ autoklaverte rør og løsninger, hvor det var mulig, og bruk av hansker for å minimere risiko for nukleasekontaminasjon.

3.1. Dyrking og stimulering av celler

Cellelinjen benyttet i denne oppgaven var hovedsaklig HT-29 celler, isolert fra en pasient med adenokarsinom i tykktarmen. Under testing av primere ble det også benyttet en annen cellelinje fra kolorektal kreft, HCT116. Cellene ble innkjøpt fra ATCC, Manassas, VA, USA. Cellene ble dyrket i Dulbecco's Modified Eagle's Medium tilsatt penicillin, streptomycin, 2 mM glutamin og 10 % hesteserum ved 37°C i en CO₂-inkubator. Alt celledarbeid foregikk i en vertikal LAF-benk. Til de enkelte forsøkene ble cellene sådd ut med en tetthet på 50000 celler/cm² i 20 cm² Corning-skåler. De ble dyrket over natten, deretter ble mediet fjernet, cellene ble skylt 2 ganger med 0,9 % NaCl, og serumfritt medium ble tilsatt. Etter et døgn ble mediet fjernet igjen og nytt serumfritt medium ble tilsatt sammen med de enkelte ligandene (rosiglitazon eller NSAIDs). Cellene ble så dyrket i varierende tid og konsentrasjon, som angitt i resultater og de enkelte figurtekstene, før de ble høstet til RNA-isolering. I forsøk der cellene ble forbehandlet med GW9662, ble DMSO (kontroller) eller GW9662 tilsatt direkte i skålen en time før bytte av medium. Samtidig med tilsetning av medium med rosiglitazon eller NSAIDs ble så GW9662 eller DMSO tilsatt på nytt.

3.2. Høsting av celler og RNA- isolering

Alt foregikk ved romtemperatur. Mediet ble fjernet og cellene ble skylt med sterilt 0,9 % NaCl. Deretter ble det tilsatt 350 µl lysisbuffer (RLT buffer, Qiagen, tilsatt 10 µl merkaptoetanol per ml). Cellene ble skrapet med en cell-lifter og lysatet ble overført til RNase-fritt eppendorf-rør. Lysatet måtte deretter passeres minst 3 ganger gjennom en steril kanyle med sprøyte for å homogeniseres. Etter homogeniseringen ble cellelysatet enten frosset ved -80°C eller RNA- isolering ble utført med det samme.

For RNA- isolering er det blitt brukt et RN'easy kit fra Qiagen. Alt foregikk ved romtemperatur, inklusive sentrifugeringstrinnene. Det ble tilsatt 350 µl 70 % etanol til cellelysatet og hele volumet ble blandet godt med pipette for å felle ut RNA og DNA. Innholdet i eppendorf rørene (700 µl) ble deretter overført til RN'easy minikolonne (søyle) plassert i et 2 ml oppsamlingsrør og sentrifugert i 15 sekunder på maks hastighet (13.000 rpm). Da vil RNA være bundet til silicamembranen i kolonnen. Eluatet ble kastet.

I vasketrinnet ble det pipetert 350 μ l buffer RW1 på kolonnen og prøvene ble sentrifugert i 15 sekunder ved 13.000 rpm. Deretter ble det pipetert 80 μ l DNase-miks (10 μ l DNase stamløsning i 70 μ l buffer RDD) på membranen for å fjerne DNA. Dette stod ved romtemperatur i 15 minutter. DNase ble fjernet med en ny vask med 350 μ l buffer RW1. Etter sentrifugering i 15 sekunder ved 13.000 rpm ble eluatet kastet og søylene overført til nye oppsamlingsrør.

Et nytt vasketrinn ble utført med RPE- buffer. 500 μ l av bufferen ble pipetert på kolonnen, prøvene ble sentrifugert i 15 sekunder ved 13.000 rpm og eluatet kastet. Samme mengde RPE- buffer ble pipetert igjen på kolonnen, som denne gangen ble sentrifugert i 2 min på maks hastighet for å tørke silicamembranen.

For å eluere RNA ble søylene overført til nye eppendorf-rør og tilsatt 30-50 μ l RNase-fritt vann på membranen. Dette ble sentrifugert i 1 min på 13.000 rpm. Eppendorf-rør med eluatet ble merket og frosset ved -80 °C for senere bruk.

3.3. OD-måling

Konsentrasjonen av RNA i prøvene ble bestemt ved spektrofotometrisk måling enten i et vanlig spektrofotometer (Ultrospec 2100 pro), eller ved bruk av Nanodrop 2000. Begge instrumentene gir absorbans ved 260 nm (A_{260}), konsentrasjon av RNA i μ g/ μ l og renhet av prøven (260/280 ratio).

Ved bruk av Nanodrop trenger man ingen prøvebearbeidelse. Man bruker en blank prøve bestående av RNase-fritt vann til å nullstille bakgrunn. Deretter tilsetter man bare en dråpe av hver prøve direkte på instrumentet og måler absorbansen.

Ved vanlig spektrofotometri ble 5 μ l av hver prøve blandet med 95 μ l 10 mM TE-buffer i et nytt eppendorf-rør. Blankprøven bestod av 5 μ l RNase-fritt vann og 95 μ l TE-buffer. Innholdet i hvert rør ble blandet med pipette før overføring til en kuvette for absorbansmåling.

3.4. RNA- Gelelektroforese

Kvaliteten av RNA ble kontrollert ved gelelektroforese. Det grunnleggende prinsippet for metoden er at RNA blir separert etter størrelse i en gel ved hjelp av et elektrisk felt. Ved nøytral pH er RNA negativt ladet og vil vandre gjennom gelen fra negativ til positiv pol når

spenning tilføres [61]. Vandringshastigheten avhenger av størrelsen til molekylene som skal atskilles, spenningen over gelen og porestørrelse og konsentrasjon av gelmateriale [62].

Støping av agarosegel

Støpingen skjedde i svalrommet. Først ble støpekaret med brønnkammene i satt opp. 1 % agarosegel ble tilberedt ved å blande SeaKem® LE agarosepulver med 1xTAE-buffer og varme opp i mikrobølgeovn til koking. Oppvarmingen ble gjentatt et par ganger til alt pulveret var løst siden partikler kan påvirke vandringshastigheten. Etter delvis avkjøling ble GelRed 10000x (5 µl per 50 ml) tilsatt. Agaroseløsningen ble helt over i støpekaret. Når gelen stivnet ble kammene tatt ut og gelen overført til elektroforesekaret.

Selve elektroforesen

Gelen ble plassert i elektroforesekaret slik at brønnene var ved negativ pol og karet ble fylt med 1xTAE-buffer. Prøvene ble preparert ved å blande 2 µl formamid med 5 µl RNA (tilsvarende 1 µg RNA fortynnet eventuelt med RNase-fritt vann), for så å bli inkubert ved 65°C i 10 minutter. Prøveløsningene ble avkjølt på is og tilsatt 2 µl RNA loadingbuffer. Hele volumet (9 µl) ble applisert på gelen i hver sine brønner og elektroforesen ble kjørt ved 50 V lenge nok til at RNA-båndene skiller seg og før fargefronten vandrer ut av gelen (ca. 30-60 minutter). Etter elektroforesen ble agarosegelen gjennomlyst med ultrafiolett (UV) lys. Det RNA-bundne GelRed absorberer lyset og det emitteres i det synlige spektrumet. Dermed kan man observere de to separate og intakte 18S og 28S RNA-båndene. Gelen ble fotografert som dokumentasjon på kvaliteten.

3.5. cDNA syntese

mRNA er ikke stabilt og for å kunne kvantiteres må det først omdannes til cDNA. cDNA er en komplementær DNA-kopi syntetisert fra mRNA ved hjelp av enzymet revers transkriptase (RT) [63]. I tillegg til RT trengs alle 4 deoksynukleotidtrifosfater, magnesiumioner og nøytral pH for at syntesen skal foregå [63]. Det ble benyttet to forskjellige kits fra Invitrogen til cDNA-syntesen i denne oppgaven: *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* og *SuperScript® III Reverse Transcriptase*. Begge inneholder enzymet SuperScript® III reverstranskriptase, som skal sikre høyt cDNA utbytte.

SuperMix formuleringen er spesielt egnet for syntese av cDNA til kvantitativ RT-PCR, og ble benyttet når EP2 ekspresjon skulle bestemmes, fordi EP2 mRNA hadde relativt lav

ekspresjon. Denne formuleringen kan brukes til å kvantifisere færre enn 10 kopier av et målgen i qRT-PCR, og skal kunne gi nøyaktig kvantifisering av mRNA fra opp til 1 µg av totalt RNA.

3.5.1. cDNA syntese med SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR

Hele prøvebearbeidelsen foregikk på is og med hansker. Små eppendorf-rør ble merket og tilsatt 20 µl 2xRT reaksjonsmiks (med oligoDT, random hexamers, MgCl₂ og dNTPs), 4 µl enzymsmiks (med revers transkriptase og RNaseOut), et volum tilsvarende 1 µg RNA og RNase-fritt vann opptil 40 µL. Rekkefølgen for tilsetningen var først vann, deretter reaksjonsmiks, RNA og til slutt enzymsmiks.

Det ble laget to standardkurver med 5 konsentrasjoner hver. 3 µl av utvalgte prøver ble blandet og eventuelt fortynnet med RNase-fritt vann til en kjent konsentrasjon. Første standardkurve ble laget ved å pipettere ut varierende volum tilsvarende 0,125 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 1,0 µg og 2,0 µg RNA. Den andre standardkurven ble laget ved å tilsette 1 µg RNA fra blandingen til hvert av 5 rør. Rørene til standardkurvene ble tilsatt samme løsninger som prøvene.

Det ble også kjørt prøver uten revers transkriptase for å utelukke kontaminasjon med genomisk DNA. Her ble det blandet 8 µl 5x First strand buffer, 0,1 M DTT, 1 µg RNA og RNase-fritt vann opptil 40 µl. (Reaksjonsmiksen til SuperScript III Reverse Transcriptase ble her benyttet, fordi kittet til SuperMix ikke hadde ekstra reaksjonsmiks til å kjøre prøver uten revers transkriptase).

Prøvene ble inkubert i PCR maskin med følgende innstillinger:

Temperatur / °C	Tid i minutter
25	10
50	30
85	5
4	End

Deretter ble det tilsatt 2 µl E. Coli RNase H til hvert rør (ikke de uten revers transkriptase), blandet, sentrifugert og inkubert ved 37 °C i 20 min og deretter avkjølt til 4 °C. Behandlingen

med RNaseH fører til at eventuelt RNA som ikke er omdannet til cDNA kuttet til små biter, som dermed ikke påvirker PCR- reaksjonen senere.

Etter cDNA syntesen ble alle prøvene og standardkurve 1 fortynnet med 80 µl RNase- fritt vann. Dette ble kalt fortynning A. Standardkurve 2 ble fortynnet etter at alle fem rørene var blandet i 1 stort rør og 5 nye små rør merket på nytt og følgende standardkurve laget (dette tilsvarer fortynning A):

Std.kurve	cDNA	Mix*	RNase- fritt Vann
0,125 µg	5 µl	35 µl	80 µl
0,25 µg	10 µl	30 µl	80 µl
0,5 µg	20 µl	20 µl	80 µl
1,0 µg	40 µl		80 µl
2,0 µg	80 µl		40 µl

*MIX: 20 µl 5xFirst strand buffer + 10 µl DTT + 70 µl vann.

Etter blanding og sentrifugering ble alle prøvene (unntatt prøver kjørt uten revers transkriptase) og begge standarkurvene fortynnet i nye rør ved å blande 5 µl fra fortynning A med 300 µl RNase- fritt vann. Resten av de ufortynnede prøvene, i likhet med fortynning A og B ble frosset ved -20°C for senere bruk.

3.5.2. cDNA syntese med revers transkriptase (SuperScript III)

Med denne metoden ble det først tilsatt 1 µl dNTP mix 10 mM, 1 µl Oligo dT, et volum tilsvarende 2,5 µg RNA og RNase-fritt vann til 13 µl totalt volum til hvert av eppendorf-rørene. Her ble det også laget to standardkurver. RNA-mengden i standardkurve 1 var 0,25 µg, 0,5 µg, 1,0 µg, 2,5 µg og 5 µg. For standardkurve 2 ble det tilsatt 2,5 µg RNA fra blandingen til hvert av 5 rør. Prøvene ble inkubert i PCR-maskin ved 65°C i 5 minutter og deretter avkjølt på is og sentrifugert før tilsetning av reaksjonsmiksen.

Reaksjonsmiksen for prøvene og standardkurvene ble laget ved å blande 4 µl 5x First strand buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT og 1 µl SuperScript III per prøve. For prøver uten revers transkriptase ble SuperScript III og RNaseOUT erstattet med RNase- fritt vann. 7 µl

av disse reaksjonsmiksene ble tilsatt til hvert rør og blandet ved å pipettere opp og ned. Alle prøverørene ble inkubert i PCR- maskin med følgende innstillinger:

Temperatur / °C	Tid i minutter
25	5
50	60
70	15
4	End

Prøvene ble også fortynnet på samme måte, men fortynning A ble laget ved å fortynne alle prøvene og standardkurve 1 med 40 µl RNase- fritt vann. Fortynning A for standardkurve 2 ble laget på følgende måte:

Std.kurve	cDNA	RNase- fritt Vann
0,25 µg	10 µl*	50 µl
0,5 µg	20 µl*	40 µl
1,0 µg	8 µl	52 µl
2,0 µg	20 µl	40 µl
5,0 µg	30 µl	15 µl

*Fortynning: 10 µl av cDNA blanding til 40 µl RNase- fritt vann.

3.6. Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Polymerase kjedereaksjon (engelsk Polymerase chain reaction) er en in vitro metode for enzymatisk amplifisering og kvantitering av spesifikke DNA-sekvenser. Reaksjonen bruker to oligonukleotid primere (forward og revers), samt de fire deoksynukleotidene, DNA polymerase og magnesiumklorid [64].

PCR reaksjonen foregår i tre trinn som repeteres mange ganger. Disse syklusene gir eksponensiell opphopning av de bestemte DNA-fragmentene ved at antallet DNA kopier dobles for hver syklus [64]:

- Første trinn er denaturering av dsDNA (dobbeltrådet) templat der enkeltrådene skiller lag ved oppvarming til ca. 94-98°C .

- Primer annealing skjer ved at man senker temperaturen slik at primerne kan hybridisere til den komplementære sekvensen på templat-ssDNA (enkeltrådet).
- Elongering av ny komplementær DNA. Temperaturen økes til ca 72°C og den varmestabile DNA polymerasen vil utvide og syntetisere den andre tråden ut fra primerne med templat-DNA som mal. Derved har man fått to nye like DNA tråder fra den ene man startet fra. Så starter en ny syklus ved at reaksjonen varmes opp igjen slik at DNA deles til enkeltråder og det hele gjentas.

3.6.1. Kontroll av primere

Kvalitativ PCR er kjørt først og fremst for å påvise tilstedeværelse av prostaglandinreseptorene EP2 og EP4, samt ADRP. Alt foregikk på is. 1 µl sense og 1µl antisense primere ble pipettert per rør. Det ble laget en reaksjonsblanding som skulle inneholde følgende per prøve:

10 X PCR-buffer	5 µl
25 milliM MgCl ₂	3 µl
10 milliM dNTP mix	1 µl
cDNA	2 µl
AmpliTaq DNA polymerase	0,25 µl
Nukleasefritt vann	36,75 µl

48 µl av denne reaksjonsblandingen ble tilsatt til hvert rør, blandet og sentrifugert. Deretter ble prøveløsningen kjørt i PCR-maskinen med følgende betingelser:

Temperatur / °C	Tid
95	5 min
94	30 sek
55	30 sek
72	1 min
72	10 min
4	End

} 50 sykluser

DNA- Gelelektroforese

Prøvene ble deretter brukt til å kjøre gelelektroforese. Det er samme prinsipp for DNA elektroforese som RNA elektroforese. En 2 % agarosegel med Nusieve® 3:1 agarosepulver

ble støpt ved romtemperatur. GelRed ble også brukt som et interkalerende fluorescerende molekyl. Selve elektroforesen foregikk ved at 20 μl av hver prøve ble blandet med 4 μl 6 x DNA loading buffer. Hele volumet (24 μl) ble applisert på gelen i hver sine brønner og kjørt ved 100 mV i ca. 60 minutter. For β -actin-prøvene ble det applisert 12 μl , pga kraftig signal. Samtidig ble det kjørt 6 μl 100 bp ladder, som består av DNA-fragmenter med kjent størrelse, i en av brønnene. GelRed vil binde seg inne i DNA-molekylet, mellom baseparene og ved UV-belysning vil det emitteres i det synlige spektret. Ved hjelp av den kjente markøren, kan man finne om de syntetiserte DNA-fragmentene har riktig størrelse.

3.6.2. Kvantitativ RT-PCR

Real-time kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qRT-PCR) metoden tillater både amplifisering og kvantifisering av en spesifikk nukleinsyresekvens i en prøve. I qRT-PCR vil man kvantifisere produktet ved å måle fluorescens for hver syklus av PCR-reaksjonen (dvs. i sanntid) [63]. I denne oppgaven er det brukt to fluorescerende stoffer; SYBR Green I og TaqMan probe.

SYBR Green I binder seg til dobbeltrådet DNA (produktet) og avgir et fluorescerende signal av en definert bølgelengde når den bestråles med lys. Deteksjonen skjer i elongeringstrinnet av PCR. Signalintensiteten øker med økende syklusnummer på grunn av opphopning av PCR-produktet [65].

TaqMan-prober er sekvens-spesifikke oligonukleotid-prober som har en fluorofor festet ved 5'-enden og en quencher ved 3'-enden [66]. TaqMan-proben binder seg til enkeltrådet DNA. DNA polymerase vil under elongeringstrinnet kløyve av fluoroforen som da emitterer lys [63]. Dette resulterer i detekterbar fluorescens som er proporsjonal med mengden akkumulert PCR-produkt.

Prøvebearbeidelse

Alt foregikk på is. Prøvene er kjørt enten i 96- brønners- eller 384-brønners brett. I 96-brønners brett er ADRP/ EP2 prøvene kjørt med SYBR Green I SuperMix mens GAPDH prøvene ble kjørt med TaqMan probe. I 384-brønners brett er alle prøvene kjørt med SYBR Green I. Det er laget PCR reaksjonsmiks som skulle inneholde følgende per prøve (x 3) avhengig av brettstørrelse:

Reaksjonsmiks	Til 96 brønner (µL)	Til 384 brønner (µL)
SuperMix	37,5	25
Forward primer	1,5	1
Revers primer	1,5	1
RNase- fritt vann	25,5	14

For 96 brønners brett er det blandet 9 µl av cDNA med 66 µl av reaksjonsmiksen med pipette. 24 µl av blandingen er tilsatt i hver brønn i triplikater. For 384 brønners brett er det tilsatt ved hjelp av automatpipette 3 µl cDNA og 12 µl reaksjonsmiks direkte i hver brønn i triplikater.

Der det er benyttet Thermo Scientific Solaris qPCR Gene Expression Assays for deteksjon av EP2 mRNA, inneholdt reaksjonsmiksen følgende:

Reaksjonsmiks	Til 384 brett (µL)
Solaris Master Mix	22,5
Solaris primer/probe	2,25
H2O (RNase-fritt)	5,25

5 µl cDNA er tilsatt sammen med 10 µl reaksjonsmiks direkte i hver brønn i triplikater.

Til ADRP/ EP2 er cDNA fra fortytning A benyttet, mens for GAPDH er cDNA fra fortytning B benyttet. Det er også kjørt blankprøver der cDNA er erstattet med RNase-fritt vann. Ved SYBR Green-analysen er det kjørt dissosiasjonstrinn for alle prøvene. Etter sentrifugering er qPCR kjørt med følgende betingelser for ADRP og EP2 (egen-designede primere):

Temperatur / °C	Tid
50	2 min
95	10 min
95	15 sek
60	60 sek
95	15 min

} 40 sykluser

PCR-reaksjonen ble utført i en ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems). qPCR for EP2 (Thermo Scientific Solaris) ble kjørt med følgende betingelser, som anbefalt av produsenten:

Temperatur / °C	Tid
95	10 min
95	15 sek
60	60 sek

} 40 sykluser

3.7. Analyse av data

Etter endt PCR-reaksjon ble resultatene automatisk beregnet ved hjelp av "Sequence Detector Software" (SDS versjon 2.2, Applied Biosystems). Et amplifikasjonsplott ble laget for hvert forsøk ved å plote antall PCR-sykluser (x-aksen) mot fluorescensintensitet fra amplifikasjonen (ΔR_n , y-aksen). Når mengden amplikon overstiger terskelen, *Threshold Line*, detekteres fluorescensen ved en bestemt syklus. Denne PCR syklusen kalles *Threshold Cycle* (Ct). Gjennomsnittets Ct-verdi for hvert forsøk (triplikat) blir også beregnet automatisk.

Ved å sette inn konsentrasjonen av prøvene for standardkurvene, kunne programmet lage en standardkurve for hvert forsøks-sett ved å plote gjennomsnittets Ct-verdi mot log konsentrasjon til hver av de fem konsentrasjonene. Kurven følger en lineær regresjonsmodell med følgende likning:

$$Ct = a (\log Q) + b$$

a er stigningstallet som beskriver effektiviteten til amplifikasjonen og bør være på 3,3 for optimal effektivitet. 3,3 sykluser er nødvendig for å oppnå en ti-gangers økning av produktmengden [63]. Q er mengden av startmateriale og b er skjæringspunktet med y-aksen. Man får også oppgitt korrelasjonskoeffisienten R^2 som forteller hvor god sammenhengen er mellom Ct-verdien og konsentrasjonen av RNA. R^2 er alltid mellom 0 og 1, der 1 indikerer en lineær sammenheng mellom de to.

Deretter ble dataene eksportert til Excel som ble brukt til videre analyse. Ut i fra likningen ble RNA mengden (Q) beregnet, for hvert forsøk og så er det tatt gjennomsnitt av triplikatene.

Hvert forsøk ble også kjørt med tre paralleller, og den endelig beregnede mengden er gjennomsnittet av de tre parallellene. Til slutt ble forholdet mellom ADRP eller EP2 og GAPDH beregnet. Hvert forsøks-sett ble gjentatt minst tre ganger og deretter ble alle forsøkene slått sammen. Resultatene er oppgitt i relative enheter der ADRP/GAPDH eller EP2/GAPDH ratio for kontrollen er satt til 1.

I dataprogrammet *GraphPad Prism 5* ble grafene tegnet, og statistisk analyse foretatt ved hjelp av ANOVA enveis variansanalyse med Bonferronikorreksjon for parvis sammenligning. Resultatene ble ansett som signifikante dersom p var mindre enn 0,05. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM.

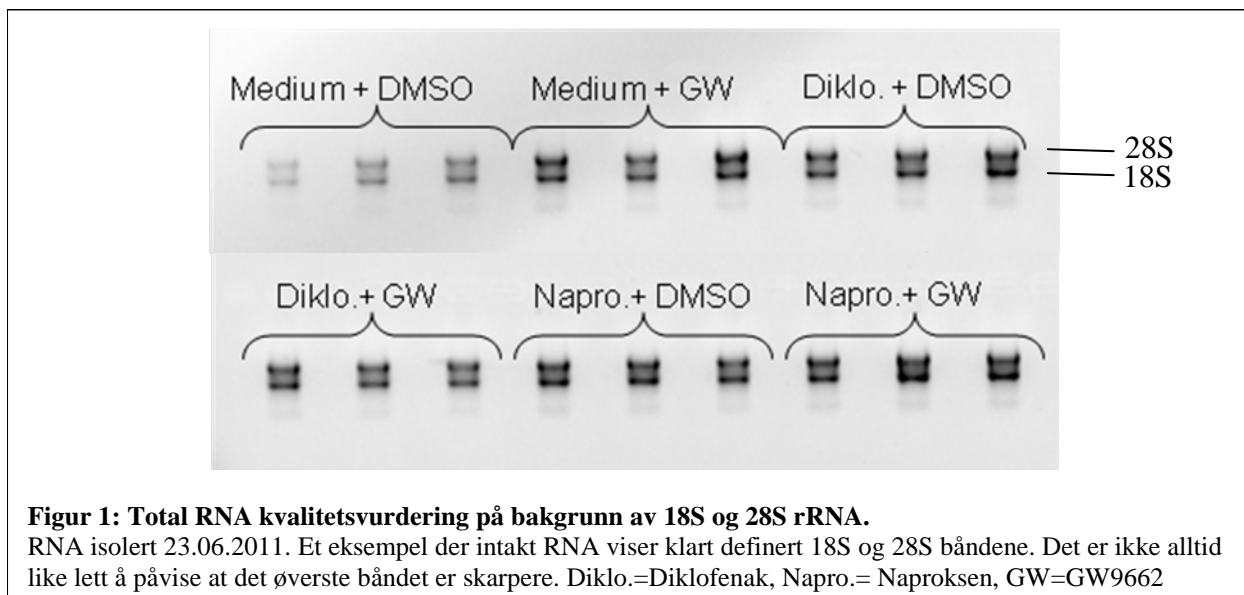
4. RESULTATER

4.1. Kontroll av RNA

RNA er svært ustabil og følsomt for degradering, derfor er det viktig å dokumentere kvaliteten (renhet) av RNA templatet, da det kan påvirke ytelsen og kvantitative data av qRT-PCR [67]. RNA kvaliteten ble testet både spektrofotometrisk og ved gelelektroforese.

Den optiske tettheten (OD) ble målt fotometrisk ved ulike bølgelengder for å vurdere både renhet og konsentrasjon av RNA i prøvene. OD 260/280 ratio gir en indikasjon på RNA renhet. I alle prøvene var OD ratioen mellom 1,8 og 2,0.

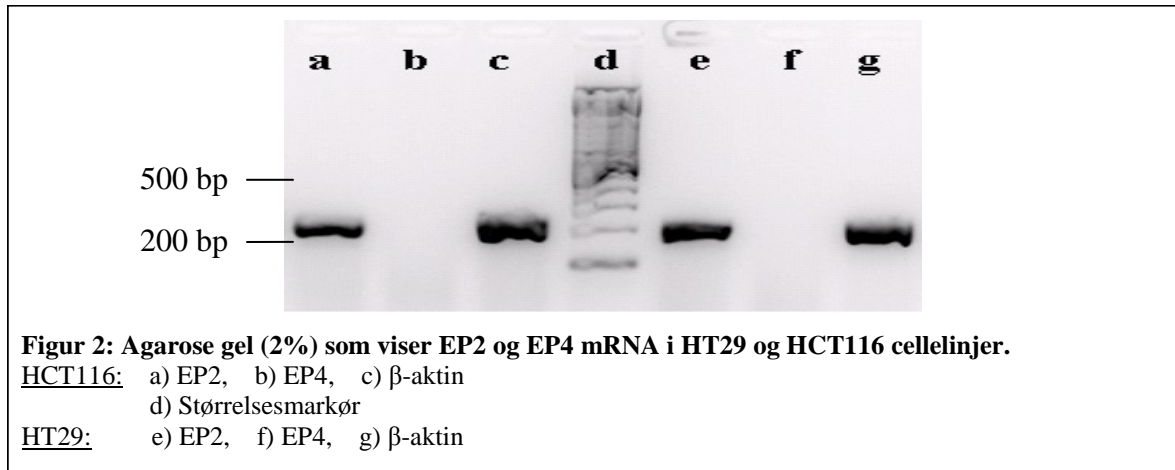
I gelelektroforese blir RNA-kvaliteten kontrollert ved å påvise fraksjonene (18S, 28S) av ribosomalt RNA (rRNA). Hvis RNA er av god kvalitet skal forholdet mellom 28S og 18S båndene være 2:1 [67]. I alle forsøk ble 28S og 18S båndene påvist, men det var ikke alltid like lett å vurdere tettheten av det øverste båndet (28S) i forhold til det nederste båndet (figur 1).



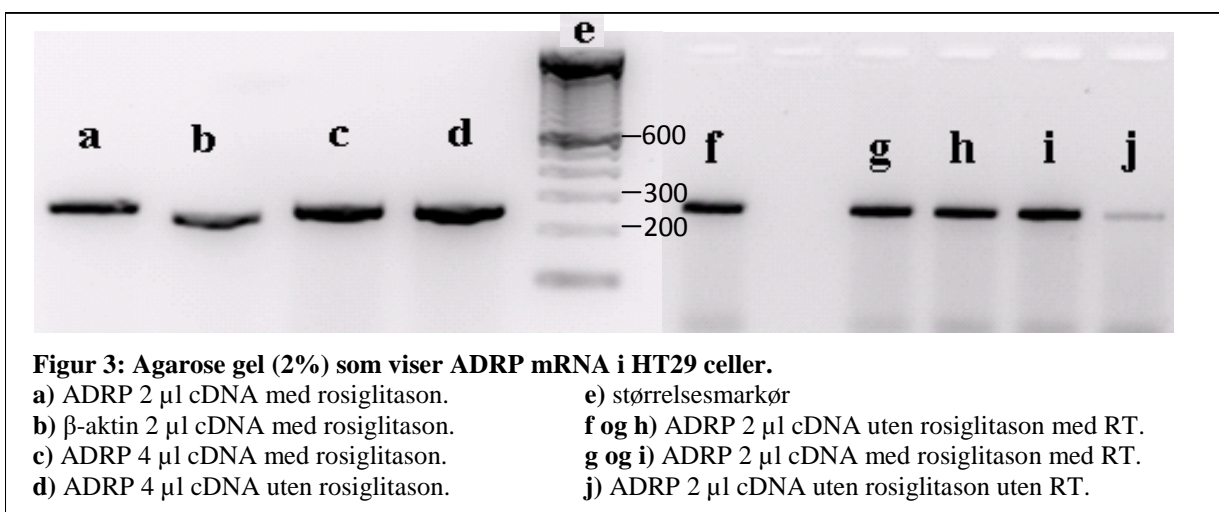
4.2. Test av primere

Det er påvist at HT29-cellene uttrykker EP2- og EP4-reseptorene. For kontroll av primerne i tillegg til å bekrefte ekspresjonen av EP2 og EP4 mRNA i HT29 celledinjen, ble kvalitativ RT-PCR og gelelektroforese benyttet. I disse innledende forsøkene ble også celledinjen HCT116 benyttet. Av figur 2 kan man se tilstedeværelse av EP2 båndet med en størrelse på ca 200 basepar (bp) og dermed kunne EP2 primerne brukes videre. Deteksjonen av EP4 mRNA

var ikke vellykket, noe som hindret videre kvantitering av EP4 mRNA. β -aktin båndene var også intakte og bekrefter at PCR-reaksjonen har fungert som den skal. Forventet størrelse av PCR-produktene var: ca 200 for EP2, 300 for EP4 og 225 for β -aktin.



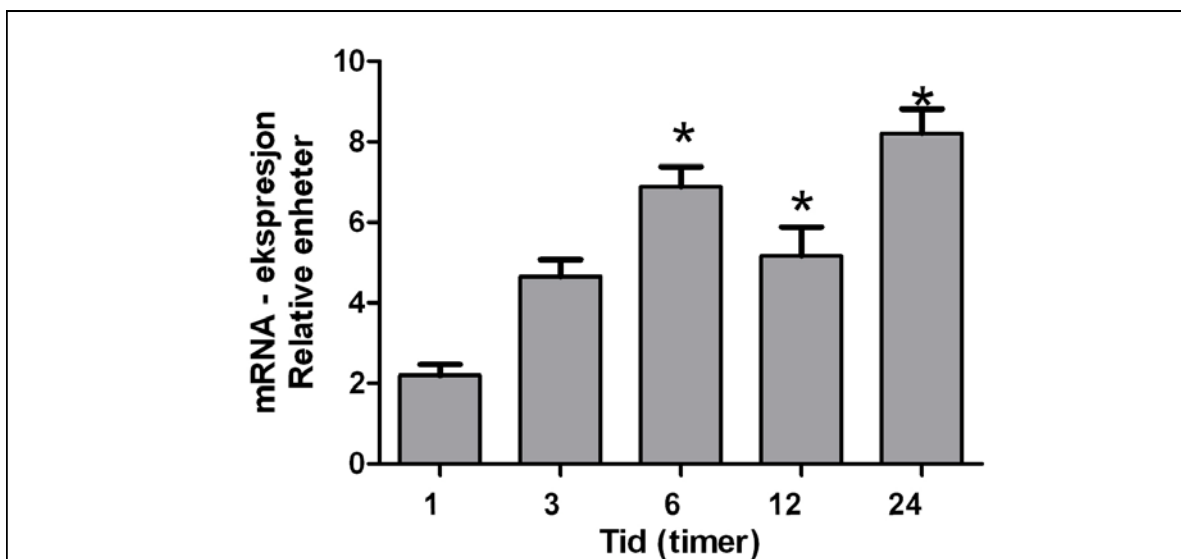
Det er også påvist at HT29-cellelinjen uttrykker ADRP. Samme metode ble brukt for å kontrollere ADRP primere. Det ble her benyttet mRNA fra celler forbehandlet med rosiglitazon eller bare medium, og cDNA syntesen ble utført både med og uten revers transkriptase for å kontrollere for genomisk DNA. Disse RNA prøvene ble ikke DNase-behandlet. I figur 3 kan man se ADRP båndet på agarosen med størrelse på ca 249 bp, men man kan ikke se signifikante forskjeller mellom båndene for celler forbehandlet med eller uten rosiglitazon. Ved fravær av revers transkriptase var det ene båndet mye svakere (figur 3j), noe som tyder på at det hovedsakelig er mRNA som amplifiseres i PCR-reaksjonen.



4.3. Tidsavhengig effekt av rosiglitazon på ADRP-uttrykk

ADRP er kjent for å være regulert av PPAR, og PPAR-agonister er vist å øke ADRP-uttrykket [33]. Derfor er rosiglitazon (selektiv PPAR γ -agonist) blitt brukt i forsøkene som en positiv kontroll på aktivering av PPAR γ .

Med en celletetthet på 50 000 celler/cm² ble cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og ytterligere et døgn serumfritt før de ble stimulert med 10 μ M rosiglitazon eller bare serumfritt medium. Av praktiske grunner var det ikke mulig å undersøke alle tidspunkter i samme forsøk, derfor ble cellene høstet etter 1, 3 og 6 timer i tre uavhengige forsøk, mens i tre andre forsøk ble de høstet etter 6, 12 og 24 timer, i tillegg til et ekstra forsøk der cellene ble høstet etter 24 timer. Dermed ble ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen satt til 1 ved hvert tidspunkt og ADRP/GAPDH ratioen for rosiglitazon-stimulerte cellene ble beregnet i forhold til kontrollen og er oppgitt i relative enheter. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av 7 uavhengige forsøk (figur 4). Resultatene viser at ADRP-ekspresjonen øker med tiden. Ved bruk av ANOVA analyse med Bonferroni korreksjon kunne vi vise en signifikant forskjell ($p < 0,05$) i ekspresjonen av ADRP etter 6, 12 og 24 timers stimulering med rosiglitazon.

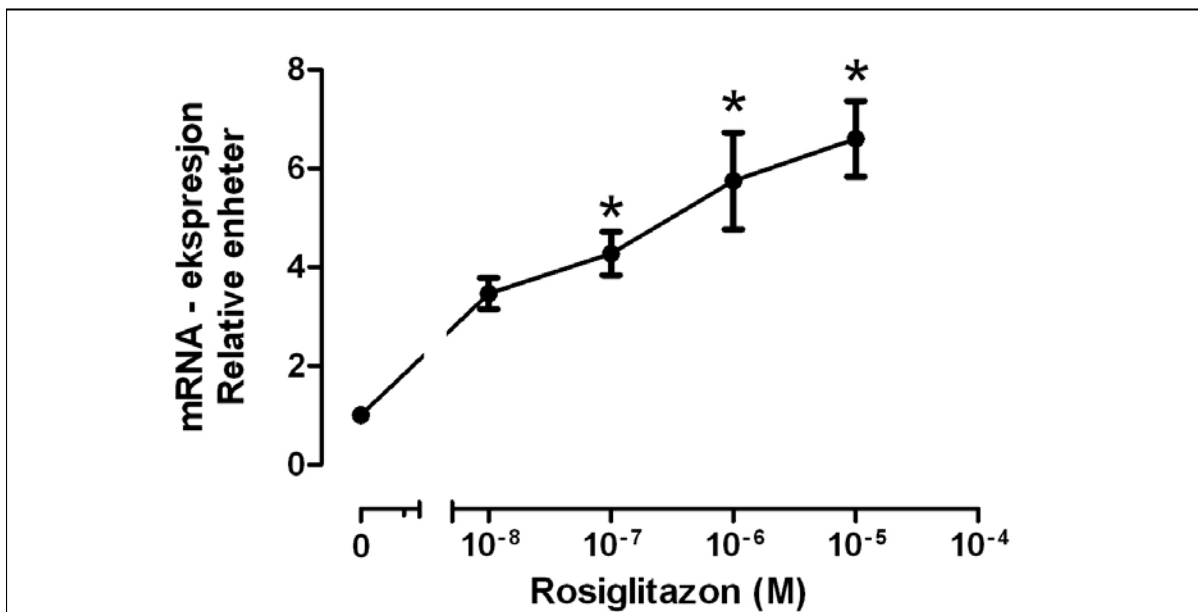


Figur 4: Tidsavhengig effekt av rosiglitazon på ADRP mRNA uttrykk

Med en celletetthet på 50 000 celler/cm² ble HT29 cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og et døgn i serumfritt medium. Deretter ble de stimulert med 10 μ M rosiglitazon eller bare serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 1, 3, 6, 12 og 24 timer. ADRP/GAPDH ratioen for rosiglitazon-stimulerte cellene er beregnet i relative enheter ut i fra ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen ved hvert tidspunkt som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av syv uavhengige forsøk. * indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ($p < 0,05$).

4.4. Doseavhengig effekt av rosiglitazon på ADRP-uttrykk

Med en celledetthet på 50 000 celler/cm² ble cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og ytterligere et døgn serumfritt før de ble stimulert med rosiglitazon i konsentrasjoner 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M og 10⁻⁵ M eller med bare serumfritt medium. På bakgrunn av resultatene fra tidskurve-forsøket (figur 4) ble cellene høstet etter 6 timers stimulering med rosiglitazon. ADRP/GAPDH ratioen for rosiglitazon-stimulerte cellene er beregnet i relative enheter ut i fra ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen (kun medium) som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre uavhengige forsøk. Figur 5 viser økende uttrykk av ADRP med økende konsentrasjon av rosiglitazon, det vil si en doseavhengig effekt. Høyest ekspresjon ble oppnådd ved konsentrasjon av rosiglitazon på 10⁻⁵ M. ANOVA analysen med Bonferroni korreksjon viste en signifikant forskjell (p < 0,05) i ADRP ekspresjonen ved rosiglitazon-konsentrasjoner på 10⁻⁷, 10⁻⁶ og 10⁻⁵ M.



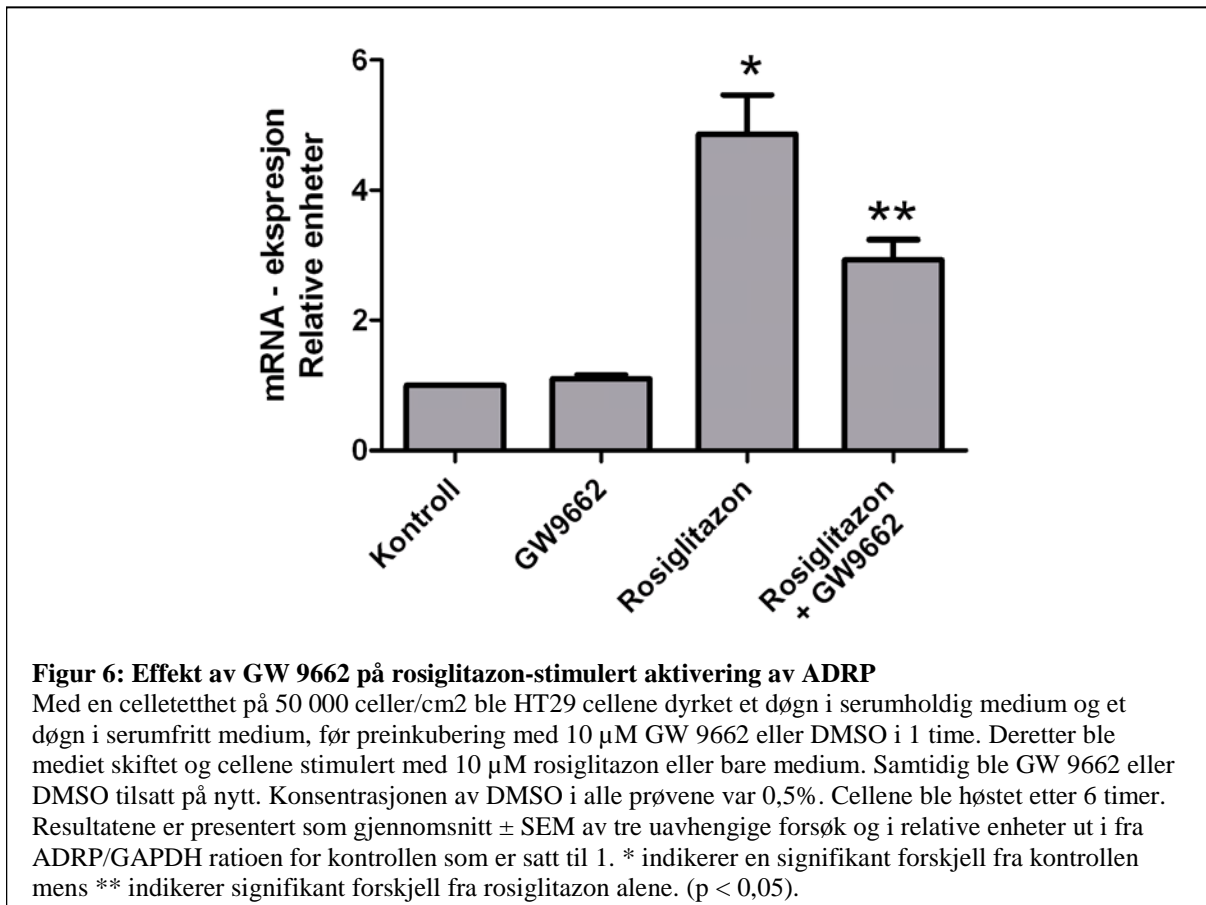
Figur 5: Dose-avhengig effekt av rosiglitazon på ADRP-uttrykk

Med en celledetthet på 50 000 celler/cm² ble HT29 cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og et døgn i serumfritt medium. Deretter ble de stimulert med rosiglitazon i konsentrasjoner 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M og 10⁻⁵ M eller med bare medium (serumfritt). Cellene ble høstet etter 6 timer. Resultatet er beregnet i relative enheter der ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen (kun medium) er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre uavhengige forsøk. * indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen (p < 0,05).

4.5. Effekt av GW 9662 på rosiglitazon-stimulert ADRP-ekspressjon

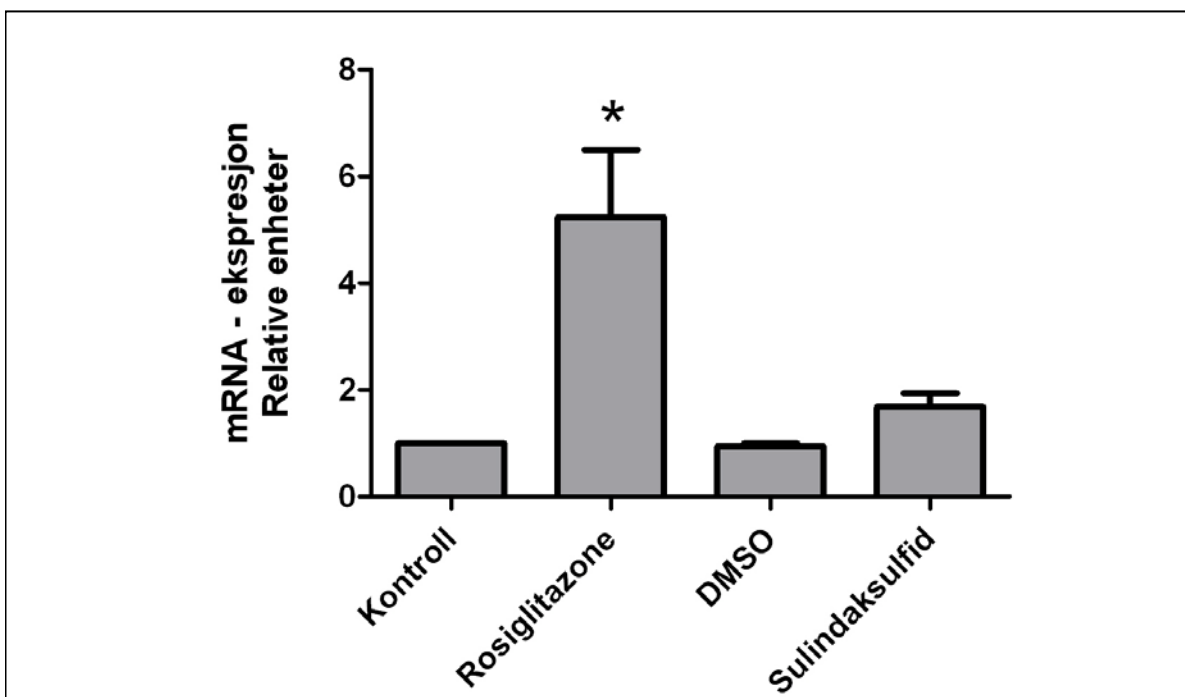
For å avgjøre om effekten av rosiglitazon på ADRP-ekspressjonen er mediert via aktivering av PPAR γ -reseptoren, ble en potent og selektiv, irreversibel PPAR γ -antagonist, 2-klor-5-nitrobenzanilid (GW9662) benyttet.

Cellene ble dyrket et døgn i serumholdig medium og ytterligere et døgn i serumfritt medium før de ble preinkubert med 10 μ M GW 9662 eller DMSO i 1 time. Deretter ble mediet skiftet og cellene stimulert med 10 μ M rosiglitazon eller bare medium. Samtidig ble GW 9662 eller DMSO tilsatt på nytt. Cellene ble høstet etter 6 timer. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk. Resultatene er beregnet i relative enheter ut i fra ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen som er satt til 1. Figur 6 viser at GW 9662 alene ikke har noen effekt på ADRP-ekspressjon, men preinkubering med GW 9662 hemmer rosiglitazon-stimulert ADRP-ekspressjon. Resultatene viser, ved hjelp av ANOVA analysen, ingen signifikant forskjell i ADRP aktivering mellom GW 9662 og kontrollen. Resultatene viser også at det er signifikant forskjell i rosiglitazon-stimulert ADRP-ekspressjon i nærvær og fravær av GW 9662 ($p < 0,05$).



4.6. Effekt av sulindaksulfid på ADRP-uttrykk

Effekten av sulindaksulfid på ADRP ekspresjon ble sammenlignet med effekten av rosiglitazon. Med en celletetthet på 50 000 celler/cm² ble cellene dyrket et døgn i serumholdig og ytterligere et døgn serumfritt før de ble stimulert med 10 µM rosiglitazon eller 10 µM sulindaksulfid. Kontrollen ble bare tilsatt serumfritt medium (merket kontroll), eller serumfritt medium med samme konsentrasjon av DMSO som i prøvene med sulindaksulfid (0,02 %, merket DMSO). Cellene ble høstet etter 24 timer. Resultatet er beregnet i relative enheter ut i fra ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre uavhengige forsøk. Av figur 7 kan man se et høyere ADRP uttrykk ved stimulering med rosiglitazon sammenlignet med kontroll. Stimulering med rosiglitazon viste ved ANOVA analysen en signifikant forskjell fra kontrollen ($p < 0,05$). Det var derimot ingen signifikant forskjell mellom sulindaksulfid og kontrollen.

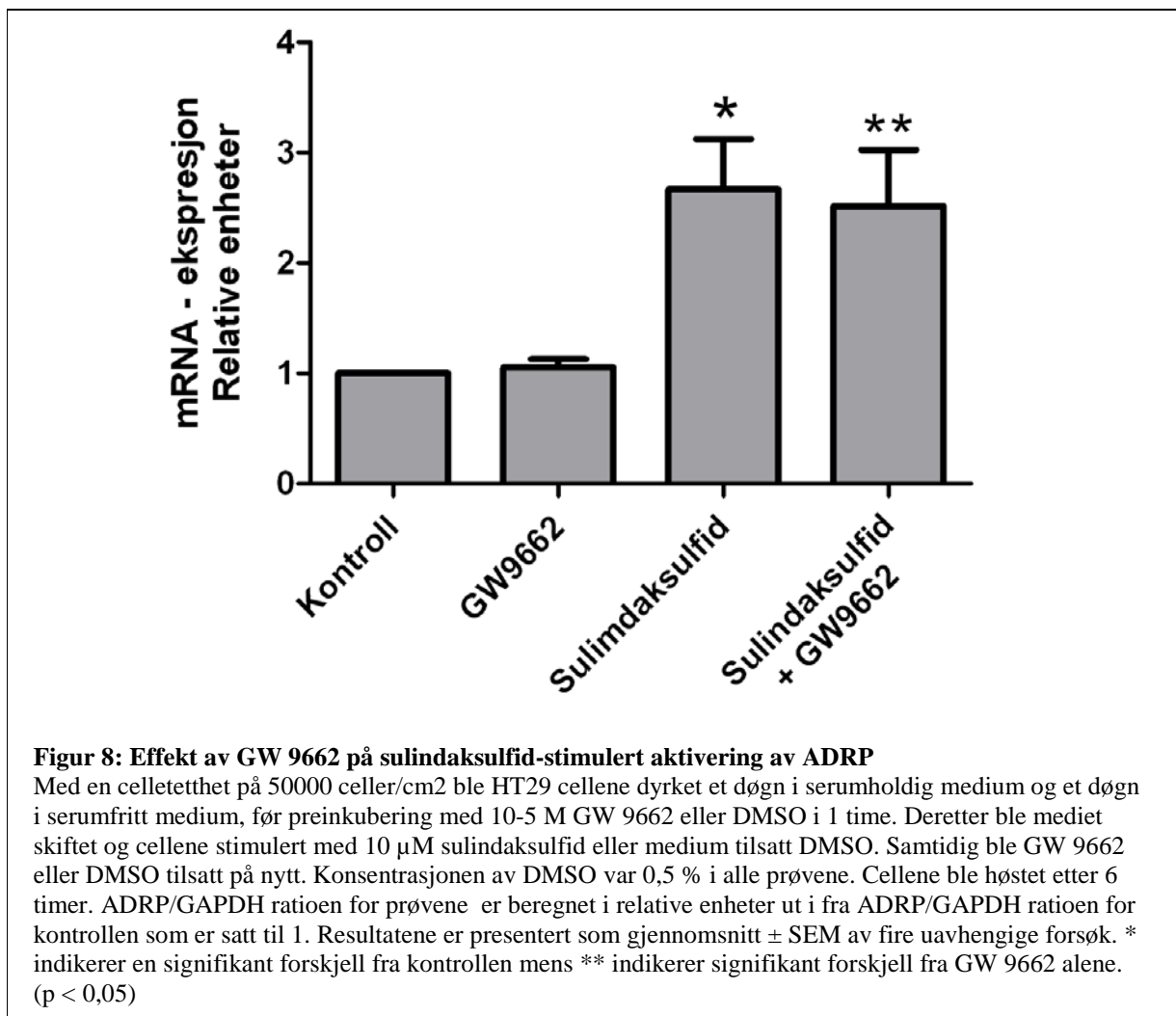


Figur 7: Effekt av Sulindaksulfid på ADRP-uttrykk

Med en celletetthet på 50 000 celler/cm² ble HT29 cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og et døgn i serumfritt medium. Deretter ble de stimulert med 10 µM rosiglitazon eller sulindaksulfid. Kontrollen for rosiglitazon ble bare tilsatt serumfritt medium, mens kontrollen for sulindaksulfid ble tilsatt serumfritt medium med samme DMSO-konsentrasjon som i sulindaksulfidprøvene (0,02% DMSO). Cellene ble høstet etter 24 timer. ADRP/GAPDH ratioen for prøvene er beregnet i relative enheter ut i fra ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen (kun medium) som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre uavhengige forsøk. * indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ($p < 0,05$).

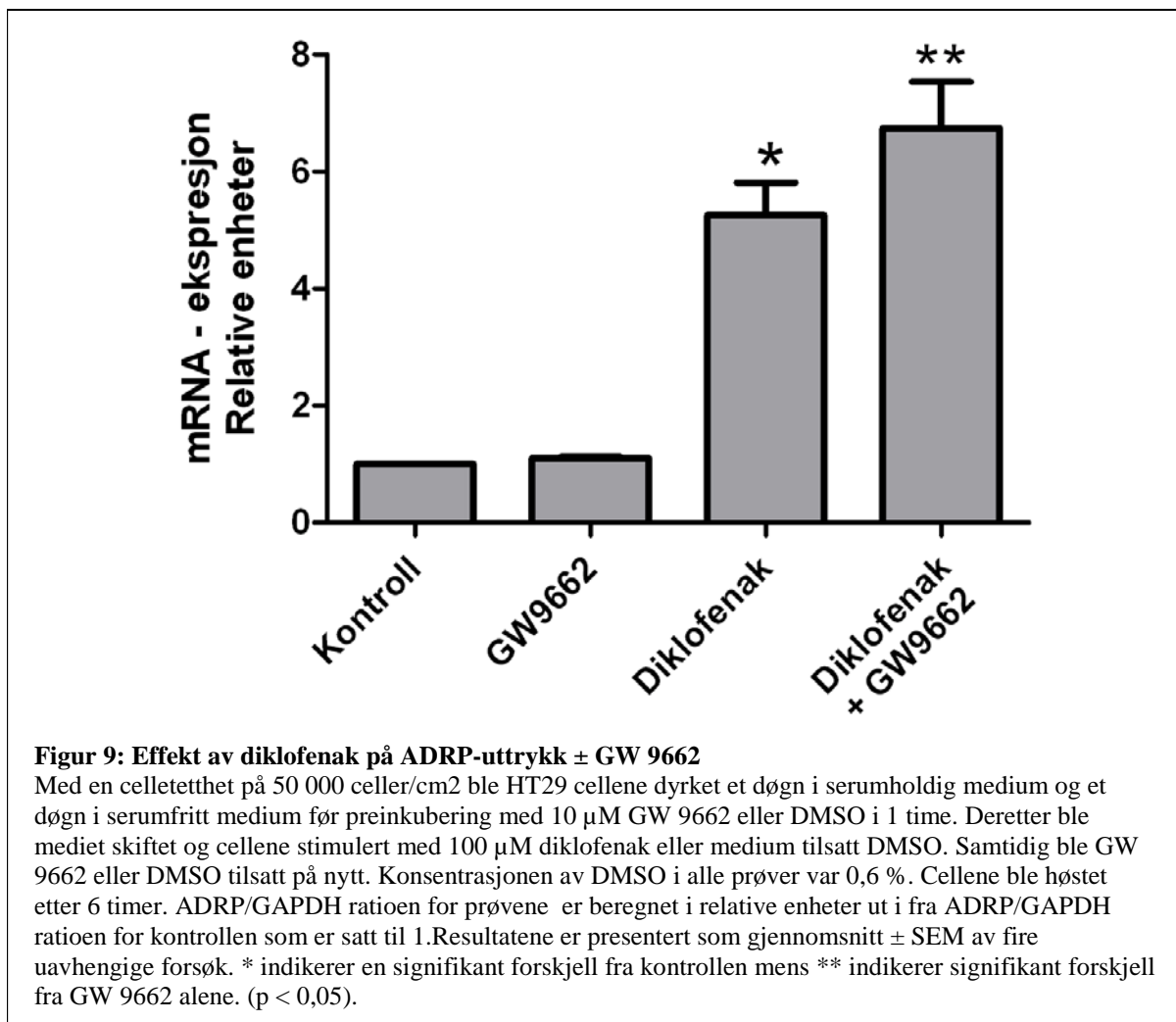
4.7. Effekt av GW 9662 på sulindaksulfid-stimulert aktivering av ADRP

Cellene ble dyrket et døgn i serumholdig medium og ytterligere et døgn i serumfritt medium før de ble preinkubert med 10 μ M GW 9662 eller DMSO 0,5 % i 1 time. Deretter ble mediet skiftet og cellene stimulert med 10 μ M sulindaksulfid eller medium tilsatt samme konsentrasjon av DMSO som prøvene med sulindaksulfid, 0,02 %. Samtidig ble GW 9662 eller DMSO tilsatt på nytt. Cellene ble høstet etter 6 timer. Resultatene er presentert i relative enheter som gjennomsnitt \pm SEM av fire uavhengige forsøk. Man kan se av figur 8 at sulindaksulfid har en svak stimulerende effekt på ADRP-ekspresjon, men GW 9662 hemmer ikke denne effekten. ANOVA analysen viste en signifikant forskjell i ADRP ekspresjon mellom sulindaksulfid og kontrollen ($p < 0,05$), men det var ingen signifikant forskjell i sulindaksulfids ADRP aktivering i nærvær eller fravær av GW 9662.



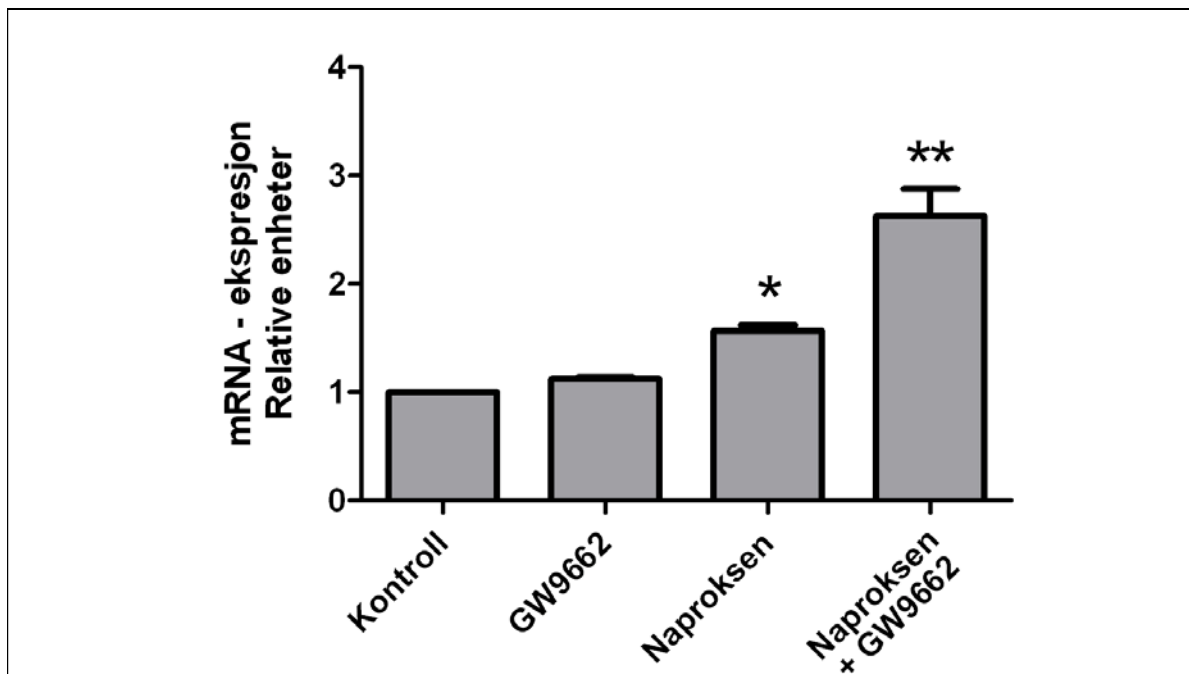
4.8. Effekt av diklofenak på ADRP-uttrykk i nærvær og fravær av GW 9662

Cellene ble dyrket et døgn i serumholdig medium og ytterligere et døgn i serumfritt medium før de ble preinkubert med 10 μ M GW 9662 eller 0,5 % DMSO i 1 time. Deretter ble mediet skiftet og cellene stimulert med 100 μ M diklofenak eller medium tilsatt DMSO. Samtidig ble GW 9662 eller DMSO tilsatt på nytt. Cellene ble høstet etter 6 timer. Resultatene er presentert i relative enheter som gjennomsnitt \pm SEM av fire uavhengige forsøk. Figur 9 viser en stimulerende effekt av diklofenak på ADRP-ekspressjon, og at preinkubering med GW 9662 ikke hemmer denne effekten men derimot har en forsterkende effekt. Resultatene viste etter ANOVA analysen at det var signifikant forskjell i ADRP mRNA ekspressjon mellom diklofenak og kontrollen ($p < 0,05$). Det var derimot ingen signifikant forskjell i diklofenak-stimulerte celler i nærvær eller fravær av GW 9662.



4.9. Effekt av naproksen på ADRP-uttrykk i nærvær og fravær av GW 9662

Etter preinkubering med GW 9662 eller DMSO i 1 time ble mediet skiftet og cellene stimulert med 100 μ M naproksen eller medium. Samtidig ble GW 9662 eller DMSO tilsatt på nytt. Cellene ble høstet etter 6 timer. Resultatene er presentert i relative enheter som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk. Som figur 10 viser har naproksen en svak stimulerende effekt på ADRP-uttrykk. Det er også høyere ADRP-ekspressjon ved stimulering med naproksen i cellene som var preinkubert med GW 9662. ANOVA-analyse med Bonforreni korreksjon viste en signifikant forskjell mellom naproksen og kontrollen. I tillegg viste det også en signifikant forskjell i ADRP-ekspressjonen i naproksen-stimulerte celler i nærvær eller fravær av GW 9662.

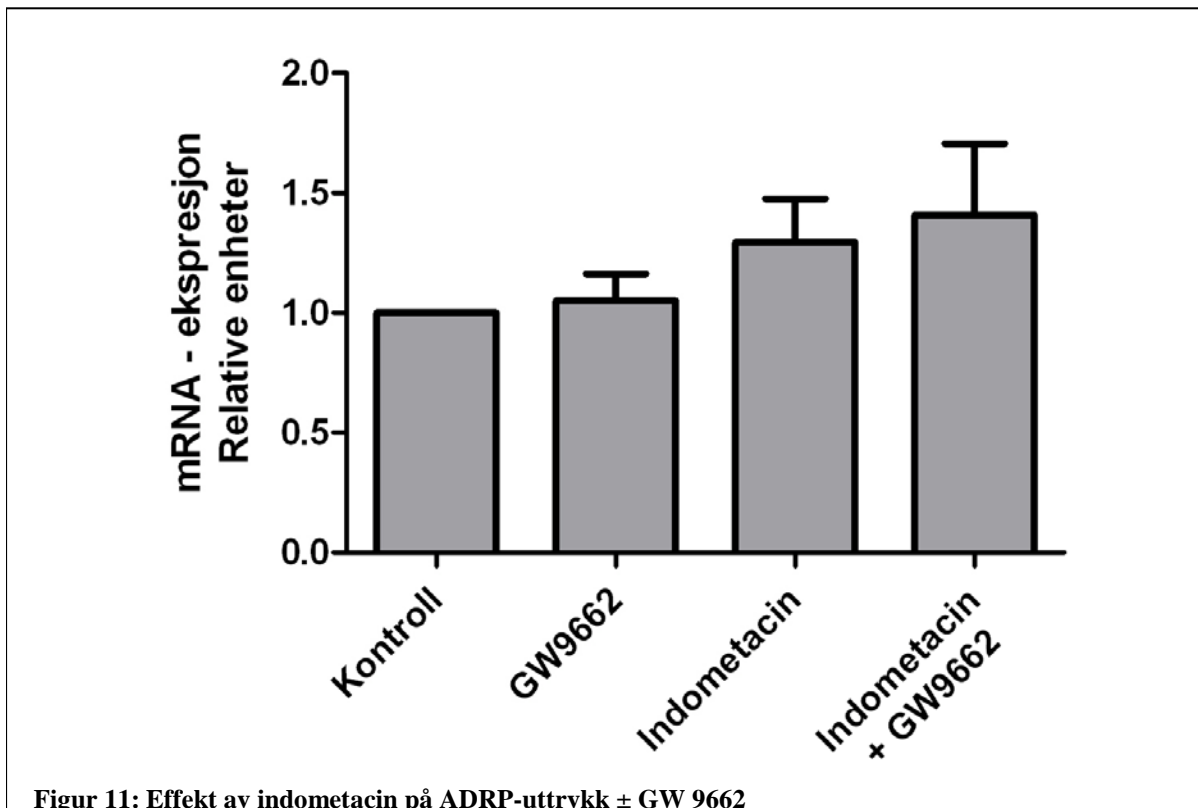


Figur 10: Effekt av naproksen på ADRP-uttrykk \pm GW 9662

Med en celletetthet på 50 000 celler/cm² ble HT29 cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og et døgn i serumfritt medium før preinkubering med 10 μ M GW 9662 eller DMSO i 1 time. Deretter ble mediet skiftet og cellene stimulert med 100 μ M naproksen eller medium. Samtidig ble GW 9662 eller DMSO tilsatt på nytt. Konsentrasjonen av DMSO i alle prøver var 0,5 %. Cellene ble høstet etter 6 timer. ADRP/GAPDH ratioen for prøvene er beregnet i relative enheter ut i fra ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk. * indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen, mens ** indikerer signifikant forskjell fra naproksen alene. (p < 0,05)

4.10. Effekt av indometacin på ADRP-uttrykk i nærvær og fravær av GW 9662

Cellene ble preinkubert som tidligere beskrevet. Etter preinkuberingen ble cellene stimulert med 30 μ M indometacin eller medium og GW 9662 eller DMSO ble tilsatt på nytt. Cellene ble høstet etter 6 timer. Resultatene er presentert i relative enheter som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk. Av figur 11 kan man se at indometacin ikke hadde effekt på ADRP-uttrykk. ANOVA-analyse viste at det ikke var noen signifikant forskjell i ADRP mRNA-uttrykk mellom indometacin og kontroll og indometacin i nærvær av GW 9662.



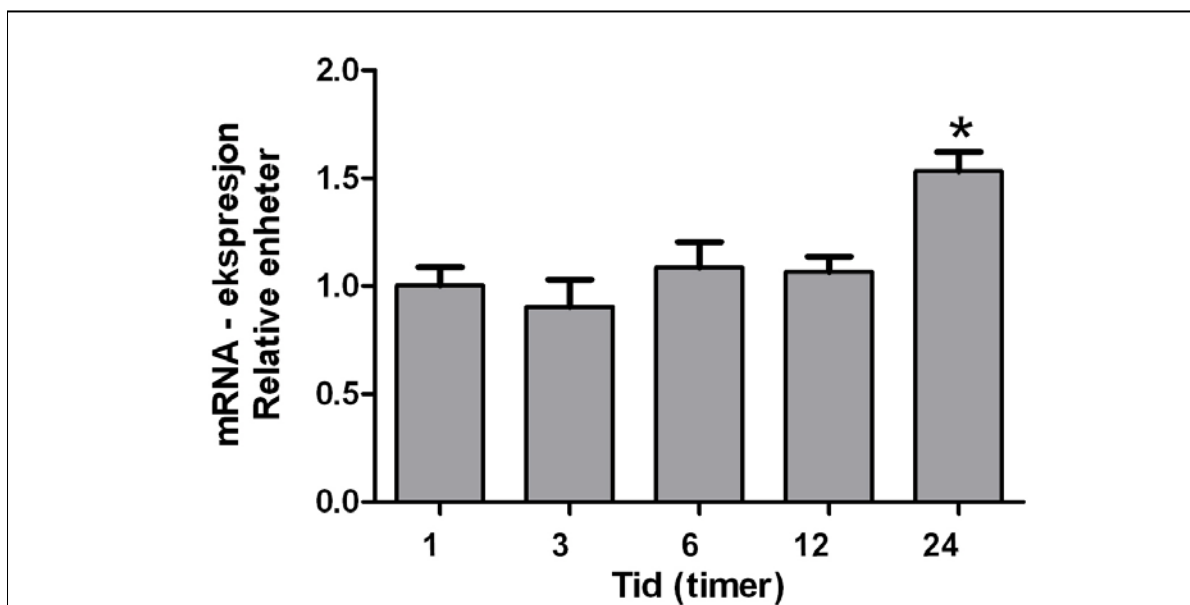
Figur 11: Effekt av indometacin på ADRP-uttrykk \pm GW 9662

Med en celledensitet på 50 000 celler/cm² ble HT29 cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og et døgn i serumfritt medium, før preinkubering med 10 μ M GW 9662 eller DMSO i 1 time. Deretter ble mediet skiftet og cellene stimulert med 30 μ M indometacin eller medium tilsatt DMSO. Samtidig ble GW 9662 eller DMSO tilsatt på nytt. Konsentrasjonen av DMSO i alle prøver var 0,5 %. Cellene ble høstet etter 6 timer. ADRP/GAPDH ratioen for prøvene er beregnet i relative enheter ut i fra ADRP/GAPDH ratioen for kontrollen som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk.

4.11. Tidsavhengig effekt av rosiglitazon på ekspresjon av EP2-reseptor mRNA

Tidligere forsøk har vist at rosiglitazon og utvalgte NSAIDs nedregulerer PGE₂-stimulert cAMP produksjon i HT29 cellelinjen [57]. For å avklare om effekten er mediert via PPAR γ ble effekten av rosiglitazon på EP2-uttrykket undersøkt over en tid på 24 timer. Cellene ble stimulert med 10 μ M rosiglitazon eller bare medium. Cellene ble høstet etter 1, 3 og 6 timer i tre uavhengige forsøk, mens i tre andre forsøk ble de høstet etter 6, 12 og 24 timer.

EP2/GAPDH ratioen for kontrollen er satt til 1 ved hvert tidspunkt og EP2/GAPDH ratioen for rosiglitazon-stimulerte cellene ble beregnet i forhold til kontrollen og er oppgitt i relative enheter. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av seks uavhengige forsøk. Figur 12 viser at EP2-ekspresjonen ikke endrer seg med tiden og er på samme nivå som kontrollen, men viser en liten økning etter 24 timer. ANOVA-analysen bekrefter at det var en signifikant forskjell i EP2 mRNA-ekspresjon kun ved stimulering med rosiglitazon i 24 timer.

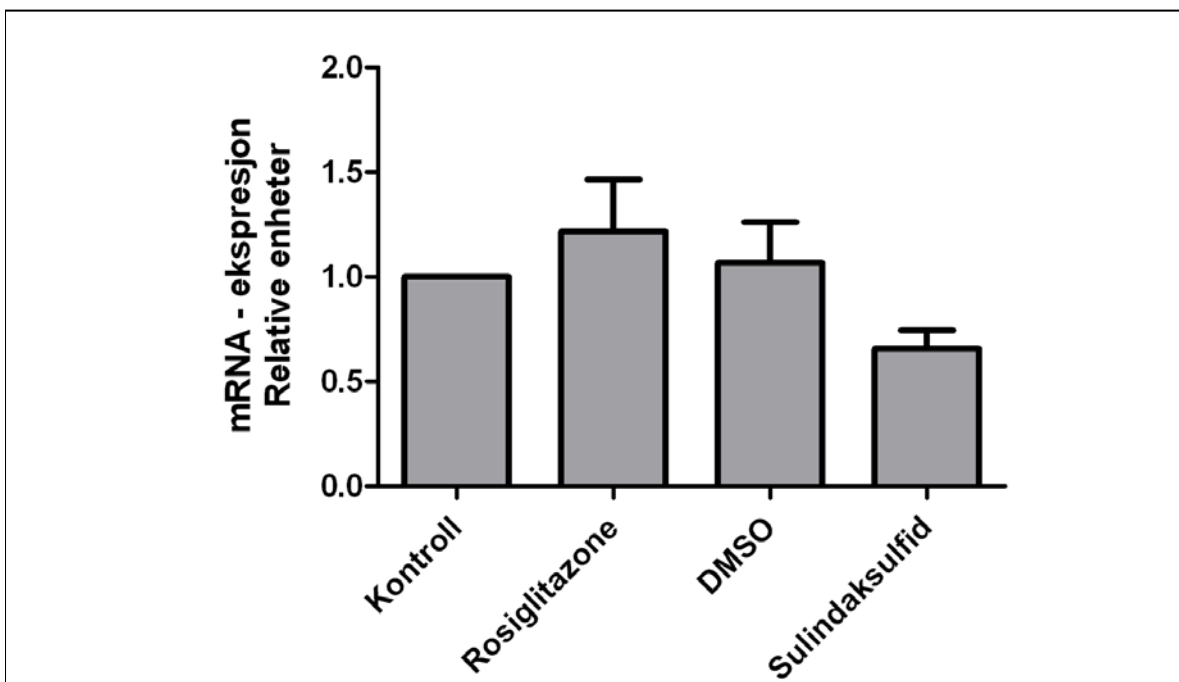


Figur 12: Tidsavhengig effekt av rosiglitazon på EP2-uttrykk

Med en celledetthet på 50 000 celler/cm² ble HT29 cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og et døgn i serumfritt medium. Deretter ble de stimulert med 10 μ M rosiglitazon eller bare serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 1, 3, 6, 12 og 24 timer. EP2/GAPDH ratioen for rosiglitazon-stimulerte cellene er beregnet i relative enheter ut i fra EP2/GAPDH ratioen for kontrollen i hvert tidspunkt som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av seks uavhengige forsøk. * indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ($p < 0,05$).

4.12. Effekt av rosiglitazon og sulindaksulfid på EP2-uttrykk

Effekten av sulindaksulfid på EP2 ekspresjon ble sammenlignet med effekten av rosiglitazon. Cellene ble stimulert med 10 μ M rosiglitazon eller 10 μ M sulindaksulfid. Kontrollen ble bare tilsatt serumfritt medium, eller serumfritt medium med samme konsentrasjon av DMSO som i prøvene med sulindaksulfid (0,02 %). Cellene ble høstet etter 24 timer. Resultatene er presentert i relative enheter som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk. Av figur 13 kan man se at rosiglitazon og sulindaksulfid ikke har effekt på EP2-uttrykk. ANOVA-analysen viste ingen signifikant forskjell mellom rosiglitazon og kontroll og sulindaksulfid og kontroll eller DMSO ($p < 0,05$).



Figur 13: Effekt av rosiglitazon og sulindaksulfid på EP2-uttrykk

Med en celledetthet på 50 000 celler/cm² ble HT29 cellene dyrket et døgn i serumholdig medium og et døgn i serumfritt medium. Deretter ble de stimulert med 10 μ M rosiglitazon eller sulindaksulfid. Kontrollen for rosiglitazon ble bare tilsatt serumfritt medium, mens kontrollen for sulindaksulfid ble tilsatt serumfritt medium med samme DMSO-konsentrasjon som i sulindaksulfid-prøvene (0,02 % DMSO). Cellene ble høstet etter 24 timer. EP2/GAPDH ratioen for prøvene er beregnet i relative enheter ut i fra EP2/GAPDH ratioen for kontrollen (kun medium) som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk.

5. DISKUSJON

5.1. Metodologiske aspekter

5.1.1. Kontroll av RNA

RNA er svært ustabil og følsomt for degradering etter ekstraksjon, og det kan påvirke ytelsen og kvantitative data av qRT-PCR [67]. Optisk tetthet (OD) måles fotometrisk ved ulike bølgelengder for å vurdere renhet og konsentrasjon av nukleinsyrer: 230 nm (absorpsjon av forurensninger og bakgrunn), 260 nm (absorpsjonsmaksimum for nukleinsyrer), 280 nm (absorpsjonsmaksimum for proteiner), og 320 nm (absorpsjon av forurensninger & bakgrunn) [67]. OD-ratioen 260/280 gir en indikasjon på RNA renhet og bør være på 1,8-2,0 [67, 68]. En ratio høyere enn 1,8 indikere høyt rensede preparater av DNA og RNA og eventuelle forurensninger vil senke dette forholdet. I alle forsøkene var OD-ratioen høyere enn 1,8, det vil si at RNA var av god kvalitet og kunne brukes videre for kvantitering.

I følge MIQE- (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) retningslinjene er måling av absorpsjonsratio ikke tilstrekkelig dersom nukleinsyrer skal brukes for kvantitativ analyse og man bør i det minste gjøre gelelektroforese i tillegg som kontroll av renhet [68]. Metoden baserer seg på antakelsen om at kvalitet og kvantitet av ribosomalt RNA- (rRNA) reflekterer kvaliteten av mRNA [68]. Agarose gelelektroforese brukes for å skille de forskjellige fraksjonene (18S, 28S) av rRNA. For RNA av god kvalitet bør 28S og 18S båndene være skarpe og avgrensede, og intensiteten av det øverste båndet (28S) bør være omtrent det dobbelte av det nederste, 18S båndet (molekylvekten er hhv 5kb og 2kb) [67, 68]. I alle forsøkene var 28S og 18S båndene intakte men det var ikke alltid like lett å se at det øverste båndet var tettere. Dette var fordi mengde RNA ikke alltid var 1 µg, dermed ble båndene ikke veldig intense slik at bestemmelse av skarpheten ble vanskelig. Det ville være en fordel å benytte kapillærelektroforese, f.eks. Agilent Bioanalyzer instrumentet som er en mer sensitiv metode som både kan kvantitere og kvalitetskontrollere RNA. Den angir kvaliteten av RNA på en skala fra 1 til 10, som kalles RNA Integrity Number (RIN).

5.1.2. Test av primere

Den COX-2-positive cellelinjen HT29 uttrykker alle de fire EP reseptorsubtypene (mer av EP2 og EP4), mens den COX-2-negative cellelinjen HCT116 uttrykker bare EP2 og EP4 [69]. HT-29 uttrykker i tillegg alle PPAR subtypene (PPAR α , PPAR δ , og PPAR γ), men det er bare PPAR γ -agonister som er vist å indukere apoptose i HT-29 cellene [70]. Heid og medarbeidere

har ved bruk av RT-PCR og immunfluorescens påvist uttrykk av ADRP mRNA og protein i HT29 celler [71].

Kvalitativ RT-PCR og gelelektroforese ble benyttet for å validere EP2, EP4 og ADRP primerne. β -aktin ble brukt som en positiv kontroll som bekreftet at PCR-reaksjonen fungerte som forventet. Primerne benyttet i oppgaven viste ekspresjon av EP2 og ADRP både i HT29 (og HT116) cellelinjen. Båndene var av forventet størrelse på ca 200 bp. Ved fravær av revers transkriptase var ADRP båndet mye svakere, noe som tydet på at det hovedsakelig var mRNA som ble amplifisert i PCR-reaksjonen. Dermed kunne EP2 og ADRP primerne brukes videre for kvantitering av ADRP og EP2 mRNA.

Av figur 3 kunne man ikke se signifikante forskjeller mellom båndene for celler forbehandlet med eller uten rosiglitazon. Dette viser dermed at gelelektroforese alene ikke er en egnet metode for kvantitering av mRNA.

5.1.3. Kontroll av RT-qPCR

For å påvise eventuelle rester av genomisk DNA eller uønskede amplifikasjons-produkter som primer dimerer, ble det kjørt både kontroller uten templat og kontroller uten revers transkriptase tilstede under cDNA-syntesen parallelt med cDNA-prøvene i PCR-reaksjonen. Kontrollen uten templat inneholder ikke cDNA, og vil påvise eventuelle forurensninger, mens kontrollen uten revers transkriptase vil vise hvor mye genomisk DNA bidrar til dannelsen av produktet. Kontrollene uten templat ga ikke noe amplifikasjonssignal, mens kontrollene uten revers transkriptase ga et signal med Ct-verdier ca 5-10 ganger høyere enn prøvene som var behandlet med revers transkriptase. Selv om disse kontrollene viste at DNase-behandlingen ikke var helt effektiv, forventes ikke restene av genomisk DNA å påvirke resultatene. Det ble også utført smeltepunktanalyse (dissosiasjonskurve) for alle cDNA-prøver kjørt med SYBR[®] Green. Kurven viste kun en topp i alle forsøkene, noe som bekreftet at primerne var spesifikke, og at det ikke ble dannet primer dimere.

I denne oppgaven er referanse-genet GAPDH brukt som internkontroll for å normalisere PCR data. Referanse-genet korrigerer for mulig RNA degradering eller tilstedeværelse av inhibitorer i RNA prøvene, for variasjon i RNA ekstraktet, reverse-transkripsjon og amplifikasjons-effektivitet [68]. Det bør bemerkes at resultatet av EP2 og ADRP mRNA-uttrykket er presentert i forhold til GAPDH mRNA og kan ha blitt påvirket av faktorer som

kan påvirke uttrykket av GAPDH. Det er rapportert at GAPDH mRNA nivåene kan variere mellom individer, på ulike stadier av cellyklus og etter behandling med ulike legemidler, derfor kan en kombinasjon av flere normaliseringsgener være en mer pålitelig referanse for kvantifiseringsstudier.

5.2. Effekt av rosiglitazon på ADRP-uttrykk

PPAR γ er sterkt uttrykt i mange svulster og er foreslått å fungere som en tumor-suppressor i tykktarmskreft [36, 37]. I mange studier har PPAR γ -agonister vist evnen til å hemme proliferasjon og angiogenese og stimulere apoptose [30, 38-40]. Rosiglitazon, som er en selektiv PPAR γ -agonist [8], har også vist evnen til å redusere PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-celler, men uten tegn til cytotoxicitet ved konsentrasjon på 10 μ M [57]. I denne oppgaven er rosiglitazon benyttet som en kontroll på aktivering av PPAR γ via måling av ADRP-uttrykk. ADRP er vist å være regulert av alle PPAR subtypene (PPAR α , PPAR γ og PPAR δ) [33, 72]. Tidsforløpet for stimulering av ADRP-ekspressjon med rosiglitazon ble undersøkt i celler som enten ble stimulert i 1, 3 og 6 timer eller 6, 12 og 24 timer. Resultatene viste at det er signifikant forskjell fra kontrollen i ekspressjonen av ADRP etter 6, 12 og 24 timers stimulering med rosiglitazon. Dette tyder på at stimuleringen av ADRP-ekspressjon er tidsavhengig og at den optimale tiden for stimulering og høsting av cellene er 6 timer.

I ettertid så vi at det hadde vært en fordel å ha med ADRP-ekspressjonen ved tid 0, men siden dette ikke ble gjort, valgte vi å uttrykke ADRP-ekspressjonen ved hvert tidspunkt relativt til kontrollen uten rosiglitazonbehandling. Vi så imidlertid av resultatene at mellom 6 og 24 timer var det en tendens til at ratio ADRP/GAPDH i kontrollene sank. Man kan se et tilsynelatende fall i tidskurven etter 12 timers stimulering med rosiglitazon (figur 4). Dette er sannsynligvis et tilfeldig utslag av variasjon fra forsøk til forsøk, og skyldes at dette punktet representerer middelverdien av 3 forsøk, mens 6 timers og 24 timers punktene representerer mer enn 3 forsøk.

Resultatene viser også at stimulering av ADRP-ekspressjon er doseavhengig. Det er en proporsjonal sammenheng mellom rosiglitazon-konsentrasjon og ADRP-ekspressjon. Høyest ekspressjon ble oppnådd ved konsentrasjon av rosiglitazon på 10 μ M. Den laveste ADRP stimulerende konsentrasjon av rosiglitazon er 10⁻⁷ M. Økt mRNA ekspressjon kan enten skyldes økt transkripsjon av genet, eller økt mRNA stabilitet. Vi burde derfor ideelt ha undersøkt om stabiliteten av mRNA ble påvirket.

5.3. Effekt av NSAIDs på ADRP-uttrykk

Flere studier har vist at NSAIDs kan virke gjennom mekanismer som er uavhengige av deres evne til å hemme COX. Visse NSAIDs har vist evnen til å binde seg til og aktivere kjernereseptorer av typen PPAR og dermed hemme proliferasjon og indusere apoptose [29, 38, 46]. Andre studier har også vist at NSAIDs kan øke nivået av ADRP mRNA, og at det skyldes stimulering av transkripsjon av genet [48]. I denne oppgaven er effekten av utvalgte NSAIDs på ekspresjon av ADRP i HT29 celler undersøkt. Det er benyttet ulike konsentrasjoner av ligandene. Basert på tidligere forsøk, ble det valgt konsentrasjoner som var forventet å ha minimal cytotoxisk effekt.

Av figur 7 kan man se en svak, ikke signifikant stimulerende effekt av sulindaksulfid på ADRP-ekspresjon ved høsting av celler etter 24 timer. Derimot ser man en signifikant forskjell fra kontrollen ved høsting etter 6 timer (figur 8). Det kan være nødvendig med en tidskurve for å undersøke effekten av sulindaksulfid på ADRP-uttrykk over tid for å finne det optimale tidspunktet for høsting av celler. Dette ble det ikke tid til. Konsentrasjonen benyttet for sulindaksulfid i denne oppgaven er 10 μM og derfor kunne man brukt høyere konsentrasjoner for å undersøke eventuelt dose-avhengig effekt. I en studie har sulindaksulfid vist maksimal PPAR γ -binding ved konsentrasjon på 50 μM i celler fra kolorektal kreft transfektert med et konstrukt som inneholdt det ligandbindende domene av PPAR γ [47]. Indometacin (10-100 μM) og ibuprofen (1000 μM) ga høyere aktivering enn sulindaksulfid i dette assayet. I andre studier har sulindaksulfid vist evnen til å binde seg og aktivere PPAR γ ved konsentrasjoner høyere enn 100 μM [73], mens det hemmet aktiviteten av PPAR δ [73, 74].

Diklofenak viste en signifikant stimulerende effekt på ADRP-ekspresjon, nesten på samme nivå som rosiglitazon. Det skal bemerkes at konsentrasjonen av diklofenak var 100 μM . Adamson og medarbeidere har vist at diklofenak bindes med høy affinitet til PPAR γ (K_i ca 700 nM), men bare ga en svak aktivering ved 25 μM [54]. Videre motvirket diklofenak rosiglitazon-indusert aktivering av PPAR γ , og er således en partiell agonist på PPAR γ . Høyest binding til PPAR γ i transfekterte kolorektalceller ble oppnådd ved 200 μM diklofenak, og da ga diklofenak nesten samme grad av aktivering som indometacin og ibuprofen [47]. Spørsmålet om diklofenak er en partiell agonist på PPAR γ bør undersøkes nærmere.

Naproxen viste en lav, men signifikant stimulerende effekt på ADRP-ekspressjon i denne oppgaven. Naproxen ble brukt i samme konsentrasjon som diklofenak, 100 μM , og var således mindre effektiv. Jaradat og medarbeidere viste en dose-avhengig aktivering av PPAR γ med s-naproxen, med høyest effekt ved doser høyere enn 100 μM [45]. De fant også at S(+) naproxen var mer effektiv enn indometacin og S(+) ibuprofen.

Indometacin hadde ingen signifikant stimulerende effekt på ADRP-ekspressjon. Dette er i motsetning til andre studier som har vist at indometacin binder og aktiverer PPAR γ ved konsentrasjoner fra 10-100 μM [29, 38, 45], men er i samsvar med Jaradat og medarbeidere, som fant at naproxen var mer effektiv enn indometacin [45]. Adamson og medarbeidere har også vist at indometacin ved høye konsentrasjoner (500 μM) fungerer som en full PPAR γ -agonist [54]. I denne oppgaven ble det benyttet 30 μM indometacin.

Det er brukt ulike konsentrasjoner av NSAIDs i denne oppgaven, fra 10 til 100 μM , og derfor kan ikke effekten på ADRP-uttrykk uten videre sammenlignes. Det ville vært ønskelig med fulle dose-respons kurver, eller i hvert fall flere, sammenlignbare konsentrasjoner for hver ligand.

5.4. Effekt av GW9662

For å avgjøre om effekten av rosiglitazon og NSAIDs på ADRP-ekspressjon er mediert spesifikt via aktivering av PPAR γ -reseptoren, ble en potent og selektiv, irreversibel PPAR γ -antagonist, GW9662, benyttet [49, 75]. Resultatene viste at preinkubering av cellene med GW9662 hemmet rosiglitazon-stimulert ADRP-ekspressjon. GW9662 viser i seg selv ingen effekt på ADRP-ekspressjon og dermed tyder resultatene på at den stimulerende effekten av rosiglitazon på ADRP-ekspressjon er mediert via aktivering av PPAR γ . Men GW9662 hemmet ikke rosiglitazon-stimulert ADRP-ekspressjonen fullstendig. Fordi GW9662 er en irreversibel hemmer, lar det seg ikke gjøre å bestemme affiniteten i kompetitive bindingsstudier, men det hadde vært ønskelig med dose-responskurver for rosiglitazon i fravær og nærvær av GW9662, og gjerne med en noe høyere konsentrasjon av GW9662.

I motsetning til hva som er funnet i andre studier hadde ikke GW9662 noen hemmende effekt på sulindaksulfid-stimulert ADRP-uttrykk i denne oppgaven. I en studie var det vist at PPAR γ -agonist effekten av sulindaksulfid hemmes ved bruk av GW9662 [73]. GW9662 hadde heller ikke noen hemmende effekt på de andre NSAIDs stimulering av ADRP-uttrykk.

Andre studier har også vist at GW9662 ikke blokkerer den hemmende effekten av den endogene PPAR γ -liganden, PGJ₂ [42]. Resultatene tyder på at NSAIDs øker ADRP-ekspressjon via mekanismer som både er PPAR γ -avhengige og -uavhengige. Som nevnt tidligere kan ADRP reguleres av alle PPAR subtypene og noen NSAIDs har vist evne til å binde seg både til PPAR α og PPAR γ . Dermed kan noe av den stimulerende effekten av NSAIDs være mediert via PPAR α . Naproksen og indometacin har vist seg å binde og aktivere både PPAR α og PPAR γ på en dose-avhengig måte [29, 45]. Vi har ikke funnet noen undersøkelser av om sulindaksulfid eller diklofenak aktiverer PPAR α . Ibuprofen er i to studier funnet å være mer effektiv enn indometacin og naproksen ved aktivering av PPAR α [29, 45], og indometacin er vist å være mer effektiv i aktivering av PPAR α enn naproksen [45]. Det er også vist at PPAR δ i fravær av ligand kan hemme gentranskripsjon [72, 76]. NSAIDs hemmer binding av PPAR δ til DNA, og kunne således tenkes å motvirke en hemmende effekt av PPAR δ . Denne mekanismen kunne dermed også bidra til økt ADRP-ekspressjon.

GW9662 hadde en svak, ikke signifikant forsterkende effekt på diklofenak- og indometacin-stimulert ADRP-uttrykk, mens denne effekten av GW9662 på naproksen-stimulert ADRP-uttrykk var signifikant forskjellig fra naproksen alene. Vi har foreløpig ingen god forklaring på dette, men ved blokkering av binding til PPAR γ kan mer ligand tenkes å bli tilgjengelig for binding til PPAR α .

Totalt sett vil det være av interesse å se på effekten av NSAIDs på ADRP-ekspressjon i nærvær og fravær av en selektiv PPAR α -antagonist og sammenligne med effekten av en PPAR α -agonist på ADRP-ekspressjon. En annen mulighet vil være å bruke celler med siRNA-mediert ”knockdown” av PPAR γ .

5.5. Effekt av rosiglitazon på EP2-uttrykk

Studier har vist at PPAR γ -agonister kan redusere PGE₂ produksjon og hemme uttrykket av EP2 reseptorer og dermed hemme effekten av endogent eller eksogent tilført PGE₂ [41, 42]. Han og medarbeidere har vist at rosiglitazon og ciglitazon hemmet celleveksten av humane lungekarsinomceller via en nedregulering av EP2 mRNA-nivået [42]. Tidligere forsøk på laboratoriet har vist at rosiglitazon reduserer PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-celler [57]. Derfor er det undersøkt i denne oppgaven om det er tidsavhengig effekt av rosiglitazon på EP2-reseptor mRNA. Resultatet viste at EP2 ekspressjonen ikke endret seg med tiden og

var på samme nivå som kontroller som ikke var stimulert med rosiglitazon, men det var en liten, signifikant økning ved stimulering i 24 timer. Dette tyder på at det ikke er mRNA-syntesen som påvirkes men at rosiglitazon nedregulerer PGE₂-stimulert cAMP-produksjon via en mekanisme som er uavhengig av EP2 mRNA-ekspressjon. Det er tenkelig at PPAR γ -agonister og NSAIDs kan påvirke stabiliteten av EP2 reseptoren via mekanismer som er uavhengig av PPAR γ . Kambe og medarbeidere har vist at troglitazon nedregulerte EP4 mRNA-nivået i glioblastomceller via PPAR γ -uavhengige mekanismer [59]. De viste at troglitazon induserer fosforylering og dermed inaktivering av transkripsjonsfaktoren Sp-1 som regulerer EP4 uttrykket.

5.6. Effekt av sulindaksulfid på EP2-uttrykk

Sulindaksulfid har vist en dose-avhengig reduksjon i PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-cellene ved konsentrasjonene 10 og 30 μ M [57]. I denne oppgaven er det undersøkt om denne effekten er mediert via hemmet transkripsjon av EP2 reseptoren. Resultatene viste en ikke-signifikant nedregulerende effekt av sulindaksulfid på EP2 mRNA-uttrykk.

Konsentrasjon av sulindaksulfid benyttet i denne oppgaven er 10 μ M for å unngå cytotoxicitet, men det er mulig at 30 μ M ville gitt høyere effekt. En tidligere undersøkelse har vist at indometacin reduserte PGE₂-stimulert cAMP i en cellelinje fra kolorektal kreft via en dose-avhengig reduksjon av EP2-reseptor mRNA, som var signifikant ved konsentrasjoner på 30 og 100 μ M [58]. I denne undersøkelsen ble det imidlertid ikke gjort kvantitativ PCR, men analyse av PCR-produktet på agarosegel. Som nevnt tidligere er gelelektroforese en kvalitativ metode og er ikke egnet for kvantitering av mRNA.

6. KONKLUSJON

I denne oppgaven er det funnet at rosiglitazon-stimulering av ADRP mRNA-uttrykk er både tids- og dose-avhengig. PPAR γ -antagonisten, GW9662, motvirket denne effekten, noe som bekrefter at den stimulerende effekten av rosiglitazon på ADRP-ekspressjon er mediert via aktivering av PPAR γ . Det er også funnet at utvalgte NSAIDs stimulerer ADRP mRNA-ekspressjonen via mekanismer som er uavhengig av PPAR γ . Om PPAR α er involvert i mekanismen bør undersøkes i videre arbeid. Resultatene tyder på at nedreguleringen av PGE₂-stimulert cAMP-produksjon mediert av NSAIDs og rosiglitazon, ikke synes å være mediert via nedregulering av EP2 reseptor mRNA.

7. REFERANSER

1. Bray, F., et al., *Tykkarms-og endetarmskreft i Norge-epidemiologi*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2007. **127**(20): p. 2682-2687.
2. Henriksen, M. and B. Moum, *Kolorektal kreft ved inflammatorisk tarmsykdom*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2007. **127**(20): p. 2696-2699.
3. Nesbakken, A. and M. Gaard, *Kirurgisk behandling av tykktarmskreft*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2007. **127**(22): p. 2942-2945.
4. Dahl, O., *Adjuvant kjemoterapi ved tykktarmskreft*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2007. **127**(23): p. 3094-3096.
5. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. The FASEB journal, 1998. **12**(12): p. 1063-1073.
6. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(16): p. 11613-11617.
7. Michalik, L., B. Desvergne, and W. Wahli, *Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(1): p. 61-70.
8. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell 2010*, Oslo: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok, Fagbokforlaget AS, Oslo.
9. Din, F.V.N., et al., *Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer*. Gut, 2010. **59**(12): p. 1670-1679
10. Gupta, R.A. and R.N. DuBois, *Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2*. Nature Reviews Cancer, 2001. **1**(1): p. 11-21.
11. Harris, R., *Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung*. Inflammopharmacology, 2009. **17**(2): p. 55-67.
12. Sinicropo, F.A. and S. Gill, *Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer*. Cancer and Metastasis Reviews, 2004. **23**(1): p. 63-75.
13. Giardiello, F.M., et al., *Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis*. New England Journal of Medicine, 1993. **328**(18): p. 1313-1316.
14. Steinbach, G., et al., *The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(26): p. 1946-1952.
15. Arber, N., et al., *Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(9): p. 885-895.
16. Bertagnolli, M.M., et al., *Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(9): p. 873-884.
17. Baron, J.A., et al., *A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1674-1682.
18. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1183-1188.
19. Shoji, Y., et al., *Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development*. Gut, 2004. **53**(8): p. 1151-1158
20. Watanabe, K., et al., *Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis*. Cancer research, 1999. **59**(20): p. 5093-5096.
21. Sonoshita, M., et al., *Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc 716 knockout mice*. Nature Medicine, 2001. **7**(9): p. 1048-1051.
22. Wang, D. and R.N. DuBois, *Eicosanoids and cancer*. Nature Reviews. Cancer, 2010. **10**(3): p. 181-193.
23. Zhang, Y. and Y. Daaka, *PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA C {gamma} pathway*. Blood, 2011(doi:10.1182/blood-2011-04-350587).

24. Hanif, R., et al., *Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway* I*. *Biochemical pharmacology*, 1996. **52**(2): p. 237-245.
25. Amann, R. and B.A. Peskar, *Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate*. *European journal of pharmacology*, 2002. **447**(1): p. 1-9.
26. Kopp, E. and S. Ghosh, *Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin*. *Science*, 1994. **265**(5174): p. 956-959.
27. Schwenger, P., et al., *Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(7): p. 2869-2873
28. Zhang, L., et al., *Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents*. *Science*, 2000. **290**(5493): p. 989-992
29. Lehmann, J.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(6): p. 3406-3410.
30. Park, B.H., B. Breyer, and T.C. He, *Peroxisome proliferator-activated receptors: roles in tumorigenesis and chemoprevention in human cancer*. *Current opinion in oncology*, 2001. **13**(1): p. 78-83.
31. Tugwood, J.D., et al., *The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5'flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene*. *The EMBO journal*, 1992. **11**(2): p. 433-439.
32. Murphy, G.J. and J.C. Holder, *PPAR-[gamma] agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer*. *Trends in pharmacological sciences*, 2000. **21**(12): p. 469-474.
33. Targett-Adams, P., et al., *A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2005. **1728**(1-2): p. 95-104.
34. Phillips, S.A., et al., *Adipocyte Differentiation-related Protein in Human Skeletal Muscle: Relationship to Insulin Sensitivity* & &. *Obesity*, 2005. **13**(8): p. 1321-1329.
35. Motomura, W., et al., *Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006. **340**(4): p. 1111-1118.
36. Han, S.W. and J. Roman, *Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma]: a novel target for cancer therapeutics?* *Anti-Cancer Drugs*, 2007. **18**(3): p. 237-244.
37. Sarraf, P., et al., *Loss-of-function mutations in PPAR [gamma] associated with human colon cancer*. *Molecular Cell*, 1999. **3**(6): p. 799-804.
38. Wang, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] in malignant diseases*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2006. **58**(1): p. 1-14.
39. Kitamura, S., et al., *Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Induces Growth Arrest and Differentiation Markers of Human Colon Cancer Cells*. *Cancer Science*, 1999. **90**(1): p. 75-80.
40. Margeli, A., G. Kouraklis, and S. Theocharis, *Peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ) ligands and angiogenesis*. *Angiogenesis*, 2003. **6**(3): p. 165-169.
41. Hazra, S., et al., *Pioglitazone and Rosiglitazone decrease PGE2 in non-small cell lung cancer cells by upregulating 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*. *Molecular pharmacology*, 2007. **71** (6): p. 1715-1720

42. Han, S.W. and J. Roman, *Suppression of prostaglandin E2 receptor subtype EP2 by PPAR [gamma] ligands inhibits human lung carcinoma cell growth*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **314**(4): p. 1093-1099.
43. Gupta, R.A., et al., *Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor- δ accelerates intestinal adenoma growth*. Nature Medicine, 2004. **10**(3): p. 245-247.
44. Wang, D., et al., *Prostaglandin E2 promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor [delta]*. Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 285-295.
45. Jaradat, M.S., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H2 synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin I*. Biochemical pharmacology, 2001. **62**(12): p. 1587-1595.
46. Yamazaki, R., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in rheumatoid synovial cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002. **302**(1): p. 18-25
47. Nixon, J., et al., *Evaluation of eicosanoids and NSAIDs as PPAR [gamma] ligands in colorectal carcinoma cells*. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, 2003. **68**(5): p. 323-330.
48. Ye, H. and G. Serrero, *Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression by ibuprofen and indomethacin in adipocyte precursors and in adipocytes*. Biochemical Journal, 1998. **330**(Pt 2): p. 803-809.
49. Leesnitzer, L.M., et al., *Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662*. Biochemistry, 2002. **41**(21): p. 6640-6650.
50. Rao, C.V., et al., *Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent*. Cancer research, 1995. **55**(7): p. 1464-1472.
51. Shiff, S., et al., *Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells*. Journal of Clinical Investigation, 1995. **96**(1): p. 491-503.
52. Jarvis, M.C., T.J.B. Gray, and C.N.A. Palmer, *Both PPAR and PPAR influence sulindac sulfide-mediated p21WAF1/CIP1 upregulation in a human prostate epithelial cell line*. Oncogene, 2005. **24**(55): p. 8211-8215.
53. Hixson, L.J., et al., *Antiproliferative effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs against human colon cancer cells*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1994. **3**(5): p. 433-438.
54. Adamson, D.J.A., et al., *Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor- signaling*. Molecular pharmacology, 2002. **61**(1): p. 7-12.
55. Andreassen, H.K., *Effekter av PPAR γ -agonist og NSAIDs i cellelinjer fra coloncancer: medieres effekter av NSAIDs via PPAR γ ?*, 2009, H.K. Andreassen: Oslo.
56. Dugstad, M., *Effekter av PPAR δ -agonist og NSAIDs i cellelinjer fra coloncancer: medieres effekter av NSAIDs via PPAR δ ?*, 2009, M. Dugstad: Oslo.
57. Ellingsen, M., *NSAIDs og beskyttelse mot kreft: COX-avhengige eller COX-uavhengige mekanismer?*, 2010, M. Ellingsen: Oslo. p. 79 s.
58. Fujino H Fau - Chen, X.-b., et al., *Indomethacin decreases EP2 prostanoid receptor expression in colon cancer cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **359**(3): p. 568-573
59. Kambe, A., et al., *Regulation of EP4 expression via the Sp-1 transcription factor: inhibition of expression by anti-cancer agents*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2008. **1783**(6): p. 1211-1219.

60. Kambe, A., et al., *The cyclooxygenase inhibitor sulindac sulfide inhibits EP4 expression and suppresses the growth of glioblastoma cells*. Cancer Prevention Research, 2009. **2**(12): p. 1088-1099.
61. Tietz, N.W., et al., *Tietz fundamentals of clinical chemistry* 2008, St. Louis: Saunders Elsevier. 952.
62. Jacobsen, E., *Elektroforese*, 20.10.11, Store norske leksikon. Hentet fra <http://snl.no/elektroforese>.
63. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. Journal of molecular endocrinology, 2000. **25**(2): p. 169-193
64. Lie, A., *DNA-analyser i diagnostisk patologi*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2000. **120**(5): p. 589-594.
65. Bustin, S. and R. Mueller, *Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis*. Clinical Science, 2005. **109**: p. 365-379.
66. Qiagen Sample & Assay Technologies, *Real-Time PCR Brochure : Critical Factors for Successful Real-Time PCR*. Hentet fra www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=23490. 07/2010.
67. Becker, C., et al., *mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis*. Methods, 2010. **50**(4): p. 237-243.
68. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clinical chemistry, 2009. **55**(4): p. 611-622.
69. Banu, N., et al., *Inhibition of COX 2 with NS 398 decreases colon cancer cell motility through blocking epidermal growth factor receptor transactivation: possibilities for combination therapy*. Cell proliferation, 2007. **40**(5): p. 768-779.
70. Shimada, T., et al., *Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) ligand induced apoptosis in colon cancer cells*. Gut, 2002. **50**(5): p. 658-664
71. Heid, H., et al., *Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases*. Cell and tissue research, 1998. **294**(2): p. 309-321.
72. Tachibana, K., et al., *Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms*. Nuclear Receptor, 2005. **3**(1): p. 3.
73. Jarvis, M.C., T.J.B. Gray, and C.N.A. Palmer, *Both PPAR γ and PPAR δ influence sulindac sulfide-mediated p21WAF1/CIP1 upregulation in a human prostate epithelial cell line*. Oncogene, 2005. **24**(55): p. 8211-8215.
74. He, T.C., et al., *PPAR [delta] is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. cell, 1999. **99**(3): p. 335-345.
75. Seargent, J.M., E.A. Yates, and J.H. Gill, *GW9662, a potent antagonist of PPAR , inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPAR agonist rosiglitazone, independently of PPAR activation*. British Journal of Pharmacology, 2004. **143**(8): p. 933-937.
76. Shi, Y., M. Hon, and R.M. Evans, *The peroxisome proliferator-activated receptor δ , an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(5): p. 2613-2618.