

# Effekter av PPAR $\gamma$ -agonist og NSAIDs i cellelinjer fra coloncancer: Medieres effekter av NSAIDs via PPAR $\gamma$ ?

*Masteroppgave i farmakologi*

**Heidi Krohg Andreassen**



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

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2009

## Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Farmakologisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden juni 2008 – mai 2009. Dagny Sandnes har vært hovedveileder, mens Hege Thoresen har vært internveileder. Jeg vil gjerne takke Dagny for enestående oppfølging gjennom hele arbeidet, både i planlegging og utførelsen av labarbeid og ikke minst i skriveprosessen.

Jeg vil takke Eva Østby, Ellen Johanne Johansen, Renuka Patel, Kristin Meisdalen Müller, John Ødegård, Monica Aasrum, Ingunn Heiene Tveteraas og Kjetil Wessel Andressen for hjelp med det praktiske arbeidet. Takk for at dere har vært tilgjengelig for store og små spørsmål. En takk går også til resten av de ansatte på Farmakologisk Institutt for at dere har bidratt til at jeg har hatt et hyggelig og lærerikt år.

Tusen takk til Marie Dugstad og Arna Teigen for koselig selskap på studentkontoret dette året. En spesiell takk til Marie, som har vært min samarbeidspartner gjennom hele arbeidet med oppgaven. Takk for selskap på laben, nyttige diskusjoner og hjelp med datatekniske problemer.

Til slutt vil jeg takke min familie og mine venner for støtte og motivasjon gjennom hele studietiden.

Oslo, mai 2009

Heidi Krohg Andreassen

---

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>2</b>
<b>INNHOLDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>3</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>10</b>
1.1 KREFT .....	10
1.1.1 Tykktarmskreft.....	11
1.2 IKKE-STEROIDE ANTIINFLAMMATORISKE LEGEMIDLER (NSAIDs) .....	13
1.2.1 <i>Cyklooksxygenase</i> .....	13
1.2.2 <i>PGE<sub>2</sub></i> .....	14
1.2.3 <i>NSAIDs, COX og kreft</i> .....	16
1.2.4 <i>COX-uavhengige mekanismer</i> .....	17
1.3 PEROKSISOM-PROLIFERATOR-AKTIVERTE RESEPTORER (PPARs) .....	19
1.3.1 <i>Interaksjoner mellom PPAR og COX</i> .....	22
1.4 LIGANDENE SOM ER UNDERSØKT I DENNE OPPGAVEN .....	26
1.5 MÅL FOR OPPGAVEN .....	27
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>28</b>
2.1 MATERIALER.....	28
2.1.1 <i>Kjemikalier</i> .....	28
2.1.2 <i>Antistoffer</i> .....	28
2.1.3 <i>Isotop</i> .....	29
2.1.4 <i>Medium</i> .....	29

---

2.1.5	<i>Reagenser til transfeksjon</i> .....	29
2.1.6	<i>Løsninger</i> .....	29
2.2	CELLER OG CELLEDYR KING .....	36
2.2.1	<i>Cellelinjene HT 29 og HCT 116</i> .....	36
2.2.2	<i>Dyrking og splitting av celler</i> .....	36
2.2.3	<i>Telling av celler</i> .....	37
2.3	CELLEFORSØK .....	37
2.3.1	<i>Luciferase Reporter Assay</i> .....	37
2.3.2	<i>Western blotting</i> .....	40
2.3.3	<i>cAMP-assay</i> .....	42
2.3.4	<i>Proteinmåling</i> .....	44
2.4	BEREGNINGER OG STATISTISK ANALYSE.....	45
<b>3.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>46</b>
3.1	METODEUTVIKLING.....	46
3.1.1	<i>Transfeksjon av cellelinjer med PPRE og respons på PPAR<math>\gamma</math>-aktivering</i> .....	46
3.2	EFFEKT AV DE ULIKE LIGANDENE PÅ PPAR $\gamma$ -AKTIVERING MÅLT VED LUCIFERASEASSAY .....	51
3.2.1	<i>Rosiglitazon</i> .....	51
3.2.2	<i>Sulindak, sulindaksulfid og sulindaksulfon</i> .....	53
3.2.3	<i>Indometacin, diklofenak, naproksennatrium og NS 398</i> .....	56
3.3	EFFEKT AV PPAR $\gamma$ -AKTIVERING PÅ PGE <sub>2</sub> -STIMULERT CAMP-AKKUMULERING .....	59
3.3.1	<i>Rosiglitazon og indometacin</i> .....	59
3.3.2	<i>Sulindaksulfid</i> .....	61
3.3.3	<i>Rosiglitazon</i> .....	62

---

3.4	EFFEKT AV PPAR $\gamma$ -AKTIVERING OG NSAIDS PÅ EKSPRESJON AV PTEN, COX-2 OG 15-HYDROKSYPROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE MÅLT VED WESTERN BLOTTING .....	63
3.4.1	<i>PTEN</i> .....	63
3.4.2	<i>COX-2</i> .....	66
3.4.3	<i>15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase</i> .....	68
3.5	CYTOTOKSISITET .....	70
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>72</b>
4.1	METODOLOGISKE ASPEKTER .....	72
4.1.1	<i>Transfeksjon</i> .....	72
4.1.2	<i>Western blotting</i> .....	73
4.2	UTTØVER NSAIDS NOEN AV SINE EFFEKTER VED Å STIMULERE PPAR $\gamma$ ? .....	74
4.3	KAN PPAR $\gamma$ -AKTIVERING REGULERE NIVÅET AV EP2-RESEPTORER? .....	76
4.4	REGULERER PPAR $\gamma$ EKSPRESJON AV PTEN, COX-2 OG 15-HYDROKSYPROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE? .....	79
4.4.1	<i>PTEN</i> .....	79
4.4.2	<i>COX-2</i> .....	81
4.4.3	<i>15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase</i> .....	82
4.4.4	<i>Mikrosomal prostaglandin E syntase-1</i> .....	83
4.5	FORSKJELL PÅ RESPONSER I HT 29 CELLER OG HCT 116 CELLER .....	84
4.6	KONKLUSJON .....	85
	<b>REFERANSER</b> .....	<b>86</b>

## Forkortelser

15-PGDH	15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase
AC	Adenylyl cyklase
Akt/PKB	Protein kinase B
AP-1	Aktivator protein 1
APC	Adenomatøs polyposis coli
cAMP	Adenosin 3',5' cyklisk monofosfat
CBP	cAMP responsivt element (CRE) bindende protein
Cdk	Cyklin-afhængig kinase
COX	Cyklooksygenase
CRE	cAMP responsivt element
ER	Endoplasmatisk retikulum
Erk	Ekstracellulært signal-regulert kinase
FGF	Fibroblast vekstfaktor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
mPGES-1	Mikrosomal prostaglandin E syntase-1
NF-IL-6 RE	Nukleær faktor interleukin-6 responsivt element
NF- $\kappa$ B	Nukleær faktor kappaB
NF- $\kappa$ B RE	Nukleær faktor kappaB responsivt element
NK celler	Natural killer cells
NSAID	Ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel
pAkt	Fosforylert Akt (protein kinase B)

---

PDK1	Fosfoinositid-afhængig proteinkinase 1
PI-3K	Fosfoinositid 3 kinase
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidylinositol 4,5 bisfosfat
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidylinositol 3,4,5 trisfosfat
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandin F <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PPAR	Peroksisom-proliferator-aktivert reseptor
PPRE	Peroksisom-proliferator-responsivt element
PTEN	Fosfatase og tensinhomolog
RXR	Retinoid X reseptor
TCF	T-celle faktor
TXA <sub>2</sub>	Tromboksen A <sub>2</sub>
VEGF	Vaskulær endotelial vekstfaktor

## Sammendrag

Epidemiologiske studier har vist at ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) kan redusere risikoen for å utvikle kreft, spesielt kreft i tykktarm. Mange studier viser at de antiproliferative effektene til NSAIDs ikke kan forklares utelukkende ved inhibering av enzymet cyklooksigenase (COX), da disse effektene også forekommer i celler som ikke uttrykker COX. Mange alternative mekanismer har derfor vært foreslått, blant annet at NSAIDs utøver effekter via peroksisom-proliferator-aktiverede reseptorer (PPARs). Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke ulike NSAIDs med hensyn på aktivitet på PPAR $\gamma$ , i kreftceller isolert fra tykktarm. Det ble også undersøkt om NSAIDs har effekter på ekspresjon av ulike proteiner som i litteraturen er beskrevet å være regulert av PPAR $\gamma$ -agonister, men der det ikke er avklart om dette skyldes en direkte PPAR $\gamma$ -reseptormediert effekt.

Cellelinjene HT 29 og HCT 116 ble transfektert med et PPAR-responsivt-element (PPRE)-konstrukt forbundet med en luciferasereporter. Cellene ble deretter behandlet med rosiglitazon, en anerkjent PPAR $\gamma$ -agonist, og ulike NSAIDs, og reseptoraktivering ble detektert i et luciferaseassay. I tillegg ble ekspresjon av ulike proteiner etter stimulering med PPAR $\gamma$ -agonist og NSAIDs, detektert ved henholdsvis Western blotting og cAMP-assay. Proteinene som ble undersøkt var PTEN, COX-2 og 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH), samt ekspresjon av EP2-reseptorer målt ved PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-produksjon.

Resultatene fra transfeksjonsforsøkene var lite reproducerbare og det var også tydelige tegn på cytotoxicitet ved stimulering med NSAIDs. Sulindakulfid var den eneste liganden som gav en doseavhengig respons på PPAR $\gamma$ -aktivering, imidlertid var de høyeste konsentrasjonene som ble benyttet for øvrig svært cytotoxic. I HT 29 cellelinjen førte stimulering med rosiglitazon og indometacin til redusert ekspresjon av PTEN, mens nivået av PTEN ble svakt oppregulert i HCT 116 cellene. Ekspresjonen av



COX-2 ble oppregulert i HT 29 celler, det samme ble nivået av 15-PGDH i disse cellene. I HCT 116 cellene ble det imidlertid ikke funnet noen endring i ekspresjon av 15-PGDH etter behandling med rosiglitazon og indometacin. Ekspresjon av EP2-reseptorer ble nedregulert ved stimulering med disse ligandene målt ved ett-punktsbestemmelse, mens effekten fremkom enda tydeligere i dose-responsforsøk.

På bakgrunn av funnene i denne oppgaven kan det konkluderes med at NSAIDs kan utøve noen av sine effekter via PPAR $\gamma$ . Det er likevel et faktum at effekter av NSAIDs på PPAR $\gamma$  kun opptrer ved høye konsentrasjoner som tydelig er cytotoksiske. Effekter ved lavere konsentrasjoner kunne ikke detekteres i metodene som er benyttet i denne oppgaven.

# 1. Innledning

## 1.1 Kreft

Kreft er en sykdom som innebærer at normale celler transformeres til celler med ukontrollert celledeling og vekst. Årsaken til slik ukontrollert celledeling er arvelige mutasjoner som gir endringer i kroppens DNA. Disse mutasjonene kan være medfødt eller ervervet, og kan da skyldes ytre miljøfaktorer som stråling, kjemikalier eller virus [1]. Cellenes egenskaper endres dersom mutasjoner fører til at proto-onkogener aktiveres til onkogener, eller at tumorsuppressorgener inaktiveres. Proto-onkogener er gener som normalt kontrollerer celledeling, apoptose og differensiering av celler, men som ved påvirkning utenfra kan konverteres til onkogener. Tumorsuppressorgener har evnen til å undertrykke maligne endringer hos celler. Dersom disse genene endres og mister sin funksjon, kan det utvikles kreft [2].

Man kan skille mellom maligne (ondartede) og benigne (godartede) svulster. Begge formene skyldes ukontrollert cellevekst, mens forskjellen ligger i spredning og invadering av annet vev. Maligne svulster består av kreftceller som vokser uten avgrensning og som derfor kan forflytte seg via blod eller lymfe til andre deler av kroppen og invadere nytt vev. Benigne svulster vokser derimot med en slags kapsel rundt seg som skiller den fra resten av vevet. Dermed vil en slik svulst ikke kunne bevege seg inn i omliggende vev og det er heller ingen fare for spredning [1].

Kreftceller har visse egenskaper som gjør at de skiller seg fra normale celler. Ukontrollert celledeling, dedifferensiering og tap av opprinnelig funksjon, metastase og invasjon i nytt vev, er karakteristisk for kreftceller. Den ukontrollerte celledelingen skyldes at kreftcellene har større delingskapasitet og ikke er regulert av normale prosesser for celledeling og vekst. Mutasjoner kan føre til endringer i mekanismene som styrer

---

apoptose, regulatorer i cellesyklus, vekstfaktorer og deres reseptorer og signalveier. Ved kreft er det også endringer i prosessene som regulerer angiogenese, dannelsen av nye blodårer. For at en tumor skal kunne vokse ut over 1-2 millimeter i størrelse er det avgjørende at den får tilgang på oksygen og næringsstoffer [2]. En kreftsvulst sender ut vekstfaktorer som VEGF (vascular endothelial growth factor/ vaskulær endotelial vekstfaktor) og FGF (fibroblast growth factor/ fibroblast vekstfaktor). Disse aktiverer gener i endotelceller nær tumoren som fører til dannelse av nye kapillærer ut fra de eksisterende blodårene. Kapillærene vokser inn i tumoren, der stimulusen kom fra. På denne måten kan celledelingen fortsette og tumoren vokser i størrelse [3].

Metastaser er sekundære tumorer som dannes ved at kreftcellene har evne til å vokse inn i omliggende vev og forflytte seg til andre deler av kroppen. Normale celler vil ikke kunne bevege seg ut av sitt opprinnelige vev. Dersom dette skjer vil de gjennomgå apoptose. Kreftceller har derimot evne til å skille ut enzymer som bryter ned den ekstracellulære matriksen, noe som fører til at cellene kan vandre ut i omliggende vev. Kreftcellene kan deretter forflytte seg til andre steder i kroppen via blod- og lymfesystemet. Cellene fortsetter å dele seg og det dannes en sekundær tumor. Kreft som metastaserer er ofte assosiert med dårlig prognose [2].

### **1.1.1 Tykktarmskreft**

Tykktarmskreft er den hyppigste kreftformen i fordøyelsessystemet, og nest etter prostatakreft hos menn og brystkreft hos kvinner, utgjør kreft i tykktarm/endetarm den vanligste kreftformen hos begge kjønn. Hvert år rammes i overkant av 2000 personer i Norge av dette, en noe større andel kvinner i forhold til menn. Tykktarmskreft forekommer sjelden før 30-årsalder, og er hyppigst i 60-70-årsalderen [4].

Tykktarmskreft utvikles ofte fra en bestemt type polypper i tarmen. Disse polyppene er en form for utvekster fra slimhinnen, og som regel er slike polypper godartede. De kan

derimot utvikles til ondartede svulster, og ved å fjerne slike utvekster kan man sannsynligvis hindre utvikling av kreft [5]. Det typiske symptomet på tykktarmskreft er endring i avføringsvaner. Dette kan forekomme som friskt blod eller slim i avføringen, diaré eller obstipasjon. Slike symptomer følges ofte av vekttap, buksmerter, tretthet og slapphet [6].

Årsakene til utvikling av kreft i tykktarm er flere. Sykdommen kan være arvelig eller oppstå sporadisk, og enkelte inflammatoriske tarmsykdommer kan øke risikoen for å utvikle kreft. Felles for alle tilfeller av tykktarmskreft er likevel at de er genetisk betinget. Mutasjoner i signalveiene i tarmcellene fører til manglende regulering og kontinuerlig proliferasjon. Over 90 % av krefttilfellene skyldes endringer i APC-signalveien. APC (adenomatøs polyposis coli) er et tumorsuppressorgen, som koder for et stort protein som normalt binder  $\beta$ -catenin i cytosol og dermed regulerer binding av  $\beta$ -catenin til TCF (T-celle faktor) i cellekjernen [7].  $\beta$ -catenin/TCF-komplekset interagerer med DNA og fremmer genekspressjon. Ved mutasjoner i APC-genet vil  $\beta$ -catenin kontinuerlig strømme inn i cellekjernen, øke genekspressjonen og føre til vedvarende celleproliferasjon [5]. Risikoen for å utvikle tykktarmskreft øker med alderen, og andre faktorer som trolig kan assosieres med økt forekomst av sykdommen er høyt fettinntak, fedme, lite fysisk aktivitet, høyt forbruk av alkohol og tobakk, og lavt inntak av fiber, frukt og grønnsaker [4].

Den eneste helbredende behandling av tykktarmskreft er fjerning av den delen av tarmen hvor svulsten sitter, samt tilhørende lymfeknuter [8]. Men hos halvparten av pasientene vil svulsten metastasere, da først og fremst ved spredning til lever, og ofte også til lunger og lymfeknuter. Hos omtrent en tredjedel av de som rammes har svulsten metastasert allerede ved diagnosetidspunktet, mens ytterligere 20 % kommer til å utvikle spredning i sykdomsforløpet. Metastasering er forbundet med dårlig prognose, og det er kun 5 % overlevelse etter fem år hos pasienter med spredning til andre organer [9].

---

## 1.2 Ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs)

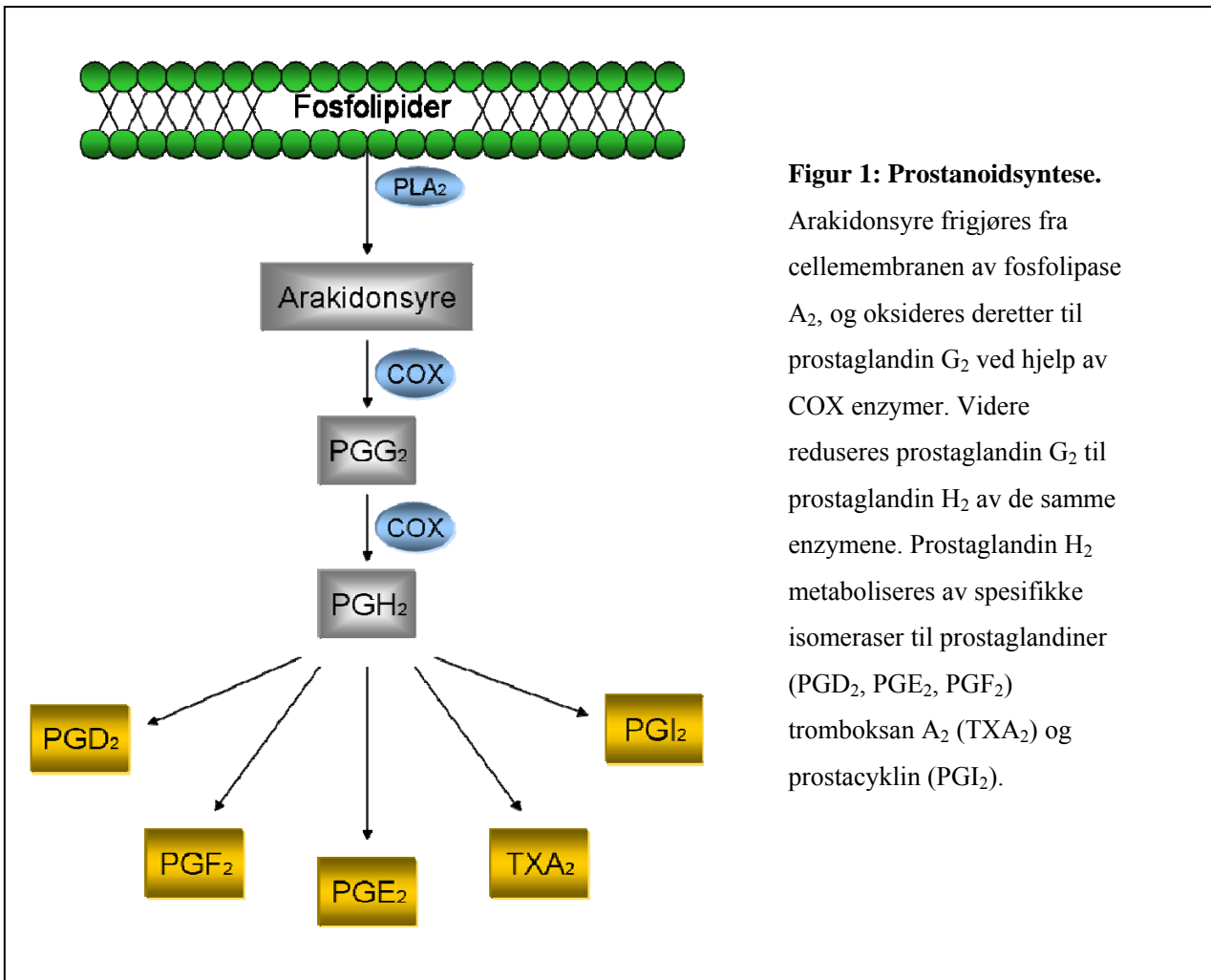
NSAIDs er blant de mest brukte legemidlene verden over. Denne gruppen legemidler har antiinflammatoriske, analgetiske og antipyretiske effekter. NSAIDs utøver sin virkning gjennom hemming av prostaglandinsyntesen, ved å blokkere enzymene cyklooksygenase (COX-1 og COX-2) og dermed hindre dannelsen av forskjellige prostanoider fra arakidonsyre [10].

### 1.2.1 Cyklooksygenase

Cyklooksygenase (COX) enzymer er membran-assosierte proteiner som er lokalisert i endoplasmatisk retikulum (ER) og i kjernemembranen [11]. Disse enzymene er viktige i metabolismen av prostanoider. Syntesen starter med at arakidonsyre frigjøres fra cellemembranen av fosfolipase A<sub>2</sub>. Arakidonsyre oksideres deretter til prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) ved hjelp av COX-enzymene. Videre reduseres prostaglandin G<sub>2</sub> til prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) av de samme enzymene. PGH<sub>2</sub> er ustabil og metaboliseres av spesifikke isomeraser til prostaglandiner (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) og prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) (figur 1) [12].

Det finnes to isoformer av enzymet: COX-1 og COX-2. COX-1 er konstitutivt til stede i de fleste vev og forsyner kroppen med prostanoider som er nødvendig for å opprettholde homeostasen og sørger for normal organfunksjon [4]. Blant annet er COX-1 viktig for dannelsen av prostaglandiner som beskytter mageslimhinnen og for aggregering av blodplater [10]. COX-2 induseres av forskjellige vekstfaktorer, cytokiner og andre inflammatoriske mediatorer ved patologiske tilstander som for eksempel inflammasjon og kreft [11].

Uselektive NSAIDs som hemmer både COX-1 og COX-2, kan gi bivirkninger som økt blødningstendens og økt risiko for magesår og gastrointestinale blødninger, som følge av hemming av COX-1. Selektive COX-2-hemmere gir lavere risiko for magesår og blødninger, men det er derimot vist at disse legemidlene kan øke risikoen for alvorlige kardiovaskulære hendelser, som hjerneslag og hjerteinfarkt [10].



### 1.2.2 PGE<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub> er en av de viktigste metabolittene som dannes i prostaglandinsyntesen.

Hovedoppgavene til PGE<sub>2</sub> er blant annet å beskytte mageslimhinnen mot det sure miljøet i magesekken og å opprettholde normal nyrefunksjon. PGE<sub>2</sub> utøver sine effekter gjennom fire reseptorer EP1, EP2, EP3 og EP4. De er alle transmembrane G-protein koblede reseptorer, men er forbundet med forskjellige intracellulære signalveier og resulterer i

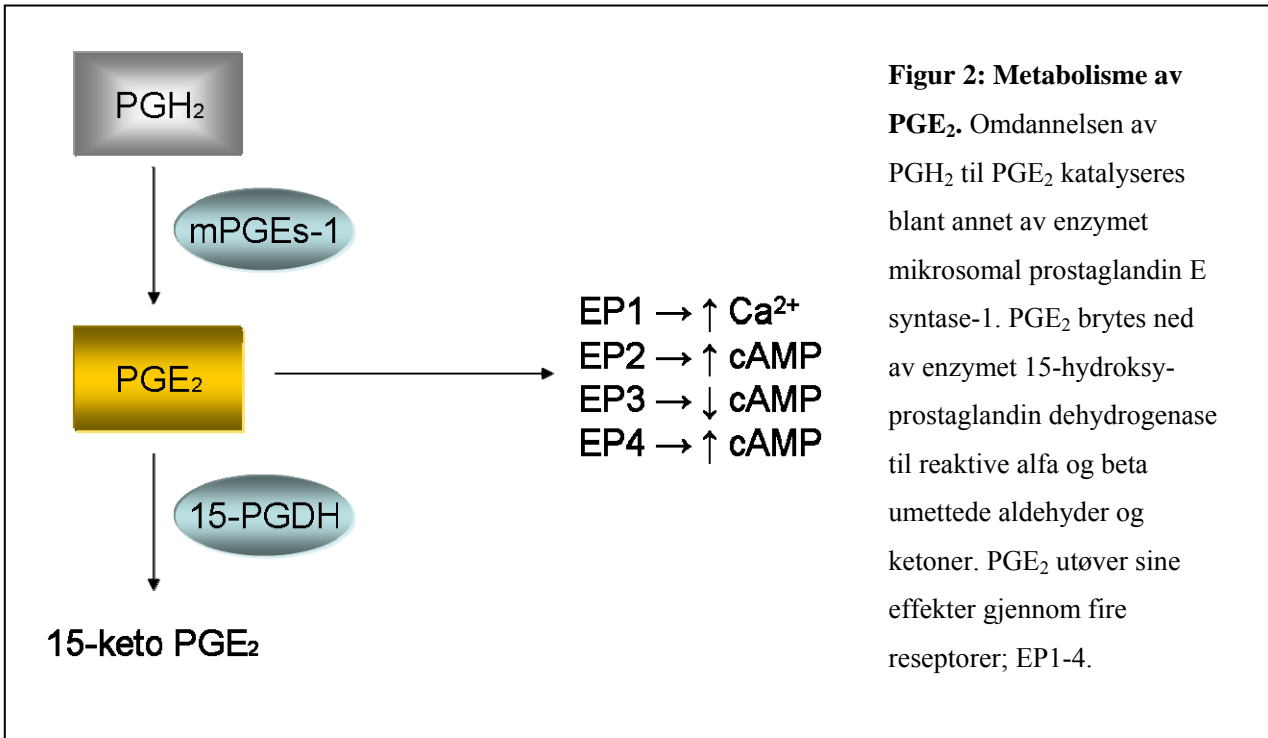
ulike effekter i cellen [13]. Aktivisering av EP1 reseptor medfører en økning i intracellulært kalsium. EP2 og EP4 reseptor bindes til et Gs-protein og ved å stimulere adenylyl cyklase (AC), gir de økt cAMP i cellen. EP3 reseptor finnes i flere isoformer, som både kan redusere og øke intracellulært cAMP, og øke intracellulært kalsium (figur 2) [14].

### *Mikrosomal prostaglandin E syntase-1*

Mikrosomal prostaglandin E syntase-1 (mPGE syntase-1) er et induserbart enzym som katalyserer omdannelsen av PGH<sub>2</sub> til PGE<sub>2</sub>, både ved normale og inflammatoriske tilstander. Aktivisering av PPAR $\gamma$  fører til nedsatt IL-1 $\beta$ -indusert oppregulering av COX-2 og mPGE syntase-1, og dermed redusert PGE<sub>2</sub> [15]. Samtidig viser det seg at mutasjoner i genet som uttrykker mPGE syntase-1, ikke bare reduserer dannelse av PGE<sub>2</sub>. Dette medfører også oppregulering av PPAR $\gamma$ , som igjen kan hindre ekspresjon av COX-2 og mPGE syntase-1 og videre nedsette PGE<sub>2</sub>-produksjon. Enzymet PGE syntase finnes også i to andre varianter, mikrosomal PGE syntase-2 og cytosolisk PGE syntase. Disse synes derimot ikke å være regulert av PPAR $\gamma$  [15].

### *15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase*

15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) er et viktig enzym i prostaglandinmetabolismen, og er involvert i nedbrytningen av biologisk aktive prostaglandiner, blant annet PGE<sub>2</sub>. Produktene som dannes i disse reaksjonene er reaktive alfa og beta umettede aldehyder og ketoner [16]. 15-PGDH har også vært foreslått å være et tumorsuppressorgen. Dersom ekspresjonen av 15-PGDH undertrykkes, kan nedsatt inaktivering av PGE<sub>2</sub> føre til økt vekst av tumor, og studier viser at 15-PGDH ser ut til å være nedregulert i tykktarmskreft. Det er derimot holdepunkter for at enkelte PPAR $\gamma$ -agonister kan oppregulere ekspresjonen av 15-PGDH. Denne effekten kan skyldes en PPAR $\gamma$ -avhengig eller -uavhengig mekanisme, og agonister på PPAR $\gamma$  kan dermed hindre tumorutvikling [17].



### 1.2.3 NSAIDs, COX og kreft

Epidemiologiske studier har vist at regelmessig inntak av NSAIDs over tid kan redusere risikoen for å utvikle kreft, spesielt kreft i tykktarm. Det er også vist at NSAIDs kan ha effekt på kreftutvikling i andre deler av GI-trakt, som for eksempel mage og spiserør, og for utvikling av bryst-, blære- og lungekreft [12, 18].

COX-2-enzymet er overuttrykt ved flere typer kreft [12, 18]. Til tross for at krefttypene som har oppregulert COX-2 varierer i stor grad, korrelerer en slik overuttrykking med mer maligne fenotyper: aggressivt forløp, utvikling av metastaser og dårlig prognose for pasienten [12].

Prostaglandiner regulerer normalt prosesser for cellevekst og celledød, spesielt apoptose, men også angiogenese og celler i immunsystemet. Økt aktivitet av COX og dermed økt



---

dannelse av prostaglandiner kan derfor øke resistens mot apoptose, fremme angiogenese og svekke immunsystemet. Det er først og fremst dannelsen av PGE<sub>2</sub> som er essensielt for tumorutviklingen. Dette prostaglandinet og tilhørende EP-reseptorer uttrykkes i stor grad i tumorer og genererer angiogene og antiapoptotiske faktorer. I tillegg kan PGE<sub>2</sub> blokkere antitumoraktiviteten til lymfocytter, NK-celler (natural killer cells) og makrofager. PGE<sub>2</sub> kan også hemme produksjonen av cytotoksiske lymfokiner og stimulere dannelsen av immunosuppressive lymfokiner. Angiogenese stimuleres ved at PGE<sub>2</sub> øker ekspresjonen av angiogene faktorer som VEGF og FGF. Ved oppregulering av COX-2 fører dette derfor til økt angiogenese. I tumorceller som ikke uttrykker COX-2 har man sett en redusert ekspresjon av VEGF [12].

Etttersom metabolitter fra COX-2 kan fremme tumorutvikling, kan profylaktisk bruk av COX-2-hemmere (både NSAIDs og selektive COX-2-hemmere) dermed begrense videre utvikling av tidlige former for svulster og redusere risikoen for kreft hos pasienter med arvelige mutasjoner. Det viser seg at COX-2 er overuttrykt i både tidlige og sene stadier i utviklingen av en tumor, og enzymet spiller sannsynligvis en viktig rolle gjennom hele prosessen [18].

Studier viser at COX-2-hemmere også reduserer cellevekst i celler som ikke uttrykker COX, noe som tyder på at antitumoraktiviteten i større eller mindre grad også kan opptre gjennom COX-2-uavhengige mekanismer [12].

#### **1.2.4 COX-uavhengige mekanismer**

Mange studier viser at de antiproliferative effektene til NSAIDs og COX-2-hemmere ikke kan forklares utelukkende ved inhibering av enzymet COX, da disse effektene også forekommer i celler som ikke uttrykker COX [19, 20]. I tillegg er det vist at konsentrasjonene av COX-hemmere som skal til for å gi antitumoraktivitet, er 10 til 100 ganger høyere enn konsentrasjonene som er nødvendig for å hemme

prostaglandinsyntesen [7]. Dermed er det sannsynlig at COX-hemmere også kan utøve effekt gjennom COX-uavhengige mekanismer.

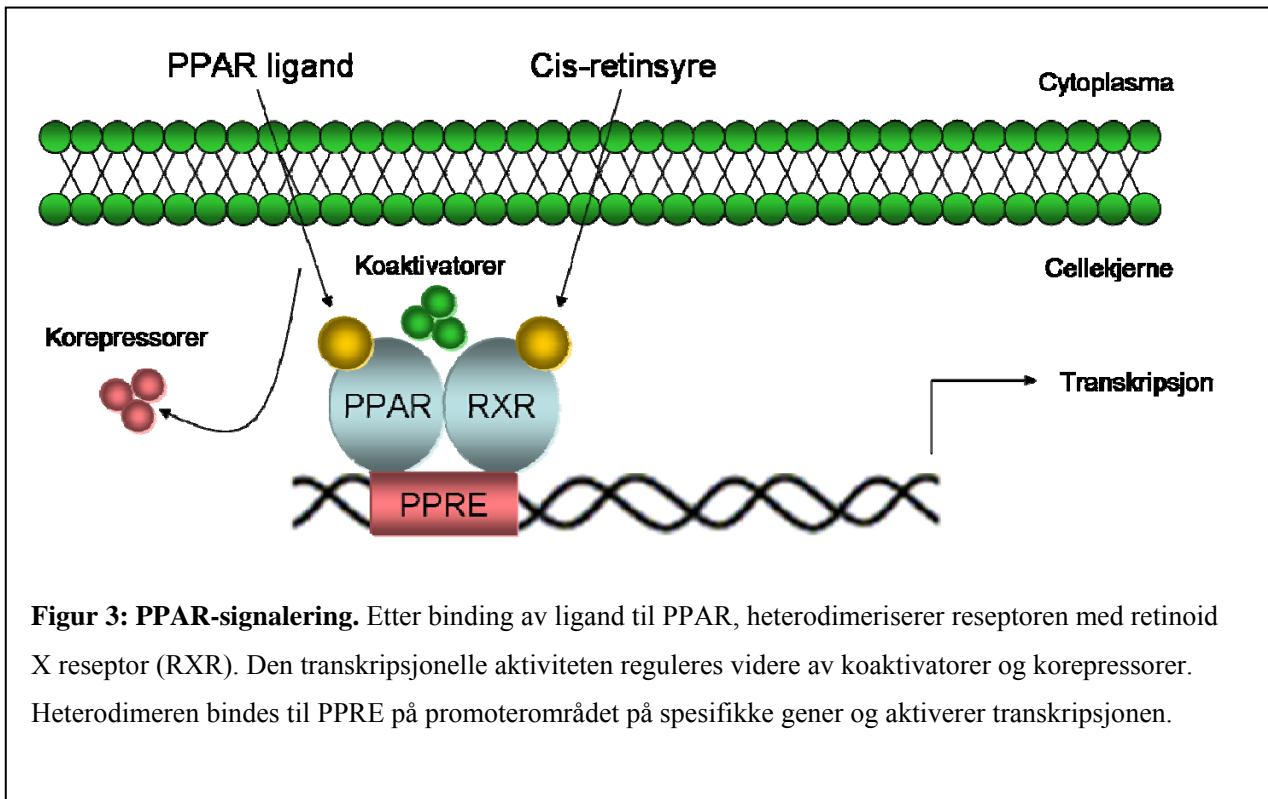
Det er foreslått flere mulige COX-uavhengige mekanismer [19]. NSAIDs er vist å hemme forskjellige transkripsjonsfaktorer som for eksempel NF- $\kappa$ B og AP-1. Disse regulerer gener som induserer apoptose og celleoverlevelse, og som regulerer immunresponsen. NSAIDs kan redusere aktiviteten til transkripsjonsfaktorene direkte, eller via nedstrømssignalveier som fører til endret aktivitet i transkripsjonsfaktorene. NSAIDs kan påvirke MAP kinase kaskaden ved å blokkere aktivitet av Erk-1 og -2, aktivere JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) eller aktivere p38 MAPK. Cykliner og cyklin-avhengige kinaser (Cdk) er ansvarlige for regulering og kontroll av cellyklus, og ved å hemme disse kan NSAIDs gi cellyklusarrest og hindre videre celledeling. Det er imidlertid i liten grad avklart hvordan NSAIDs påvirker aktiviteten av transkripsjonsfaktorer, MAP kinase og cykliner/cyklin-avhengige kinase, og det er nødvendig med flere studier for å kartlegge mekanismene bak dette. I tillegg til overnevnte mekanismer kan NSAIDs også regulere aktiviteten til kjernereseptorene PPAR $\gamma$  og PPAR $\delta$ . Ved å aktivere PPAR $\gamma$  og inhibere PPAR $\delta$ -aktivitet kan NSAIDs indusere apoptose og redusere tumorvekst i kreftceller [19].

Disse COX-uavhengige mekanismene er ikke felles for alle NSAIDs. Forskjellige typer NSAIDs kan virke inn på ulike signalveier, noe som tyder på at strukturelle forskjeller har betydning for stoffenes ulike effekter [19].

### 1.3 Peroxisom-Proliferator-Aktiverte Reseptorer (PPARs)

Peroxisom-proliferator-aktiverte reseptorer (PPARs) er kjernereseptorer, og ble opprinnelig identifisert som reseptorer som induserer peroksisom-proliferasjon og virker inn på lipidmetabolismen ved å regulere cellulære nivåer av fettsyrer og fettsyrederivater [21]. Senere har det blitt vist at PPARs også er viktige for glukose- og kolesterolmetabolismen [22]. PPARs kan regulere celleproliferasjon, differensiering og overlevelse, og man antar at reseptorene har betydning for utviklingen av kreftceller i forskjellige vev [21].

I likhet med andre kjernereseptorer er PPARs ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer og avhengig av binding av ligand for å utøve sin virkning. Reseptorene består av fire hovedområder: A/B-domene (transkripsjonsaktiverende domene), C-domene (DNA-bindende domene), D-domene (bindingsområde for kofaktorer) og E/F-domene (ligandbindende domene) [7, 23]. PPARs heterodimeriserer med reseptorer for *cis*-retinsyre, retinoid X reseptor (RXR) etter binding av ligand, og den transkripsjonelle aktiviteten til heterodimeren reguleres videre av koaktivatorer og korepressorer [7]. Heterodimeren bindes til spesifikke sekvenser kalt peroksisom-proliferator-responsivt element (PPRE) som finnes på promotorområdet på spesifikke gener og aktiverer dermed genekspressjon. Aktivering av PPRE fører til økt transkripsjon av de aktuelle genene og dermed en økning i proteinekspressjonen (figur 3) [24].



**Figur 3: PPAR-signalering.** Etter binding av ligand til PPAR, heterodimeriserer reseptoren med retinoid X reseptor (RXR). Den transkripsjonelle aktiviteten reguleres videre av koaktivatorer og korepressorer. Heterodimeren bindes til PPRE på promoterområdet på spesifikke gener og aktiverer transkripsjonen.

Det finnes tre subtyper av reseptoren: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , og PPAR $\delta$  (også kalt PPAR $\beta$ ).

PPAR $\gamma$  finnes hovedsakelig i brunt og hvitt fettvev og i tykktarm, men også i mindre grad i hjerte, lever, skjelettmuskel og i lymfe. PPAR $\gamma$  uttrykkes i tillegg i endotelceller og i flere typer celler i immunsystemet [21, 23]. Aktivering av PPAR $\gamma$  er vist å gi antikarsinogene effekter, som hemmet proliferasjon og celledeling, stimulering av apoptose og redusert angiogenese. Det er derimot studier som viser at agonister på PPAR $\gamma$  også kan ha prokarsinogene effekter, og dermed øke risikoen for kreft. Disse motsetningene kan forklares med at effektene er vevsspesifikke, og mutasjoner i ulike vev kan forårsake forskjellige effekter [21]. Man antar også at stimulering på PPAR $\gamma$  tidlig i tumorforløpet gir andre effekter i forhold til stimulering etter tumordannelsen [23]. Ulike studier konkluderer med forskjellige resultater, avhengig av om studien er gjort in vivo eller in vitro. Flere studier av cellelinjer fra tykktarmskreft in vitro viser en inhiberende effekt på tumordannelse ved stimulering av PPAR $\gamma$ -agonister. Derimot fastslår andre studier at PPAR $\gamma$ -agonister kan øke tumorveksten in vivo i mus. Det har

---

også betydning for utfallet om konsentrasjonen av liganden som benyttes er høy eller lav. Det ser ut til at høye konsentrasjoner av PPAR $\gamma$ -agonister hemmer tumorvekst, mens lave konsentrasjoner kan øke tumorveksten. Det trengs derfor flere studier på dette området for å kartlegge de ulike effektene av PPAR $\gamma$ -agonister [25]. Det er i tillegg holdepunkter for at agonister på PPAR $\gamma$  kan ha reseptor-uavhengige mekanismer. Studier har vist at effekter av PPAR $\gamma$ -ligander ikke ble blokkert ved tilføring av en PPAR $\gamma$ -antagonist. Det er også vist at enkelte PPAR $\gamma$ -agonister gir effekter som ikke er generelle for hele denne gruppen av PPAR $\gamma$ -ligander, dette taler også for en reseptor-uavhengig mekanisme [26]. Ved aktivering av PPAR $\gamma$  er det holdepunkter for at det som regel er antikarsinogene effekter som dominerer, og utfallet er redusert risiko for kreft og nedsatt tumordannelse i de fleste vev [21]. Nedsatt ekspresjon av PPAR $\gamma$  assosieres med økt tumordannelse i for eksempel tykktarm, og aktivering av PPAR $\gamma$  fører til hemmet cellevekst i humane cellelinjer isolert fra tykktarmskreft [27]. PPAR $\gamma$  er også viktig for utvikling av fettvev ved å indusere den terminale differensieringen av preadipocytter til adipocytter. I tillegg regulerer PPAR $\gamma$  kroppens respons på insulin [28]. Glitazoner (tiazolidindioner) er PPAR $\gamma$ -agonister med hypoglykemiske effekter, og brukes klinisk i behandlingen av diabetes type 2 [21].

PPAR $\delta$  uttrykkes i de fleste vev i kroppen, med høyeste nivå i tarm, nyre, hjerne og hjerte. PPAR $\delta$ s rolle og funksjon er mindre kjent, men man antar at reseptoren er involvert i lipidmetabolismen og ved inflammatoriske responser [7]. Det viser seg også at reseptoren er viktig for cellefunksjoner som adhesjon, proliferasjon, differensiering og celleoverlevelse. Studier viser at aktivering av PPAR $\delta$  medfører økt celleoverlevelse og migrasjon, og i tillegg reduserer apoptose [21]. Det er også vist at PPAR $\delta$  er overuttrykt i noen typer kreft, noe som fører til induert cellevekst og proliferasjon [7].

PPAR $\alpha$  uttrykkes i stor grad i lever og i brunt fettvev, men finnes også i nyre, hjerte, tarm, pankreas og skjelettmuskel [21]. Denne reseptoren regulerer transkripsjonen av gener som er involvert i lipidmetabolismen. Fettsyrer som frisettes fra fettvevet tas opp i lever hvor PPAR $\alpha$  aktiveres og videre medfører fettsyreoksidasjon [28]. Hovedoppgaven til

PPAR $\alpha$  er dermed å regulere energihomeostasen. Fibrater er agonister på PPAR $\alpha$ , og brukes mot dyslipidemi [21].

### 1.3.1 Interaksjoner mellom PPAR og COX

Det er i den senere tid vist flere mulige interaksjonsmekanismer mellom COX og PPAR. De fleste prostaglandinene som dannes i COX-signalveien skilles ut fra cellen og utøver sin effekt ved å bindes til overflatereseptorer. Det finnes imidlertid holdepunkter for at noen prostaglandiner virker ved å bindes til kjernereseptorer, som for eksempel PPARs. Dette ser ut til å ha sammenheng med at de to isoformene av COX er noe forskjellige, ikke bare i struktur, men også med tanke på lokalisering i cellen. COX-1 finnes hovedsakelig i endoplasmatisk retikulum (ER) og danner prostaglandiner som transporteres ut av cellen og bindes til overflatereseptorer. COX-2 er derimot primært lokalisert i kjernemembranen, hvor enzymet produserer såkalte ”cyclopentenone prostaglandiner” eller 2.generasjonsprostaglandiner (for eksempel 15-deoksy PGJ<sub>2</sub>) som er produkter av de første prostaglandinene som dannes fra PGH<sub>2</sub>. Disse cyclopentenone prostaglandinene antas å bindes til kjernereseptorer [11].

Det er flere regulatoriske områder på COX-2-promoter som PPAR $\gamma$  kan interferere med og dermed føre til endring i ekspresjon av COX-2. Aktivisering av PPAR $\gamma$  medfører binding til PPRE [29]. Nå er det ikke endelig avklart om det finnes PPRE i COX-2-promoter, eller om PPAR $\gamma$ -agonister kun interagerer med andre regulatoriske områder på COX-2-promoter. Blant disse er CRE (cAMP responsivt element), NF- $\kappa$ B RE og NF-IL-6 RE [30]. PPAR $\gamma$ -aktivisering kan hemme Akt og dermed føre til redusert NF- $\kappa$ B aktivitet. Nedsatt Akt-aktivitet kan skyldes økt ekspresjon av PTEN [31], eller økt aktivitet av PTEN [30]. Det er i tillegg indikasjoner for at det finnes PPRE på promoterområdet til PTEN-genet [31], noe som tyder på at det er en sammenheng mellom aktivisering av PPAR $\gamma$ , økt ekspresjon av PTEN, hemmet Akt og redusert NF- $\kappa$ B. PPAR $\gamma$ -ligander kan også nedregulere COX-2-ekspresjon ved å hemme AP-1 binding til CRE [32, 33]. Mekanismen bak dette er hemming av c-Jun ekspresjon og konkurranse

---

om binding til CBP (CRE bindende protein). Dette fører til at mindre AP-1 kan bindes til CBP og aktivere CRE, slik at resultatet er redusert COX-2-ekspressjon. Selv om det er vist at PPAR $\gamma$ -ligander kan nedregulere COX-2-ekspressjon i for eksempel livmorhalskreft [32], viser andre studier at PPAR $\gamma$  ligander kan oppregulere ekspressjon av COX-2 i enkelte kreftceller fra tykktarm. Dette tyder på at interaksjonen mellom PPAR $\gamma$  og COX-2 er vevsspesifikk og ikke kan sees under ett, men avhenger av hvordan COX-2 er regulert i ulike celler [34].

Selv om NSAIDs' virkningsmekanisme er å hemme COX-aktivitet, er det også vist at noen NSAIDs kan øke transkripsjonen av COX-2 [34]. Årsaken til denne økningen i transkripsjon av COX-2 kan tenkes å være en feedbackmekanisme for å kompensere for nedsatt COX-aktivitet. Det er imidlertid flere holdepunkter som taler imot en slik mekanisme. For det første nedreguleres ikke COX-2-ekspressjonen ved å tilføre eksogent PGE<sub>2</sub>. For det andre har ikke NSAIDs noen effekt på COX-1-ekspressjonen. Dersom hypotesen om en feedbackmekanisme stemte, ville uselektive NSAIDs også gitt en økning av ekspressjonen av COX-1. Og for det tredje gir ikke forskjellige NSAIDs lik oppregulering av COX-2, selv om de alle hemmer COX-aktivitet i samme grad [29]. Dette tyder på at NSAIDs øker COX-2-ekspressjonen via en prostanoid-uavhengig mekanisme. Det er vist at NSAIDs regulerer genekspressjon ved å aktivere PPAR, som igjen bindes til regulerende områder på COX-2-promoter som nevnt tidligere [29]. I tillegg ser man en sammenheng mellom grad av økning i COX-2-ekspressjon og affinitet til PPAR, noe som også taler for en prostanoid-uavhengig mekanisme for NSAIDs. Selv om NSAIDs både hemmer COX-aktivitet og øker transkripsjonen av COX-2, vil den inhiberende effekten trolig overgå økningen i enzyemmengde, slik at økt ekspressjon ikke har noen klinisk betydning [34].

Selektive COX-2-hemmere antas å interferere med PPAR $\gamma$  på flere måter. COX-2-hemmere kan redusere PPAR $\gamma$ -aktivitet ved å nedsette produksjonen av cyclopentenone prostaglandiner. Mindre cyclopentenone prostaglandiner kan dermed bindes til PPAR $\gamma$ . COX-2-hemmere kan på en annen side stimulere PPAR $\gamma$ -aktivitet. Hemming av COX-2

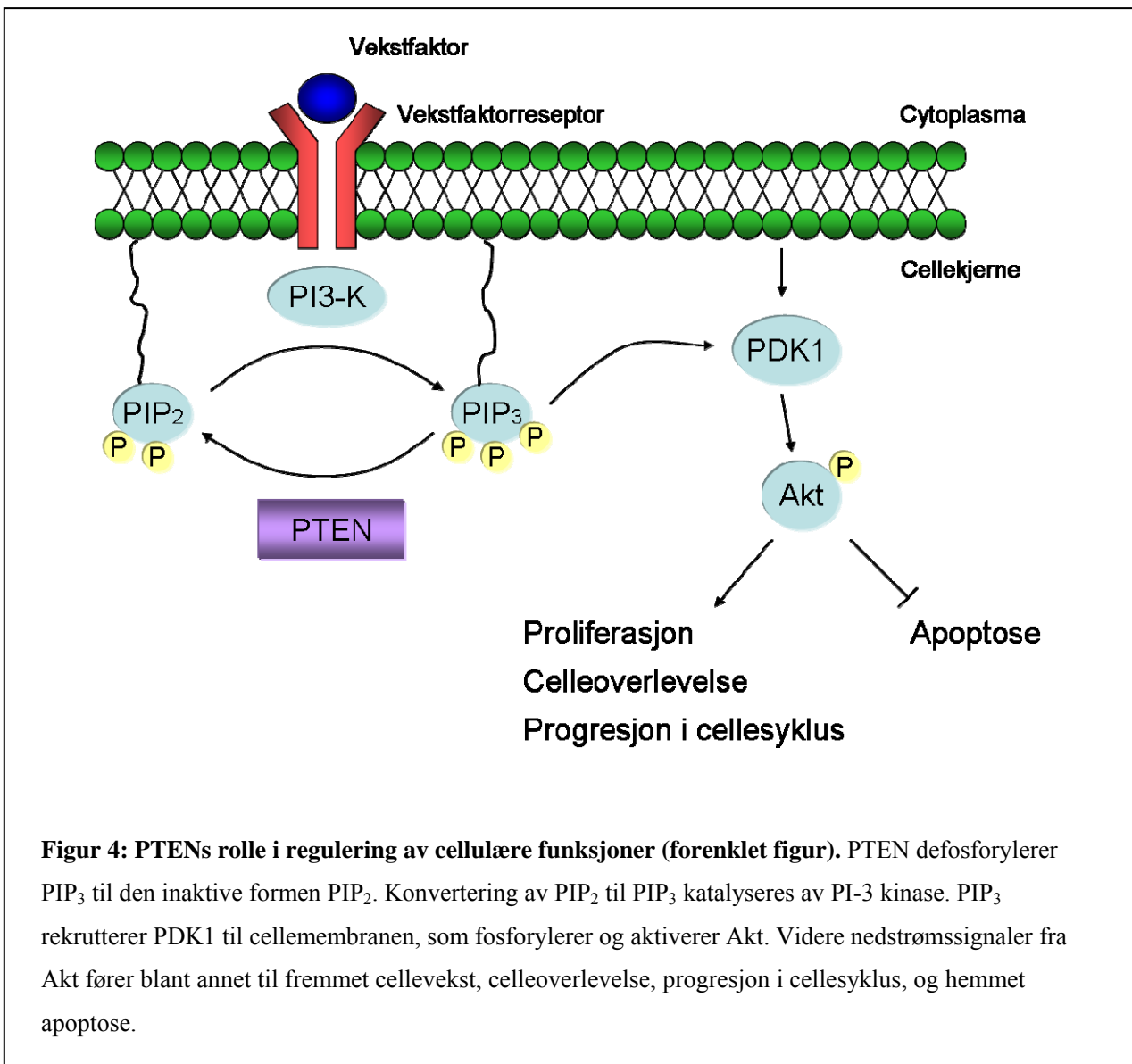
kan føre til opphopning av arakidonsyre, og arakidonsyre kan i seg selv aktivere PPAR $\gamma$ . Samtidig kan PPAR $\gamma$  som sagt interagere med COX-2-promoter, øke COX-2-ekspressjonen, som igjen fører til økt dannelse av cyclopentenone prostanoider som kan aktivere PPAR $\gamma$ . COX-2-hemmere og NSAIDs generelt kan også direkte aktivere PPAR $\gamma$  gjennom en COX-uavhengig mekanisme [11].

COX-2-hemmere kan hypotetisk sett dermed både stimulere og redusere PPAR $\gamma$ -aktivitet. Den totale effekten av dette er avhengig av balansen mellom disse prosessene. Et viktig moment er selvfølgelig også om cellene uttrykker COX-2. Noen kreftsvulster uttrykker ikke COX-2, blant annet visse typer pankreaskreft [11] og brystkreft [35]. Effekten til COX-2-hemmere vil i slike tilfeller uttøves via en COX-uavhengig mekanisme [11].

## **PTEN**

PTEN (phosphatase and tensin homolog) er et tumorsuppressorgen og blant de vanligste muterte genene ved kreft [36]. PTEN regulerer cellulære funksjoner som celledifferensiering, proliferasjon og celleoverlevelse. PTEN virker hovedsakelig ved å defosforylere PIP<sub>3</sub> (fosfatidylinositol 3,4,5 trisfosfat) til den inaktive formen PIP<sub>2</sub> (fosfatidylinositol 4,5 bisfosfat). Den motsatte reaksjonen, det vil si konvertering av PIP<sub>2</sub> til PIP<sub>3</sub>, katalyseres av PI-3 kinase (fosfoinositid 3-kinase). PIP<sub>3</sub> rekrutterer PDK1 til cellemembranen, og PDK1 fosforylerer og aktiverer Akt (også kalt PKB). Videre nedstrømssignaler fra Akt fører blant annet til fremmet cellevekst og celleoverlevelse (figur 4) [36]. Det er vist at aktivering av PPAR $\gamma$  induserer ekspressjonen av PTEN i forskjellige kreftceller, blant annet kreftceller fra pankreas [37] og tykktarm [38]. PPAR $\gamma$  antas å regulere PTEN ved å binde til PPRE på promoter i PTEN-genet [31], det trengs imidlertid flere studier for å bekrefte dette.





**Figur 4: PTENs rolle i regulering av cellulære funksjoner (forenklet figur).** PTEN defosforylerer PIP<sub>3</sub> til den inaktive formen PIP<sub>2</sub>. Konvertering av PIP<sub>2</sub> til PIP<sub>3</sub> katalyseres av PI-3 kinase. PIP<sub>3</sub> rekrutterer PDK1 til celledmembranen, som fosforylerer og aktiverer Akt. Videre nedstrømssignaler fra Akt fører blant annet til fremmet celledvekst, celleoverlevelse, progresjon i cellyklus, og hemmet apoptose.

## 1.4 Ligandene som er undersøkt i denne oppgaven

### *Rosiglitazon*

Rosiglitazon er et tiazolidindion som brukes klinisk i behandlingen av diabetes type 2. Den er en agonist på PPAR $\gamma$ , med høy affinitet [39]. Rosiglitazon er vist å oppregulere PTEN [40], og kan i tillegg redusere nivået av PGE<sub>2</sub> i lungekreftceller ved å øke 15-PGDH, trolig via en PPAR $\gamma$ -uavhengig mekanisme [17].

### *Indometacin*

Indometacin er et NSAID i eddiksyrederivatgruppen, og en svært potent PPAR $\gamma$ -aktivator [40-42]. Indometacin er vist å nedregulere ekspresjonen av EP2-reseptor i tykktarmskreftceller, ved en COX-uavhengig mekanisme, trolig via aktivering av PPAR $\gamma$  [43]. Studier utført på tykktarmskreftceller viser at denne liganden har antiproliferative effekter, men det er ikke avklart om dette er en effekt som har sammenheng med indometacins evne til å aktivere PPAR $\gamma$  [44].

### *Sulindak*

Sulindak er et NSAID som i likhet med indometacin er av gruppen eddiksyrederivater. Sulindak er et prodrug som omdannes til metabolittene **sulindaksulfid** og **sulindaksulfon** in vivo, hvor kun den førstnevnte er biologisk aktiv med hensyn på COX-hemming. Begge metabolittene er vist å være agonister på PPAR $\gamma$  [45, 46], i likhet med sulindak som også er en PPAR $\gamma$ -agonist [47].

### *Diklofenak*

Diklofenak er et NSAID og er klassifisert som et eddiksyrederivat, i likhet med overnevnte NSAIDs. Liganden er beskrevet å fungere som en partiell PPAR $\gamma$ -agonist i nyreceller isolert fra ape [48].

---

### *Naproksennatrium*

Naproksennatrium er et NSAID i gruppen propionsyrederivater, og er vist å være en agonist på PPAR $\gamma$  [49]. Studier av naproksennatrium utført på lungekreftceller fra rotte, viser at liganden har antiproliferative effekter [50].

### *NS 398*

NS 398 (*N*-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)-methanesulfonamide) er en selektiv COX-2-hemmer. NS 398 er ikke vist å aktivere PPAR $\gamma$  i studier av tykktarmskreftceller [51], men har derimot antiproliferative effekter i de samme cellene ved å hemme transaktivering av EGF-reseptor [52].

## 1.5 Mål for oppgaven

Epidemiologiske studier har vist at NSAIDs kan redusere risikoen for å utvikle kreft, spesielt kreft i tykktarm [12]. Mange studier viser at de antiproliferative effektene til NSAIDs ikke kan forklares utelukkende ved inhibering av enzymet COX, da disse effektene også forekommer i celler som ikke uttrykker COX [19, 20]. Mange alternative mekanismer har derfor vært foreslått, blant annet at NSAIDs utøver effekter via PPARs [19].

Målet med oppgaven var derfor å undersøke ulike NSAIDs med hensyn på aktivitet på PPAR $\gamma$ , i kreftceller isolert fra tykktarm. Underveis i arbeidet med oppgaven ble det i tillegg besluttet å undersøke om NSAIDs har effekter på ekspresjon av ulike proteiner som i litteraturen er beskrevet å være regulert av PPAR $\gamma$ -agonister, men der det ikke er avklart om dette skyldes en direkte PPAR $\gamma$ -reseptormediert effekt.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

#### 2.1.1 Kjemikalier

- 30% Acrylamide/BIS Solution, ammoniumpersulfat (APS), N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED), Tween-20 fra **BIO-RAD Laboratories (Hercules, CA, USA)**
- Indometacin, natriumdodecylsulfat solution (SDS), glycerol, mercaptoetanol, ponceau S oppløsning, eddiksyreanhydrid, naproksennatrium, sulindaksulfid, sulindaksulfon, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dimetylsulfoksid (DMSO), adenosine 3',5' cyklisk monofosfat (cAMP) fra **Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA)**
- Tris hydroksymetylaminometan (TRIS) fra **Calbiochem (San Diego, CA, USA)**
- Glycine, trietylamin fra **Merck (Darmstadt, Tyskland)**
- Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), rosiglitazon, diklofenak, sulindak, NS-398 fra **Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)**
- GW9662 fra **Biomol International (Plymouth Meeting, PA, USA)**
- Opti-Fluor<sup>®</sup> fra **PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA)**
- Coomassie<sup>®</sup> Plus Protein Assay Reagent fra **Interchim (Montlucon, Frankrike)**
- Odyssey Infrared Imaging system blocking buffer fra **Li-Cor Biosciences (Cambridge, England)**
- Rainbow Full Range Marker til immunoblot fra **GE Healthcare (Sverige)**

#### 2.1.2 Antistoffer

- PTEN Rabbit monoklonalt antistoff, GAPDH Rabbit monoklonalt antistoff fra **Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)**
- Donkey anti-rabbit antistoff, donkey anti-mouse antistoff, donkey anti-goat antistoff fra **Li-Cor Biosciences (Cambridge, England)**
- COX-2 Mouse monoklonalt antistoff, COX-2 (human) Western ready control, Prostaglandin E Synthase -1 (microsomal) Rabbit monoklonalt antistoff, 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase Rabbit polyklonalt antistoff fra **Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)**
- Antistoff mot adenosine 3',5' cyklisk monofosfat (cAMP) var egenprodusert på **Farmakologisk Institutt (Oslo) [53]**

### 2.1.3 Isotop

- Isotop:[2,8-3H] adenosine 3',5' cyklisk monofosfat (cAMP) (38 Ci/mmol) fra **NEN Radiochemical (New England, UK)**

### 2.1.4 Medium

- Dulbecco's modified Eagle's medium, Pen-Strep (10 000 enheter/mL penicillin, 10 000 µg/mL streptomycin) fra **Gibco (Grand Island, NY, USA)**
- Trypsin/EDTA (170 000 enheter trypsin/L, 200 mg/L EDTA) fra **Lonza LTD (Sveits)**
- OptiMEM Gibco™ fra **Invitrogen (Grand Island, NY, USA)**

### 2.1.5 Reagenser til transfeksjon

- Lipofectamine 2000 Reagent fra **Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)**
- Luciferaseassay kit, renilla luciferase (pGL4.74) fra **Promega (Madison, WI, USA)**
- PPRE-konstruktet (PPREx3-TK-LUC) var en gave fra **Dr. Ron M. Evans (Salk Institute, La Jolla, CA, USA) [54]**

Alle andre kjemikalier var av analytisk kvalitet.

### 2.1.6 Løsninger

#### Løsninger til Western blotting

1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8	
TRIS	18,15 g
MQ vann	til 100 mL
pH justeres med konsentrert HCl	

<b>0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8</b>	
TRIS	6 g
MQ vann	til 100 mL
pH justeres med konsentrert HCl	

<b>Samplebuffer</b>	
SDS 10 %	40 mL
Glycerol	20 mL
TRIS/HCl 0,5 M, pH 6,8	25 mL

<b>Laemmlibuffer</b>	
Samplebuffer	300 $\mu$ L
Merkaptoetanol	30 $\mu$ L
Bromfenolblått	15 $\mu$ L

<b>Elektroforesebuffer 5 x</b>	
TRIS	15 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
MQ vann	til 1000 mL
pH justeres med sterk saltsyre til 8,3	

<b>Elektroforesebuffer</b>	
Elektroforesebuffer 5 x	80 mL
MQ vann	320 mL

<b>Transferbuffer 10 x</b>	
TRIS	30,3 g
Glycine	144,0 g
MQ vann	til 1000 mL
pH skal ligge mellom 8,1 og 8,3	

<b>Transferbuffer</b>	
Transferbuffer 10 x	100 mL
Metanol	100 mL
MQ vann	800 mL

<b>TBS 10 x, pH 7,6</b>	
TRIS	12,1 g
NaCl	58,4 g
MQ vann	til 1000 mL

<b>TBS</b>	
TBS 10 x	100 mL
MQ vann	900 mL

<b>TTBS</b>	
Tween-20	500 $\mu$ L
TBS	1000 mL

<b>BLOTTO</b>	
Tørrmelkspulver	5 g
TTBS	til 100 mL

<b>Ammoniumpersulfat (APS) 10 %</b>	
APS	100 mg
MQ vann	til 1 mL

<b>Separasjonsgel 10 %</b>	
MQ vann	1,9 mL
30 % acrylamide mix	1,7 mL
1,5 M TRIS (pH 8,8)	1,3 mL
10 % SDS	50 $\mu$ L
10 % ammoniumpersulfat	50 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L



<b>Separasjonsgel 15 %</b>	
MQ vann	1,1 mL
30 % acrylamide mix	2,5 mL
1,5 M TRIS (pH 8,8)	1,3 mL
10 % SDS	50 $\mu$ L
10 % ammoniumpersulfat	50 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L

<b>Stackinggel 5 %</b>	
MQ vann	680 $\mu$ L
30 % acrylamide mix	170 $\mu$ L
0,5 M TRIS (pH 6,8)	130 $\mu$ L
10 % SDS	10 $\mu$ L
10 % ammoniumpersulfat	10 $\mu$ L
TEMED	1 $\mu$ L

### Løsninger til cAMP-assay

<b>Stock-løsninger til Krebs-Ringer løsning A</b>	
NaCl	45g/L
KCl	5,75 g/100 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,55 g/100 mL
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	19,1 g/100 mL
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,08 g/100 mL

<b>Krebs-Ringer løsning A</b>	
NaCl (142 mM)	201,4 mL
KCl (3,53 mM)	5 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,83 mM)	4 mL
MgSO <sub>4</sub> (1,41 mM)	2 mL
CaCl <sub>2</sub> (2,32 mM)	4,6 mL
H <sub>2</sub> O	873 mL

<b>Krebs-Ringer Hepes buffer</b>	
Glukose 15 mM	0,38 g
Hepes 154 mM	21 mL
Krebs-Ringer løsning A	218 mL
pH justeres med NaOH til 7,4	
Endelig konsentrasjon i KRH-buffer:	
NaCl (119 mM)	
KCl (2,96 mM)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,37 mM)	
MgSO <sub>4</sub> (1,18 mM)	
CaCl <sub>2</sub> (1,95 mM)	
Hepes (24,9 mM)	

<b>Krebs-Ringer Hepes buffer m/ IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) (2 mM)</b>	
IBMX	13,4 mg
Krebs-Ringer Hepes buffer	30 mL

<b>Acetyleringsreagens</b>	
Eddiksyreanhydrid	0,4 mL
Trietylamin	1,0 mL

<b>Mettet ammoniumsulfat</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	322 g
H <sub>2</sub> O	til 1000 mL

<b>Antistoffbuffer</b>	
Bovin serum albumin	0,2 g
Gammaglobulin	0,04 g
Natriumacetat 100 mM, pH 6,2	50 mL
H <sub>2</sub> O	50 mL

<b>Isotop</b>	
<sup>3</sup> H cAMP 3 nM	480 µL
Natriumacetat 100 mM, pH 6,2	til 11,52 mL

## 2.2 Celler og celledyrking

### 2.2.1 Cellelinjene HT 29 og HCT 116

Cellelinjene HT 29 og HCT 116 er begge isolert fra humane tykktarmskreftsvulster.

HT 29 cellelinjen har en mutasjon i genet p53, som er et tumorsuppressorgen. Dette genet er viktig for kontroll og regulering av celledyklus, og en mutasjon i dette genet kan føre til videre celledeling selv om DNA er skadet [55]. HT 29 celler har også en mutasjon i et annet tumorsuppressorgen, APC (adenomatøs polyposis coli), noe som fører til utvikling av tykktarmskreft [56]. Denne cellelinjen uttrykker i høy grad PPAR $\gamma$  [57] og COX-2-protein [52, 58]. I tillegg har HT 29 celler også ekspresjon av EP2-reseptor. I dette laboratoriet er det tidligere gjort forsøk som viste at HT 29 cellene nesten utelukkende inneholdt EP2-reseptor, framfor de tre andre EP-reseptorene (upublisererte data).

HCT 116 cellelinjen har et normalt APC-gen [59], men har derimot en mutasjon i Ras-genet. Denne mutasjonen fører til en konstitutiv aktivering av Ras og dermed økt celleproliferasjon [60]. HCT 116 celler uttrykker også i høy grad PPAR $\gamma$  [51], men har i motsetning til HT 29 celler ikke ekspresjon av COX-2 [52, 58]. HCT 116 cellelinjen uttrykker reseptorene EP2 og EP4, fortrinnsvis mer av EP4 i forhold til EP2 [52].

### 2.2.2 Dyrking og splitting av celler

Cellene ble dyrket i 75 cm<sup>2</sup> Costar-flasker ved 37°C i DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), tilsatt 10 % hesteserum (mycoplasma-screenet), 100 units/mL Pen-Strep (penicillin, streptomycin) og 2 mM glutamin. Ved splitting ble cellene først vasket to ganger med sterilt saltvann, og deretter tilsatt 2 mL trypsin/EDTA for å løsne cellene fra flasken. Cellene ble inkubert i varmeskap i ½-1 minutt (noe lenger for HT 29 cellene), før de ble tilsatt 9 mL medium for å nøytralisere trypsinet. Cellesuspensjonen ble så overført til rør, og videre sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm. Mediet ble helt av og

---

cellepelleten resuspendert i 1 ½-2 mL medium. Deretter ble cellene sådd ut i Costar-brett eller Corning-skåler for videre celleforsøk.

### 2.2.3 Telling av celler

Cellene ble telt i mikroskop ved hjelp av Bürcher-kammer. Cellesuspensjonen ble først fortynnet 1:5, for å unngå for høy celletetthet under telling. Deretter ble en dråpe cellesuspensjon avsatt under dekkglasset på Bürcher-kammeret, og det ble telt celler i tre store telleruter (tilsvarer 0,1 µL per rute). Gjennomsnittet av de tre celletallene ble multiplisert med 5, og videre multiplisert med  $10^4$  for å få antall celler per mL.

## 2.3 Celleforsøk

### 2.3.1 Luciferase Reporter Assay

#### *Prinsipp for analysen*

For å undersøke ligandaktivering av reseptoren PPAR $\gamma$  ble det benyttet et såkalt Dual Luciferase Reporter Assay. Prinsippet innebærer transfeksjon av ønskede regulatoriske elementer inn i cellene som skal studeres, ved hjelp av plasmid DNA transfeksjon. DNA som ble transfektert inn var PPRE (peroksisom-proliferator-responsivt element) og Renilla. Binding av ligand til PPAR $\gamma$  fører til aktivering av PPRE. Denne aktiveringen medfører uttrykking av et luciferasegen (luc) fra ildflue som sitter i samme plasmid. Når dette enzymet reagerer med luciferin (kjemikalium) genereres lys som kan detekteres i et luminometer. Renilla er en vektor som uttrykker genet renilla luciferase, og som i prinsippet aktiveres i alle celler som er transfektert, uavhengig om cellene er stimulert av ligand eller ikke. Renilla brukes derfor for å justere for cellevariasjon og transfeksjonseffektivitet.

I analysen benyttes reagensene LAR (Luciferase Assay Reagens) og Stop&Glo-reagens. Først måles luminescens fra ildflue luciferase, ved at cellene eksponeres for LAR. Deretter tilsettes Stop&Glo-reagens, som stopper reaksjonen med LAR og videre genererer luminescens fra renilla luciferase. Signalene som registreres kan dermed benyttes til å beregne grad av reseptoraktivering.

GFP (green fluorescent protein) ble også brukt for å undersøke transfeksjonseffektiviteten i de samme cellene. Dette proteinet lyser grønt når det blir belyst med blått lys. Man kan dermed se med det blotte øye antall celler som er transfektert.

### *Dyrking av celler*

Cellene ble sådd ut i 96-brønners Costar-brett, med forskjellige celledettheter, henholdsvis 30 000, 40 000, 50 000 og 75 000 celler pr. brønn. Cellene ble deretter inkubert med serumholdig medium (10 % serum) i et døgn før de ble transfektert.

### *Plasmid DNA Transfeksjon*

Det ble forsøkt to forskjellige metoder for transfeksjon av DNA:

**Metode 1:** Lipofectamine og OptiMEM ble blandet sammen og ble stående 5 minutter i romtemperatur. Lipofectamine er et transfeksjonsreagens som har til hensikt å få DNA lettere inn i cellene. Deretter ble DNA (PPRE og Renilla) tilsatt og løsningen ble stående 20 minutter i romtemperatur. Mediet i brønnene ble fjernet og 70  $\mu$ L nytt medium (uten penicillin/streptomycin) og 30  $\mu$ L av DNA-blandingen ble tilsatt i hver brønn. Det ble forsøkt forskjellige serumkonsentrasjoner i mediet under transfeksjonen, henholdsvis

---

serumfritt medium, og medium med 0,1 %, 1 % og 10 % serum. Cellebrettet ble deretter inkubert ved 37°C over natt.

**Metode 2:** Lipofectamine og DNA (PPRE og Renilla) ble blandet med OptiMEM hver for seg, og ble stående 5 minutter i romtemperatur. De to løsningene ble deretter blandet sammen og ble stående i 20 minutter i romtemperatur. Mediet i brønnene ble fjernet og 100 µL av DNA-løsningen ble tilsatt i hver brønn. Cellebrettet ble inkubert i 5 timer, før det ble byttet til medium med 10 % serum og videre inkubert ved 37°C til neste morgen.

### *Stimulering av celler*

Cellene ble stimulert i ca. 24 timer med forskjellige ligander; rosiglitazon, indometacin, sulindak, sulindaksulfid, sulindaksulfon, naproksennatrium og NS 398.

### *Høsting av celler og analyse*

Mediet i brønnene ble fjernet og cellene ble skylt med 0,9 % NaCl. Det ble deretter tilsatt 20 µL PLB (Passive Lysis Buffer) i hver brønn, for å løsne cellene. Brettet ble satt på ristemaskin i 20 minutter, før det ble kontrollert at cellene var løst og brettet ble deretter sentrifugert i 15 sekunder. Innholdet i hver brønn, 20 µL celleduspensjon, ble overført til hvit 96-brønners Optiplate og plassert i luminometeret (GloMax®-Multi Detection System og senere Fluoroskan Ascent® FL). Stop&Glo-reagens og LAR (Luciferase Assay Reagens) ble tilberedt og gjort klart til analyse i apparatet.

### *Optimalisering av metoden*

Det ble gjort forsøk med forskjellige celledettheter, og forskjellig seruminnhold i mediet for å optimalisere metoden. Det ble videre testet med forskjellige konsentrasjoner av DNA i transfeksjonsblandingen, i forholdene 6:1, 5:1 og 5:2 med Lipofectamine og

DNA. I tillegg ble det forsøkt med 0,1 og 0,2  $\mu\text{g}$  DNA i alle tre konsentrasjonene, slik at det totalt ble seks varianter. Det ble også forsøkt å variere transfeksjonstiden og å stimulere cellene i forskjellige tider; 8, 12 og 24 timer. Det ble i tillegg til dette undersøkt om selve brettet som cellene ble sådd ut i hadde noe å si for resultatet, ved å benytte en annen type 96-brønners brett.

### **2.3.2 Western blotting**

#### *Prinsipp for analysen*

Western blotting er en analytisk metode hvor man detekterer spesifikke proteiner. Man separerer først proteinene på bakgrunn av størrelse ved elektroforese. Proteinene overføres deretter til en nitrocellulosemembran og merkes med primære og videre sekundære antistoffer, for så å detekteres direkte via infrarød fluorescens.

De primære antistoffene som ble brukt var rettet mot PTEN, mikrosomal PGE syntase-1, 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase og COX-2. For å korrigere for eventuelle variasjoner i proteinmengde, ble det benyttet et primært antistoff mot GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase) som er konstitutivt uttrykt i de fleste vev og fungerer som kontroll. Dataene fremstilles som relativ ekspresjon, for eksempel ratio PTEN/GAPDH.

#### *Dyrking og stimulering av celler*

Cellene ble dyrket i Corning-skåler (20  $\text{cm}^2$ ), med en celletetthet på 50 000 celler/ $\text{cm}^2$ . De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), skylt med 0,9 % NaCl og videre inkubert med serumfritt medium i enda et døgn. Deretter ble cellene stimulert med rosiglitazon (10  $\mu\text{M}$ ), indometacin (100  $\mu\text{M}$ ) og sulindaksulfid (30  $\mu\text{M}$  og 100  $\mu\text{M}$ ) i cirka 24 timer.



### *Høsting av celler*

Mediet i skålene ble helt av, og det ble skylt med 0,9 % NaCl. Det ble tilsatt 345  $\mu$ L Laemmlibuffer per skål, før de ble skrapet med cell-lifter og cellene overført til eppendorfrør. Rørene ble satt på varmeblokk ved 115°C i 10 minutter. Prøvene ble så avkjølt og satt i fryser (-20°C) til de skulle analyseres.

### *Gelstøping*

Det ble benyttet glassplatestativ for 0,75 mm tykke geler. 10 og 15 % separasjonsgeler ble laget og fylt i glasstativet. Litt destillert vann ble tilsatt på toppen av gelen for å fjerne luftbobler og unngå at oksygen kom til og hindret polymeriseringsprosessen. Gelen stod deretter og polymeriserte i ca. 45 minutter til den stivnet. Så ble det overflødige vannet helt av, og resten ble fjernet med litt papir. 5 % stackinggel ble laget og tilsatt på toppen av separasjonsgelen og brønnkammen satt i. Stackinggelen polymeriserer raskere enn separasjonsgelen, den ble satt for å stivne i ca. 5 minutter. Brønnkammen ble fjernet, brønnene skylt med destillert vann og glassplatene med gel satt i elektroforesekaret. Dersom elektroforesen ikke skulle kjøres med en gang ble gelsandwichen pakket inn i papir, fuktet med destillert vann og lagt i kjøleskap.

### *Elektroforese*

Elektroforesekaret ble fylt med runningbuffer, først i midtkammeret og deretter i resten av karet til væsken stod 2-3 cm opp på gelen. Prøvene ble deretter tilsatt i brønnene, det ble forsøkt med forskjellige volum, fra 5-25  $\mu$ L pr. brønn. Rainbowmarkør ble tilsatt i en av de ytterste brønnene med volum 3  $\mu$ L. Ved deteksjon av COX-2 ble det i tillegg applisert en COX-2-standard i ytterste brønn (volum 3-5  $\mu$ L). Elektroforesen ble deretter kjørt på 100 V i 5-10 minutter, så ble spenningen økt til 125 V i 90-120 minutter til fargekanten nådde nederst på gelen.

### *Overføring av protein til membran*

For å overføre proteinene til nitrocellulosemembranen ble det benyttet semi-dry blottemodul. Glassplatene ble åpnet, og gelen ble tatt forsiktig ut. Stackinggelen ble fjernet før separasjonsgelen ble lagt på anodeplaten i blottemaskinen i denne rekkefølgen: filterpapir – nitrocellulosemembran – gel – filterpapir. Filterpapir og membran ble fuktet i transferbuffer før bruk. Katodeplaten og lokket ble lagt på før maskinen ble satt på strøm, 10 V i ca. 30 minutter, noe lenger for 15 % geler. For å kontrollere at blottingen var vellykket ble membran lagt i Ponceau S.-løsning og deretter skylt med destillert vann og TTBS.

### *Detektering av spesifikke proteiner (immunoblott)*

Nitrocellulosemembranen ble lagt i BLOTTO-løsning, for å blokkere uspesifikke bindingssteder. BLOTTO består av fettfri tørrmelk løst i TTBS og inneholder mye proteiner som bindes til reaktive grupper på membran. Etter blokkingen ble det skylt med TTBS før det ble tilsatt primært antistoff og satt på vippebrett på kjølerom ved 4°C over natt. Dagen etter ble det igjen vasket med TTBS 4 ganger 5 minutter, før det ble tilsatt sekundært antistoff som var løst i samme titer og i samme fortykning som primær antistoffet. Membranen ble inkubert med sekundært antistoff i ca. 45-60 minutter i romtemperatur på vippebrett. Deretter ble det vasket med TTBS 4 ganger 5 minutter, før membran ble skylt med vann og tilslutt PBS før detektering av proteinene i maskinen (Odyssey® Infrared Imaging System).

## **2.3.3 cAMP-assay**

### *Prinsipp for analysen*

Målet med analysen er å finne den ukjente konsentrasjonen cAMP i våre celleprøver. Det benyttes derfor en standardkurve med kjente konsentrasjoner cAMP og isotop ( $^3\text{H}$  cAMP) for å detektere mengde cAMP. Det oppstår konkurranse mellom cAMP og  $^3\text{H}$  cAMP om binding til tilsatt antistoff. Høy radioaktivitet (høyt antall desintegrasjoner pr.

minutt) og dermed høy binding av  $^3\text{H}$  cAMP gir uttrykk for lav konsentrasjon umerket cAMP i prøven. For å fjerne ubundet cAMP tilsettes ammoniumsulfat som vil felle ut cAMP/antistoff - komplekset. Radioaktiviteten detekteres i en scintillasjonsteller (Tri-Carb® Liquid Scintillation Analyzer).

### *Dyrking og stimulering av celler*

Cellene ble dyrket i 6-brønners Costar-brett ( $10\text{ cm}^2/\text{brønn}$ ), med en celletetthet på  $50\,000\text{ celler}/\text{cm}^2$ . De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), skylt med saltvann og videre inkubert med serumfritt medium i enda et døgn. Deretter ble cellene stimulert med rosiglitazon ( $10\ \mu\text{M}$ ), indometacin ( $100\ \mu\text{M}$ ) og sulindaksulfid ( $100\ \mu\text{M}$ ) i cirka 24 timer.

### *Preparering av prøver*

Mediet i brønnene ble fjernet, og det ble tilsatt 1,5 mL Krebs-Ringer-Hepes buffer. Cellebrettene ble deretter preinkubert ved  $37^\circ\text{C}$  i ca. 15 minutter.  $500\ \mu\text{L}$  hormon ( $\text{PGE}_2$ ) løst i KRH-buffer med IBMX ble tilsatt hver brønn, inkubert i 3 minutter og deretter ble reaksjonen stoppet ved å fjerne bufferen og tilsette  $600\ \mu\text{L}$  5 % TCA. Som kontroll ble det brukt KRH-buffer med IBMX. Prøvene ble skrapet med rubber-policeman og cellene overført med glasspipette til glassrør. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 2400 rpm i 10 minutter ved  $4^\circ\text{C}$ . Supernatanten ble overført til matte TT-rør, og prøvene ble satt i fryser ( $-20^\circ\text{C}$ ) til de skulle analyseres. Pelleten ble løst i  $500\ \mu\text{L}$  0,08 M NaOH, ristet på Whirlmixer og etter ca. 1 time overført til blanke TT-rør. Prøvene ble satt i kjøleskap til proteinmålingen skulle utføres.

### *Analyse av prøvene*

Analysen ble utført som beskrevet av Skomedal og medarbeidere (1980) [53]. Det ble laget en standardkurve med konsentrasjonene 0 – 1,25 – 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 –

160 nM cAMP løst i 5 % TCA, i tillegg til en bakgrunnsprøve med kun 5 % TCA. Disse standardløsningene og 300 µL av hver celleprøve ble overført til små glassrør, det ble tilsatt en spatelspiss CaCO<sub>3</sub> i hvert rør, for å nøytralisere prøven, og disse ble så ristet på Whirlmixer. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 2000 rpm i 10 minutter ved 4°C. Prosedyren foregikk videre på is. 2 paralleller a 50 µL av hver prøve ble overført til Nunc-rør. 50 µL isotop ble tilsatt i alle rør. Videre ble 5 µL acetyleringsreagens tilsatt i hvert rør og ristet umiddelbart på Whirlmixer. 100 µL antistoff fortynnet i antistoffbuffer (1:2000) ble tilsatt i alle rør bortsett fra de to rørene med bakgrunn, som i stedet ble tilsatt kun antistoffbuffer i samme volum. Prøvene ble så inkubert på kjølerom over natt. Neste dag ble de tilsatt 1 mL mettet ammoniumsulfat og sentrifugert ved 5000 rpm i 30 minutter ved 4°C. Supernatanten ble helt av og rørene satt på hodet i stativ med papir i ca. 30 minutter. Deretter ble det tilsatt 100 µL destillert vann og 2 mL tellevæske (Opti-Fluor®) til hvert rør, før de ble ristet på Whirlmixer, korket og plassert i scintillasjonstelleren for analysing.

### **2.3.4 Proteinmåling**

Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit ble benyttet til å måle proteinmengden i celleprøvene til cAMP-analysen. Det ble laget en standardkurve med protein (BSA = Bovin serum albumin) løst i 0,08 M NaOH i konsentrasjonene 0 – 0,025 – 0,05 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 0,75 -1,0 M. I et 96-brønners brett ble det tilsatt 10 µL standard/celleprøve i hver brønn, 3 paralleller av hver. Deretter ble det tilsatt 300 µL Coomassie® Plus Protein Assay Reagent i hver brønn og brettet ble analysert i instrumentet EnVision® 2104 Multilabel Reader.

Proteinmålingen ble både utført på celleprøvene fra cAMP-analysen og på celleprøver fra egne proteinbrett. Disse tallene ble sammenliknet og det viste seg å være større mengde protein i prøvene fra proteinbrettet. Dette var som forventet da det er sannsynlig at noe protein forsvinner under prøveopparbeidelsen til cAMP-analysen.

## 2.4 Beregninger og statistisk analyse

Luciferaseassayet og cAMP-analysen ble utført med tre replikater av kontroll og av hver konsentrasjon av ligand, mens for Western blott-forsøkene ble det applisert to replikater på hver gel. De fleste forsøkene ble gjentatt minst tre ganger, dersom ikke annet er oppgitt i teksten. For luciferaseassayet og cAMP-analysen ble gjennomsnittet av de tre replikatene beregnet, før alle forsøkene ble slått sammen. I Western blott-forsøkene ble gjennomsnittet av kvantifiseringen av de to parallellene beregnet, og forsøkene deretter slått sammen, dersom ikke annet er oppgitt. De sammenslåtte resultatene ble analysert for statistisk signifikans ved bruk av enveis variansanalyse (ANOVA), og forskjellene ble ansett som statistisk signifikante dersom  $p < 0,05$ . Både utarbeiding av grafer og statistiske beregninger er utført i dataprogrammet GraphPad.

De fleste testene resulterte i ikke-signifikante forskjeller, og de få signifikante endringene er derfor kun nevnt i aktuelle figurtekster.

### **3. Resultater**

#### **3.1 Metodeutvikling**

##### **3.1.1 Transfeksjon av cellelinjer med PPRE og respons på PPAR $\gamma$ -aktivering**

For å undersøke NSAIDs grad av PPAR $\gamma$ -aktivering ble cellene først transfektert med et konstrukt som inneholdt PPRE forbundet med en luciferasereporter. Aktivering av PPAR fører til videre aktivering av luciferase, og reaksjonen ender med generering av lys som detekteres. Sterkt lyssignal er dermed forbundet med høy reseptoraktivering.

##### *Optimalisering av transfeksjonsmetoden*

##### **Celletetthet**

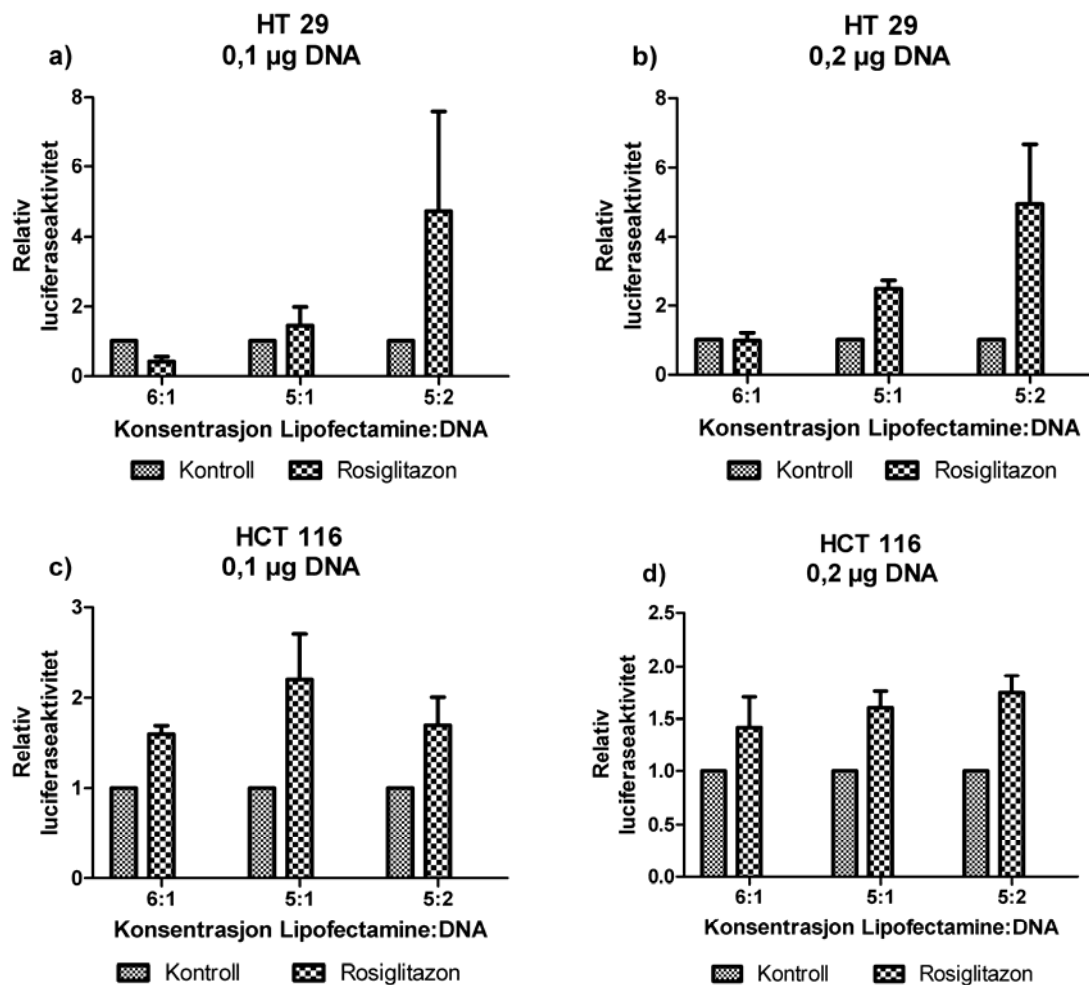
Det er generelt anbefalt å la cellene vokse til de er tilnærmet konfluente før transfeksjon. Etter transfeksjonen dyrkes cellene videre før de stimuleres, og det var derfor nødvendig å sammenlikne ulike celletettheter. Det ble gjort forsøk med forskjellige celletettheter, henholdsvis 30 000, 40 000, 50 000 og 75 000 celler pr. brønn. Det viste seg at med celletettheten 30 000 celler pr. brønn vokste cellene for spredt og antall celler ble for lavt. I brønnene med 75 000 celler var det derimot altfor tett, og heller ikke denne celletettheten ble valgt videre. For HCT 116 cellene ble det bestemt å så ut celler videre med celletetthet 40 000 celler pr. brønn, og for HT 29 cellene ble det valgt celletetthet 50 000 celler pr. brønn. Celletettheten til HT 29 cellene ble etter hvert satt ned til 40 000 celler pr. brønn, da dette var mer hensiktsmessig.

**Seruminnhold i mediet**

Under transfeksjonen ble det forsøkt med forskjellige konsentrasjoner av serum i mediet; serumfritt medium, og medium med 0,1 %, 1 % og 10 % serum. HT 29 cellene trivdes best med 10 % serum i mediet, mens HCT 116 cellene først ble transfektert med serumfritt medium, og senere ble det forandret til 1 % serum i mediet.

**Konsentrasjon Lipofectamine:DNA**

Konsentrasjonen av DNA i blandingen ble variert, i forholdene 6:1, 5:1 og 5:2 med Lipofectamine og DNA. I tillegg ble det forsøkt med 0,1 og 0,2  $\mu\text{g}$  DNA i alle tre konsentrasjonene, slik at det totalt ble seks varianter (figur 5). For HT 29 cellene ble det valgt konsentrasjon 5:1 med 0,2  $\mu\text{g}$  DNA, mens HCT 116 cellene videre ble transfektert med konsentrasjon 5:1 med 0,1  $\mu\text{g}$  DNA.



**Figur 5: Stimulering av celler med rosiglitazon.** Varierende konsentrasjon av Lipofectamine og DNA, med a) 0,1 µg DNA i HT 29 celler, b) 0,2 µg DNA i HT 29 celler, c) 0,1 µg DNA i HCT 116 celler, d) 0,2 µg DNA i HCT 116 celler. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre paralleller i hvert forsøk.

### Transfeksjonstid

I begynnelsen ble cellene transfektert og inkubert over natt, før transfeksjonsmediet ble fjernet og cellene ble stimulert med ligand. Etter gjentatte forsøk utført på denne måten, hvor resultatene viste seg å være svært ujevne, ble det besluttet å undersøke om transfeksjonstiden kunne spille en rolle for resultatet. Begge cellytypene ble transfektert



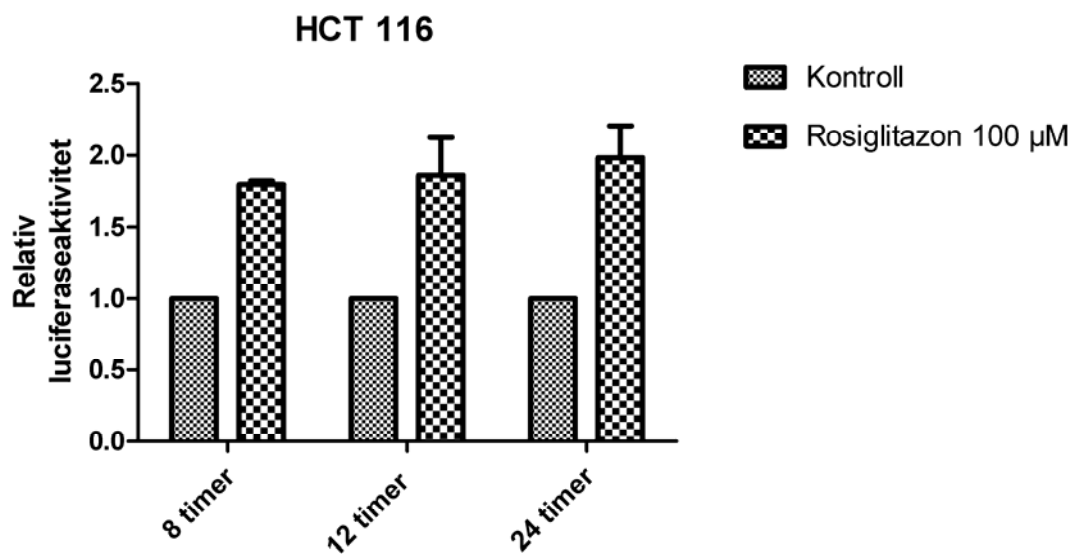
med GFP (green fluorescent protein), for å kartlegge transfeksjonseffektiviteten til cellene. Det viste seg at HCT 116 cellene ble effektivt transfektert etter kortere tid, i motsetning til HT 29 cellene. HCT 116 cellene hadde en fullstendig transfeksjon allerede etter 5-10 timer (data ikke vist her), mens HT 29 cellene selv etter 24 timers transfeksjon ikke hadde tilstrekkelig antall transfekterte celler (tabell 1). Etter dette ble det bestemt å transfektere HCT 116 cellene i 5 timer, for så å bytte til serumholdig medium og videre inkubere cellene til neste morgen, da de ble stimulert med ligand. Transfeksjonstiden til HT 29 cellene ble ikke endret, de ble fortsatt transfektert i omtrent et døgn.

<b>HT 29 celler – Transfeksjon med GFP</b>			
	<b>Antall transfekterte celler</b>	<b>Totalt antall celler</b>	<b>Prosentandel transfekterte celler</b>
40 000 celler pr. brønn	89	999	8,9 %
	58	675	8,6 %
	77	805	9,6 %
50 000 celler pr. brønn	157	1214	12,9 %
	148	892	16,6 %
	60	750	8,0 %
<b>Transfeksjonseffektivitet</b>			<b>10,8 %</b>

**Tabell 1: HT 29 celler transfektert med GFP.** Cellene ble sådd ut med to forskjellige celletettheter, 40 000 og 50 000 celler pr. brønn. Etter 24 timers transfeksjon ble både antall transfekterte celler og totalt antall celler telt i tre uavhengige brønner og transfeksjonseffektiviteten ble beregnet.

### Stimulering med ligand i etterkant av transfeksjonen

Det ble gjort et forsøk hvor tiden cellene ble stimulert med ligand ble variert. Det ble valgt stimuleringstid på 8, 12 og 24 timer. Det var kun HCT 116 cellene som ble testet, og ligand som ble brukt var rosiglitazon og medium som kontroll (figur 6). Konklusjonen var at stimuleringstiden ikke hadde noe å si for resultatet av forsøket, og cellene ble videre stimulert i 24 timer som tidligere.



**Figur 6: Stimulering av HCT 116 celler med rosiglitazon, i henholdsvis 8, 12 og 24 timer.**

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for ett enkelt forsøk (n=3).

### Optimalisering av Western blott-metoden

Det var flere trinn i Western blott-metoden som måtte optimaliseres for at proteinuttrykkene skulle komme til syne i ønsket grad, i verken for tynne eller for tykke bånd. Mengde celleprøve som ble applisert på gelen ble variert fra 5-25 µL pr. brønn, hvor det viste seg å være 20 µL som gav de mest klare og avgrensede båndene. Det ble også forsøkt ulike konsentrasjoner av de forskjellige primærantistoffene, for å finne konsentrasjonen som gav tydelige proteinuttrykk.

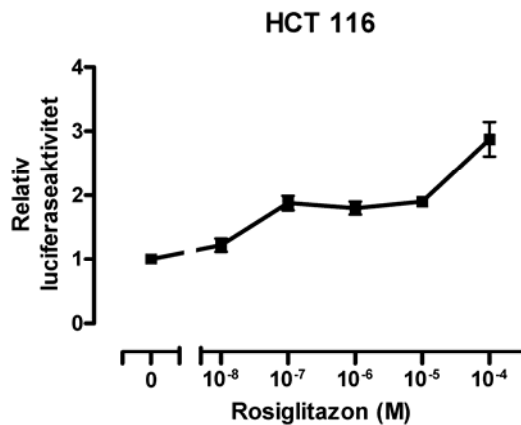
## 3.2 Effekt av de ulike ligandene på PPAR $\gamma$ -aktivering målt ved luciferaseassay

Cellene ble stimulert med ligand i forskjellige konsentrasjoner, og vi ønsket å undersøke om behandling med ligand ville gi en doseavhengig økning i reseptoraktivering.

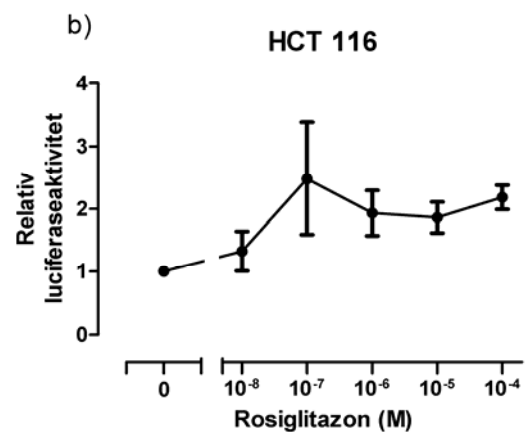
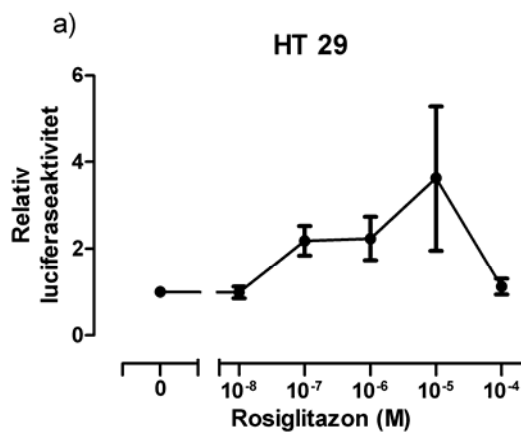
Rosiglitazon som er en godt dokumentert PPAR $\gamma$ -agonist [22], ble benyttet som en kontroll i tillegg til de ulike NSAIDs. Relativ luciferaseaktivitet er et mål på reseptoraktivering.

### 3.2.1 Rosiglitazon

De aller første dose-respons forsøkene med rosiglitazon gav omtrent 3 gangers økning i respons (figur 7). Det viste seg derimot etter hvert at reseptoraktiveringen som rosiglitazon gav var svak og viste ingen god doseavhengig respons. I HCT 116 cellene fikk vi omtrent en dobling av responsen, med en topp ved konsentrasjon 0,1  $\mu$ M. I HT 29 cellene gav stimulering med rosiglitazon først en dobling av respons ved konsentrasjon 0,1  $\mu$ M, og en tilsynelatende økning ved konsentrasjon 10  $\mu$ M, mens effekten avtok ved høyere konsentrasjoner. I begge cellelinjene så det ut til at maksimal respons ble nådd ved konsentrasjon 0,1  $\mu$ M. Da det var variasjon i hvilken konsentrasjon av rosiglitazon som gav best utslag i forsøkene, ble det ingen tydelig dose-responseeffekt når resultater fra flere forsøk ble lagt sammen i en graf (figur 8).



**Figur 7: Effekt av rosiglitazon på luciferaseaktivitet.** Figuren viser et av de første forsøkene hvor stimulering med rosiglitazon (10 nM til 100  $\mu$ M) gav respons på reseptoraktivering. Resultatet er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre paralleller i et enkelt forsøk.



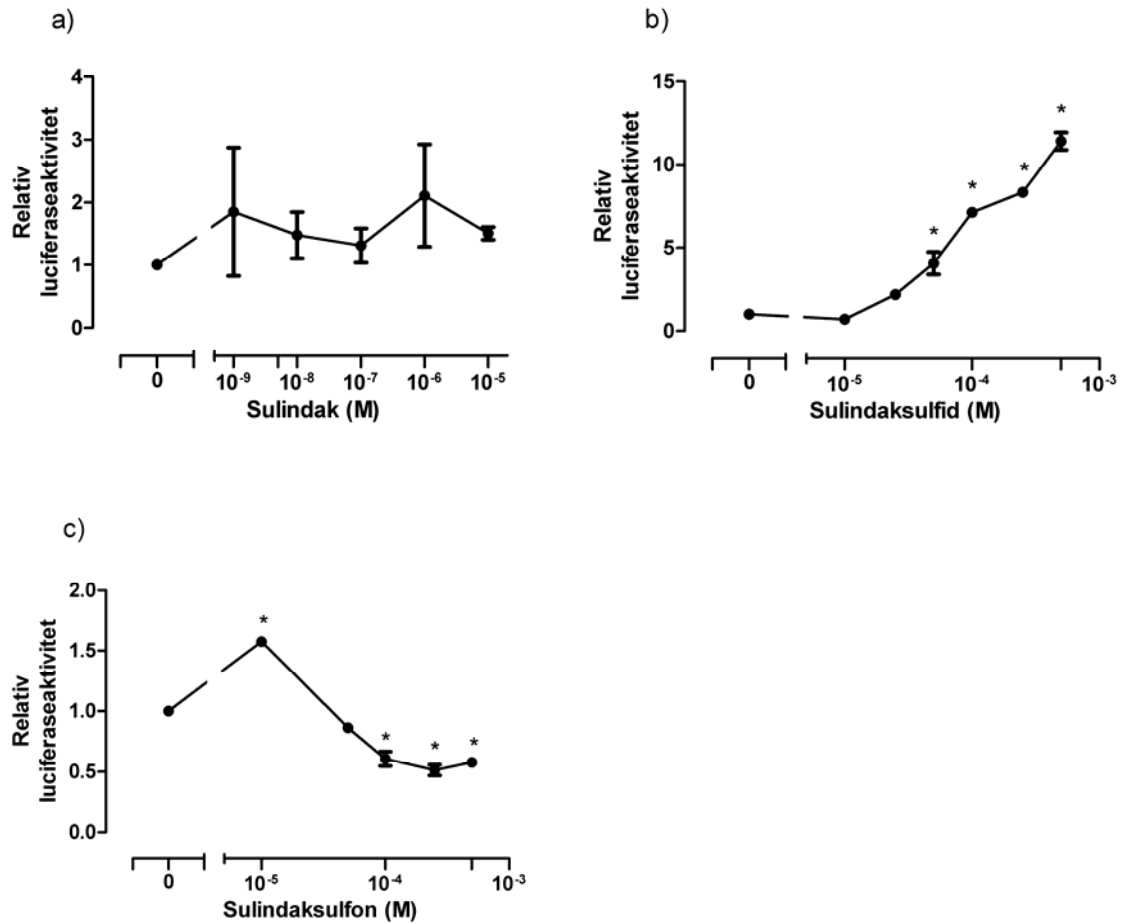
**Figur 8: Effekt av rosiglitazon på luciferaseaktivitet.** Cellene ble sådd ut med en celledensitet på 40 000 – 50 000 celler pr. brønn. De gikk en dag i serumholdig medium (10 % serum), før de ble transfektert og det ble byttet til serumfritt medium eller medium med 1 % serum for HCT 116 cellene og medium med 10 % serum for HT 29 cellene. Deretter gikk de videre en dag før de ble stimulert i serumfritt medium, og etter enda et døgn ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. Cellene ble stimulert med rosiglitazon i konsentrasjoner fra 10 nM til 100  $\mu$ M. a) viser effekt av rosiglitazon i HT 29 celler, mens b) viser effekt i HCT 116 celler. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 5 uavhengige forsøk for begge cellelinjer.

### 3.2.2 Sulindak, sulindaksulfid og sulindaksulfon

For sulindak ble det i begynnelsen gjort forsøk med selve prodrugget. Dette gav lav reseptoraktivering og det ble derfor videre gjort forsøk med metabolittene sulindaksulfid og sulindaksulfon. Sulindaksulfid gav en dose-avhengig økning i reseptoraktivering. Vi fant opptil 10 ganger økning i responsen i begge celletypene. For HT 29 cellene var det høyeste konsentrasjon, 500  $\mu\text{M}$ , som gav best respons (figur 9), mens i HCT 116 cellene fikk vi en utflatning av kurven ved høye konsentrasjoner, med størst respons for konsentrasjonene 100-500  $\mu\text{M}$  (figur 10). Sulindaksulfon gav også en dose-avhengig reseptoraktivering i HCT 116 cellene, imidlertid ikke i samme grad som sulfidet. Konsentrasjonen som gav den høyeste reseptoraktiveringen var på 500  $\mu\text{M}$  (figur 10). I HT 29 cellene hadde derimot sulindaksulfon ingen effekt (figur 9). Flere av konsentrasjonene var imidlertid signifikant lavere enn kontrollen, noe som kan ha sammenheng med cytotoksisitet (figur 21).

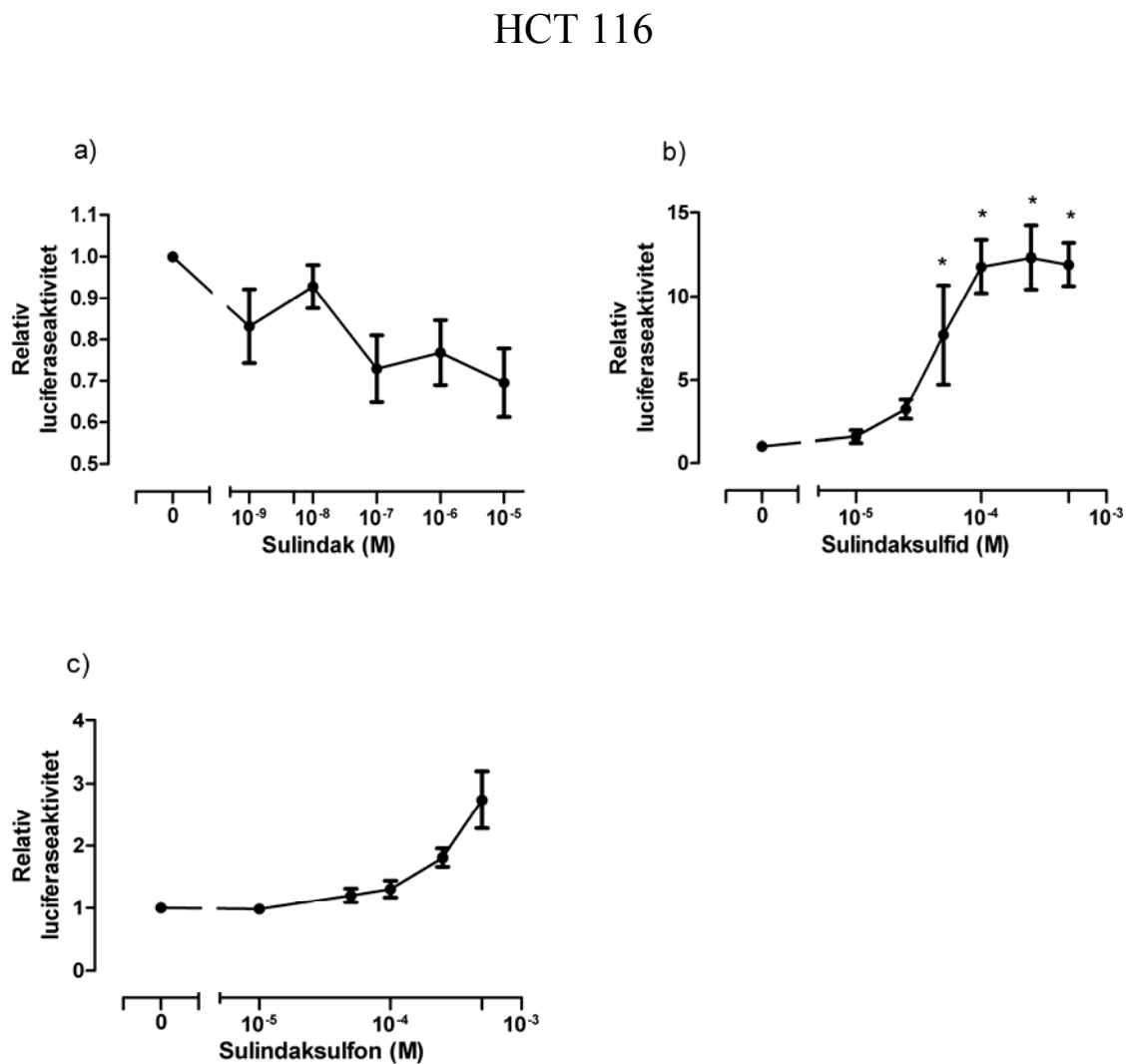
I HT 29 cellene ble det kun gjort to forsøk med hver av ligandene sulindak, sulindaksulfid og sulindaksulfon. For sulindak og sulindaksulfon anså vi at det ikke var hensiktsmessig å gjenta forsøket en tredje gang, og det var heller ikke tid til å utføre flere forsøk med sulindaksulfid på slutten av arbeidet med masteroppgaven.

## HT 29



**Figur 9: Effekt av sulindak, sulindaksulfid og sulindaksulfon på luciferaseaktivitet, i HT 29 celler.**

Cellene ble sådd ut med en celledetthet på 40 000 – 50 000 celler pr. brønn. De gikk en dag i serumholdig medium (10 % serum), før de ble transfektert og det ble byttet til nytt medium med 10 % serum. Deretter gikk de videre en dag før de ble stimulert, og etter enda et døgn ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. a) Cellene ble stimulert med sulindak i konsentrasjoner fra 1 nM til 10  $\mu$ M. b) Cellene ble stimulert med sulindaksulfid i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. c) Cellene ble stimulert med sulindaksulfon i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre paralleller i ett av to enkeltforsøk. Det andre forsøket som ble utført på ligandene viser tilsvarende effekt. \*Resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved bruk av enveis variansanalyse ( $p < 0,05$ ).



**Figur 10: Effekt av sulindak, sulindaksulfid og sulindaksulfon på luciferaseaktivitet, i HCT 116 celler.** Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 40 000 celler pr. brønn. De gikk en dag i serumholdig medium (10 % serum), før de ble transfektert og det ble byttet til serumfritt medium eller medium med 1 % serum. Deretter gikk de videre en dag før de ble stimulert, og etter enda et døgn ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. a) Cellene ble stimulert med sulindak i konsentrasjoner fra 1 nM til 10  $\mu$ M. Resultatet er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. b) Cellene ble stimulert med sulindaksulfid i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. Resultatet er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk. c) Cellene ble stimulert med sulindaksulfon i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. Resultatet er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. \*Resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved bruk av enveis variansanalyse ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Indometacin, diklofenak, naproksennatrium og NS 398

Indometacin er ansett for å være en potent PPAR $\gamma$ -aktivator [41, 44]. Stimulering med indometacin i HT 29 celler førte kun til en dobling i reseptoraktivering og størst respons ved konsentrasjon 300  $\mu$ M (figur 11). I HCT 116 cellene fikk vi en tredobling av respons i forhold til kontrollen, med en topp på cirka 200  $\mu$ M, før effekten igjen ble redusert ved høyere konsentrasjoner (figur 12).

Studier viser at diklofenak er en partiell agonist på PPAR $\gamma$  [48], og vi ønsket å undersøke grad av reseptoraktivering for denne liganden. Diklofenak gav i HT 29 cellene en dobling i respons ved konsentrasjonen 250  $\mu$ M (figur 11). I HCT 116 cellene fant vi ingen reseptoraktivering ved stimulering med diklofenak. Høyeste konsentrasjon, 500  $\mu$ M, gav en liten økning i reseptoraktivering, men her var det stor spredning i responsen (figur 12).

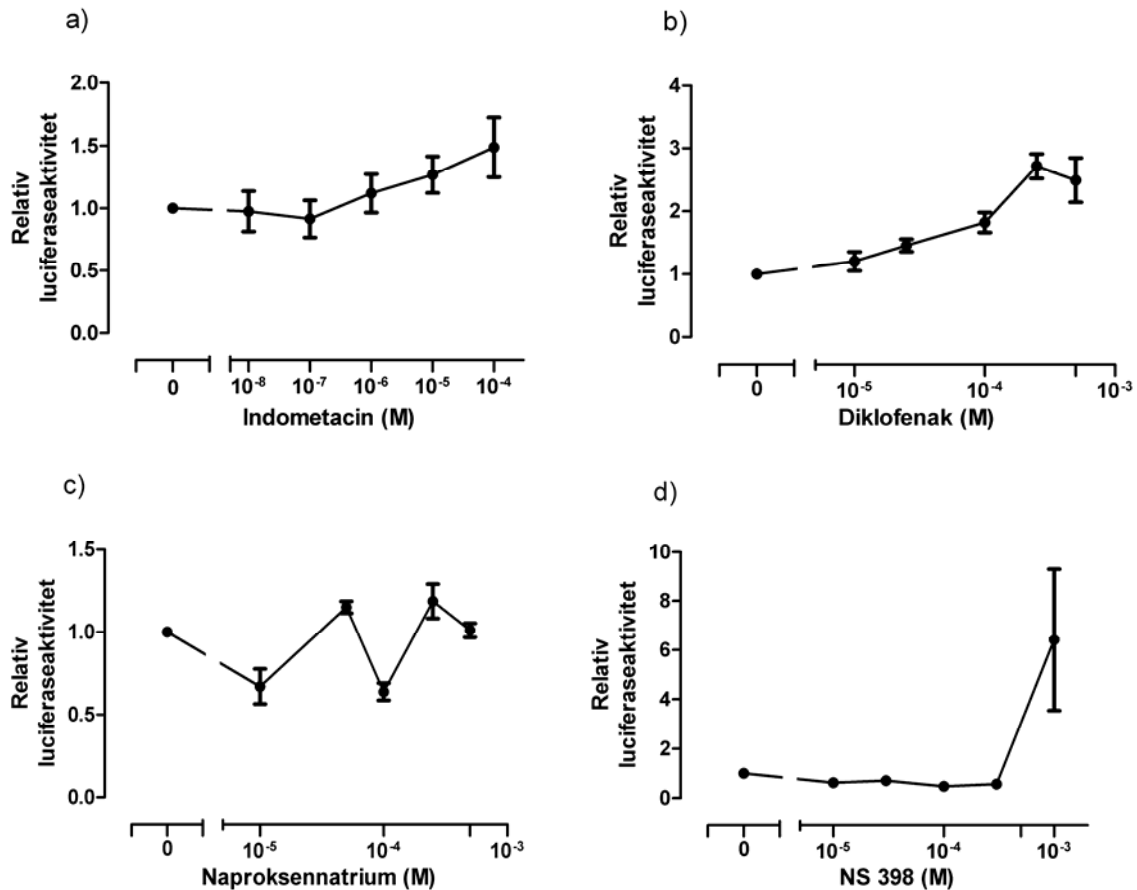
Naproksennatrium er tidligere vist å være en agonist på PPAR $\gamma$  [50], men gav ingen tegn til reseptoraktivering i våre forsøk, verken i HT 29 eller HCT 116 cellene (figur 11-12).

Stimulering med NS 398 førte ikke til reseptoraktivering, verken i HT 29 eller HCT 116 cellene. Den høyeste konsentrasjonen som ble benyttet, 1 mM, gav en tredobling i respons i begge celletypene, imidlertid med stor spredning (figur 11-12). Resultatet var i samsvar med funn i andre studier, da NS 398 ikke tidligere er vist å aktivere PPAR $\gamma$  [51].

For diklofenak og NS 398 ble det kun gjort to forsøk i hver celletype. Det ble bestemt å ikke gjenta forsøket en tredje gang. Når det gjelder naproksennatrium ble denne også analysert kun to ganger i HT 29 cellene, da liganden ikke gav respons på reseptoraktivering.

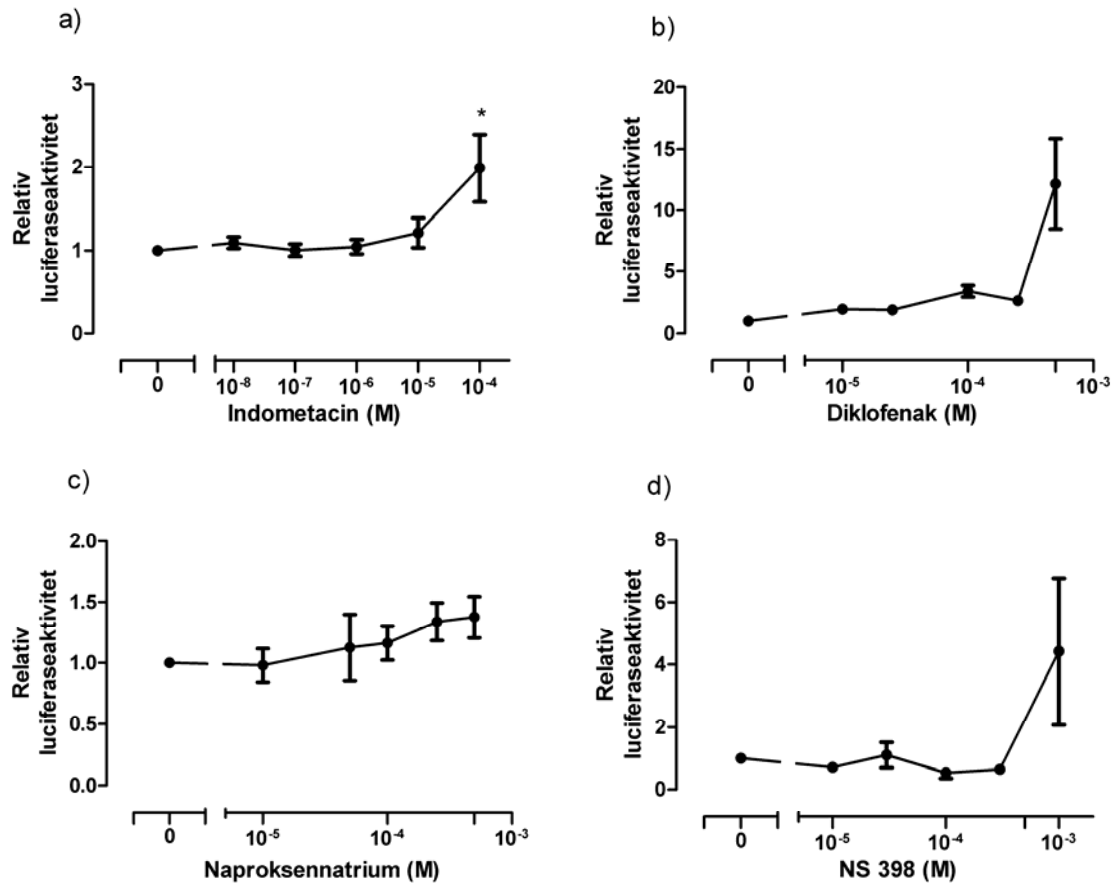


## HT 29



**Figur 11: Effekt av indometacin, diklofenak, naproksennatrium og NS 398 på luciferaseaktivitet, i HT 29 celler.** Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 40 000 – 50 000 celler pr. brønn. De gikk en dag i serumholdig medium (10 % serum), før de ble transfektert og det ble byttet til nytt medium med 10 % serum. Deretter gikk de videre en dag før de ble stimulert, og etter enda et døgn ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. a) Cellene ble stimulert med indometacin i konsentrasjoner fra 10 nM til 300  $\mu$ M. b) Cellene ble stimulert med diklofenak i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. c) Cellene ble stimulert med naproksennatrium i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. d) Cellene ble stimulert med NS 398 i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 1 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk (a), eller som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre paralleller i ett av to enkeltforsøk (b-d). Det andre forsøket som ble utført på ligandene (b-d) viser tilsvarende effekt.

## HCT 116



**Figur 12: Effekt av indometacin, diklofenak, naproksennatrium og NS 398 på luciferaseaktivitet, i HCT 116 celler.** Cellene ble sådd ut med en celledetthet på 40 000 celler pr. brønn. De gikk en dag i serumholdig medium (10 % serum), før de ble transfektert og det ble byttet til serumfritt medium eller medium med 1 % serum. Deretter gikk de videre en dag før de ble stimulert, og etter enda et døgn ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. a) Cellene ble stimulert med indometacin i konsentrasjoner fra 10 nM til 100  $\mu$ M. b) Cellene ble stimulert med diklofenak i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. c) Cellene ble stimulert med naproksennatrium i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 500  $\mu$ M. d) Cellene ble stimulert med NS 398 i konsentrasjoner fra 10  $\mu$ M til 1 mM. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk (a, c), eller som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre paralleller i ett av to enkeltforsøk (b, d). Det andre forsøket som ble utført på ligandene (b, d) viser tilsvarende effekt. \*Resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved bruk av enveis variansanalyse ( $p < 0,05$ ).

---

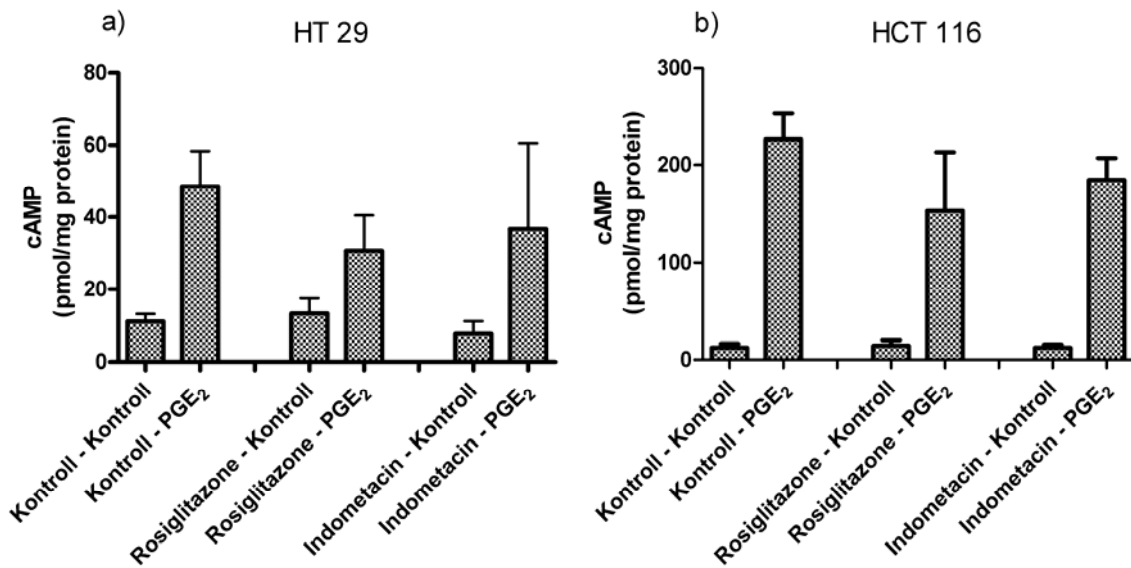
### 3.3 Effekt av PPAR $\gamma$ -aktivering på PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-akkumulering

Transfeksjonsforsøkene viste seg å være lite reproduserbare, og det var også tydelige tegn på cytotoxicitet. Det var imidlertid vanskelig å bedømme om dette skyldtes selve transfeksjonsprosedyren eller en cytotoxic effekt av NSAIDs. Det ble derfor besluttet å undersøke effekten av PPAR $\gamma$ -aktivering på ekspresjon av ulike proteiner som i litteraturen er beskrevet å være regulert av PPAR $\gamma$ -agonister, men der det ikke er avklart om dette skyldes en direkte PPAR $\gamma$ -reseptormediert effekt.

Aktivering av EP2- og EP4-reseptorer medfører stimulering av adenylyl cyklase (AC) som igjen gir økt cAMP i cellen [14]. Det er tidligere vist at PPAR $\gamma$ -ligander, blant annet rosiglitazon, kan hemme cellevekst ved å nedsette ekspresjon av EP2-reseptorer [61]. Cellene ble stimulert med rosiglitazon og indometacin som begge er agonister på PPAR $\gamma$  [39-42]. Hypotesen er at PPAR $\gamma$ -aktivering nedregulerer ekspresjon av EP2-reseptorer. Da HT 29 cellelinjen som tidligere nevnt uttrykker EP2 i stor grad, ville vi undersøke om vi fikk en reduksjon i PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-produksjon i disse cellene ved forbehandling med PPAR $\gamma$ -agonist. HCT 116 cellene, som inneholder hovedsakelig EP4-reseptorer framfor EP2 [52], ble også undersøkt.

#### 3.3.1 Rosiglitazon og indometacin

Stimulering med rosiglitazon gav en nedgang i PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-produksjon både i HT 29 og HCT 116 cellene (figur 13). Reduksjonen var noe større i HT 29 cellene i forhold til HCT 116 cellene. For indometacin var nedgangen ikke like tydelig, men man kan likevel se en liten reduksjon i cAMP, imidlertid med stor spredning i HT 29 cellene. Reduksjonen var ikke signifikant for verken HT 29 eller HCT 116 cellene.

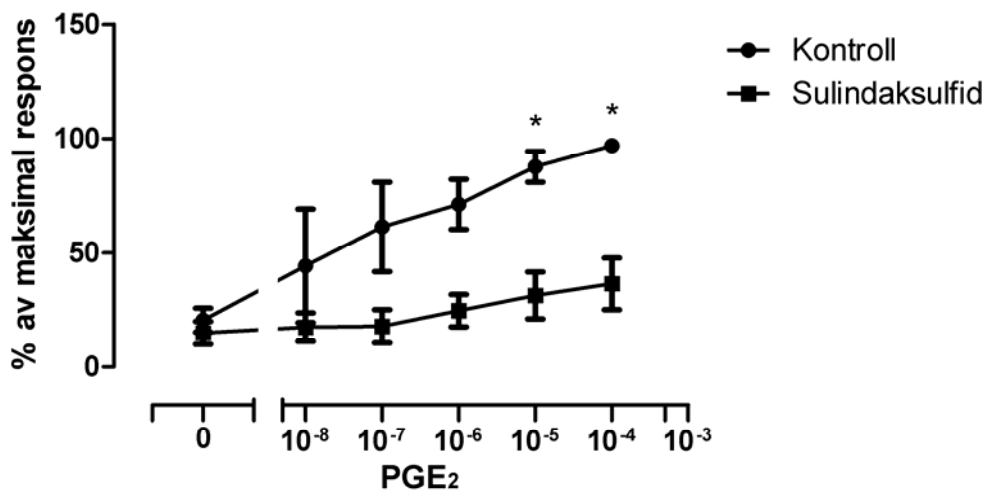


**Figur 13: Effekt av rosiglitazon og indometacin på PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-akkumulering.** Cellene ble sådd ut med en celledensitet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble forbehandlet med ligand i omtrent et døgn, før de ble høstet og konsentrasjonen av cAMP ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. a) Effekt av rosiglitazon (10 µM) og indometacin (100 µM) i HT 29 celler. b) Effekt av rosiglitazon (10 µM) og indometacin (100 µM) i HCT 116 celler. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av fem uavhengige forsøk for begge cellelinjer.

Resultatene i HT 29 cellene kunne tyde på en effekt av rosiglitazon. For å få en sikrere bestemmelse av om effekten var reell, ble det etter forbehandling med henholdsvis sulindaksulfid og rosiglitazon gjort cAMP-bestemmelse med fulle dose-responskurver med PGE<sub>2</sub>.

### 3.3.2 Sulindaksulfid

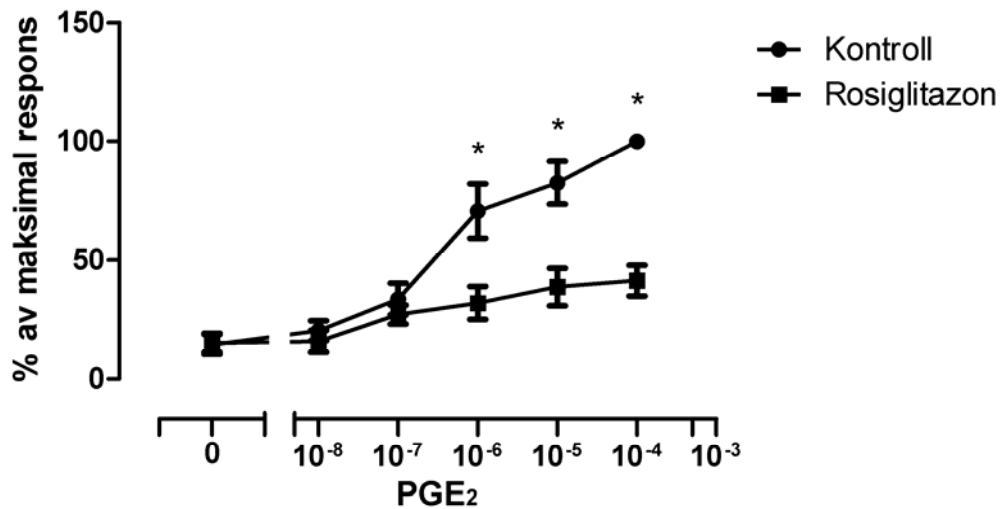
Resultatene for sulindaksulfid viser et tydelig fall i PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-produksjon, sammenliknet med kontrollen (figur 14). Dette tyder på en aktivering av PPAR<sub>γ</sub>, med etterfølgende nedregulering av EP2-reseptorer og dermed lavere uttrykk av cAMP.



**Figur 14: Effekt av sulindaksulfid på PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-akkumulering, i HT 29 celler.** Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble så stimulert med 100 μM sulindaksulfid i omtrent et døgn, før de ble høstet og konsentrasjonen av cAMP ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre uavhengige forsøk. Høyeste verdi i hvert forsøk er satt til 100 %, gjennomsnitt av høyeste verdi: 60,2 pmol/mg protein, SEM: 20,3 pmol/mg protein. \*Resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved bruk av enveis variansanalyse (p<0,05).

### 3.3.3 Rosiglitazon

Resultatene for rosiglitazon viser også et fall i PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-produksjon, sammenliknet med kontroll (figur 15).



**Figur 15: Effekt av rosiglitazon på PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-akkumulering, i HT 29 celler.** Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble så stimulert med 10 μM rosiglitazon i omtrent et døgn, før de ble høstet og konsentrasjonen av cAMP ble målt som beskrevet i Materialer og metoder. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre uavhengige forsøk. Høyeste verdi i hvert forsøk er satt til 100 %, gjennomsnitt av høyeste verdi: 37,9 pmol/mg protein, SEM: 5,2 pmol/mg protein. \*Resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved bruk av enveis variansanalyse (p<0,05).

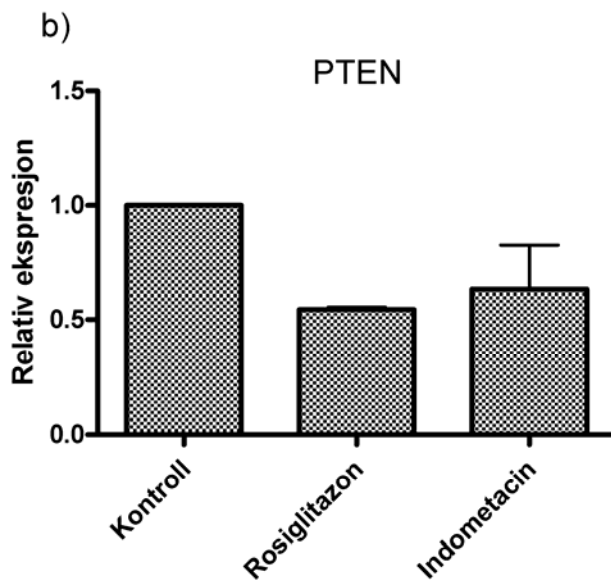
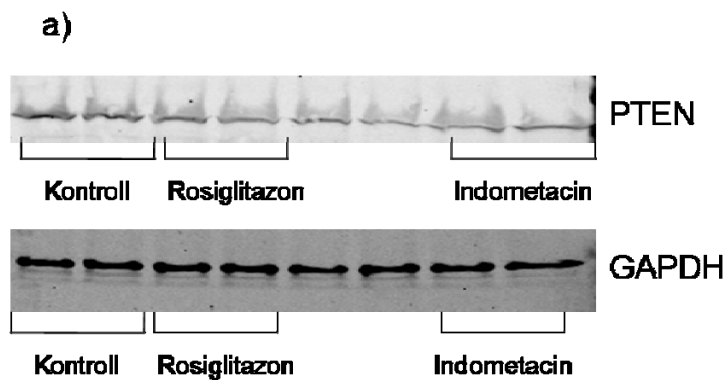
### 3.4 Effekt av PPAR $\gamma$ -aktivering og NSAIDs på ekspresjon av PTEN, COX-2 og 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase målt ved Western blotting

Det ble underveis i arbeidet med oppgaven besluttet å undersøke reseptoraktivering ved hjelp av en tredje metode: Western blotting. Antistoffene for detektering av proteiner i celleprøvene som ble valgt var rettet mot PTEN, COX-2, 15-PGDH og mPGE syntase-1. Som kontroll ble det benyttet antistoff for et protein som er konstitutivt uttrykt i de fleste vev, GAPDH (molekylvekt = 37 kDa). Og for å bekrefte at det var de ønskede båndene som fremkom ved detektering, ble det brukt en rainbowmarkør for å relatere våre uttrykte bånd til proteinuttrykk med kjent molekulvekt.

Celler ble stimulert med rosiglitazon og indometacin, i tillegg til sulindaksulfid. Celleprøver fra ustimulerte celler ble brukt som kontroll for rosiglitazon og indometacin, mens kontrollen til sulindaksulfid ble behandlet med 0,2 % DMSO, i samsvar med konsentrasjon av DMSO som sulindaksulfid var løst i. Western blottene utført på sulindaksulfidcellene er ikke vist her, da det åpenbart var lite celler igjen etter stimulering (se figur 21).

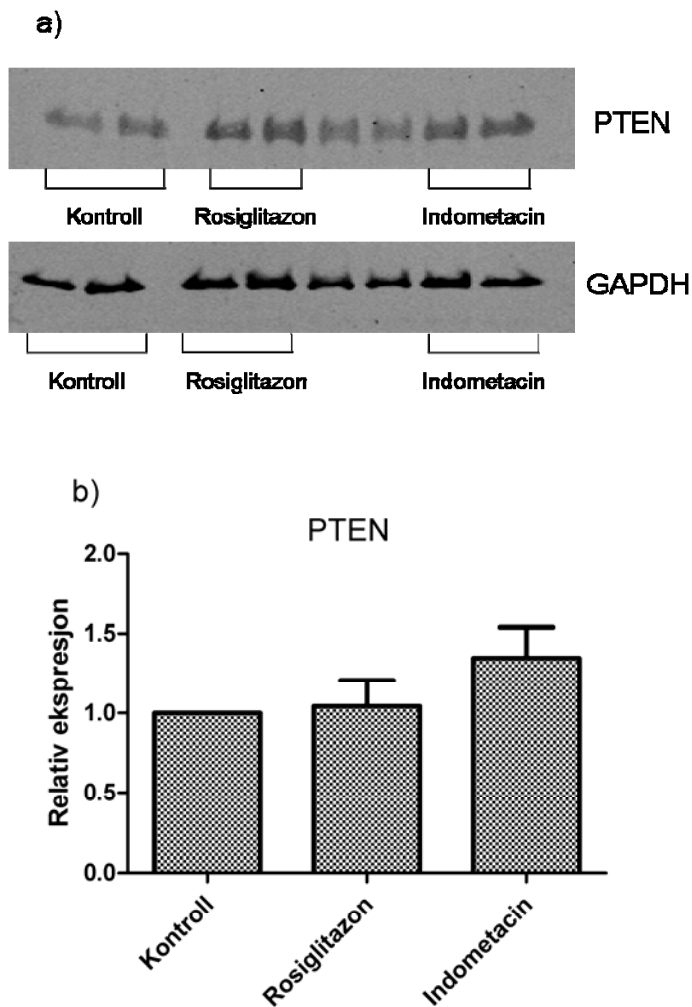
#### 3.4.1 PTEN

Det er vist at aktivering av PPAR $\gamma$  induserer ekspresjonen av PTEN i forskjellige kreftceller [37, 38]. Det ble derfor bestemt å undersøke dette ved å stimulere celler med rosiglitazon og indometacin, og måle ekspresjon av PTEN ved Western blott-analyse. Blottene for HT 29 cellelinjen indikerer et lavere nivå av PTEN-ekspresjon i de stimulerede cellene (figur 16). I HCT 116 cellene ser man en svak økning av PTEN-ekspresjon, noe høyere for indometacin i forhold til rosiglitazon (figur 17). Endringene var imidlertid ikke statistisk signifikante.



**Figur 16: Effekt av rosiglitazon (10 $\mu$ M) og indometacin (100 $\mu$ M) på ekspresjon av PTEN målt ved Western blotting, i HT 29 celler (n=3). Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble behandlet med ligand i omtrent et døgn, før de ble høstet og ekspresjon av PTEN (molekylvekt = 54 kDa) ble detektert som beskrevet i Materialer og metoder. a) Typisk Western blott fra ett av tre forsøk. Blottet inneholder også bånd fra en ligand (GW501516), som ikke er relevant for denne oppgaven, da forsøkene ble gjort i samarbeid med en annen masterstudent. b) Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. Data er beregnet som relativ ekspresjon med ratio PTEN/GAPDH, i forhold til kontroll.**





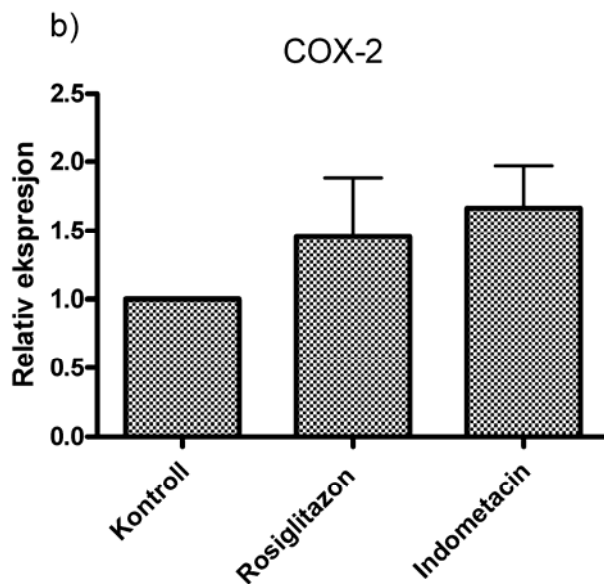
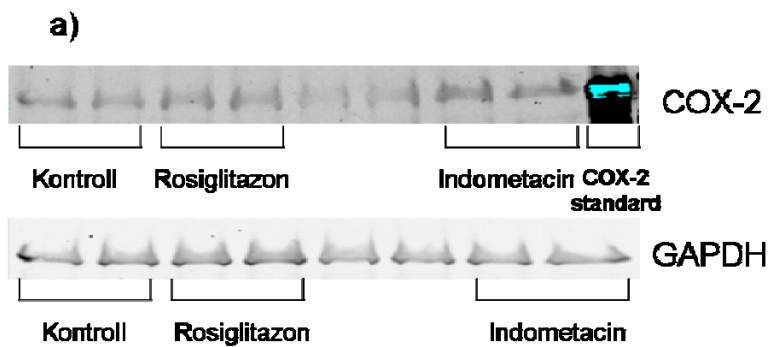
**Figur 17: Effekt av rosiglitazon (10 $\mu$ M) og indometacin (100 $\mu$ M) på ekspresjon av PTEN målt ved Western blotting, i HCT 116 celler (n=4). Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble behandlet med ligand i omtrent et døgn, før de ble høstet og ekspresjon av PTEN (molekylvekt = 54 kDa) ble detektert som beskrevet i Materialer og metoder. a) Typisk Western blott fra ett av fire forsøk. Blottet inneholder også bånd fra en ligand (GW501516), som ikke er relevant for denne oppgaven, da forsøkene ble gjort i samarbeid med en annen masterstudent. b) Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk. Data er beregnet som relativ ekspresjon med ratio PTEN/GAPDH, i forhold til kontroll.**

### 3.4.2 COX-2

Antistoff mot COX-2 ble benyttet for å undersøke om aktivering av PPAR $\gamma$  fører til en endring i ekspresjon av COX-2. Studier på området viser motstridende effekter av PPAR $\gamma$ -aktivering med hensyn på COX-2-ekspresjon, både som nevnt tidligere i forskjellige vev, men også i samme type celler, som celler isolert fra tykktarmskreft (HT 29). Noen viser en oppregulering i ekspresjon av COX-2 [34], mens andre har funnet at ekspresjonen av COX-2 nedreguleres i disse cellene [62]. Man har også undersøkt effekten av NSAIDs på COX-2-ekspresjon, og studier beskriver en svak økning [34] eller ingen effekt av indometacin på ekspresjon av COX-2 i HT 29 celler [63].

Våre resultater viser en økning i ekspresjon av COX-2, både ved stimulering med rosiglitazon og i enda større grad ved stimulering med indometacin (figur 18). Forsøket ble imidlertid kun utført to ganger, da det ikke var tid til flere forsøk på slutten av arbeidet med masteroppgaven.

Det ble også utført et forsøk med COX-2-antistoff på HCT 116 cellene, men dette forsøket viste ingen ekspresjon av COX-2, verken basalt eller etter forbehandling med rosiglitazon og indometacin (data ikke vist her). Manglende basal ekspresjon er i samsvar med andre studier som viser at HCT 116 cellene ikke har ekspresjon av COX-2 [52, 58].

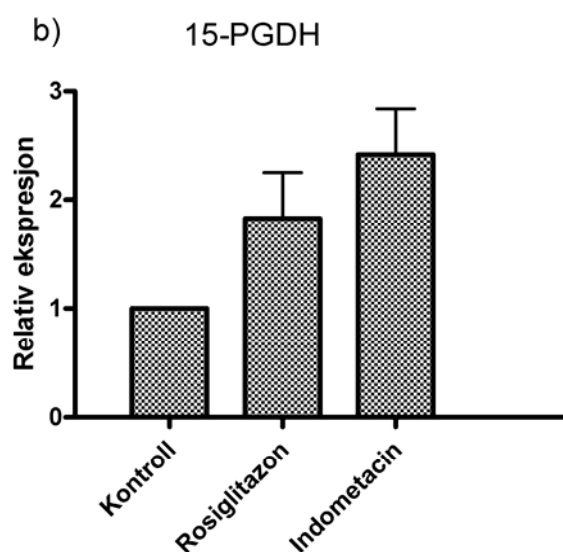
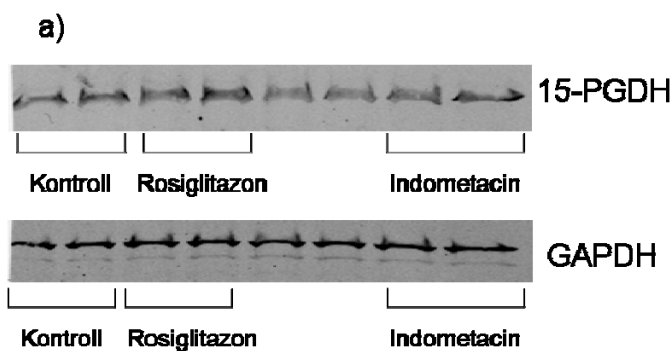


**Figur 18: Effekt av rosiglitazon (10 $\mu$ M) og indometacin (100 $\mu$ M) på ekspresjon av COX-2 målt ved Western blotting, i HT 29 celler (n=2).**

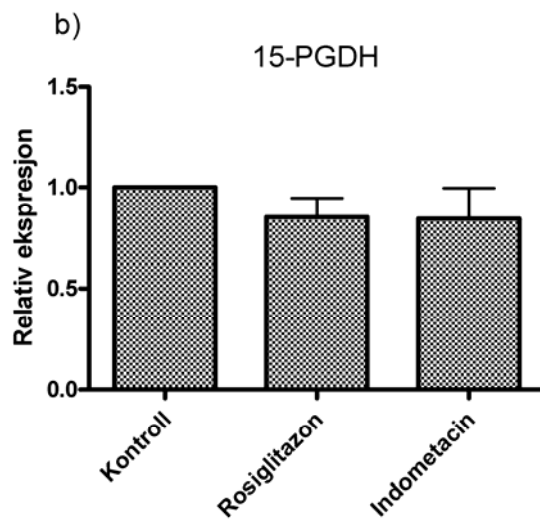
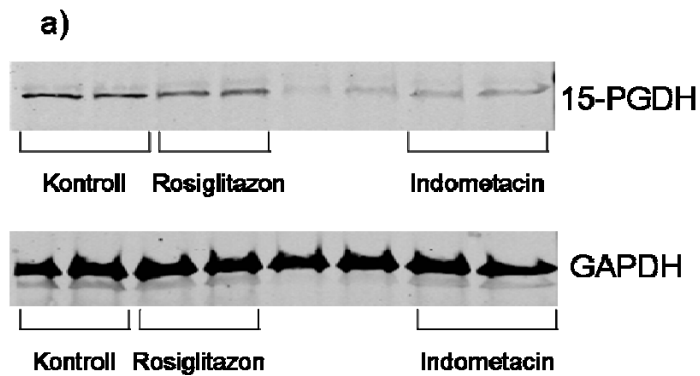
Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble behandlet med ligand i omtrent et døgn, før de ble høstet og ekspresjon av COX-2 (molekylvekt = 72 kDa) ble detektert som beskrevet i Materialer og metoder. a) Ett av to parallelle Western blott. Det andre blottet viser tilsvarende effekt. Blottet inneholder også bånd fra en ligand (GW501516), som ikke er relevant for denne oppgaven, da forsøkene ble gjort i samarbeid med en annen masterstudent. b) Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire paralleller i to uavhengige forsøk. Data er beregnet som relativ ekspresjon med ratio COX-2/GAPDH, i forhold til kontroll.

### 3.4.3 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase

Agonister på PPAR $\gamma$  er vist å oppregulere ekspresjonen av 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) [17]. Det er uavklart om dette skjer via en PPAR $\gamma$ -avhengig eller -uavhengig mekanisme. Det var derfor av interesse å undersøke om vi kunne finne en endring i ekspresjon av 15-PGDH i våre celler, ved behandling med rosiglitazon og indometacin. I HT 29 cellene fikk vi en økning i ekspresjon av 15-PGDH for begge ligandene, noe svakere for rosiglitazon i forhold til indometacin (figur 19). Resultatet er basert på kun to forsøk, da det var liten tid igjen på slutten av arbeidet med masteroppgaven. I HCT 116 cellene fikk vi derimot ingen effekt av rosiglitazon og indometacin på 15-PGDH ekspresjon (figur 20).



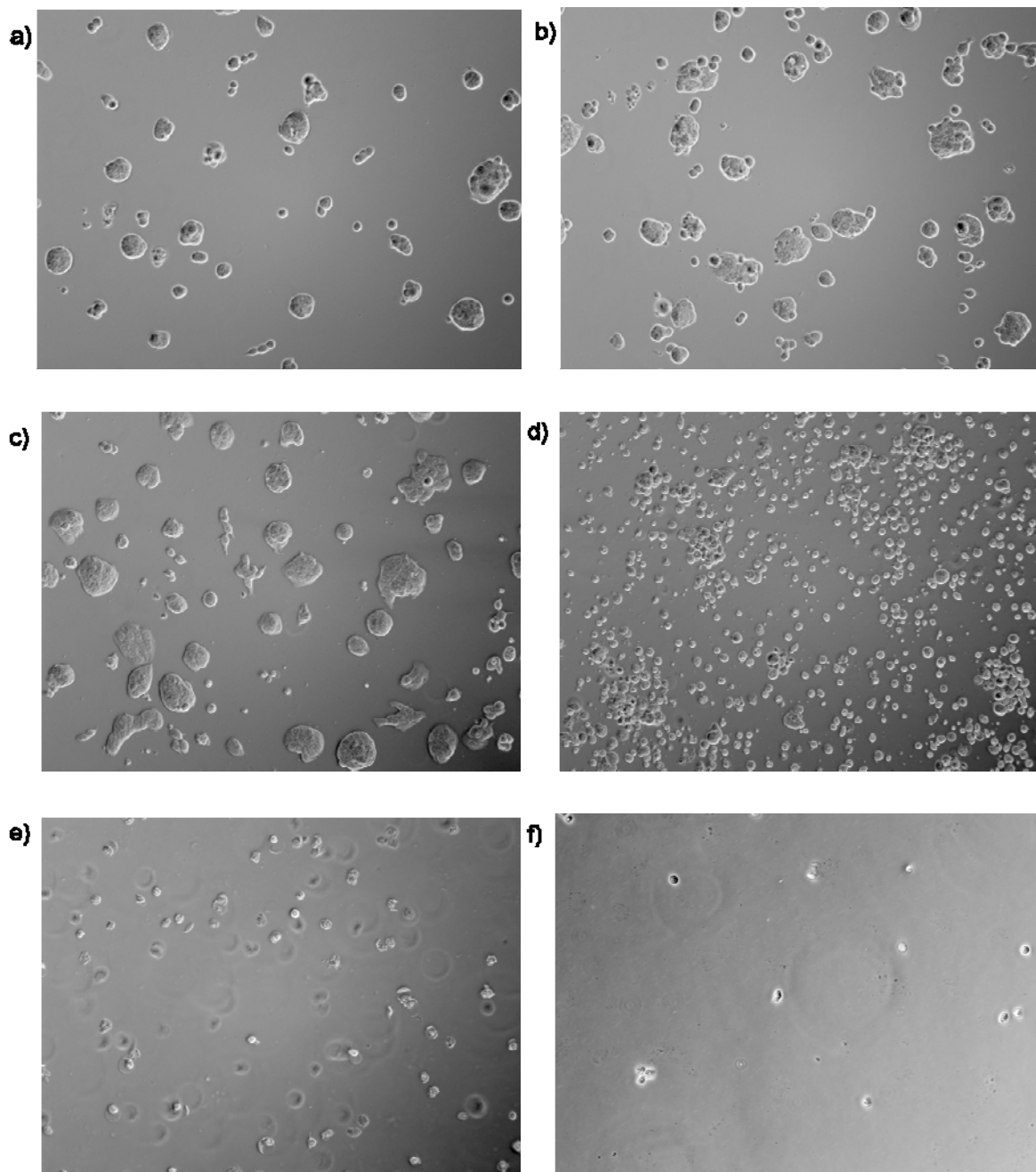
**Figur 19: Effekt av rosiglitazon (10 $\mu$ M) og indometacin (100 $\mu$ M) på ekspresjon av 15-PGDH målt ved Western blotting, i HT 29 celler (n=2).** Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble behandlet med ligand i omtrent et døgn, før de ble høstet og ekspresjon av 15-PGDH (molekylvekt = 25 kDa) ble detektert som beskrevet i Materialer og metoder. a) Ett av to parallelle Western blott. Blottet inneholder også bånd fra en ligand (GW501516), som ikke er relevant for denne oppgaven, da forsøkene ble gjort i samarbeid med en annen masterstudent. b) Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire paralleller i to uavhengige forsøk. Data er beregnet som relativ ekspresjon med ratio 15-PGDH /GAPDH, i forhold til kontroll.



**Figur 20: Effekt av rosiglitazon (10 $\mu$ M) og indometacin (100 $\mu$ M) på ekspresjon av 15-PGDH målt ved Western blotting, i HCT 116 celler (n=4). Cellene ble sådd ut med en celletetthet på 50 000 celler/cm<sup>2</sup>. De ble inkubert i et døgn med serumholdig medium (10 % serum), deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i enda et døgn. Cellene ble behandlet med ligand i omtrent et døgn, før de ble høstet og ekspresjon av 15-PGDH (molekylvekt = 25 kDa) ble detektert som beskrevet i Materialer og metoder. a) Typisk Western blott fra ett av fire forsøk. Blottet inneholder også bånd fra en ligand (GW501516), som ikke er relevant for denne oppgaven, da forsøkene ble gjort i samarbeid med en annen masterstudent. b) Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk. Data er beregnet som relativ ekspresjon med ratio 15-PGDH/GAPDH, i forhold til kontroll.**

### 3.5 Cytotoksisitet

For de fleste av ligandene som ble benyttet kunne man se en økende tendens til cytotoxicitet ved stigende konsentrasjoner av ligandene. Ved høyere konsentrasjoner av ligandene, kunne vi i mikroskop tydelig se at cellenes morfologi var endret i forhold til celler som ikke var stimulert, som vist i figur 21 (c-f), for sulindaksulfid. Cellene gikk fra å vokse i ansamlinger til å skille seg ut fra disse, og vi kunne tydelig se hver enkelt celle. Cellene var klart avgrenset og etter hvert trakk de seg sammen og fikk redusert cellestørrelse. Døde celler løsnet og ble liggende i væskelaget over brønnflaten. I de høyeste konsentrasjonene kunne vi se at de fleste cellene lå som løse partikler, og som forsvant når mediet i brønnene ble fjernet. Forbehandling med rosiglitazon var imidlertid ikke cytotoxicisk (figur 21 a-b).



**Figur 21: HT 29 celler stimulert med rosiglitazon og sulindaksulfid.** a) Kontroll: ubehandlede celler. b) Celler stimulert med 10  $\mu\text{M}$  rosiglitazon. Cellenes morfologi er uendret sammenliknet med kontroll. c) Kontroll: celler eksponert for medium med 0,2 % DMSO (samme konsentrasjon av DMSO som for sulindaksulfid). d) Celler stimulert med 100  $\mu\text{M}$  sulindaksulfid. Det er tydelig at cellene er døde eller i ferd med å dø. e) Celler stimulert med 500  $\mu\text{M}$  sulindaksulfid. Det er få celler igjen, de fleste cellene er døde og ligger i væskelaget over brønnflaten. f) De samme cellene som i figur (e). Mediet er byttet ut og med det ble de fleste (døde) cellene fjernet. Bildet viser dermed hvor få levende celler som er igjen.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Metodologiske aspekter

Luciferaseassayet inkludert transfeksjonen var ikke en veletablert metode ved dette laboratoriet, det var derfor nødvendig å utvikle og optimalisere metoden. Nå viste det seg imidlertid at det var vanskelig å få fram tydelige effekter ved hjelp av denne metoden i cellelinjene som ble benyttet. Det ble derfor underveis i arbeidet med oppgaven besluttet å undersøke effekter av PPAR $\gamma$ -aktivering ved hjelp av cAMP-assay og Western blotting, som er veletablerte metoder ved dette laboratoriet.

Stoffene sulindak, sulindaksulfid, sulindaksulfon, diklofenak, NS 398 og GW9662 har alle dårlig løselighet i vann, og DMSO ble benyttet som løsemiddel for disse ligandene. DMSO er regnet for å være et inert løsemiddel, likevel ble konsentrasjon av DMSO holdt så lav som mulig (endelig konsentrasjon 0,1-2 %), da denne viste seg å være cytotoxisk i høye konsentrasjoner. Kontrollene for de respektive stoffene ble tilsatt samme konsentrasjon av DMSO.

#### 4.1.1 Transfeksjon

Til tross for flere forsøk på å optimalisere transfeksjonsmetoden, viste studier av transfeksjonseffektiviteten at spesielt HT 29 cellene ikke ble tilstrekkelig transfektert. Kun omtrent 10 % av totalt antall celler ble transfektert. Imidlertid var transfeksjonseffektiviteten relativt bedre i HCT 116 cellene. Problemet med disse cellene var derimot at de var mer følsomme for manipulering, løsnet lettere og ble lettere vasket bort, slik at vi underveis i arbeidet med oppgaven besluttet å fokusere på HT 29 cellelinjen. I tillegg til lav transfeksjonseffektivitet for HT 29 cellene, kunne vi se i mikroskop at det var mye døde celler etter transfeksjonen i begge cellelinjer. I motsetning til HT 29 cellene vokste HCT 116 cellene raskere både under transfeksjonen og ved



---

stimulering med ligand, slik at vi måtte så ut disse cellene med lavere celletetthet enn for HT 29 cellene. Responsen på aktivering med rosiglitazon viste til å begynne med omtrent 2-3 gangers økning i luciferaseaktivitet, men etter hvert viste det seg at det var vanskelig å få fram gode dose-responskurver. Disse tidligste resultatene er i samsvar med hva andre har funnet av effekter av rosiglitazon. Allred og medarbeidere (2008) viste en 5 gangers økning i luciferaseaktivitet av rosiglitazon sammenliknet med kontroll, i HT 29 celler transfektert med et PPRE-konstrukt forbundet med en luciferasereporter [64]. I samme type forsøk fant Tencer og medarbeidere (2008) omtrent 3-4 gangers økning i luciferaseaktivitet av rosiglitazon [65].

I tillegg til lav transfeksjonseffektivitet for HT 29 cellene, var det åpenbart at konsentrasjonene av NSAIDs som gav tydelige responser var cytotoksiske. Som vist i figur 21 kan man åpenbart se at cellene er i ferd med å dø. Konsentrasjonene som er benyttet i denne oppgaven, er i samsvar med konsentrasjoner som er brukt i de fleste andre studier som er gjort tidligere [44, 45, 48, 61]. Det er bemerkelsesverdig at mange av disse studiene ikke tar opp problemstillingen med cytotoksiske konsentrasjoner og ikke nevner effekten av dette på cellene. Det er derfor nødvendig med flere studier på området, som kan kaste lys over denne problemstillingen. Samtidig som transfeksjonseffektiviteten var lav, så vi også at aktiviteten av renilla, som aktiveres i alle celler som er transfektert, ble redusert i de høyeste konsentrasjonene. Dette tyder og på cytotoksisitet, som sett i sammenheng med en lite effektiv transfeksjon førte til ujevne resultater og usikkerhet rundt disse.

#### **4.1.2 Western blotting**

For å detektere proteiner på membranen ble det benyttet fluoriserende antistoffer. Fordelen med bruk av fluoriserende antistoffer er at signalet er konstant og ikke endres over tid, slik at tidsaspektet for detekteringen ikke er av betydning. I tillegg blir kvantifiseringen av båndene mer nøyaktig og objektiv i forhold til deteksjon med

for eksempel kjemiluminescens som tidligere har vært mye brukt ved dette laboratoriet. For å korrigere for varierende proteinmengde i celleprøvene ble det benyttet antistoff for et protein som er konstitutivt uttrykt i de fleste vev, GAPDH. Det ble laget egne geler og blott for GAPDH, men ulempen med dette er at forskjeller i "loading" og proteinoverføring kan gi betydelig variasjon mellom forskjellige blott. For å unngå dette kunne man først detektere de ønskede proteinene, for så å "strippe" membranen og benytte den samme membranen til detektering med GAPDH. Derimot ble forsøk med "stripping" av membranen ikke vellykket, tap av protein var årsaken til at det ble besluttet å videre bruke to separate membraner for PTEN/COX-2/15-PGDH og GAPDH.

## 4.2 Uttøver NSAIDs noen av sine effekter ved å stimulere PPAR $\gamma$ ?

Måling av luciferaseaktiviteten slik vi har utført det, er et direkte mål på aktivering av PPAR. Denne metoden er beskrevet i litteraturen, og flere studier viser tydelige effekter av PPAR $\gamma$ -agonister på luciferaseaktivitet [64, 65]. De aller første dose-respons forsøkene med rosiglitazon gav omtrent 3 gangers økning i respons. Det viste seg derimot etter hvert at stimulering med rosiglitazon gav lite reproducerbar reseptoraktivering. Liten respons på reseptoraktivering kan skyldes lav ekspresjon av PPAR $\gamma$  i kombinasjon med lav transfeksjonseffektivitet. For å forbedre metoden kunne vi transfektere inn PPAR $\gamma$  i våre cellelinjer, HT 29 og HCT 116, slik at disse dermed fikk en høyere ekspresjon av denne reseptoren framfor de andre isoformene. En svakhet ved en slik transient transfektert cellelinje vil være variabel transfeksjonseffektivitet, i likhet med metoden som ble benyttet i oppgaven. Man kunne derimot valgt en stabilt transfektert cellelinje, som uttrykker genet for PPAR $\gamma$  på et konstant nivå. Ved bruk av denne typen cellelinje får man et mer konsistent uttrykk av reseptoren, og resultatene vil dermed bli jevnere og lettere å reproducere. Et tredje alternativ er å benytte en ren cellelinje, som ikke inneholder noen av de tre isoformene av reseptoren fra før, og transfektere inn PPAR $\gamma$ , med en av de to overnevnte metodene: stabil eller transient

---

transfeksjon. Ved bruk av en slik spesifikk cellelinje ville effekten som fremkom kunne relateres til PPAR $\gamma$ .

Enkelte NSAIDs er vist å ha antiproliferative effekter mediert via PPAR $\gamma$ , som tidligere nevnt [19, 45]. Ved behandling av cellene med ulike NSAIDs, antar vi derfor at effektene som fremkommer medieres via PPAR $\gamma$ . Denne antakelsen burde bekreftes ved å samtidig stimulere cellene med GW9662, som er en blokker av PPAR $\gamma$ . Seimandi og medarbeidere (2005) viste at GW9662 ikke aktiverer PPAR $\gamma$ -mediert transkripsjon, men hindrer derimot reseptoraktivering av PPAR $\gamma$ -agonister, som for eksempel rosiglitazon [22]. Dette ble forsøkt i arbeidet med denne oppgaven, ved å behandle cellene med en kombinasjon av den kjente PPAR $\gamma$ -agonisten rosiglitazon og GW9662. Da resultatene fra stimulering med rosiglitazon alene ikke gav tydelige dose-responskurver, ble det imidlertid vanskelig å tyde resultatet fra kombinasjonen med blokker. Forsøkene ble derfor ikke tatt videre med NSAIDs og blokker. I videre studier bør derfor PPAR $\gamma$ -mediert effekt av NSAIDs bekreftes ved samtidig behandling med GW9662, ideelt i en ren PPAR $\gamma$ -cellelinje som beskrevet over, eventuelt i celler med siRNA-mediert ”knockdown” av PPAR $\gamma$ .

Sulindaksulfid, som er vist å være en agonist på PPAR $\gamma$  [45], gav tydelige doseavhengige responser i begge cellelinjene. Det var derimot ikke ventet at effekten av denne liganden skulle bli kraftigere enn effekten av den etablerte PPAR $\gamma$ -aktivatoren rosiglitazon, en full agonist, som det fremkommer av resultatene. Selv om sulindaksulfid var cytotoxisk, kan det ikke forklare den sterke responsen, ettersom andre NSAIDs viste tilsvarende cytotoxisitet. Man kan av den grunn tenke seg at sulindaksulfid har effekter som medieres via andre mekanismer enn binding til PPAR $\gamma$ . Aktivering av PPAR fører til heterodimerisering med retinoid X reseptor. Den transkripsjonelle aktiviteten til heterodimeren reguleres videre av koaktivatorer og korepressorer [7], og effekten av PPAR-agonister er dermed avhengig av hvilke kofaktorer som er tilstede i cellene. En hypotese for den kraftige effekten av sulindaksulfid kan være at denne liganden rekrutterer koaktivatorer i cellene mer effektivt sammenliknet med rosiglitazon. Det er

også mulighet for at sulindaksulfid i tillegg til aktivering av PPAR $\gamma$  også aktiverer RXR, og dermed får en større effekt på aktiveringen av PPRE på promoter i det aktuelle genet. Dette bør undersøkes videre i mer dyptgående studier. For å bekrefte en eventuell PPAR $\gamma$ -uavhengig effekt kan man benytte blokkeren GW9662, eller behandling med sulindaksulfid i ”knockdown”-celler uten ekspresjon av PPAR $\gamma$ .

Responser på den partielle PPAR $\gamma$ -agonisten diklofenak [48], var ikke signifikant forskjellig fra kontrollen, verken i cellelinjen HCT 116 eller HT 29. Utgangspunktet for studiene av diklofenak var blant annet å undersøke ligandens partielle agonistiske effekt, ved å stimulere cellene med rosiglitazon, som anses for å være en full agonist, i tillegg til diklofenak. På denne måten kunne vi fått bekreftet at diklofenak er en partiell agonist. Men på grunn av den lave responsen vi fikk av rosiglitazon, ville dette blitt problematisk å bestemme, og det ble besluttet å utelate disse forsøkene.

Samlet sett tyder forsøkene med reporter-assayet på at NSAIDs kan aktivere PPAR $\gamma$ , men at dette skjer ved konsentrasjoner som er cytotoxiske.

### 4.3 Kan PPAR $\gamma$ -aktivering regulere nivået av EP2-reseptorer?

Det er rapportert at PPAR $\gamma$  nedregulerer EP2-reseptorer i lungeceller [61], og indometacin er vist å nedregulere EP2-reseptorer i tykktarmceller, muligens via PPAR $\gamma$  [43]. Det var derfor av interesse å undersøke om henholdsvis rosiglitazon og NSAIDs hadde liknende effekter i våre celler. Analyse av cAMP-produksjon som et mål på nivå av EP-reseptorer, er en indirekte metode som kan benyttes for å undersøke om PPAR $\gamma$ -aktivering påvirker nivået av EP-reseptorer, da det er en korrelasjon mellom reseptorbinding og respons.

---

EP2-reseptor er vist å spille en viktig rolle i tumorutvikling [66], blant annet i kreftceller isolert fra lungesvulster [61]. Økt ekspresjon av EP2-reseptorer og dermed høyere produksjon av cAMP medfører inhibering av apoptose [67, 68]. Han og Roman (2004) viste at stimulering av lungekreftceller med en PGE<sub>2</sub>-analog, 16,16-dimethyl-prostaglandin E<sub>2</sub>, resulterte i økt celleproliferasjon. Denne effekten ble bekreftet ved stimulering med butaprost, som er en EP2-agonist. Dette kan tyde på at effekten av PGE<sub>2</sub> på cellevekst medieres via EP2-reseptor i celler isolert fra lungesvulster [61]. Sonoshita og medarbeidere (2001) fant at mutasjoner i genet som uttrykker EP2-reseptor fører til reduksjon i både antall og størrelse av polypper i tarmen, i en musmodell for human familiær adenomatøs polypose (FAP). Dette bekrefter også at det er en sammenheng mellom effekt av PGE<sub>2</sub> på EP2-reseptorer og økt celleproliferasjon [69].

Våre funn viser en reduksjon i produksjonen av cAMP (figur 13-15). Vi antar at dette skyldes nedregulert ekspresjon av EP2-reseptorer, men for å bekrefte at det er en relasjon mellom redusert cAMP og nedsatt uttrykk av EP2-reseptor, burde vi gjort videre studier på dette. Fujino og medarbeidere (2007) viste at indometacin reduserer PGE<sub>2</sub>-stimulert cAMP-dannelse i celler isolert fra tykktarmskreft. For å bevise at dette var i sammenheng med nedregulering av EP2-reseptorer, målte de nivå av EP2-reseptor mRNA ved hjelp av Real-Time PCR. Ved forbehandling av cellene med indometacin, fant de en dose-avhengig nedgang i EP2-reseptor mRNA [43].

For å fastslå om effektene som fremkom i forsøkene av nedregulering av EP2-reseptor og måling av cAMP-nivå var mediert via PPAR $\gamma$ , måtte vi gjort nærmere studier av disse effektene. Det er imidlertid uklart om PPRE finnes på EP-promoter, eller om PPAR $\gamma$ -agonister interagerer med andre transkripsjonsfaktorer i cellene. Ved å benytte PPAR $\gamma$ -blokkeren GW9662 eller celler med siRNA-mediert ”knockdown” av PPAR $\gamma$ , ville vi fått bekreftet om effekter av rosiglitazon og NSAIDs var mediert via PPAR $\gamma$ -avhengige eller –uavhengige mekanismer. I følge Han og Roman (2004) utøves effektene av rosiglitazon og andre PPAR $\gamma$ -agonister både via PPAR $\gamma$ -avhengige og –uavhengige mekanismer i lungekreftceller [61]. De viste at den hemmende effekten av rosiglitazon og ciglitazon,

begge agonister på PPAR $\gamma$ , på ekspresjon av EP2-reseptorer ble reversert av blokkeren GW9662. Imidlertid hadde GW9662 ingen innvirkning på den hemmende effekten av den endogene PPAR $\gamma$ -liganden PGJ<sub>2</sub>. I tillegg fant de at behandling av cellene med PPAR $\gamma$ -agonister var assosiert med fosforylering av Erk, og at en hemmer av MEK-1/Erk-signalering blokkerte effektene av PPAR $\gamma$  på EP2-ekspresjon [61].

Indometacin kan interagere med både PPAR $\gamma$  og PPAR $\delta$ . Ved å virke som agonist på PPAR $\gamma$  [41] og å hindre interaksjon mellom PPAR $\delta$  og DNA [70], vil effektene av indometacin ofte forsterkes, da disse to reseptorene som regel har motsatte effekter. Som tidligere nevnt kan aktivering av PPAR $\gamma$  nedregulere ekspresjon av EP2-reseptorer, noe som medfører lavere produksjon av cAMP i cellen [61]. Derimot kan aktivering av PPAR $\delta$  oppregulere ekspresjon av EP4-reseptorer [71], og dermed øke nivået av cAMP. Indometacin kan derfor redusere produksjonen av cAMP i cellene, i teorien både ved å aktivere PPAR $\gamma$  og å hindre interaksjon mellom PPAR $\delta$  og DNA. Studier viser at rosiglitazon og indometacin aktiverer PPAR $\gamma$  i omtrent samme grad [41]. Dersom indometacin har en tilleggseffekt ved å hindre binding av PPAR $\delta$  til DNA, kunne man forestilt seg en større nedgang i cAMP-produksjon av indometacin sammenliknet med rosiglitazon. Trolig vil dette imidlertid ikke ha betydning for effekten av indometacin i disse cellene. For å undersøke om effekten av indometacin var mediert via PPAR $\gamma$ , kunne vi samtidig stimulert cellene med GW9662, som er en blokker av PPAR $\gamma$ , eller benyttet celler med siRNA-mediert ”knockdown” av PPAR $\gamma$ .

Resultatene fra dose-respons forsøkene med sulindaksulfid viser en signifikant nedgang i cAMP-produksjon, som følge av nedregulering av EP2-reseptorer. Da vi studerte disse cellene i mikroskop før høsting, var det imidlertid tydelig at en stor del av cellene enten var i ferd med å dø eller allerede var døde, og at det dermed var få levende celler igjen (se figur 21 d). Effekten av sulindaksulfid blir derfor ikke typisk for disse cellene, da det kun er en liten andel av cellene som er ansvarlig for nedreguleringen av cAMP-produksjon som fremkommer i resultatet. De mest

---

hardføre cellene som er igjen og gir effekt av behandlingen, kan ha utviklet andre egenskaper enn resten av cellekulturen. Effekten er dermed ikke representativ for disse HT 29 cellene. Det ville imidlertid vært av interesse å undersøke om 30  $\mu\text{M}$  sulindaksulfid eller lavere konsentrasjoner har tilsvarende effekter på cellene.

#### 4.4 Regulerer PPAR $\gamma$ ekspresjon av PTEN, COX-2 og 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase?

Western blott-metoden ble benyttet for å undersøke om PPAR $\gamma$ -agonister regulerer ekspresjon av ulike proteiner. Proteinene som ble valgt er i litteraturen beskrevet å være regulert av PPAR $\gamma$ -agonister, men det er imidlertid ikke avklart om dette skyldes en direkte PPAR $\gamma$ -mediert effekt eller via en PPAR $\gamma$ -uavhengig mekanisme. Det er en svakhet at noen av forsøkene ikke ble gjentatt tilstrekkelig antall ganger, men man kan likevel se tendenser i resultatene som er bakgrunn for diskusjon.

##### 4.4.1 PTEN

Resultatene fra deteksjon av PTEN-nivå etter behandling med rosiglitazon og indometacin, viser en nedgang i ekspresjon av proteinet i HT 29 cellelinjen. I HCT 116 cellene fant vi ingen endring i ekspresjon av PTEN. I motsetning til våre funn viser studier at aktivering av PPAR $\gamma$  øker ekspresjonen av PTEN [37, 38, 72]. Denne effekten er studert i flere celletyper, blant annet kreftceller isolert fra bryst [72], pankreas [37] og tykktarm [31]. Teresi og medarbeidere (2006) viste at rosiglitazon kan indusere ekspresjon av PTEN. Imidlertid viste de at andre agonister på PPAR $\gamma$ , ciglitazon, troglitazon og pioglitazon, ikke utøver denne effekten. Dette kan tyde på strukturspesifikke effekter av ligander på PPAR $\gamma$  [72]. I motsetning til etablerte agonister på PPAR $\gamma$ , er effektene av NSAIDs med hensyn på ekspresjon av PTEN lite studert tidligere.

Studier av ekspresjon av PTEN ved stimulering av PPAR $\gamma$ -agonister, varierer både med tanke på stimuleringstid og valg av konsentrasjon av ligand. Patel og medarbeidere (2001) benyttet kun en konsentrasjon av rosiglitazon (1  $\mu$ M) [31], mens Teresi og medarbeidere (2006) stimulerte cellene med varierende konsentrasjoner og fant størst økning i ekspresjon ved 30  $\mu$ M av rosiglitazon [72]. Til tross for varierende konsentrasjoner av PPAR $\gamma$ -agonist, viser begge studier en økning i ekspresjon av PTEN. I tillegg til forskjellige konsentrasjoner av rosiglitazon, benyttet også Teresi og medarbeidere (2006) forskjellige tidsaspekter ved stimulering med ligand. Det viste seg at økt ekspresjon av PTEN oppstod allerede etter et døgn, men at den største økningen fant sted etter 48 timers stimulering [72]. Dette kan være en medvirkende årsak til våre negative resultater, da vi behandlet cellene med ligand i kun et døgn. Flere studier bekrefter at økt ekspresjon av PTEN medfører redusert nivå av fosforylert Akt, noe som tyder på at PPAR $\gamma$ -agonister øker nivået av funksjonelt og aktivt PTEN [31, 37, 72]. Det er i tillegg utført studier som bekrefter at økningen i nivå av PTEN skyldes økt transkripsjon og ikke hemmet degradering av proteinet, ved å måle mRNA ved hjelp av Real-Time PCR [72].

Spørsmålet om effekter av rosiglitazon medieres via en PPAR $\gamma$ -avhengig mekanisme, tas opp i flere studier. Farrow og medarbeidere (2003) benyttet PPAR $\gamma$ -blokkeren GW9662 i kombinasjon med rosiglitazon og viste at dette hindret økning av proteinnivåer av PTEN [37]. Teresi og medarbeidere (2006) transfekterte celler med en dominant negativ PPAR $\gamma$ . Behandling med rosiglitazon i disse cellene forårsaket ingen endring i ekspresjon av PTEN. I tillegg benyttet de en inaktiv analog av rosiglitazon, som ikke påvirket nivået av PTEN, i motsetning til aktiv rosiglitazon [72]. Noen antyder også at det finnes PPRE i promoterområdet til PTEN-genet [31], men denne hypotesen er ennå ikke tilstrekkelig dokumentert. Alt i alt bekrefter disse studiene at økt ekspresjon av PTEN skyldes direkte effekter mediert via PPAR $\gamma$ .



#### 4.4.2 COX-2

Ekspresjonen av COX-2 er vist å være oppregulert i tykktarmskreft [73], og det er holdepunkter for at dette kan påvirke dannelsen og utviklingen av denne typen kreft [62]. Tidligere studier av aktivering av PPAR $\gamma$  med hensyn på COX-2-ekspresjon, viser motstridende resultater i humane cellelinjer isolert fra tykktarm. I følge Yang og medarbeidere (2001) nedreguleres ekspresjonen av COX-2 når HT 29 celler stimuleres med PPAR $\gamma$ -agonister [62]. Andre studier viser derimot ingen endring i COX-2-ekspresjon ved aktivering av PPAR $\gamma$  [73, 74]. Det er til og med vist at stimulering med prostaglandiner og NSAIDs kan øke ekspresjonen av COX-2 [34]. I sistnevnte studie er det ikke brukt de samme ligandene som i de andre studiene for å undersøke denne effekten, noe som kan være av betydning for resultatet. I noen studier har man benyttet etablerte PPAR $\gamma$ -agonister som rosiglitazon og ciglitazon, for å undersøke effekter som følge av aktivering av reseptor. Mens i andre studier som har undersøkt de samme effektene, har man brukt prostaglandiner og NSAIDs, som foreløpig ikke er like anerkjente aktivatorer av PPARs. Det er i tillegg til valg av ligander, variasjoner i hvordan forsøkene er utført. I noen studier er cellene stimulert med PPAR $\gamma$ -agonister i 24 timer før ekspresjon av COX-2 er målt. Disse viste ingen endring i COX-2-ekspresjon [74]. I en annen studie er cellene derimot stimulert i opptil to døgn før detekteringen av COX-2-ekspresjon er utført. Denne studien viste en nedregulering i ekspresjon av COX-2 [62]. Etersom det kan ta opptil to døgn med stimulering av cellene før effektene fremkommer, kan det tyde på at det er en indirekte PPAR $\gamma$ -effekt som forårsaker denne endringen i COX-2-ekspresjon. Det er i tillegg til andre variabler også ulikheter i forsøkene når det gjelder hvordan ekspresjonen er detektert. Dette kan også ha betydning for hvilke resultater som fremkommer i studiene.

Våre funn støtter hypotesen om en oppregulering av COX-2 ved aktivering av PPAR $\gamma$ . Selv om våre resultater ikke er signifikante, kan man se en tendens til økt ekspresjon av COX-2 i celler behandlet med rosiglitazon og indometacin. Det skal nevnes at dette forsøket kun ble utført to ganger, og bør gjentas i flere forsøk. Det er som tidligere nevnt flere regulatoriske områder på COX-2-promoter som PPAR $\gamma$  kan interferere med og

videre føre til endring i ekspresjon av COX-2. I likhet med spørsmålet om promoterområdet i PTEN-genet inneholder PPRE, er det også antakelser om at dette responsive elementet finnes på COX-2-promoter [62]. I tillegg viser studier at PPAR $\gamma$  kan interagere med andre regulatoriske områder på COX-2-promoter, eksempelvis CRE, NF- $\kappa$ B RE og NF-IL-6 RE [30]. Det er nødvendig med videre studier for å undersøke om effekten av rosiglitazon og indometacin er reseptormediert, eller uttøves via en PPAR $\gamma$ -uavhengig mekanisme.

#### **4.4.3 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase**

Studier viser at ekspresjonen av 15-PGDH ser ut til å være nedregulert i tykktarmskreft [75]. Det er i tillegg indikasjoner for at stimulering av celler med PPAR $\gamma$ -agonister kan oppregulere ekspresjonen av dette enzymet, som er involvert i nedbrytningen av PGE<sub>2</sub> [17]. Hazra og medarbeidere (2007) viste at behandling med rosiglitazon og pioglitazon, kjente PPAR $\gamma$ -agonister, førte til induert ekspresjon av 15-PGDH i lungekreftceller [17]. For å bekrefte disse resultatene utførte de en transient transfeksjon av siRNA mot 15-PGDH-genet. Uten PPAR $\gamma$ -agonist tilstede hadde disse siRNA-transfekserte cellene en økning i konsentrasjon av PGE<sub>2</sub>, sammenliknet med kontrollceller. Ved behandling med PPAR $\gamma$ -agonist i disse to celletypene, fant de en reduksjon i PGE<sub>2</sub> produksjon i kontrollcellene, mens de siRNA-transfekserte cellene viste ingen nedgang i PGE<sub>2</sub>. Dette tyder på at oppregulering av 15-PGDH er viktig for PPAR $\gamma$ -mediert nedregulering av PGE<sub>2</sub>-nivåer [17]. Det er i tillegg vist at indometacin kan øke ekspresjon av 15-PGDH [75], det er derimot ikke gjort studier som kan belyse om denne effekten medieres via en PPAR $\gamma$ -avhengig mekanisme.

Det er imidlertid andre studier som fastslår at ved stimulering med agonister på PPAR $\gamma$ , ser man ingen endring i ekspresjon av 15-PGDH, henholdsvis utført på celler isolert fra tykktarmskreft og lungekreft [75, 76]. Det var derfor av interesse å undersøke om aktivering av PPAR $\gamma$  ville føre til en endring i ekspresjon av dette proteinet i våre celler. Resultatene som fremkom i denne oppgaven viste en svak, men ikke signifikant økning i ekspresjon av 15-PGDH i HT 29 cellene, mens samme studier i HCT 116 cellene viste

---

ingen endring i nivå av 15-PGDH etter stimulering med rosiglitazon og indometacin. Da det er holdepunkter for en sammenheng mellom ekspresjon av COX-2 og 15-PGDH [77], kan dette forklare de ulike effektene i de to cellelinjene. Det er vist at COX-2 nedregulerer ekspresjonen av 15-PGDH i blant annet kreftceller isolert fra mage og lunge [77, 78], noe som kan bety at HT 29 celler som uttrykker COX-2 har lavere nivå av 15-PGDH, i forhold til HCT 116 celler, som ikke har basal ekspresjon av COX-2.

Dermed ser det ut til at våre funn støtter hypotesen om at PPAR $\gamma$  ikke regulerer ekspresjon av 15-PGDH, det trengs likevel flere og grundigere studier for å bekrefte eller avkrefte disse hypotesene. Det bør også videre undersøkes om eventuelle effekter av PPAR $\gamma$ -agonister på ekspresjon av 15-PGDH medieres direkte via PPRE på det regulatoriske området i promoter, eller om ligandene utøver effekter via en PPAR $\gamma$ -uavhengig mekanisme.

#### **4.4.4 Mikrosomal prostaglandin E syntase-1**

Det ble i tillegg til overnevnte antistoffer forsøkt å detektere proteiner med antistoff rettet mot mikrosomal prostaglandin E syntase-1 (mPGE syntase-1). Studier viser at aktivering av PPAR $\gamma$  medfører nedsatt IL-1 $\beta$ -indusert oppregulering av mPGE syntase-1 [15]. PPAR-aktivering kan også nedregulere ekspresjon av mPGE syntase-1 ved å hemme EGR-1 ekspresjon [79]. Western blott-analyse med dette antistoffet viste imidlertid dårlig deteksjon, det ble derfor bestemt å ikke fortsette med dette antistoffet og heller fokusere på de andre antistoffene.

## 4.5 Forskjell på responser i HT 29 celler og HCT 116 celler

Mange av forsøkene som er gjort i denne oppgaven viser forskjellige effekter i de to cellelinjene som er benyttet, HT 29 og HCT 116. En av årsakene til dette er at cellelinjene kan ha ulikt ekspresjonsforhold mellom PPAR $\gamma$  og PPAR $\delta$ . Vi har imidlertid ikke studert basalnivå av reseptorene i disse cellelinjene, noe som heller ikke er beskrevet i stor grad i litteraturen. Forskjellige effekter i de to cellelinjene vil trolig hovedsakelig skyldes høyere transfeksjonseffektivitet i HCT 116 i forhold til HT 29 cellene.

Fordelingen av de forskjellige subtypene av EP-reseptorer er også ulik for HT 29 og HCT 116 cellene. Da HT 29 celler uttrykker EP2-reseptorer i større grad enn HCT 116 cellene, ville man forventet en større nedgang i cAMP-produksjon i HT 29 cellene i forhold til HCT 116 cellene, ved stimulering med PPAR $\gamma$ -agonister. Det var imidlertid ingen utpreget forskjell i nedgangen av cAMP-nivå, mellom de to cellelinjene.

Reduksjonen var heller ikke statistisk signifikant sammenliknet med kontrollen. Det skal nevnes at dette forsøket ble utført som en ett-punktsbestemmelse, og resultatene dermed ikke er like pålitelige som ved bruk av flere konsentrasjoner og måling av dose-respons. En annen vesentlig forskjell mellom cellelinjene er ekspresjon av COX-2. HT 29 celler uttrykker dette proteinet, mens HCT 116 celler ikke har basal ekspresjon av COX-2.

Dette vil påvirke effekter i cellene som medieres via COX-2, i tillegg kan det tenkes at ekspresjon av COX-2 kan ha andre indirekte effekter i cellene. Det er holdepunkter for at ekspresjon av 15-PGDH nedreguleres av COX-2 i kreftceller [77]. HT 29 celler som uttrykker COX-2 kan derfor tenkes å ha lavere basalnivå av 15-PGDH, i forhold til HCT 116 celler. Det er også mulighet for at det finnes en slik sammenheng mellom COX-2-nivå og ekspresjon av PTEN, men dette er lite undersøkt og må eventuelt studeres nærmere. Økt aktivisering av PTEN medfører hemmet Akt-signalering. Dette kan videre redusere aktivitet på NF- $\kappa$ B, et regulatorisk område på COX-2-promoter, og dermed føre til lavere ekspresjon av COX-2 [30].

## 4.6 Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven bekrefter tidligere studier som viser at NSAIDs kan utøve noen av sine effekter via PPAR $\gamma$ . Det er likevel et faktum at effekter av NSAIDs på PPAR $\gamma$  kun opptrer ved høye konsentrasjoner som tydelig er cytotoxiske. Med metodene som ble benyttet i denne oppgaven, kunne vi ikke måle effekter ved lave konsentrasjoner av ligandene. Dette betyr imidlertid ikke at effektene ikke kan være av betydning også ved lavere konsentrasjoner som er mer relevante for de som oppnås in vivo. Studier med metoder som kan måle effekter på enkelcellnivå ville kunne være nyttige for å avklare det.

## Referanser

1. Golan, D.E., et al., *Principles of Pharmacology - The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 2005. p. 498-499.
2. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. 2003. p. 693-696.
3. Eichhorn, M.E., et al., *Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact*. Langenbecks Archives of Surgery, 2007. **392**(3): p. 371-9.
4. Bray, F., et al., *Tykkarms- og endetarmskreft i Norge - epidemiologi*. Tidsskr Nor Lægeforen, 2007. **127**: p. 2682-7.
5. Søreide, K., *Genetikk og molekylær klassifisering ved kolorektal kreft*. Tidsskr Nor Lægeforen, 2007. **127**: p. 2818-23.
6. Synnestvedt, M., Ø. Meen, and B. Hofstad, *Kolorektalcancer - Lokalisasjonsavhengige symptomer?* Tidsskr Nor Lægeforen, 1997. **117**: p. 3796-9.
7. 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.
8. Nesbakken, A. and M. Gaard, *Kirurgisk behandling av tykktarmskreft*. Tidsskr Nor Lægeforen, 2007. **127**: p. 2942-5.
9. Sørbye, H., M. Brændengen, and L. Balteskard, *Palliativ kjemoterapi og strålebehandling ved metastatisk kolorektal cancer*. Tidsskr Nor Lægeforen, 2008. **128**: p. 194-7.
10. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. 2003. p. 244-252.
11. Eibl, G., et al., *COX and PPAR: possible interactions in pancreatic cancer*. Pancreas, 2004. **29**(4): p. 247-53.
12. Liao, Z., et al., *Cyclo-oxygenase-2 and its inhibition in cancer: is there a role?* Drugs, 2007. **67**(6): p. 821-45.
13. Hata, A.N., et al., *Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation*. Pharmacology & Therapeutics, 2004. **103**(2): p. 147-66.
14. Hull, M.A., et al., *Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer?* Molecular Cancer Therapeutics, 2004. **3**(8): p. 1031-9.
15. Kapoor, M., et al., *Microsomal prostaglandin E synthase-1 deficiency is associated with elevated peroxisome proliferator-activated receptor gamma: regulation by prostaglandin E2 via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(8): p. 5356-66.
16. Cho, H. and H.H. Tai, *Inhibition of NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) by cyclooxygenase inhibitors and chemopreventive agents*. Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids, 2002. **67**(6): p. 461-5.
17. Hazra, S., et al., *Pioglitazone and rosiglitazone decrease prostaglandin E2 in non-small-cell lung cancer cells by up-regulating 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*. Molecular Pharmacology, 2007. **71**(6): p. 1715-20.

18. Soslow, R.A., et al., *COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors*. *Cancer*, 2000. **89**(12): p. 2637-45.
19. Tegeder, I., J. Pfeilschifter, and G. Geisslinger, *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors*. *FASEB Journal*, 2001. **15**(12): p. 2057-72.
20. 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*. *Biochemical Pharmacology*, 1996. **52**(2): p. 237-45.
21. Michalik, L., et al., *Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories*. *Nature Reviews Cancer*, 2004. **4**(1): p. 61-70.
22. Seimandi, M., et al., *Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands*. *Analytical Biochemistry*, 2005. **344**(1): p. 8-15.
23. Wang, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases*. *Critical Reviews in Oncology-Hematology*, 2006. **58**(1): p. 1-14.
24. Golan, D.E., et al., *Principles of Pharmacology - The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 2005. p. 369-370.
25. Choi, I.K., et al., *PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo*. *Investigational New Drugs*, 2008. **26**(3): p. 283-8.
26. Feinstein, D.L., et al., *Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?* *Biochemical Pharmacology*, 2005. **70**(2): p. 177-88.
27. Brockman, J.A., R.A. Gupta, and R.N. Dubois, *Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(5): p. 1049-55.
28. Evans, R.M., et al., *PPARs and the complex journey to obesity*. *Nature Medicine*, 2004. **10**(4): p. 355-61.
29. Pang, L., et al., *Cyclooxygenase-2 expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human airway smooth muscle cells: role of peroxisome proliferator-activated receptors*. *Journal of Immunology*, 2003. **170**(2): p. 1043-51.
30. Bren-Mattison, Y., et al., *Antitumorigenic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in non-small-cell lung cancer cells are mediated by suppression of cyclooxygenase-2 via inhibition of nuclear factor-kappaB*. *Molecular Pharmacology*, 2008. **73**(3): p. 709-17.
31. Patel, L., et al., *Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN*. *Current Biology*, 2001. **11**(10): p. 764-8.
32. Han, S., et al., *Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical cancer cells*. *Clinical Cancer Research*, 2003. **9**(12): p. 4627-35.
33. Subbaramaiah, K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence*

- for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(15): p. 12440-8.
34. Meade, E.A., et al., *Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(12): p. 8328-34.
  35. Kundu, N., et al., *Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer.* International Journal of Cancer, 2001. **93**(5): p. 681-6.
  36. Di Cristofano, A. and P.P. Pandolfi, *The multiple roles of PTEN in tumor suppression.* Cell, 2000. **100**(4): p. 387-90.
  37. Farrow, B., et al., *Activation of PPARgamma increases PTEN expression in pancreatic cancer cells.* Biochemical & Biophysical Research Communications, 2003. **301**(1): p. 50-3.
  38. Chen, W.C., et al., *Induction of apoptosis in colorectal cancer cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation up-regulating PTEN and inhibiting PI3K activity.* Chinese Medical Journal, 2005. **118**(17): p. 1477-81.
  39. Yki-Jarvinen, H., *Thiazolidinediones.* New England Journal of Medicine, 2004. **351**(11): p. 1106-18.
  40. Na, H.K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation.* Biochemical Pharmacology, 2003. **66**(8): p. 1381-91.
  41. Lehmann, J.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(6): p. 3406-10.
  42. Michalik, L. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions.* Current Opinion in Biotechnology, 1999. **10**(6): p. 564-70.
  43. Fujino, H., et al., *Indomethacin decreases EP2 prostanoid receptor expression in colon cancer cells.* Biochemical & Biophysical Research Communications, 2007. **359**(3): p. 568-73.
  44. Hawcroft, G., S.H. Gardner, and M.A. Hull, *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not explain the antiproliferative activity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on human colorectal cancer cells.* Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 2003. **305**(2): p. 632-7.
  45. Wick, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediating cyclooxygenase-independent inhibition of lung cancer cell growth.* Molecular Pharmacology, 2002. **62**(5): p. 1207-14.
  46. Babbar, N., et al., *Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(48): p. 47762-75.
  47. Sertznig, P., et al., *Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis,*



- progression, and therapy of cancer*. Journal of Cellular Physiology, 2007. **212**(1): p. 1-12.
48. Adamson, D.J., et al., *Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling*. Molecular Pharmacology, 2002. **61**(1): p. 7-12.
  49. Gasparini, L., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action*. Journal of Neurochemistry, 2004. **91**(3): p. 521-36.
  50. Jaradat, M.S., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin*. Biochemical Pharmacology, 2001. **62**(12): p. 1587-95.
  51. Nixon, J.B., et al., *Evaluation of eicosanoids and NSAIDs as PPARgamma ligands in colorectal carcinoma cells*. Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids, 2003. **68**(5): p. 323-30.
  52. 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. 768-79.
  53. Skomedal, T., et al., *A radioimmunoassay for cyclic AMP (cAMP) obtained by acetylation of both unlabeled and labeled (3H-cAMP) ligand, or of unlabeled ligand only*. Acta Pharmacologica et Toxicologica, 1980. **46**(3): p. 200-4.
  54. Kliewer, S.A., et al., *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors*. Nature, 1992. **358**(6389): p. 771-4.
  55. Meng, L.H., et al., *Tetrandrone induces early G1 arrest in human colon carcinoma cells by down-regulating the activity and inducing the degradation of G1-S-specific cyclin-dependent kinases and by inducing p53 and p21Cip1*. Cancer Research, 2004. **64**(24): p. 9086-92.
  56. Li, Q., et al., *Activator protein 2alpha associates with adenomatous polyposis coli/beta-catenin and Inhibits beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity in colorectal cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(44): p. 45669-75.
  57. Sarraf, P., et al., *Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma*. Nature Medicine, 1998. **4**(9): p. 1046-52.
  58. Smith, M.L., G. Hawcroft, and M.A. Hull, *The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action*. European Journal of Cancer, 2000. **36**(5): p. 664-74.
  59. Kutchera, W., et al., *Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(10): p. 4816-20.
  60. Sawhney, R.S., et al., *Integrin alpha2 and extracellular signal-regulated kinase are functionally linked in highly malignant autocrine transforming growth factor-alpha-driven colon cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(22): p. 19861-9.

61. Han, S., et al., *Suppression of prostaglandin E2 receptor subtype EP2 by PPARgamma ligands inhibits human lung carcinoma cell growth*. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2004. **314**(4): p. 1093-9.
62. Yang, W.L. and H. Frucht, *Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2001. **22**(9): p. 1379-83.
63. Kapitanovic, S., et al., *Effect of indomethacin on E-cadherin and beta-catenin expression in HT-29 colon cancer cells*. Experimental & Molecular Pathology, 2006. **80**(1): p. 91-6.
64. Allred, C.D., et al., *PPARgamma1 as a molecular target of eicosapentaenoic acid in human colon cancer (HT-29) cells*. Journal of Nutrition, 2008. **138**(2): p. 250-6.
65. Tencer, L., et al., *Rosiglitazone induces caveolin-1 by PPARgamma-dependent and PPRE-independent mechanisms: the role of EGF receptor signaling and its effect on cancer cell drug resistance*. Anticancer Research, 2008. **28**(2A): p. 895-906.
66. Liu, X.H., et al., *Prostaglandin E(2) stimulates prostatic intraepithelial neoplasia cell growth through activation of the interleukin-6/GP130/STAT-3 signaling pathway*. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2002. **290**(1): p. 249-55.
67. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. Physiological Reviews, 1999. **79**(4): p. 1193-226.
68. Nishihara, H., et al., *Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(15): p. 8921-6.
69. Sonoshita, M., et al., *Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice*. Nature Medicine, 2001. **7**(9): p. 1048-51.
70. Glazer, R.I., et al., *PPARgamma and PPARdelta as modulators of neoplasia and cell fate*. PPAR Research, 2008(247379).
71. Han, S., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) increases the expression of prostaglandin E2 receptor subtype EP4: The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and CCAAT/enhancer-binding protein beta*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(39): p. 33240-33249.
72. Teresi, R.E., et al., *Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by Lovastatin and Rosiglitazone*. International Journal of Cancer, 2006. **118**(10): p. 2390-8.
73. Ikawa, H., et al., *Effect of PPAR activators on cytokine-stimulated cyclooxygenase-2 expression in human colorectal carcinoma cells*. Experimental Cell Research, 2001. **267**(1): p. 73-80.
74. Lefebvre, A.M., et al., *Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice*. Nature Medicine, 1998. **4**(9): p. 1053-7.

- 
75. Backlund, M.G., et al., *15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(5): p. 3217-23.
  76. Hazra, S. and S.M. Dubinett, *Ciglitazone mediates COX-2 dependent suppression of PGE2 in human non-small cell lung cancer cells*. Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids, 2007. **77**(1): p. 51-8.
  77. Liu, Z., et al., *Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer*. Carcinogenesis, 2008. **29**(6): p. 1219-27.
  78. Tong, M., et al., *Reciprocal regulation of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in A549 human lung adenocarcinoma cells*. Carcinogenesis, 2006. **27**(11): p. 2170-9.
  79. Cheng, S., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(21): p. 22057-65.