

Effekter av PPAR δ agonist og NSAIDs i cellelinjer fra coloncancer: Medieres effekter av NSAIDs via PPAR δ ?

Masteroppgave i farmakologi

Marie Dugstad



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

UNIVERSITETET I OSLO

15.05.2009

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Farmakologisk Institutt på Rikshospitalet i tidsrommet juni 2008 - mai 2009. Dagny Sandnes var ekstern veileder og Hege Thoresen var intern veileder. Jeg vil først og fremst rette en stor takk til Dagny Sandnes som har gitt kyndig og god veiledning under hele oppgaveprosessen. Hun har alltid tatt seg tid til å hjelpe i forbindelse med det praktiske arbeidet, og har vært til utrolig stor hjelp med skrivingen av oppgaven. Jeg vil også takke Hege Thoresen for god oppfølging og hjelp med lab-arbeidet på Farmasøytisk Institutt.

God faglig kompetanse på avdelingen, i kombinasjon med et trivelig arbeidsmiljø, har gjort at arbeidet med oppgaven har vært trivelig, lærerikt og interessant. I løpet av perioden jeg har jobbet med masteroppgaven har jeg fått god hjelp av alle på avdelingen. Jeg vil takke Kristin Meisdalen, Eva Østby, Monica Aasrum, John Ødegård, Ellen Johanne Johansen, Renuka Patel, Ingunn Heiene Tvetraas og Kjetil Wessel Andressen for gode råd underveis, og for hjelp til det praktiske arbeidet.

Sist, men ikke minst, vil jeg rette en stor takk til Heidi Krohg Andreassen og Arna Teigen for et veldig godt samarbeid i året som har gått. Året hadde ikke blitt det samme uten dere!

Oslo, mai 2009

Marie Dugstad

Innhold

FORORD	2
INNHold	3
FORKORTELSER	7
SAMMENDRAG	9
1. INNLEDNING	11
1.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN.....	11
1.2 IKKE-STEROIDE ANTIINFLAMMATORISKE LEGEMIDLER	11
1.3 CYKLOOKSYGENASER	13
1.3.1 <i>COX-2</i> ekspresjon	14
1.4 PGE ₂ OG EP-RESEPTORER	15
1.4.1 <i>PTEN</i>	16
1.5 PROSTAGLANDIN E SYNTASER OG PROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE	17
1.5.1 <i>Mikrosomal prostaglandin E syntase-1</i>	17
1.5.2 <i>15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase</i>	18
1.6 PEROKSISOM-PROLIFERATOR-AKTIVERTE RESEPTORER.....	18
1.6.1 <i>PPARα</i> og <i>PPARγ</i>	19
1.6.2 <i>PPARδ</i>	19
1.7 SAMSPILL MELLOM PPAR δ , COX-2 OG PROSTAGLANDINER.....	20
1.8 MÅLET MED OPPGAVEN.....	20
2. MATERIALER OG METODER	21
2.1 KJEMIKALIER	21
2.2 ANTISTOFFER.....	22

2.3	ISOTOPER	23
2.4	BUFFERE OG LØSNINGER	23
2.4.1	<i>Løsninger til støping av polyakrylamidgeler</i>	23
2.4.2	<i>Buffere og løsninger til Western blotting</i>	25
2.4.3	<i>Buffere og løsninger til c-AMP assay</i>	28
2.4.4	<i>Løsning til substrat oksidasjons-assay</i>	31
2.5	DYR KING OG SPLITTING AV HT 29 OG HCT 116 CELLENE.....	31
2.6	TELLING OG UTSÅING AV HT 29 OG HCT 116 CELLENE	32
2.7	TRANSFEKSJON AV HT 29 OG HCT 116 CELLENE.....	32
2.8	STIMULERING AV HT 29 OG HCT 116 CELLENE	33
2.9	LUCIFERASE REPORTER-ASSAY.....	33
2.10	HØSTING AV CELLER TIL WESTERN BLOTTING	35
2.11	WESTERN BLOTTING (SDS-PAGE OG IMMUNOBLOTTING)	35
2.12	CAMP-ASSAY	37
2.13	BEHANDLING AV HUMANE SKJELETTMUSKELCELLER	39
2.14	SUBSTRAT OKSIDASJONS-ASSAY	40
2.15	PROTEINMÅLING	41
2.16	BEREGNINGER OG STATISTIKK	42
3.	RESULTATER	43
3.1	METODEUTVIKLING: TRANSFEKSJON	43
3.1.1	<i>Varierende celledetthet</i>	43
3.1.2	<i>Forhold mellom lipofektamin og mengde DNA</i>	43
3.1.3	<i>Måling av transfeksjonseffektivitet</i>	44
3.1.4	<i>Varighet av eksponering for ligand</i>	46

3.2	DOSE-AVHENGIG AKTIVERING AV LUCIFERASE I HCT 116 OG HT 29 CELLER.....	47
3.2.1	<i>Effekt av forskjellige konsentrasjoner av GW 501516 og rosiglitazon på luciferaseaktivitet.....</i>	47
3.2.2	<i>Effekter av sulindak og metabolittene sulindaksulfid.....</i>	50
3.2.3	<i>Effekt av andre NSAIDs på luciferaseaktivitet.....</i>	52
3.2.4	<i>Effekt av PGE₂ på luciferaseaktivitet.....</i>	54
3.3	EFFEKTER AV FORSKJELLIGE LIGANDER PÅ PPAR δ I HUMANE MYOTUBER	55
3.4	EFFEKTER AV PPAR δ -AKTIVERING PÅ PGE ₂ -STIMULERT PRODUKSJON AV CAMP	59
3.4.1	<i>Effekter av GW 501516 og indometacin på PGE₂-stimulert produksjon av cAMP ...</i>	59
3.5	EKSPRESJON AV PTEN, COX-2, 15-HYDROKSYPROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE	61
3.5.1	<i>PTEN.....</i>	61
3.5.2	<i>COX-2.....</i>	62
3.5.3	<i>15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase</i>	65
3.6	CYTOTOKSISKE EFFEKTER PÅ CELLER STIMULERT MED	67
	HØYE KONSENTRASJONER AV SULINDAKSULFID	67
4.	DISKUSJON.....	69
4.1	METODOLOGISKE ASPEKTER	69
4.1.1	<i>Luciferase-assay</i>	69
4.1.2	<i>Western blott.....</i>	70
4.2	UTØVER NSAIDs NOEN AV SINE EFFEKTER VED HEMMING AV PPAR δ AKTIVITET?.....	71
4.2.1	<i>PPRE aktiveres av PPARγ og PPARδ.....</i>	72
4.3	KAN PPAR δ AKTIVERING REGULERE NIVÅET AV EP-RESEPTORER?.....	72
4.4	REGULERER PPAR δ NIVÅET AV PTEN?	73
4.5	REGULERER PPAR δ NIVÅET AV COX-2?.....	74

4.6	REGULERER PPAR δ NIVÅET AV 15-HYDROKSYPROSTAGLANDINSYNTASE?	75
4.6.1	<i>Regulerer PPARδ nivået av mikrosomal prostaglandin E syntase-1?</i>	76
4.7	FORSKJELL I RESPONSER MELLOM HT 29 OG HCT 116.....	76
5.	KONKLUSJON	78
	REFERANSER	79

Forkortelser

ADRP	Adipocyt differensierings-relatert protein
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovint serumalbumin
cAMP	Adenosin-3',5'-cyklisk monofosfat
COX	Cyklooksygenase
cPGES	Cytosoliske PGES
DBD	DNA-bindende domene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DPM	Desintegrasjoner pr minutt
ERK	Ekstracellulær signalregulert proteinkinase
FAP	Familiær adenomatøs polypose
GFP	Grønt fluorescerende protein
HEPES	N-hydroksyetylpipezazin-N-etansulfonat
15-PGDH	15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase
IBMX	3-isobutyl-1-metylaxanthin
LAR II	Luciferase-Assay Reagent II
LOX	Lipooksygenase
mPGES	Mikrosomale PGES eller membranassosierte PGES
NF-κB	Nukleær transkripsjonsfaktor-κB
NSAID	Ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler
PDK1	Fosfoinositid-avhengig proteinkinase-1
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PGES	Prostaglandin E ₂ syntase
PGH ₂	Hydroksey-endoperoksid prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostasyklin
PI3K	Fosfoinositid-3-kinase
PIP ₂	Fosfatidylinositol(4,5)bisfosfat eller fosfatidylinositol(3,4)bisfosfat
PIP ₃	Fosfatidylinositol(3,4,5)trisfosfat
PKA	Proteinkinase A
PLB	Passiv lysisbuffer
PPAR	Peroksisom-proliferator-aktiverede reseptorer
PPRE	Peroksisom-proliferator-responsivt element
PTEN	Fosfatase og tensinhomolog
RXR	Retinoid X reseptor
SDS	Natrium-dodecylsulfat
TCA	Trikloreddiksyre
TCF-4	T-cellefaktor-4
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TRIS	Tris-hydroksymetyl aminometan

Sammendrag

Epidemiologiske og eksperimentelle data tyder på at ikke-steroid antiinflammatoriske midler (NSAIDs) kan redusere risikoen for kreft. Det er antatt at denne effekten skyldes hemming av cyklooksygenase (COX) og dermed redusert prostaglandinproduksjon. Det foreligger imidlertid data som kan tyde på at også COX-uavhengige mekanismer kan bidra til den beskyttende effekten av NSAIDs. Målet med denne oppgaven var å undersøke om effekter av NSAIDs medieres via peroksisom-proliferator-aktivert reseptor δ (PPAR δ).

Det ble benyttet to kreftcellelinjer isolert fra tykktarm, HT 29 og HCT 116. Aktiviteten av NSAIDs på PPAR ble undersøkt i et reporter-assay der et PPAR-responsivt-element koblet til luciferase ble transfektert inn i cellene. Deretter ble de stimulert med PPAR δ agonist og forskjellige NSAIDs. Humane myotuber ble også benyttet for å måle oksidasjon av oljesyre til CO₂ ved stimulering med PPAR δ agonist og NSAIDs. Ekspresjon av COX-2, 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) og PTEN i HT 29 og HCT 116 celler, forbehandlet med PPAR δ agonisten GW 501516 eller NSAIDs, ble målt ved Western blotting. Et cAMP-assay ble benyttet for å måle cAMP i celler som var forbehandlet med GW 501516, og deretter stimulert med PGE₂. cAMP-produksjon er et indirekte mål på ekspresjon av EP-reseptorer.

I reporter-assayet var det bare de høyeste konsentrasjonene av sulindaksulfid og GW 501516 som ga signifikante resultater på luciferaseaktiviteten. Effekten av rosiglitazon, sulindaksulfid og indometacin skyldes sannsynligvis en aktivering av PPAR γ . I de humane myotubene resulterte behandling med GW 501516, rosiglitazon, sulindaksulfid og indometacin i økt oksidasjon av oljesyre, men responsene var små og ikke signifikante. Det viste seg at de cellelinjene vi hadde valgt ut ikke egnet seg til å bestemme om effektene av NSAIDs var mediert via PPAR δ , fordi både PPAR δ og PPAR γ var uttrykt i cellene, og effekten på PPAR γ dominerte. Forbehandling av cellene med GW 501516 førte til en signifikant nedgang i PGE₂ stimulert cAMP-akkumulering. Undersøkelsene av ekspresjonen til PTEN, COX-2 og 15-PGDH i HT 29 og HCT 116 cellene, stimulert med GW 501516 og NSAIDs, ga ingen signifikante resultater.

Samlet sett tyder resultatene på at NSAIDs i hovedsak utøver sine effekter ved å stimulere PPAR γ . For å undersøke effekten av NSAIDs på PPAR δ bør en vurdere å benytte cellelinjer som ikke uttrykker PPAR γ , eller som overuttrykker PPAR δ .

1. Innledning

1.1 Bakgrunn for oppgaven

Kreft i tykktarm/endetarm fører til morbiditet og mortalitet i de fleste industrialiserte land [1]. Det oppdages vel 2200 nye tilfeller av tykktarmskreft i Norge hvert år og insidensen er økende [2]. En rekke epidemiologiske studier har vist at regelmessig bruk av ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) reduserer forekomsten av kreft i tykktarm/endetarm, og det finnes studier som tyder på at forekomsten av andre krefttyper også kan reduseres [3]. Effekten av NSAIDs antas å skyldes hemming av prostaglandinsyntesen, men det finnes holdepunkter for at andre mekanismer også kan være involvert. I denne oppgaven har jeg undersøkt om NSAIDs kan utøve noe av sin virkning via kjernereseptoren peroksisom-proliferator-aktivert reseptor δ (PPAR δ).

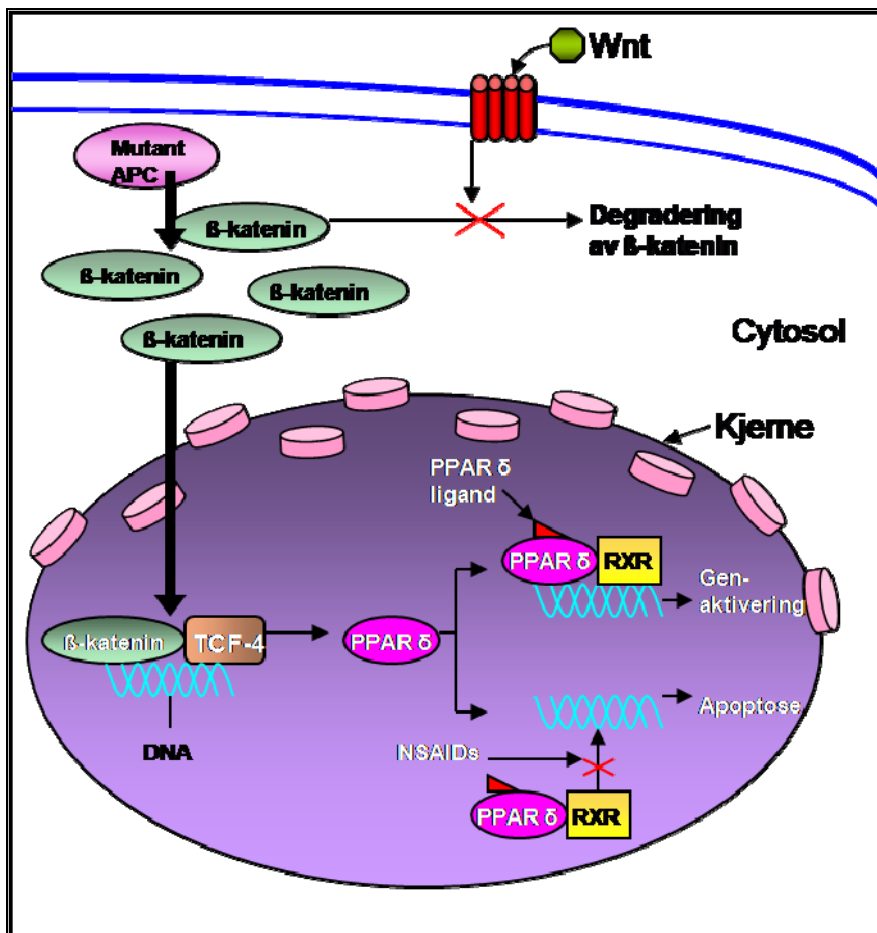
1.2 Ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler

Den viktigste virkningsmekanismen til NSAIDs er blokkering av aktiviteten til enzymet syklooksygenase (COX). Dette gir en antiinflammatorisk, analgetisk og antipyretisk effekt [4]. Det er også vist at NSAIDs hemmer veksten til kreftceller i tykktarm, og risikoen for å utvikle tykktarmskreft er senket med 40-50 % i individer som tar NSAIDs regelmessig. Det er ikke konstatert om dette er en effekt som utelukkende skyldes NSAIDs hemming av COX [4]. Det finnes holdepunkter for at NSAIDs reduserer dannelsen av polypper i tarmen ved å hemme COX-2 [5]. Andre studier hevder imidlertid at de også kan redusere dannelsen av polypper gjennom COX-2-uavhengige veier som induserer apoptose. Det er også vist at derivater av NSAIDs, som ikke er i stand til å hemme COX-2, reduserer veksten av kreftceller i tykktarm [6, 7].

Det som kjennetegner kreftceller er en rekke mutasjoner som gir cellene nye egenskaper. Kreftceller har evnen til å unngå programmert celledød (apoptose) og de er ikke lenger sensitive for veksthemmende signaler. De har et uhemmet replikasjonspotensial, har evne til vevsinvasjon og metastase, og de vedlikeholder angiogenese [8].

Utviklingen av kreft i tykktarm skyldes akkumulering av mange genetiske forandringer [9]. En tidlig genetisk forandring er en mutasjon i APC-genet som fører til dannelsen av adenomer [10]. Familiær adenomatøs polypose (FAP) er en arvelig tilstand hvor APC genet er mutert. Dette fører til utvikling av mange adenomer i tykktarm/endetarm. APC-genet koder for et stort proteinkompleks som binder β -katenin i cytosol. Mutasjoner i APC-genet forårsaker en økning i frie β -katenin nivåer, og β -katenin kan bevege seg inn i kjernen. Der danner det et kompleks med T-cellefaktor-4 (TCF-4). Dette komplekset bindes til DNA og induserer ekspresjonen av gener som fremmer cellulær vekst og proliferasjon (figur 1).

PPAR δ er normalt regulert via APC-veien. I promoteren til PPAR δ sitter det et β -katenin/Tcf-4 responsivt element. Det er vist at ekspresjonen av PPAR δ er forhøyet ved kreft i tykktarm/endetarm. Det har blitt rapportert at APC-proteinet og NSAIDs virker gjennom samme mekanisme, og resultatet blir en hemming av transkripsjonsaktiviteten til PPAR δ [9]. Hemming av PPAR δ kan motvirke mutasjonen i APC-genet, og dette fører til at NSAIDs potensielt kan indusere apoptose i kreftceller [10]. Konsentrasjonen av NSAIDs som hemmer cellevekst, er betydelig høyere enn den som kreves for å hemme COX-aktivitet. NSAIDs kan således hemme COX-aktivitet ved lave konsentrasjoner og direkte ha PPAR δ som mål ved høyere konsentrasjoner [11], og begge kan tenkes å bidra til en beskyttende effekt mot kreft.

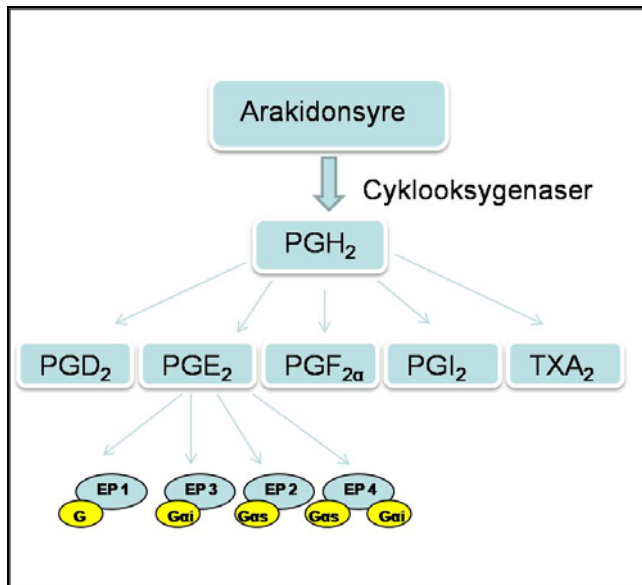


Figur 1: Wnt binder til reseptor i plasmamembranen. Signaleren gjennom reseptoren fører til hemming av nedbrytningen av β -katenin. Dette gir økte konsentrasjoner av β -katenin i cytosol. En mutasjon i APC-genet fører også til økte nivåer av β -katenin i cytosol. β -katenin kan dermed bevege seg inn i kjernen og danne et kompleks med TCF-4. Dette komplekset binder seg til DNA og aktiverer gener som regulerer celledvekst og proliferasjon. Komplekset kan også indusere ekspresjonen av PPAR δ . NSAIDs kan motvirke PPAR δ s binding til DNA. Figuren er en modifikasjon av figur 1 i referanse [10].

1.3 Cyklooksygenaser

Enzymet cyklooksygenase (COX) er et membranassosiert protein lokalisert i endoplasmatisk retikulum og kjernemembranen [1, 3, 12]. Enzymet er kjent for å katalysere det hastighetsbegrensende trinnet i metabolismen av den polyumettede fettsyren arakidonsyre, noe som resulterer i produksjon av hydrokxy-endoperoksid prostaglandin H₂ (PGH₂). PGH₂ er substrat for mange vevsspesifikke prostanoidsyntaser. Dette resulterer i produksjon av prostaglandiner, prostasyklin og tromboksan [3, 12] (figur 2). Det er to isoformer av enzymet cyklooksygenase, cyklooksygenase-1 (COX-1) og cyklooksygenase-2 (COX-2).

COX-1 uttrykkes i de fleste celler og vev under normale forhold. COX-2 er vanligvis fraværende i de fleste normale vev, eller uttrykt ved veldig lave nivåer. Ekspresjonen øker imidlertid kraftig ved nærvær av inflammatoriske mediatorer, vekstfaktorer, onkogenaktivering og tumorpromotorer [12]. COX-1 er oppregulert i forskjellige karsinomer som bl.a. ovariekreft. Økt ekspresjon av COX-2 er involvert i patogenesen til mange sykdommer.



Figur 2: Dannelse av prostaglandiner, prostasyklin og tromboksan ved arakidonsyremetabolismen. Prostaglandinet PGE₂ kan bindes til G-proteinkoblede EP-reseptorer og videre overføre signaler inn i cellen. Det er ikke tilstrekkelig avklart hvilket G-protein EP1 kobler til. Figuren er en modifisering av figur 1 i referanse [3].

1.3.1 COX-2 ekspresjon

Det har blitt dokumentert at ekspresjonen til COX-2 isoformen er økt ved mange kreftformer. Dette gjelder bl.a. tykktarm/endetarmskreft, pankreaskreft, lungekreft, kreft i magesekken, brystkreft, hode- og halskreft og prostatakreft [3, 12]. COX-2 er en av mange faktorer som fremmer tumorprogresjon. Forhøyede nivåer av COX-2 kan øke det metastatiske potensialet til kreftceller, øke proliferasjonen av kreftceller og føre til resistens mot apoptose. Ras er et onkogen som stimulerer COX-2 ekspresjon, mens p53 er et eksempel på en tumorsuppressor som nedregulerer COX-2 ekspresjon [3]. De fleste antitumoreffektene til COX-2-hemmere antas å skyldes hemming av prostaglandinsyntesen. Prostaglandiner medierer sitt signal ved å bindes til celleoverflatereseptorer. Noen

prostaglandiner har også mulighet til å bindes til peroksisom-proliferator-aktiverede reseptorer (PPAR) i cellekjernen [13]. Studier har vist at aktivering av PPAR δ resulterer i en økt COX-2 promoteraktivitet og induksjon av COX-2 genekspressjon i humane leverceller. De eksakte mekanismene er fortsatt uklare [14].

1.4 PGE₂ og EP-reseptorer

Som respons på forskjellige vekstfaktorer, hormoner eller cytokiner kan arakidonsyre mobiliseres fra fosfolipider i plasmamembranen og omgjøres til bioaktive eikosanoider gjennom cyklooksygenase- (COX), lipooksygenase- (LOX) eller P-450 epoksygenaseveien. Disse eikosanoidene kan mediere signaler gjennom sine reseptorer som fremmer forskjellige cellulære responser. De fem hovedprostanoidene som dannes fra COX-veien spiller en viktig rolle i forskjellige biologiske prosesser. PGE₂ er det best studerte prostanoidet når det gjelder den potensielle rollen i tumorprogresjon. PGE₂ er involvert i reguleringen av tumorassosiert angiogenese, cellemigrasjon, invasjon og hemming av apoptose. Prostanoidet er også involvert i kronisk inflammasjon [3]. Det har blitt rapportert at PGE₂ indirekte transaktiverer PPAR δ gjennom fosfoinositid-3-kinase (PI3K)/Akt signalering, noe som fremmer celleoverlevelse og dannelse av adenomer i tarm [15].

Det er minst to typer prostaglandinreseptorer:

- G-proteinkoblede reseptorer
- PPAR

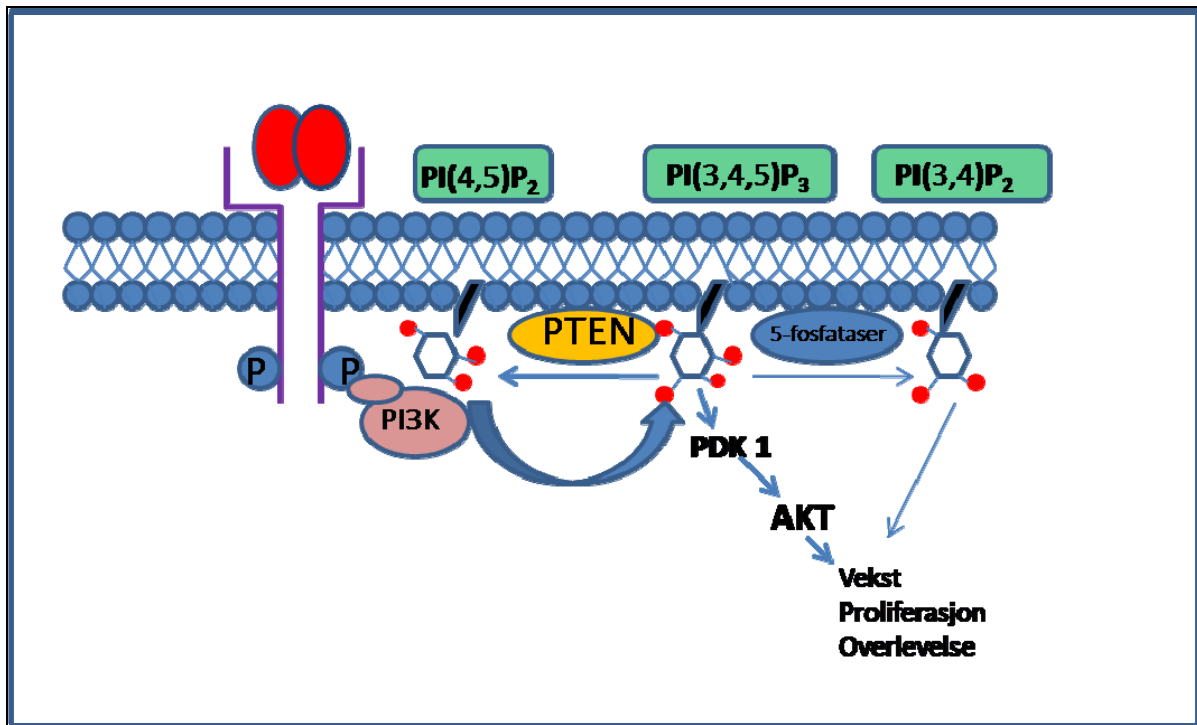
G-proteinkoblede reseptorer er en reseptorsuperfamilie bestående av proteiner som går syv ganger gjennom plasmamembranen, og som er koblet til G-proteiner. E prostanoidreseptorene EP1, EP2, EP3 og EP4 er de fire G-proteinkoblede reseptorene som kan binde PGE₂ (figur 2). EP2- og EP4-reseptorer overfører signaler gjennom økt produksjon av cAMP mediert av G α -s. EP3-reseptor er koblet til G α -i, og stimulering forårsaker en nedgang i cAMP dannelse [3]. EP1-reseptor øker intracellulære nivåer av kalsium ved å åpne kalsiumkanaler og antakelig også ved å aktivere fosfolipase C [16]. Det er rapportert at EP1-reseptor kan øke de intracellulære nivåene av kalsium gjennom G α -q, men dette er ikke tilstrekkelig bevist. PGE₂ har blitt rapportert å regulere tumorvekst ved å

stimulere angiogenese via EP2-reseptoren. EP4-reseptoren er vist å være overuttrykt i epiteliale svulster og adenomer i tykk/endetarm [3]. Det er vist at EP2- og EP4-reseptorsignalering kan føre til aktivering av Wnt signaleringskaskaden (figur 1), som ofte er aktivert ved tykktarm/endetarmskreft fordi APC er mutert. Aktivering av Wnt signaleringskaskaden forårsaker akkumulering av β -katenin i kjernen og øker transkripsjon av gener som c-myc, c-jun og cyclin D1 [17]. Både EP2- og EP4-reseptorene stimulerer β -katenin/Tcf transkripsjonelt, men gjennom forskjellige molekylære mekanismer. Aktivering av EP2-reseptoren, som er koblet til $G\alpha_s$, fører til stimulering av β -katenin /Tcf signalering via aktivering av cAMP og proteinkinase A (PKA). EP4-reseptorer, som også er koblet til $G\alpha_i$, forårsaker β -katenin /Tcf signalering primært gjennom aktivering av PI3K og ekstracellulær signalregulert proteinkinase (ERK) [18, 19].

1.4.1 PTEN

PI3K er lipidkinaser som fosforylerer fosfoinositider i 3-posisjon, og de produserer bl.a. $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ og $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$. PI3K er bl.a. regulert av vekstfaktorer som virker som ligander på reseptortyrosinkinaser [20]. $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ og $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ bidrar til aktivering av en rekke nedstrøms signalmolekyler, bl.a. fosfoinositid-avhengig kinase-1 (PDK1), som i sin tur bidrar til aktivering av Akt. Fosfatase og tensinhomologen, PTEN, hemmer PI3K-avhengig signalering ved å defosforylere $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ til $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ [21] (figur 3).

PTEN er et av de vanligst muterte tumorsuppressorgenene i humane krefttilfeller, og er mutert i 30-50 % av alle bryst-, tarm- og lungetumorer [22]. Det er holdepunkter for at aktivering av $\text{PPAR}\delta$ også kan indusere Akt fosforylering. Dette skjer via oppregulering av PDK1 og nedregulering av PTEN, og fører til økt ekspresjon av Bcl-xL og COX-2 [23]. Disse funnene indikerer at de proliferative og anti-apoptotiske effektene til $\text{PPAR}\delta$ går via PI3K/Akt og COX-2 veier.



Figur 3: Figuren viser syntesen av PIP_3 fra PIP_2 . Dette skjer via PI3Ks fosforylering av inositolringen til PIP_2 . PTEN katalyserer omdannelsen av PIP_3 tilbake til PIP_2 , mens 5-fosfataser omgjør PIP_3 til en annen PIP_2 form. Økte nivåer av PDK 1 kan aktivere Akt veien. PTEN motvirker aktivering av PDK 1. Figuren er en modifikasjon av figur 1 i referanse [21].

1.5 Prostaglandin E syntaser og prostaglandin dehydrogenase

1.5.1 Mikrosomal prostaglandin E syntase-1

Et av de hastighetsbegrensende enzymene i PGE_2 -syntesen er PGE_2 syntase (PGES). Det finnes flere PGES med forskjellige enzymatiske egenskaper, cellulær lokalisasjon og funksjon. Det finnes en cytosolisk PGES (cPGES) og to mikrosomale PGES eller membranassosierte PGES (mPGES). Membranassosierte PGES ble først identifisert i 2002. Enzymet mPGES-1 katalyserer omdannelsen av PGH_2 til PGE_2 . Uttrykket av mPGES-1 reguleres av forskjellige stimuli. Antiinflammatoriske glukokortikoider kan føre til nedregulering. mPGES-1 uttrykkes i samme typer celler som COX-2. Det er økende holdepunkter for at mPGES-1 bidrar i forskjellige patofysiologiske tilstander hvor COX-2 er involvert. Det er observert at det er en kobling mellom COX-1 og mPGES-1 bare når høye

konsentrasjoner av arakidonsyre er tilstede. Stabile nivåer av PGE₂ i svulster opprettholdes av begge typer av PGES (mPGES og cPGES) [3].

1.5.2 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase

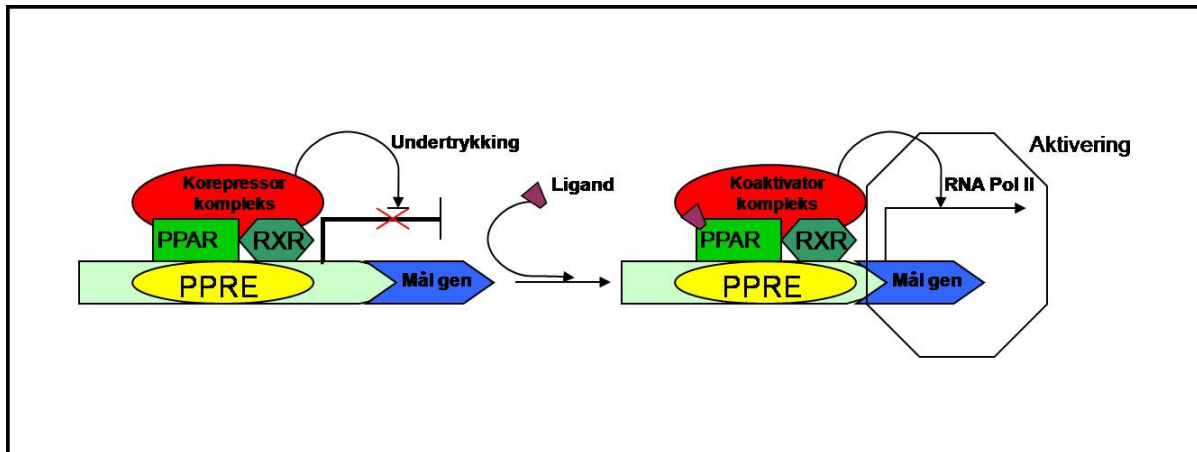
15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) er et enzym som kan degradere PGE₂ til den inaktive formen 15-keto PGE₂. Det er rapportert at 15-PGDH er nedregulert i mange svulster [3]. 15-PGDH antas å være et tumorsuppressorgen. Onkogene Ras-mutasjoner er tidlige forstadier til kreft i tykk/endetarm, og induserer COX-2 ekspresjon og PGE₂ biosyntese. 15-PGDH er nedregulert ved slike krefttyper. Dette tyder på at enzymet spiller en rolle ved å regulere PGE₂ nivåer, og at en overuttrykking av 15-PGDH kan dempe Ras-mediert tumorgenese [24, 25].

1.6 Peroxisom-proliferator-aktiverte reseptorer

Peroxisom-proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) er ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer som tilhører kjernereseptorfamilien. Denne superfamilien omfatter også bl.a. retinsyrereseptorer, tyroidhormonreseptorer, steroidhormonreseptorer og reseptorer som ikke har klart definerte naturlige ligander, de såkalte ”orphan” reseptorene. Transkripsjonsaktiviteten av målgenene avhenger av ligandenes binding til reseptor. De identifiserte ligandene til PPAR’ene inkluderer peroksisom-proliferatorer, antidiabetiske forbindelser, fettsyrer som regulerer glukose-, lipid- og kolesterolmetabolisme, fibrater, og eikosanoider [11].

PPAR-familien inneholder tre medlemmer kjent som PPAR α , PPAR δ og PPAR γ . Hver PPAR undergruppe har forskjellig vevsdistribusjon og ligandpreferanse. Alle reseptorene har samme strukturelle oppbygning. PPAR’ene inneholder fire hovedområder: A/B domenet, C domenet, D domenet og E/F domenet. C domenet er det DNA-bindende domenet (DBD). Det ligandbindende domenet omfatter E/F domenet. Selv om PPAR-medlemmene har en ganske lik strukturell utforming, har de forskjellige fysiologiske funksjoner. Alle PPAR’ene er avhengig av å heterodimerisere med reseptoren for 9-cis retinsyre (RXR) for å utøve sin funksjon (figur 4). Videre binder de seg til en spesifikk DNA-sekvens kalt peroksisom-proliferator-responsivt element (PPRE). PPRE sitter i promoteren på målgenene og finnes i

forskjellige gener som er involvert i lipidmetabolisme og energihomeostase. Bindingen av PPAR-RXR komplekset til PPRE regulerer transkripsjonen. I fravær av ligand undertrykker PPAR ekspresjonen av målgener ved å rekruttere korepressorer, mens ligand-aktiverte PPAR danner et kompleks med koaktivatorer og induserer målgener [11, 26, 27].



Figur 4: PPAR/RXR heterodimerer binder seg, ved hjelp av sitt DNA bindende domene, til PPRE lokalisert i promoteren på målgenet. PPAR knytter seg til korepressorkomplekset i fravær av ligand. I nærvær av ligand, knytter det ligand-bindende domenet seg til koaktivatorkomplekset og transkripsjonen kan starte. Figuren er en modifisering av figur 1b i referanse [27].

1.6.1 PPAR α og PPAR γ

PPAR α og PPAR γ spiller essensielle roller i fettsyrekatabolismen og lagring av fettsyrer. PPAR γ er hovedsakelig uttrykt i adipocytter. Reseptoren er involvert i kontroll av lipidlagring og spiller en kritisk rolle i induksjonen av adipogenese. PPAR γ er et angrepspunkt for antidiabetiske agens som modulerer kroppens respons på insulin. Disse omfatter troglitazon, pioglitazon og rosiglitazon. PPAR α er i stor grad uttrykt i lever og brunt fettvev, men finnes også i nyrer, hjerte og skjelettmuskel. PPAR α regulerer aktiviteten til gener som er involvert i lipidmetabolismen. Fibrater er legemidler som aktiverer PPAR α , og som benyttes ved hyperlipidemi [11, 26, 27].

1.6.2 PPAR δ

PPAR δ -reseptoren er den siste PPAR'en som ble klonet, og er den minst undersøkte blant PPAR'ene. Det er rapportert at reseptoren er involvert i regulering av kolesterol- og lipidmetabolisme, i keratinocyttoproliferasjon, i apoptose og i reguleringen av

embryoimplantasjon i mus. PPAR δ er trolig også involvert i inflammatoriske responser. PPAR δ uttrykkes stort sett overalt, men hovedsakelig i metabolsk aktivt vev inkludert lever, nyrer, skjelettmuskel og brunt fettvev. Fettsyrer og prostasyklin (PGI $_2$) er endogene ligander for PPAR δ . GW 501516 er et eksempel på en potent syntetisk ligand som aktiverer PPAR δ i nanomolarkonsentrasjoner [11, 26, 27].

1.7 Samspill mellom PPAR δ , COX-2 og prostaglandiner

Det har i litteraturen vært stor interesse rundt PPAR δ 's rolle i kreftutvikling. Studier i cellemodeller har gitt holdepunkter for at PPAR δ fremmer proliferasjon og hemmer apoptose av kreftceller, og det er observert at PPAR δ er overuttrykt ved bl.a. kreft i tykktarm [10, 26]. Hvilken rolle PPAR δ spiller ved kreftutvikling har imidlertid vært omdiskutert. Det finnes motstridende data for hvorvidt PPAR δ -aktivering har en stimulerende eller hemmende effekt på kreftcellers vekst og apoptose [26, 28-34].

Det er rapportert at PPAR δ kan oppregulere ekspresjonen av COX-2 [14, 23, 35], og at det er en invers regulering av COX-2 og 15-PGDH i flere krefttyper [36, 37]. Det er også rapportert at aktivering av PPAR δ fører til nedregulering av PTEN [23, 31, 38]. Det er holdepunkter for at PGE $_2$ kan aktivere PPAR δ indirekte via EP-reseptorer [15]. Hemming av prostaglandinsyntesen vil kunne påvirke aktiviteten til PPAR δ , men mye tyder på at også andre mekanismer kan være involvert.

1.8 Målet med oppgaven

Målet for denne oppgaven var å se på effekter av PPAR δ agonist og NSAIDs i cellelinjer fra tykk/endetarm og skjelettmuskelceller. Vi ønsket å undersøke om NSAIDs kan utøve noen av sine effekter via PPAR δ . Det er rapportert at indometacin og metabolitter av sulindak hemmer transkripsjonsaktiviteten til PPAR δ ved å interferere med bindingen av PPAR δ til DNA [9]. Derfor var det primære målet å undersøke hvordan NSAIDs påvirket transkripsjonsaktiviteten til PPAR δ i et luciferase-reporterassay. I løpet av arbeidet viste det seg at reporter-assayet ikke egnet seg til å studere PPAR δ -effekter av NSAIDs. Det ble derfor også et mål å studere hvordan PPAR δ -aktivering og NSAIDs påvirket ekspresjonen av PTEN og komponenter i COX-2/PGE $_2$ signalveien.

2. Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier

- 30 % Akrylamid/BIS løsning, ammoniumpersulfat (APS), N,N,N',N'-tetrametyletyldiamin (TEMED), Tween-20 og protein-assay fargereagenskonsentrat fra **BIO-RAD Laboratories (Hercules, CA, USA)**
- Indometacin, natriumdodecylsulfat 10 % oppløsning, glyserol, mercaptoetanol, Ponceau S løsning, eddiksyreanhydrid, naproksennatrium, sulindaksulfid, sulindaksulfon, L-karnitin hydroklorid og 3-isobutyl-1-metyl-xanthin (IBMX), dimetylsulfoksid (DMSO) fra **Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA)**
- Tris-hydroksymetyl aminometan (TRIS) fra **Calbiochem (San Diego, CA, USA)**
- Trietylamin fra **Merck (Darmstadt, Tyskland)**
- N-hydroksyetyl-piperazin-N-etansulfonat (HEPES) fra **Life Technologies (Paisley, Skottland)**
- Opti-Fluor[®] og Optiphase Supermix fra **PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA)**
- Coomassie[®] Plus protein-assay reagens fra **Interchim (Montlucon, Frankrike)**
- Luciferase-assay kit og renilla-luciferase (pGL4.74) fra **Promega (Madison, WI, USA)**
- GW501516 fra **ALEXIS Biochemicals (San Diego, USA)**
- GW9662 fra **Biomol International (Plymouth Meeting, PA, USA)**
- Rosiglitazon, diklofenak, sulindak, NS-398 og PGE₂ fra **Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)**

- Lipofektamin 2000, OptiMEM Gibco™, MDEM+Glutamax Gibco™, Dulbecco's modified Eagle's medium, Pen-Strep (10 000 enheter/ml penicillin og 10 000µg/ml streptomycin) Gibco™ fra **Invitrogen Auckland (Grand Island, NY, USA)**
- PPRE x 3-TK-LUC reporteren (responselementet var klonet inn i en TK-LUC reporter som inneholdt en virustymidin-kinasepromoter. Ekspresjonsvektoren var avledet fra pCMX) var en gave fra **Dr Ron M. Evans (Salk Institute, La Jolla, CA)**.
- Trypsin-EDTA (170 000 enheter trypsin/l, 200 mg/l EDTA) fra **LONZA LTD (Sveits)**
- Odyssey Infrared Imaging system blokkebuffer fra **Li-Cor Biosciences (Cambridge, England)**
- Rainbow (proteinvektmarkør til immunoblot) fra **GE Healthcare (Sverige)**
- Alle andre kjemikalier var av analytisk kvalitet.

2.2 Antistoffer

- PTEN monoklonalt antistoff og GAPDH monoklonalt antistoff (begge fra kanin) fra **Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)**
- COX-2 monoklonalt antistoff, COX-2 (human) Western kontroll, prostaglandin E synthase-1 monoklonalt antistoff og 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase polyklonalt antistoff fra **Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)**
- Esel-anti-kanin antistoff, esel-anti-mus antistoff og esel-anti-geit antistoff fra **Li-Cor Biosciences (Cambridge, England)**
- Antistoff mot cAMP var generert fra kaniner på **Farmakologisk institutt (Oslo)** i henhold til publisert metode [39].

2.3 Isotoper

- [2,8-³H] cAMP (38 Ci/mmol) fra **NEN Radiochemical (New England, UK)**
- [1-¹⁴C] oljesyre (55 mCi/mmol) fra **Perkin Elmer (Boston, USA)**

2.4 Buffere og løsninger

Alle vandige løsninger som ble benyttet i forbindelse med utførelsen av metodene var dobbeltdestillert. Indometacin ble løst i 0,9 % NaCl. Noen av ligandene var vanskelige å løse i bare medium, så da var det nødvendig å tilsette litt dimetylsulfoksid (DMSO) i lave konsentrasjoner for å øke løseligheten. Dette gjaldt ligandene GW 501516 (0,1 % DMSO), sulindaksulfid (1 % DMSO), sulindaksulfon (1 % DMSO), og NS-398 (2 % DMSO). PGE₂ ble løst i 1 % NaHCO₃.

2.4.1 Løsninger til støping av polyakrylamidgeler

1,5 M TRIS / HCl pH 8,8

TRIS	18,5 g
H ₂ O	ad 100 ml

pH justeres med konsentrert HCl.

0,5 M TRIS / HCl pH 6,8

TRIS	6 g
H ₂ O	ad 100 ml

pH justeres med konsentrert HCl.

10 % Ammonium persulfat (APS)

APS	100 mg
-----	--------

H ₂ O	1 ml
------------------	------

10 % separasjonsgel (5 ml pr gel)

H ₂ O	1,9 ml
------------------	--------

30 % akrylamid/BIS	1,7 ml
--------------------	--------

1,5 M TRIS/HCl pH (8,8)	1,3 ml
----------------------------	--------

10 % SDS	50 µl
----------	-------

10 % APS	50 µl
----------	-------

TEMED	2 µl
-------	------

15 % separasjonsgel (5 ml pr gel)

H ₂ O	1,1 ml
------------------	--------

30 % akrylamid/BIS	12,5 ml
--------------------	---------

1,5 M TRIS/HCl pH (8,8)	1,3 ml
----------------------------	--------

10 % SDS	50 µl
----------	-------

10 % APS	50 µl
----------	-------

TEMED	2 µl
-------	------

5 % stacking-gel (1 ml pr gel)

H ₂ O	680 µl
30 % akrylamid/BIS	170 µl
0,5 M TRIS/HCl pH (6,8)	130 µl
10 % SDS	10 µl
10 % APS	10 µl
TEMED	1 µl

2.4.2 Buffere og løsninger til Western blotting

Samplebuffer

0,5 M TRIS/ HCl pH (6,8)	25 ml
Glyserol	20 ml
10 % SDS	40 ml

Laemmlibuffer med 10 % mercaptoetanol og 5 % bromfenolblått

Samplebuffer	1 ml
Mercaptoetanol	100 µl
Bromfenolblått	50 µl

5 x elektroforesebuffer (pH 8,3)

TRIS	15 g
------	------

Glysin	72 g
--------	------

SDS	5 g
-----	-----

pH justeres med konsentrert saltsyre. Fortynnes 1+4 med H₂O før bruk. Oppbevares i kjøleskap

Elektroforesebuffer

5 x elektroforesebuffer	200 ml
-------------------------	--------

H ₂ O	800 ml
------------------	--------

10 x transferbuffer

0,25 M TRIS	30,3 g
0,72 M Glysin	144,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml

pH skal ligge mellom 8,1 og 8,3. pH skal ikke justeres, kun sjekkes.

Transferbuffer

10 x transferbuffer	100 ml
Metanol	100 ml
H ₂ O	800 ml

10 x TBS (pH 7,6)

TRIS	12,1 g
NaCl	58,4 g
H ₂ O	ad 1000 ml

pH justeres med konsentrert HCl

TTBS

10 x TTBS	100 ml
H ₂ O	900 ml
Tween 20	500 µl

BLOTTO

Fettfri tørrmelk	5 g
TTBS	100 ml

2.4.3 Buffere og løsninger til c-AMP assay

Stock-løsninger til Krebs-Ringer løsning A

0,77 M NaCl	45 g/l
0,77 M KCl	5,75 g/100ml
0,77 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O	19,1 g/100ml
0,77 M KH ₂ PO ₄	10,55 g/100ml
0,77 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O	8,08 g/100ml

Krebs-Ringer løsning A

142 mM NaCl	201,4 ml
3,53 mM KCl	5 ml
2,83 mM KH ₂ PO ₄	4 ml
1,41 mM MgSO ₄	2 ml
2,32 mM CaCl ₂	4,6 ml
H ₂ O	873 ml

Løsning B (pH 7,5)

154 mM Hepes	18,35 g
H ₂ O	0,5 l

pH justeres med 1 M NaOH (ca 25 ml)

Krebs-Ringer Hepes buffer pH (7,4)

Løsning A	109 ml
Løsning B	21 ml
15 mM Glukose	0,38 g

pH justeres med 1 M NaOH (5-10 dråper)

Endelig konsentrasjon i KR-Hepes buffer blir:

119 mM NaCl

3,0 mM KCl

2,4 mM KH₂PO₄

1,18 mM MgSO₄

1,95 mM CaCl₂

24,9 mM Hepes

Krebs-Ringer Hepes buffer med IBMX

IBMX (2 mM)	13,4 mg
-------------	---------

Krebs-Ringer Hepes buffer (KRH)	30 ml
------------------------------------	-------

IBMX er tungt løselig, så det må røres på litt varme i ca ½ time.

2.4.4 Løsning til substrat oksidasjons-assay

Forsøksmedium/trappemedium (til 80 brønner)

Dulbeco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	4,627 ml
2,4 mM Bovint serum albumin (BSA)	14,4 µl
6 mM Ikke-radioaktiv oljesyre	65,6 µl
1 M Karnitin	4,8 µl
Radioaktiv oljesyre [1- ¹⁴ C]	48 µl

2.5 Dyrking og splitting av HT 29 og HCT 116 cellene

HT 29 og HCT 116 cellene er humane celler isolert fra kreftsvulster i tykktarm. HT 29 cellelinjen har en mutasjon i tumorsupressorgenet p53 [40]. Cellelinjen har også et trunkert APC tumorsuppressor gen [41, 42]. HCT 116 cellelinjen er en udifferensiert og invasiv cellelinje med et normalt APC-gen [43]. HCT 116 cellelinjen har en mutasjon i Ras-genet som fører til konstitutiv aktivering av Ras og autokrin produksjon av TGF α [44, 45]. HT 29 og HCT 116 cellene ble dyrket i 75 cm² Costar flasker ved 37 °C. Mediet som ble brukt var Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tilsatt 10 % hesteserum, 10 000 enheter/ml Pen Strep (penicillin, streptomycin) og 2 mM glutamin. Splittingen foregikk ved å skylle cellene to ganger med ca 10 ml saltvann pr flaske slik at serumet ble borte. Dette var viktig fordi serum inaktiverer trypsin. Deretter ble 2 ml trypsin-EDTA tilsatt per flaske og videre ble cellene satt i varmeskap i noen minutter. HCT 116 cellene trengte ca ½-1 min i varmeskap for å løsne, mens HT 29 cellene trengte noe lenger tid. Deretter ble cellene tilsatt

9 ml medium per flaske for å inaktivere trypsin, og videre sentrifugert ved 1000 rpm i 5 min for å unngå at cellene skulle klumpe seg. Hver cellepellet ble tilsatt ca 2 ml medium, og denne blandingen ble brukt videre for utsåing av celler med ønsket tetthet i skåler eller brønner.

2.6 Telling og utsåing av HT 29 og HCT 116 cellene

Cellene ble fortynnet 1:5 før de ble telt i mikroskop ved hjelp av Bürcher-kammer. En dråpe av cellesuspensjonen ble avsatt under dekkglasset på Bürcher-kammeret og tre diagonale ruter i tellekammeret ble telt etter hverandre. Hver rute var på $1/10 \text{ mm}^3$ tilsvarende $0,1 \mu\text{l}$. Tallet ble multiplisert med 10^4 og fortynningsfaktoren for å få celleantallet i mill/ml. Det ble prøvd ut forskjellige celletettheter i starten av forsøkene for å finne ut hva som var optimalt. I 96 brønners brettene ble HCT 116 cellene stort sett sådd ut med en tetthet på 40 000 celler per brønn, mens HT 29 cellene ble sådd ut som 50 000 celler per brønn. HT 29 cellene og HCT 116 cellene ble i seks brønners brettene og enkeltskålene sådd ut med en tetthet på 50 000 celler per cm^2

2.7 Transfeksjon av HT 29 og HCT 116 cellene

Prinsipp

Transfeksjon går ut på å føre fremmed DNA inn i eukaryote celler, slik at cellene kan uttrykke et spesielt gen.

Metode 1: Transfeksjon av DNA i 24 timer

Transfeksjonen ble utført ved å forsiktig blande sammen lipofektamin og optimem i ønsket konsentrasjon i et rør, og la det stå i fem minutter. Deretter ble røret også tilsatt renilla-luciferase og PPRE og blandingen fikk stå i 20 min ved romtemperatur. Det ble benyttet et konstrukt der tre kopier av PPRE var klonet inn i en TK-LUC reporter som inneholdt herpesvirus thymidinkinasepromoter (-105/+51) [46]. Til slutt ble $30 \mu\text{l}$ av blandingen tilsatt per brønn i brettet sammen med $70 \mu\text{l}$ medium uten antibiotika. Brettet ble inkubert ved 37

°C over natt. Dagen etter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble stimulert med agonist.

Metode 2: Transfeksjon av DNA i 5 timer

Transfeksjonen ble utført ved å forsiktig blande sammen lipofektamin og optimem i ønsket konsentrasjon i et rør og la stå i fem minutter. Deretter ble renilla-luciferase, PPRE og optimem blandet forsiktig sammen i et annet rør. Etter fem minutter ble de to rørene blandet sammen. Blandingen fikk stå i 20 min før 100 µl ble tilsatt per brønn. Cellene stod i inkubatorskap ved 37 °C med transfeksjonsblandingen. Etter fem timer ble transfeksjonen avsluttet ved at optimem ble byttet til medium med 10 % serum. Cellene fikk stå over natten i inkubatorskap før de ble stimulert med agonist.

Transfeksjon med DNA for grønt fluorescerende protein

Grønt fluorescerende protein (GFP) er et protein som absorberer blått lys og sender ut grønt lys. Denne fluorescensen er veldig stabil og krever ingen eksogene substrater eller kofaktorer [47]. Transfeksjonen ble utført som beskrevet i metode 1. I stedet for å stimulere med agonist etter inkuberingen, ble cellene studert i fluorescensmikroskop med blått lys.

2.8 Stimulering av HT 29 og HCT 116 cellene

De forskjellige ligandene som ble benyttet ble fortynnet i serumfritt medium til ønsket konsentrasjon. Ligandene ble tilsatt brønnene/skålene to dager etter at cellene var sådd ut. De stimulerte cellene fikk stå over natt i inkubatorskap ved 37 °C.

2.9 Luciferase reporter-assay

Prinsipp

Ved luciferase reporter-assay måles det to individuelle reporterenzymet i samme system. Renilla-luciferase (sea pansy) fungerer som kontrollreporter og virker som en grunnlinjerespons, mens ildflue-luciferase (*Photinus pyralis*) er den eksperimentelle reporteren som korrelerer med effekten av de eksperimentelle forholdene. Disse to måles

sekvensielt fra en enkelt prøve. Under transfeksjonen blir plasmidet med PPRE konstruert og plasmidet med renilla-luciferase satt inn i samme celle. Konstruert med PPRE og ildflue-luciferase gir fra seg et lyssignal når PPAR/RXR komplekset stimuleres med ligand. Ildflue-luciferase reporteren måles først ved å tilsette Luciferase-Assay Reagent II (LAR II) for å generere et stabilt luminescenssignal. Etter kvantifiseringen av ildflueluminescens blir denne reaksjonen undertrykt og renilla-luciferase reaksjonen startes simultant ved å tilsette Stop&Glo reagens. Relativ luciferaseratio ble beregnet ved å dele ildflue-luciferaseresponsen på renilla-luciferaseresponsen.

Passiv lysis av cellene

Assayet ble utført i en 96 brønners plate. Først ble det tilsatt 20 µl passiv lysisbuffer (PLB) til de vaskede cellene. PLB gjorde at cellene lyserte raskt og motvirket at prøvene skummet [48]. Deretter ble brettet satt på ristemaskin i 20 min etterfulgt av en 15 sekunders sentrifugering.

Kvantifisering av ildflue-luciferase aktivitet

Lysatet ble overført til en egen 96 brønners OptiPlate-96 som var beregnet for luminescensmaskinene. (GloMax™ Multi Detection System fra Promega og Fluorskan Ascent FL fra Thermo Labsystem) Maskinene injiserte 50 µl Luciferase-Assay Reagent II til cellelysaten i brønnene for å kvantifisere ildflue-luciferase aktivitet. Deretter ble det tilsatt 50 µl Stop&Glo reagens som stoppet aktiviteten til ildflue-luciferase samtidig som den aktiverte renilla-luciferase. For luciferase-assayet ble det brukt 2 sekunders lesing fulgt av en 10 sekunders målingsperiode.

2.10 Høsting av celler til Western blotting

Etter at cellene var stimulert i ca et døgn ble reaksjonen stoppet ved at cellene ble skylt med 0,9 % NaCl. Deretter ble cellene tilsatt 345 μ l Laemmlibuffer og skrappt med en cell-lifter over i eppendorfrør. Rørene ble kokt i 10 min ved 115 °C slik at cellene lyserte. Prøvene ble tilslutt avkjølt og fryst ved -20 °C.

2.11 Western blotting (SDS-PAGE og immunoblotting)

Prinsipper

Western blotting er en metode for å detektere proteiner på en membran ved hjelp av antistoff. Celleprøver appliseres på en polyakrylamidgel for makromolekylær separasjon. Gelen som benyttes er laget fra den friradikal-induserte polymeriseringen av akrylamid og har molekylære dimensjoner på porene slik at størrelsen kan spesifiseres. Proteinene separeres ved gelelektroforese. Proteinene vandrer gjennom gelen og blir separert ved et gelfiltrasjonssystem der gelen retarderer store molekyler mer enn små molekyler. Det benyttes to typer geler med forskjellige buffere og porer. ”Running-gelen” er den nederste biten hvor separasjonen finner sted. På toppen er det en ca 1-2 cm kort ”stacking gel” med store porer. Under prøveopparbeidelsen denatureres proteinene av natrium-dodecylsulfat (SDS) som er en anionisk detergent som brukes i kombinasjon med β -merkaptoetanol og påfølgende koking av prøvene for å dissosiere proteinene. Mercaptoetanol tilsettes for å redusere disulfidbåndene som kan oppstå mellom subenehetene på proteinene. SDS er sterkt proteindenaturerende. Det binder seg til proteinene slik at denaturerte polypeptider blir negativt ladet og vandrer gjennom gelen ut i fra størrelsen. Deretter blir proteinene overført til en nitrocellulosemembran som sterkt og uspesifikt binder proteiner. Ved overføringen bindes proteinene til overflaten i samme posisjon som de hadde i gelen. Overskuddet av absorpsjonsseter på nitrocellulosen blir blokkert med et ikke-spesifikt protein som for eksempel kasein, som er et melkeprotein. Dette gjøres for å motvirke den uspesifikke absorpsjonen av antistoffene som også er proteiner. Blottet inkuberes deretter med et primært antistoff, slik at de spesifikke proteinene blir merket med antistoffet. Dagene etter

inkuberes membranen igjen med et sekundært antistoff rettet mot alle primære antistoffer som er bundet, slik at proteinene kan detekteres. Et proteins molekylære masse bestemmes ved å kjøre elektroforesen sammen med spesielle markører som f.eks. Rainbow, som inneholder proteiner med kjente molekylære masser. Hvert protein har også sin farge, slik at en kan finne ut hvor langt i gelen proteinet av interesse har vandret [49].

Støping av geler

Glassplatene og ”spacerne” ble vasket med etanol og montert i stativet. Gelløsningen ble blandet etter oppskrift avhengig av hvor tykk gel en ønsket. Løsningen ble fylt opp mellom platene med en engangspipette. Øverst ble det lagt et lite lag med destillert vann for å unngå oksidasjon. Deretter polymeriserte gelen i ca. 45 min. Vannet over den stivnete gelen ble tømt ut og tørket vekk med filterpapir før stacking-gelen ble lagt på toppen. Brønnkammene ble presset ned mellom platene før stacking-gelen stivnet. Da stacking-gelen hadde stivnet ble brønnkammene løftet rett opp, og brønnene ble skylt med destillert vann. Til slutt ble gel-sandwichen satt i elektroforesekaret.

Elektroforese

Elektroforesebuffer ble helt i midtkammeret mellom gelplatene og ut i resten av karet slik at væsken stod ca 3 cm opp på gelen. Deretter ble 20 µl av prøvene applisert per brønn. 3 µl Rainbow markør ble applisert i den ytterste brønnen. Elektroforesen ble i de første 10 minuttene kjørt på 100 V og deretter på 120 V i 90-120 min. Etter dette ble gelene fjernet fra glassplatene og lagt over i et kar med transferbuffer og derfra videre over på en nitrocellulosemembran.

Overføring av gelproteiner til nitrocellulosemembran

Det ble laget en sandwich bestående av bomullsplate i bunnen, nitrocellulosemembran, gel og bomullsplate på toppen. Deretter ble det satt på 10 V strøm i 30-45 min avhengig av gelens tykkelse. Etter overføringen ble proteinovergangen sjekket ved hjelp av Ponceau S. Til slutt ble det skylt godt med vann og TTBS.

Immunoblotting

Membranen ble under hele prosedyren ristet forsiktig på vippebrett. Uspesifikke bindingssteder ble blokket med ca 8 ml tørrmelk pr blott i 1 time ved romtemperatur.

Blokkeløsningen ble deretter helt av og blottene ble skylt enda en gang med TTBS. 8 ml primærantistoff ble tilsatt per blott i riktig fortynning og blottene ble så inkubert over natten på kjølerom. Dagen etter ble det primære antistoffet helt av og membranen ble vasket 3 ganger i 15 min med TTBS. Tilslutt ble 8 ml sekundært antistoff tilsatt med en påfølgende inkubering i 45-60 min ved romtemperatur. Membranen ble igjen vasket 3 ganger 15 min med TTBS og deretter skylt flere ganger med vann for å bli kvitt tween. Til slutt ble proteinene detektert i fluorescensmaskin, Odyssey fra LI-COR. GAPDH ble benyttet som kontroll ved Western blott-analysen slik at vi kunnen normalisere dataene vi fikk. Relativ ekspresjonsratio ble beregnet som forholdet mellom fluorescens-signalet for proteinet vi ville undersøke og GAPDH fluorescens-signalet.

2.12 cAMP-assay

Prinsipp

cAMP-assay er en metode for å måle konsentrasjonen av cAMP i ukjente prøver ved å sammenligne med en standardkurve med kjente konsentrasjoner av cAMP. Prøver og standarder tilsettes isotop. Deretter blir det en konkurranse mellom isotopens binding til antistoff og cAMPs binding til antistoff. Dersom prøven inneholder mye cAMP vil mindre isotop bindes til antistoffet og deteksjonen blir lav. Inneholder prøven derimot lite cAMP, vil mye isotop bindes til antistoffet og man får en høy deteksjon. Deteksjonen måles i desintegrasjoner pr minutt (DPM). Når mettet ammoniumsulfat tilsettes feller antistoffet med isotop og cAMP ut. Etter sentrifugeringen tas det vare på pelleten. Derfor vil all isotop som ikke er bundet til antistoff eller cAMP bli borte, og mengden antistoff som er bundet til isotop kan detekteres. Ut ifra dette er det mulig å finne ut hvor mye cAMP vi har.

Preparering av prøver

1,5 ml Krebs-Ringer-Hepes buffer ble tilsatt hver brønn i brettet. Deretter stod brettene til preinkubering i minimum 15 min. Etter dette ble 500 µl hormon (PGE₂) med IBMX tilsatt pr brønn, og det hele ble inkubert i 3 min. IBMX ble tilsatt for å motvirke at fosfodiesteraser skulle bryte ned cAMP. Reaksjonen ble avsluttet ved å suge opp det som var i brønnen (hormon+KRH buffer) og tilsette 600 µl 5 % iskald trikloreddiksyre (TCA). TCA fører til at proteinene denaturerer. Brettene med prøvene ble satt på is i kar, og hver brønn ble skrapet

med en ”rubberpoliceman” før innholdet ble overført til reagensglass. Deretter ble reagensglassene sentrifugert med prøvene oppi på 2400 rpm i 10 min ved 4 °C. Supernatanten ble pipettert over i plastrør og spesiell forsiktighet ble utøvd med pelleten. Hvis den kom med, måtte prøvene sentrifugeres på nytt. Til slutt ble prøvene frosset ned. Pelleten ble løst i 500 µl 0,08 M NaOH. Løsningen skulle brukes til proteinmåling og ble derfor overført til blanke TT-rør og satt i kjøleskap.

Analyse av prøvene

Analysemetoden ble utført som beskrevet av Skomedal et al.[39]. Det ble laget en standardkurve med forskjellige konsentrasjoner av cAMP fortynnet i triklorediksyre (TCA). Følgende konsentrasjoner ble laget: 160-80-40-20-10-5-2,5-1,25 nM. 300 µl av prøvene ble tatt ut og pipettert over i glassrør. Prøvene og standardene ble nøytralisert med en liten skje CaCO₃ og videre ristet opp på mikser. Det ble sjekket at det ble bunnfall, hvis ikke måtte mer CaCO₃ tilsettes. Prøvene ble sentrifugert ved 2000 rpm i 10 min ved 4 °C. Etter dette skulle prosedyren foregå på is. 2 paralleller av 50 µl pr prøve ble pipettert over i matte nunc-rør, men ekstra forsiktighet ble utøvd slik at CaCO₃ ble liggende som bunnfall. Det ble også tatt med en nullprøve som bare inneholdt TCA og antistoff i stedet for standard. Bakgrunnen skulle bare inneholde TCA og antistoffbuffer. Deretter ble 50 µl ³H-cAMP (isotop) tilsatt alle rør. Videre ble 5 µl acetyleringsreagens tilsatt hvert rør og umiddelbart ristet på Whirlmix slik at reaksjonen gikk skikkelig. Til slutt ble 100 µl antistoff tilsatt, og prøvene ble inkubert på kjølerom til neste dag.

Dagen etter ble 1 ml mett ammoniumsulfat tilsatt slik at antistoffet falt ut, og prøvene ble videre sentrifugert i 30 min ved 5000 rpm ved 4 °C. Så ble supernatanten helt ut i begerglass og rørene ble satt på hodet på linellapapir i minst 10 min slik at de fikk dryppet fra seg. Til slutt ble det tilsatt 100 µl vann og 2 ml tellevæske før rørene ble proppet veldig godt og satt inn i scintillasjonstalleren. (Packard TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyzer 2100TR)

2.13 Behandling av humane skjelettmuskelceller

Til substrat oksidasjons-assayet ble det benyttet humane myotuber i kultur som var proliferert og differensiert fra satelittceller. Satelittceller er forstadier til muskelceller. De er uddifferensierte stamceller lokalisert utenfor muskelfibrene. Skjelettmuskelcellene er isolert fra muskelbiopsier fra *Musculus obliquus abdominis* (skrå, indre bukmuskel) fra friske frivillige forsøkspersoner. De humane myotubene ble dyrket i henhold til prosedyren beskrevet av Gaster et. al [50]. Lagrede fryserør med satelittceller ble tint opp i temperert vann. Cellesuspensjonen ble overført til et 50 ml sentrifugerør og 5 ml utsåingsmedium ble tilsatt dråpevis og blandet forsiktig. Utsåingsmediumet som ble benyttet var Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tilsatt Glutamax, føtalt kalveserum, Penicilin-Streptomycin (10 000 enheter/ml) og Fungizone® (250 mg/ml amfotericin B). Dette ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatanten inneholdt dimetylsulfoksid (DMSO) som bevarer cellene ved nedfrysning. Denne ble fjernet. Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml utsåingsmedium og blandet godt med pipette.

For beregning av celletetthet ble 50 µl av cellesuspensjonen tatt ut til telling og farget med 50 µl 0,4 % tryptanblått. Deretter ble resten av suspensjonen tilsatt passende mengde utsåingsmedium og blandet godt, og cellene ble sådd ut på ferdigcoatede 96-brønnersbrett. Det ble sådd ut 100 µl per brønn, og dette tilsvarte en celletetthet på cirka 6000 celler per brønn.

Stimulering av muskelceller

Etter utsåing ble satelittcellene inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Utsåingsmedium ble skiftet til proliferasjonsmedium bestående av DMEM med glutamaks, føtalt kalveserum, Ultrosor G, Penicilin-Streptomycin (10 000 enheter/ml) og Fungizone® (250 mg/ml amfotericin B) og tilsatt i 100 µl per brønn. Cellene ble inkubert i 2 dager til før ytterligere 100 µl proliferasjonsmedium ble tilsatt. Dette ble gjort i stedet for å bytte medium og for å forstyrre cellene minst mulig. Proliferasjonsmedium ble skiftet hver 2.-3. dag til cellene nådde 70-80 % konfluens eller begynte å spontandifferensiere. På dette tidspunktet ble vekstmedium byttet ut med differensieringsmedium bestående av DMEM med glutamaks, føtalt kalveserum, Penicilin-Streptomycin (10 000 enheter/ml) og Fungizone® (250 mg/ml amfotericin B). Cellene startet dermed å differensiere til flerkjernede muskelfibre

(myotuber). Differensieringsmedium ble skiftet cirka hver 2. dag. Ligander ble tilsatt cellene sammen med differensieringsmediet fra dag 3 etter start av differensieringen. Ligandene ble løst til ønsket konsentrasjon i differensieringsmedium og 100 µl ble tilsatt per brønn. Cellene ble visuelt undersøkt i mikroskop i løpet av proliferasjons- og differensieringsperioden.

2.14 Substrat oksidasjons-assay

Prinsipper:

Substrat oksidasjons-assay er en metode for å fange [^{14}C] CO_2 produsert i isolerte enzymer, organeller eller intakte celler. Når et [^{14}C]-merket substrat oksideres, vil det frigitte CO_2 'et kunne fanges i et filter. [^{14}C] CO_2 som er fanget i filteret kvantifiseres ved konvensjonell scintillasjonstelling [51]. De radioaktive fettsyrene som blir tatt opp i cellene blir metabolisert til CO_2 i mitokondriene. Mengden av radioaktiv fettsyre som metaboliseres i cellene er relatert til mengden radioaktiv CO_2 som dannes. Celleassosiert radioaktiv oljesyre er et mål på cellenes fettsyreopptak etter endt inkubasjon. I realiteten er opptaket høyere, fordi en del av den radioaktive fettsyren har blitt oksidert til radioaktiv CO_2 og β -oksidasjonsprodukter fra lipidmetabolismen.

Måling av fettsyreoksidasjon (CO_2 fanging)

Det ble benyttet en 96 brønners plate med et "fangefilter" som ble fuktet med 20 µl 1M NaOH pr brønn. Deretter ble det laget et forsøksmedium med oljesyre. Det ble tilsatt 50 µl av forsøksmediet pr brønn. For å gjøre det mulig å fange CO_2 i filteret, ble det laget en sandwich bestående av en metallplate i bunnen, deretter et 96-brønners brett med celler, så en silikonplate fulgt av en 96-brønners fangefilterplate som lå opp ned. På toppen ble det lagt en metallplate for å legge et jevnt press på platene og for å få et lufttett system. Hele sandwichen ble lagt i klem i en platepresse og plassert i et inkubatorskap ved 37 °C i 4 timer. Etter inkuberingen ble forsøksmediet fjernet, og myotubene ble forsiktig vasket 2 ganger med 150 µl fosfatbufret saltvann PBS (høstebuffer) for å fjerne overflødig radioaktivitet. Filterplaten ble tilsatt 400 µl Optiphase Supermix pr brønn. Etter to dagers henstand ble

filterplaten tellet med en scintillasjonsteller (1450 Wallac MicroBeta teller fra Perkin Elmer).

Måling av celleassosiert oljesyre:

Etter vaskingen av myotubene, ble cellene høstet med 200 μ l 0,1M NaOH per brønn og platen ble frosset ned til -20 °C. For å måle radioaktiviteten til prøvene, ble 50 μ l cellelysatsatt pr brønn i brettet som skulle brukes til å måle celleassosiert radiomerking. I de fire første brønnene på brettet ble det tilsatt 50 μ l ”forsøksmedium” som kontroll. Deretter ble det tilsatt 100 μ l Optiphase Supermix pr brønn, og brettet ble tellet i en scintillasjonsteller for mikroplater (1450 Wallac MicroBeta teller fra Perkin Elmer) i 2 timer.

2.15 Proteinmåling

Prinsipp:

Dette er en spektrofotometrisk prosedyre for å måle proteinkonsentrasjonen i en løsning. Målingen baseres på at farge bindes til basiske og aromatiske aminosyrer i et surt medium. Fargen på reagentet endres fra rød/brun til blå og det skjer et absorbansskifte hvor absorpsjonsmaksimum endres fra 465 til 595 nm [52]. To forskjellige kit ble benyttet til proteinmålingene.

Standardkurve

Først ble det laget en standardkurve med proteinstandarder fortynnet fra en BSA stock-standard. Til cAMP forsøket ble standardene fortynnet med 0,08M NaOH til kjente konsentrasjoner mellom 0-1 mg/ml. Til substrat oksidasjons-assayet ble standardene fortynnet med 0,1 M NaOH til kjente konsentrasjoner mellom 0-140 μ g/ml.

Proteinkonsentrasjonene i de ukjente prøvene ble bestemt ved å sammenligne målingene med standardkurven.

Proteinmåling til cAMP-assayet

Til denne proteinmålingen ble det benyttet Coomassie[®] Plus Protein Assay Reagent fra Bio-Rad. Prøvene bestod av den oppløste pelleten fra cAMP assayet eller et eget brett med celler

sådd ut bare for dette formålet. Brettet ga en mer nøyaktig proteinmåling, så vi gikk over til å bare bruke dette i de siste forsøkene.

Det ble tilsatt 10 µl prøve/standard i hver brønn. Det ble applisert 3 paralleller av hver prøve. Deretter ble det tilsatt 300 µl romtemperert Coomassie[®] proteinreagens per brønn. Tilslutt ble platen ristet på en rister i 30 sekunder og absorbansen ved 595 nm ble målt i en Wallac EnVision 20104 Multilabel Reader fra Perkin Elmer.

Proteinmåling til substrat oksidasjons-assay:

Til denne proteinmålingen ble det benyttet et Protein Assay Dye Reagent Concentrate fra Bio-Rad.

50 µl homogenisert cellelysat ble tilsatt pr brønn i 96 brønners brettet som skulle brukes til proteinmåling. I starten av brettet ble det tilsatt to brønner med 50 µl proteinstandard per konsentrasjon. Deretter ble det tilsatt 200 µl proteinfargingsreagens. Dette ble laget ved å fortynne 1 del fargekonsentrat med 4 deler destillert vann. Prøvene stod i romtemperatur før absorbansen ved 595 nm ble målt med en Wallac Victor[™] fra Perkin Elmer.

2.16 Beregninger og statistikk

Alle resultater som ligger til grunn for dose-responskurvene ble utført med 3 eller 4 paralleller. Western blott-forsøkene er utført med to replikater av hver prøve applisert på gelen. De fleste forsøkene ble gjentatt minst 3 ganger. Noen av forsøkene er bare utført 2 ganger, fordi responsen var så dårlig at vi valgte å ikke gå videre med dem. Det ble beregnet gjennomsnitt av verdiene av de parallelle prøvene. Disse gjennomsnittsverdiene ble deretter normalisert mot kontrollen. De normaliserte dataene ble benyttet videre ved sammenslåing av forsøk for å fremstille resultatene grafisk.

Resultatene ble analysert for statistisk signifikans ved bruk av enveis-variensanalyse med Bonferronikorreksjon. En p-verdi på $< 0,05$ ble ansett som signifikant. Testene resulterte stort sett i ikke-signifikante forskjeller. Alle beregninger og utarbeidelser av grafer ble gjort i dataprogrammet GraphPad.

3. Resultater

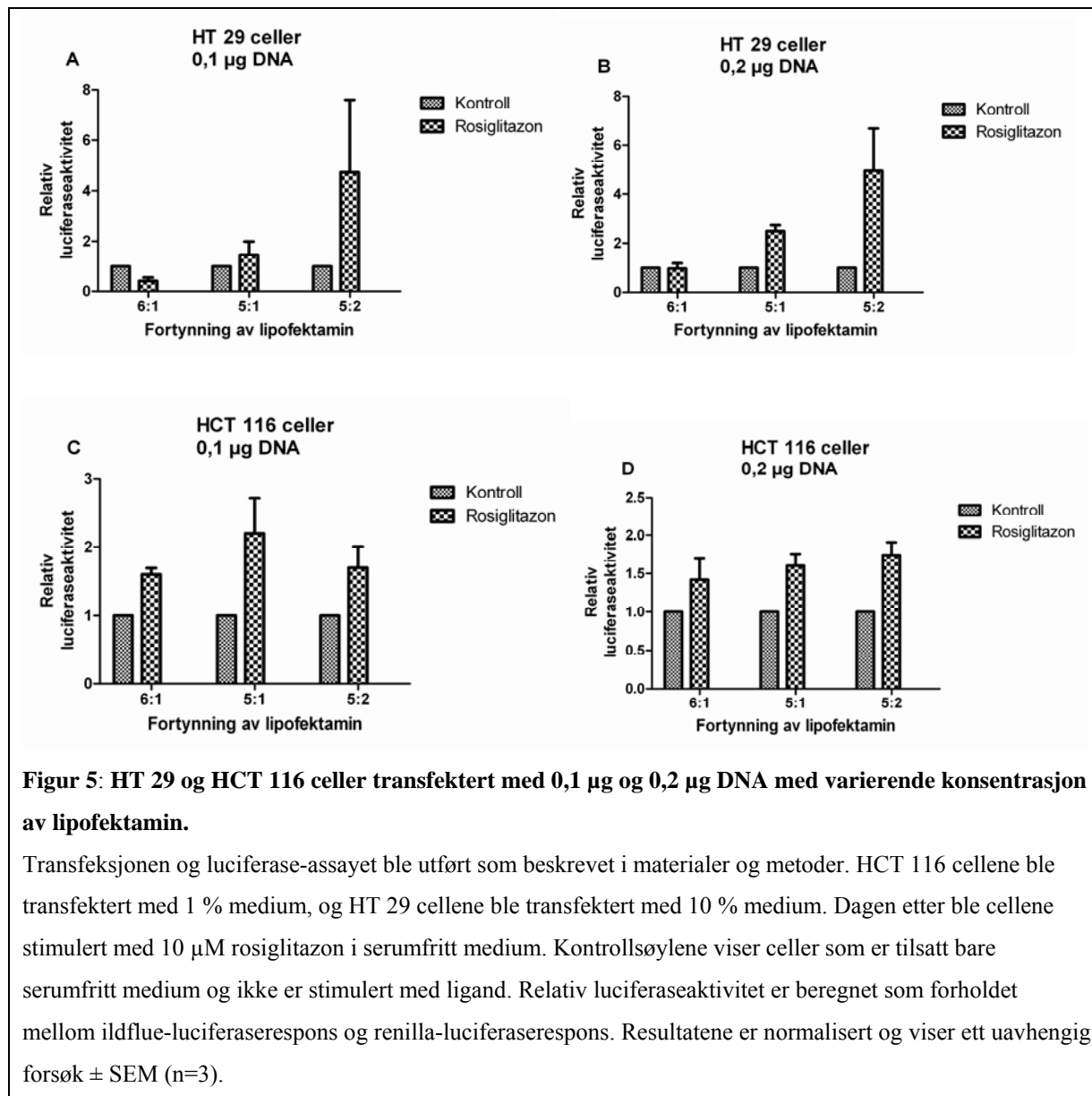
3.1 Metodeutvikling: Transfeksjon

3.1.1 Varierende celletetthet

Det første forsøket vi gjorde var å variere celletettheten ved utsåing for å finne den mest optimale tettheten. Vi begynte med en tetthet på 50 000 celler/brønn for HT 29 cellene. Etter hvert gikk vi ned til 40 000 celler/brønn. HCT 116 cellene vokste veldig raskt, så vi benyttet 40 000 celler/brønn for denne celletypen.

3.1.2 Forhold mellom lipofektamin og mengde DNA

I starten av forsøkene ønsket vi å finne ut hvilket forhold mellom lipofektamin og DNA som ga høyest transfeksjonseffektivitet. Vi transfekterte HT 29 og HCT 116 cellene med forskjellige forhold mellom lipofektamin og DNA. Forholdene vi forsøkte var 6:1, 5:1, og 5:2 for henholdsvis 0,1 μg og 0,2 μg DNA. Deretter stimulerte vi cellene med rosiglitazon 10 μM i 24 timer, og målte responsen ved luciferase-assay. Resultatene fra et typisk forsøk er vist i figur 5. Figur 5A viser i HT 29 cellene den beste effekten ved 5:2 fortykning av lipofektamin med 0,1 μg DNA. Figur 5B viser at både 5:1 og 5:2 fortykning med 0,2 μg DNA fungerer bra. I figur 5C og 5D er det ikke så store forskjeller i responsen av de forskjellige fortykningene. Det ser imidlertid ut til at 5:1 fortykning av lipofektamin med 0,1 μg DNA gir den beste responsen. Etter en samlet vurdering av responsen i de forskjellige forsøkene, kom vi fram til at vi skulle gå videre med 5:1 fortykning av lipofektamin og 0,2 μg DNA i HT 29 cellene. Vi valgte å gå videre med 5:1 fortykning av lipofektamin med 0,1 μg DNA i HCT 116 cellene.



3.1.3 Måling av transfeksjonseffektivitet

Visuell måling av transfeksjonseffektiviteten med grønt fluorescerende protein (GFP)

For å måle transfeksjonsgraden ble HT 29 cellene transfektert med GFP. På denne måten kunne vi, ved hjelp av et lysmikroskop med blått lys, få et visuelt inntrykk av hvor mange celler som hadde tatt opp DNA'et etter transfeksjonen. Forskjellige lipofektamin- og DNA konsentrasjoner i medium med 10 % serum ble forsøkt. Forsøket bekreftet at

transfeksjonsgraden for HT 29 cellene var best i brønnene med 0,2 µg DNA. Fortynningene 6:1 og 5:1 med lipofektamin og DNA ga best ekspresjon av GFP.

I et annet forsøk undersøkte vi om det var noen forskjell på å bruke medium med 10 % serum eller serumfritt medium under transfeksjonen med GFP. Forsøket ble utført i begge celletyper. Det ble benyttet 0,1 µg DNA og 5:1 fortynning av lipofektamin for begge celletyper. Etter ca ett døgn var ekspresjonen av GFP i HCT 116 cellene høy, mens HT 29 cellene hadde lav ekspresjon av GFP.

Kvalitativ måling av transfeksjonseffektiviteten i HT 29 cellene

Fordi ekspresjonen i HT 29 cellene viste seg å være så dårlig, ble det utført en kvalitativ måling for å anslå transfeksjonseffektiviteten. Cellene som lå innenfor ruten i okkulet på lysmikroskopet ble telt med og uten blått lys. Noen av brønnene hadde en celletetthet på 40 000 celler/brønn, mens andre brønner hadde en celletetthet på 50 000 celler/brønn. Resultatet ble en transfeksjonsgrad på ca 9 % for cellene med tetthet på 40 000 celler per brønn, og en transfeksjonsgrad på ca 12 % for celler med tetthet 50 000 celler pr brønn.

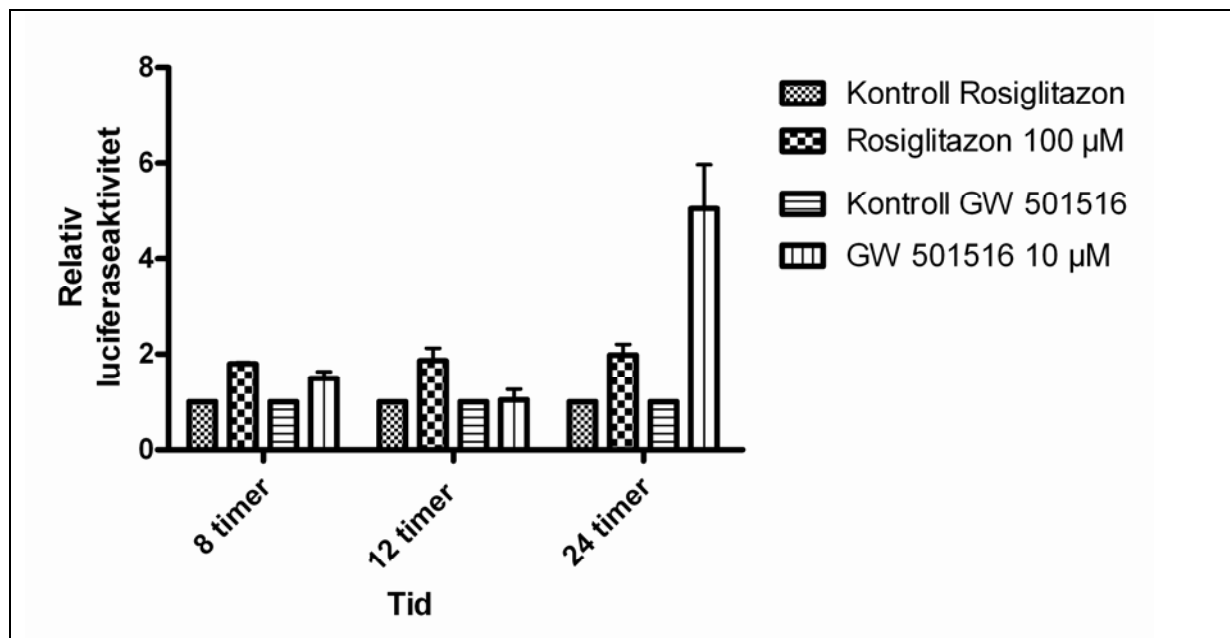
Transfeksjonseffektivitet i HT 29 celler						
	40 000 celler per brønn			50 000 celler pr brønn		
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3
Totalt antall celler	999	675	805	1214	892	750
Transfekterte celler	89	58	77	157	148	60
Tranfeksjonsgrad	8,9 %	8,6 %	9,6 %	12,9 %	16,6 %	8 %

Tabell 1: Transfeksjonseffektivitet i HT 29 celler

Transfeksjonen ble utført som beskrevet i materialer og metoder. GFP ble transfektet inn i cellene dagen etter at de var sådd ut. 3 brønner ble sådd ut med 40 000 celler/brønn, og 3 brønner ble sådd ut med 50 000 celler/brønn. Totalt antall celler og transfekterte celler ble telt i et lysmikroskop med og uten blått lys. På bakgrunn av dette ble transfeksjonseffektiviteten beregnet.

3.1.4 Varighet av eksponering for ligand

Det ble gjort ett forsøk for å finne ut hvor lang tid det tok før de stimulerte cellene ga en respons. Cellene ble stimulert i 8 timer, 12 timer eller 24 timer med ligand. Forsøket ble utført på HCT 116 celler som var transfektert med enten 1 % serum eller 10 % serum. Cellene ble stimulert med to forskjellige ligander. GW 501516 er en PPAR δ agonist [53] og rosiglitazon aktiverer PPAR γ [26]. Det viste seg at det for GW 501516 var mest ideelt å stimulere cellene i 24 timer. For rosiglitazon var det ingen tydelig forskjell på om cellene ble stimulert i 8 timer, 12 timer eller 24 timer. Figur 6 viser resultatet for celler transfektert med 10 % serum. 1 % serum ga tilsvarende respons. (Data ikke vist)



Figur 6: HCT 116 celler stimulert med ligand i 8 timer, 12 timer eller 24 timer.

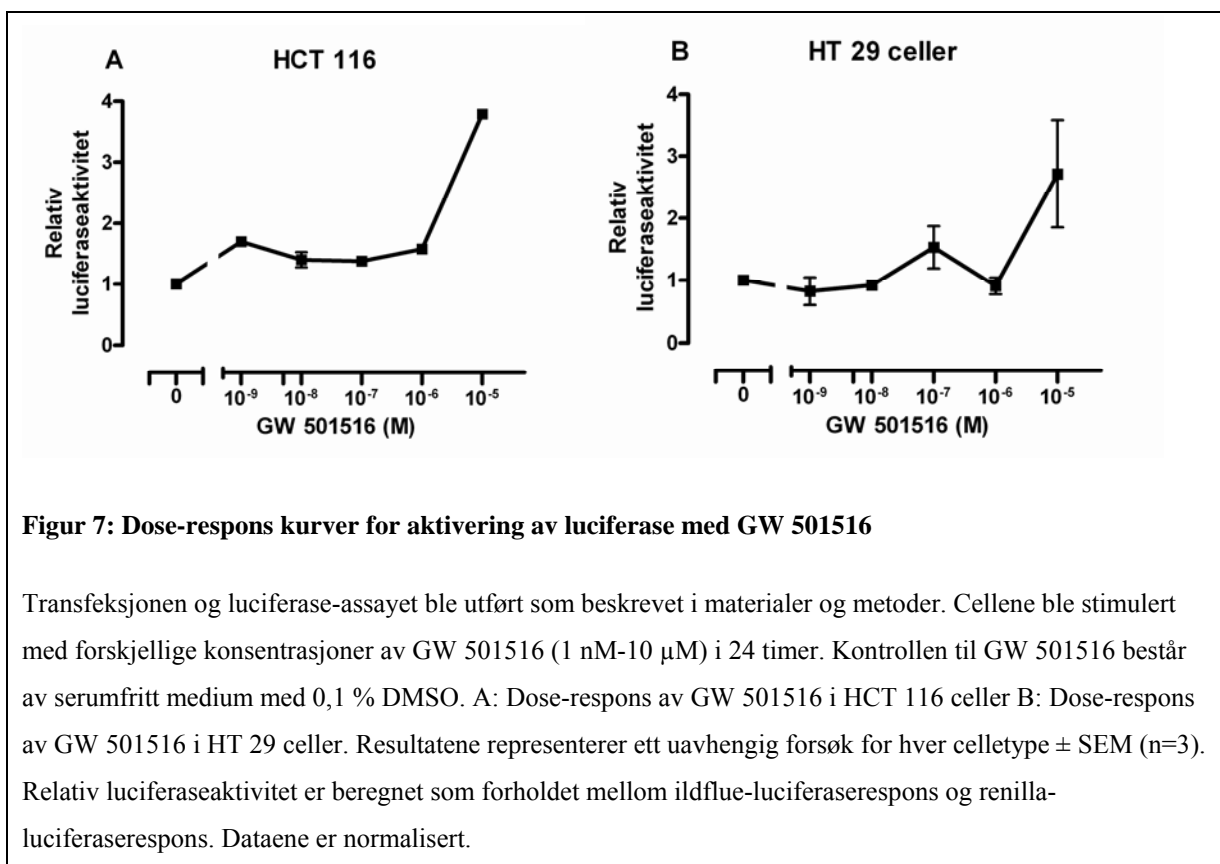
Transfeksjonen og luciferase-assayet ble utført som beskrevet i materialer og metoder. HCT 116 cellene ble sådd ut i 10 % medium. Dagen etter ble PPRE-konstrukt og renilla-luciferase transfektert inn i cellene. 2 dager etter at cellene var sådd ut, ble de stimulert med GW 501516 10 μ M eller rosiglitazone 100 μ M i 8 timer, 12 timer eller 24 timer. Kontroll søylene viser celler som ikke er stimulert med ligand, og som bare inneholder serumfritt medium. I kontroll søylen til GW 501516 er det tilsatt 0,1 % DMSO i det serumfrie mediet. Relativ luciferaseaktivitet er beregnet som forholdet mellom ildflue-luciferaserespons og renilla-luciferaserespons. Resultatene er normalisert og viser ett uavhengig forsøk \pm SEM (n=3).

3.2 Dose-avhengig aktivering av luciferase i HCT 116 og HT 29 celler

3.2.1 Effekt av forskjellige konsentrasjoner av GW 501516 og rosiglitazon på luciferaseaktivitet

GW 501516 og rosiglitazon er kjent for å stimulere henholdsvis PPAR δ og PPAR γ [53]. Det er vist at både HCT 116 og HT 29 cellene inneholder detekterbare nivåer av PPAR δ og PPAR γ [9, 54]. Vi transfekterte derfor inn et PPRE-luciferasekonstrukt i disse cellene, slik at vi kunne se på effekten av de forskjellige ligandene. Vi ønsket å finne ut om NSAIDs interfererer med PPAR δ og påvirker PPAR γ effekten.

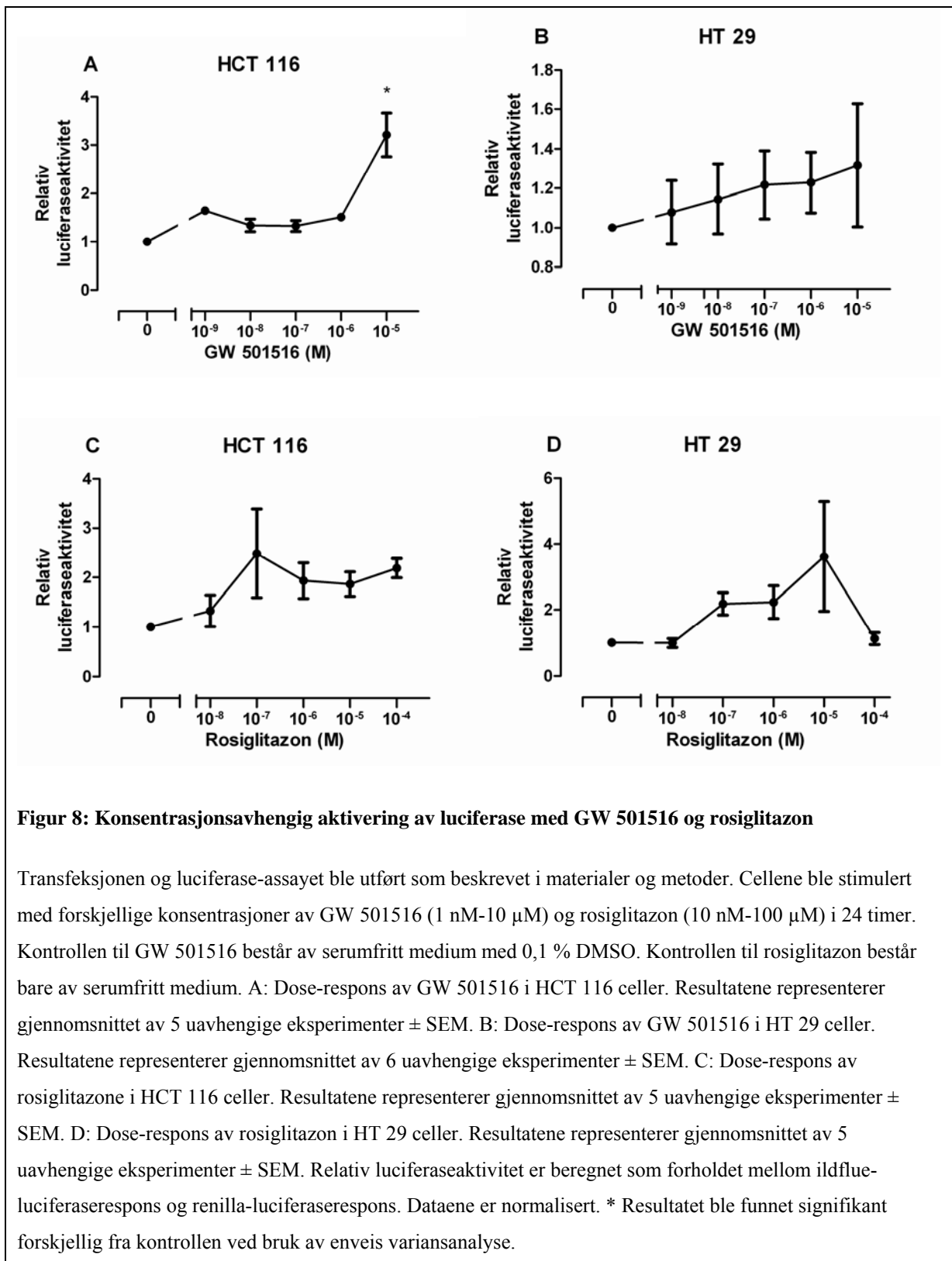
I de første forsøkene vi utførte var resultatene lovende. Etter hvert fungerte transfeksjonsassayet dårligere, og effektene ble mer variable. Derfor er det i figur 7 vist ett tidlig forsøk med GW 501516 i hver celletype.



I figur 8 er resultatene fra alle forsøkene slått sammen og normalisert. Resultatene viser en effekt ved 1nM i HCT 116 celler stimulert med GW 501516. Ved 10 μ M er responsen

signifikant høyere enn kontrollen (figur 8A). Responsen i HT 29 cellene var dårlig. Resultatene hadde veldig stor spredning og var ikke signifikante.

Effekten av rosiglitazon var i HCT 116 cellene oppe på 10 nM (figur 8C). Det varierte i de forskjellige forsøkene hvilken konsentrasjon som ga best effekt. Responsen av rosiglitazon i HT 29 cellene er oppe på 0,1 μ M (figur 8D). Ved den høyeste konsentrasjonen synker responsen. Ingen av resultatene er signifikante.



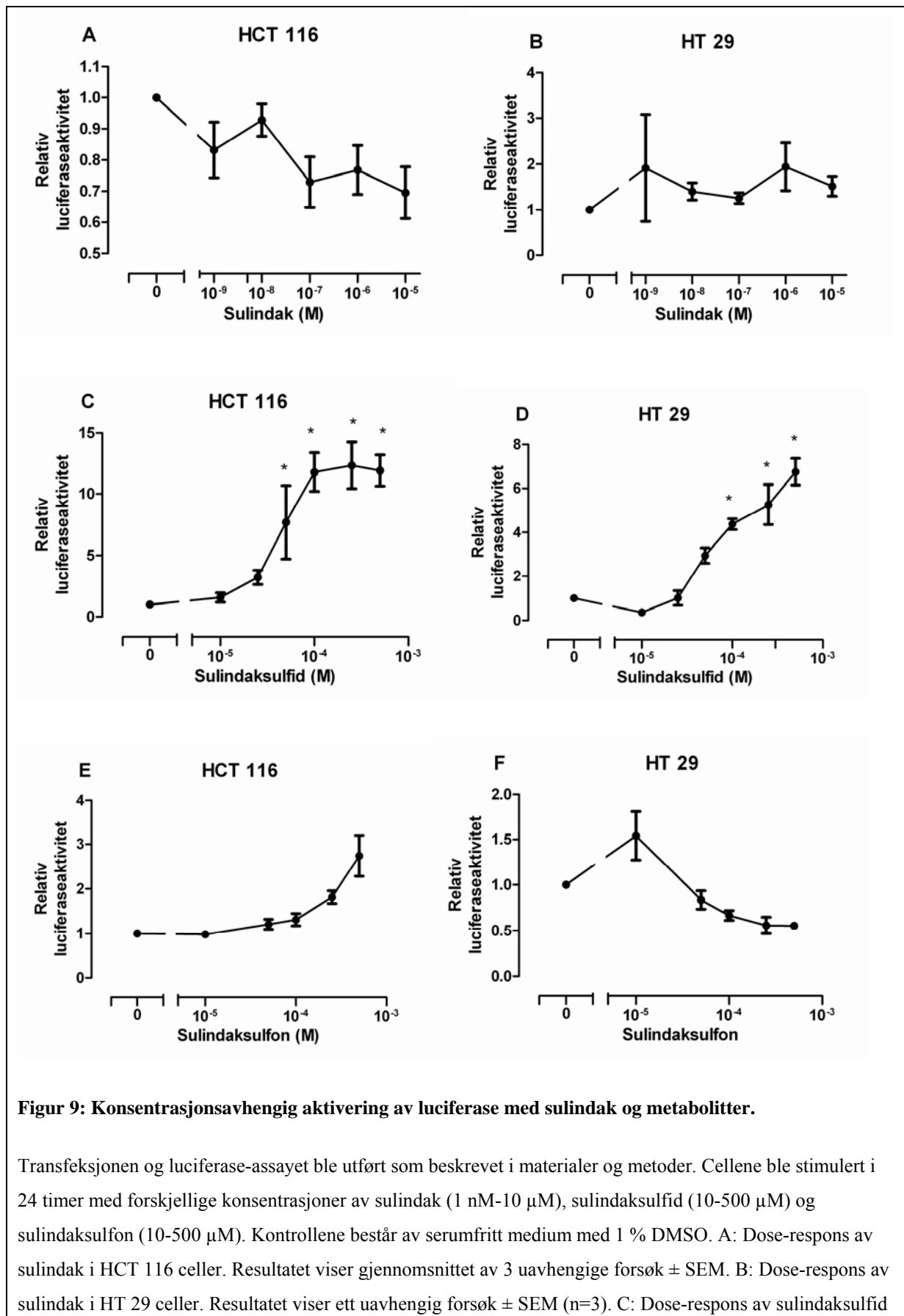
3.2.2 Effekter av sulindak og metabolittene sulindaksulfid og sulindaksulfon på luciferaseaktivitet

Sulindak er klassifisert som et NSAID, men hemmer prostaglandinsyntesen i mindre grad enn andre NSAIDs [55]. Sulindak ga ikke noen effekt i hverken HCT 116 eller HT 29 cellene (figur 9). Sulindak har to metabolitter, sulindaksulfid og sulindaksulfon. Sulindaksulfid er aktiv og hemmer COX.

Det er rapportert at sulindaksulfid virker som en antagonist på PPAR δ ved at den hemmer binding av PPAR δ til DNA [9]. Sulindaksulfid er også rapportert å stimulere PPAR γ [56]. Sulindaksulfid ga veldig høy luciferaseaktivitet ved økende konsentrasjoner i både HCT 116 cellene og HT 29 cellene (figur 9C og D). I HCT 116 cellene fikk vi den høyeste responsen ved 250 μ M. Effektene av sulindaksulfid var signifikante fra og med konsentrasjoner på 50 μ M. Den høyeste responsen i HT 29 cellene kom ved 500 μ M. Også her var resultatene signifikante fra og med konsentrasjoner på 50 μ M. Responsen av sulindaksulfid i begge celletyper skyldes antakelig aktivering av PPAR γ .

Det er rapportert at sulindaksulfon hemmer PPAR δ aktivitet [9] og stimulerer PPAR γ aktivitet [57]. I HCT 116 cellene observerte vi en gradvis økt respons ved økende konsentrasjoner av sulindaksulfon. Den høyeste konsentrasjonen av sulindaksulfon vi forsøkte (500 μ M), var også konsentrasjonen som ga best respons. Ingen av konsentrasjonene ga signifikant høyere respons enn kontrollen (figur 9E). Den beste effekten i HT 29 cellene fikk vi ved den laveste konsentrasjonen (10 μ M) (figur F). Ved høyere konsentrasjoner synker responsen.

Figuren viser for HT 29 cellene ett av to forsøk for hver av ligandene. De andre resultatene viste tilsvarende effekter.



i HCT 116 celler. Resultatet viser gjennomsnittet av 4 uavhengige forsøk \pm SEM. D: Dose-respons av sulindaksulfid i HT 29 celler. Resultatet viser ett uavhengig forsøk \pm SEM (n=3). E: Dose-respons av sulindaksulfon i HCT 116 celler. Resultatet viser gjennomsnittet av 4 uavhengige forsøk \pm SEM. F: Dose-respons av sulindaksulfon i HT 29 celler. Resultatet viser ett uavhengig forsøk \pm SEM (n=3). Relativ luciferaseaktivitet er beregnet som forholdet mellom ildflue-luciferaserespons og renilla-luciferaserespons. Dataene er normalisert. * Resultatet ble funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved bruk av enveis variansanalyse.

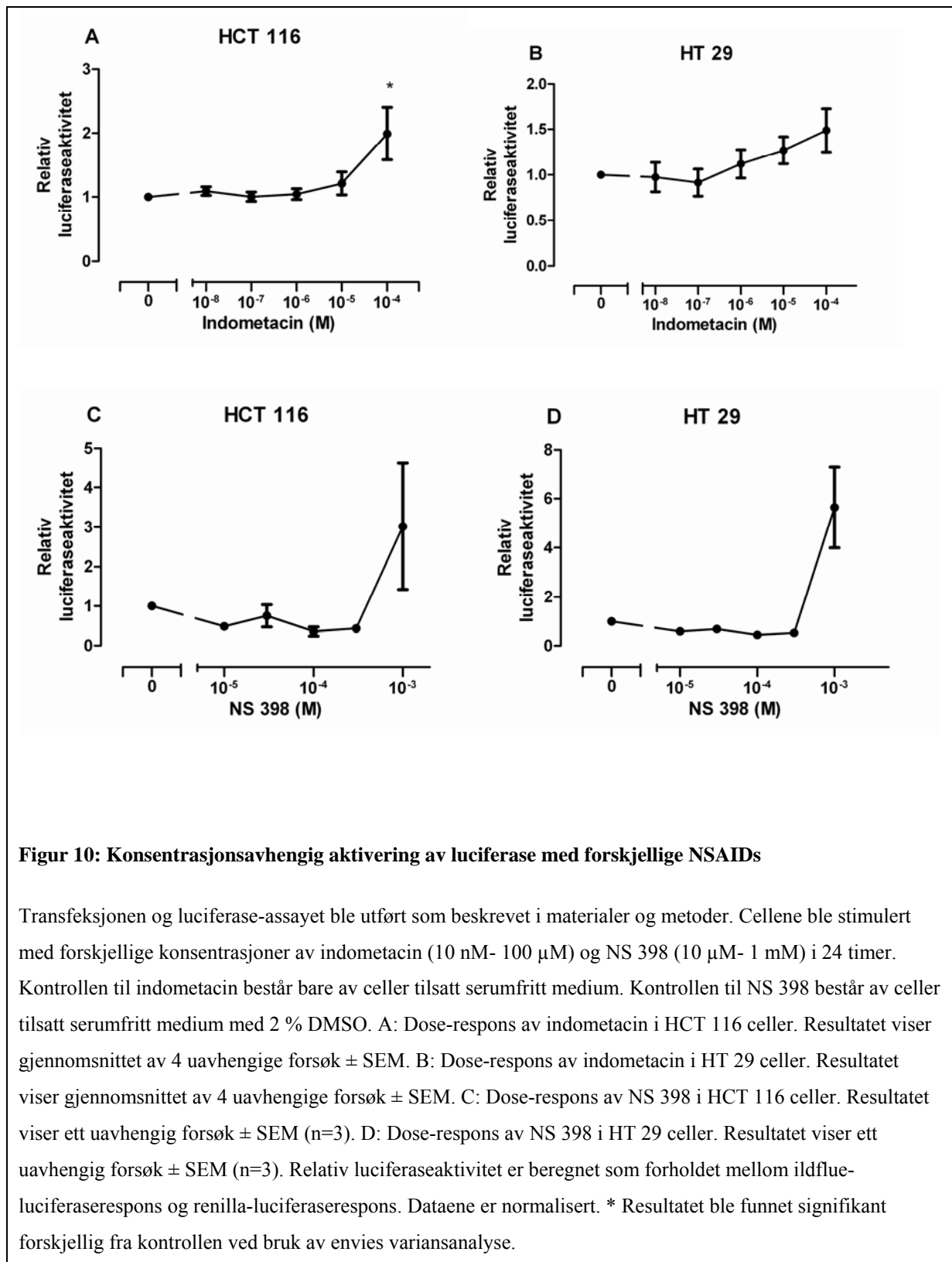
3.2.3 Effekt av andre NSAIDs på luciferaseaktivitet

Vi ønsket også å undersøke om vi fikk aktivert PPRE-luciferasekonstruktet med andre NSAIDs enn sulindakmetabolittene.

Indometacin er et NSAID som fungerer som en uselektiv COX hemmer [55]. Indometacin er rapportert å hemme PPAR δ [9, 58] og aktivere PPAR γ [59]. I forsøkene med HCT 116 cellene så vi at den høyeste konsentrasjonen av indometacin (100 μ M) ga en signifikant respons (figur 10A). I HT 29 cellene fikk vi også en topp på den høyeste konsentrasjonen vi forsøkte (100 μ M), men denne responsen var ikke signifikant (figur 10B).

NSAID'et NS 398 er en selektiv COX-2 hemmer. Det er rapportert at NS 398 kan redusere nivåene av PGE₂ i HT 29 celler [60]. NS 398 ga ingen tydelig respons i hverken HCT 116 eller HT 29 cellene våre, men ved konsentrasjoner på 1 mM steg responsen kraftig i HT 29 cellene. Figur 10 C og D viser resultatene fra ett av to forsøk i både HT 29 og HCT 116 cellene. De andre forsøkene viste tilsvarende effekter.

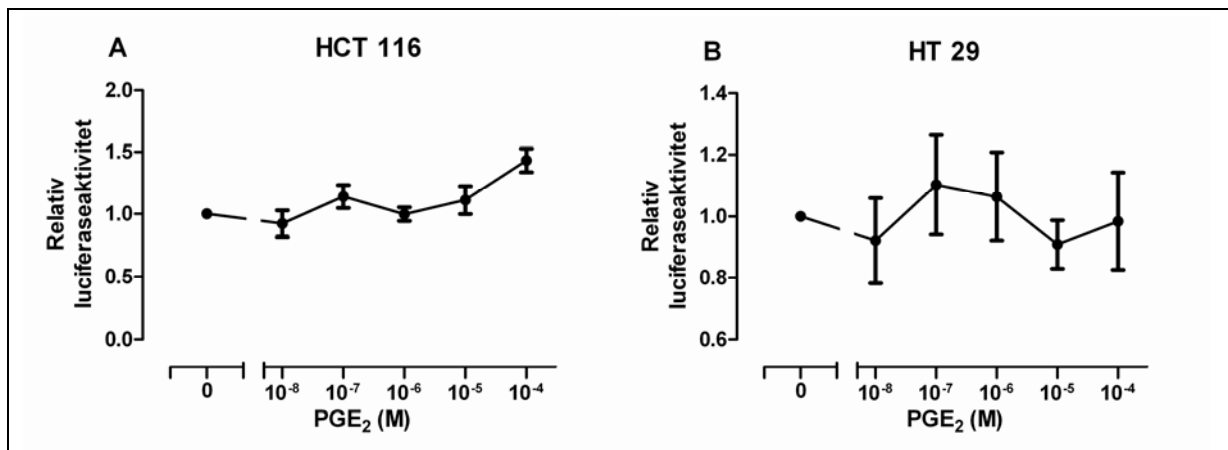
Effekten av NSAIDs alene reflekterer PPAR γ aktivering. For å få fram en potensielt hemmende effekt på PPAR δ måtte vi stimulert med GW 501516 i nærvær av økende konsentrasjoner av NSAIDs. Men fordi effekten på PPAR γ blir såpass fremtredende var dette assayet ikke egnet til å studere NSAIDs effekten på PPAR δ -stimulert aktivitet.



3.2.4 Effekt av PGE₂ på luciferaseaktivitet

Økte nivåer av PGE₂ har blitt rapportert i både humane adenomer og karsinomer i tykktarm [12, 61]. Det er holdepunkter for at PGE₂ kan transaktivere PPAR δ indirekte gjennom PI3K/Akt signalering [15]. Vi ville undersøke om PGE₂ påvirker luciferaseaktiviteten i cellene.

I HCT 116 cellene så vi en svak økning i respons med økende konsentrasjoner av PGE₂ (figur 11A). Vi så ingen effekt av PGE₂ i HT 29 cellene (figur 11B). Spredningen er dessuten veldig stor. Ingen av resultatene var signifikante.



Figur 11: Effekt av PGE₂ på luciferaseaktivitet

Transfeksjonen og luciferase-assayet ble utført som beskrevet i materialer og metoder. Cellene ble stimulert i 24 timer med forskjellige konsentrasjoner av PGE₂ (10 nM-100 μ M). Kontrollen består av celler som ikke er stimulert med ligand, men bare tilsatt serumfritt medium. A: Dose-respons av PGE₂ i HCT 116 celler.

Resultatene viser gjennomsnittet av 4 uavhengige forsøk \pm SEM. B: Dose-respons av PGE₂ i HT 29 celler.

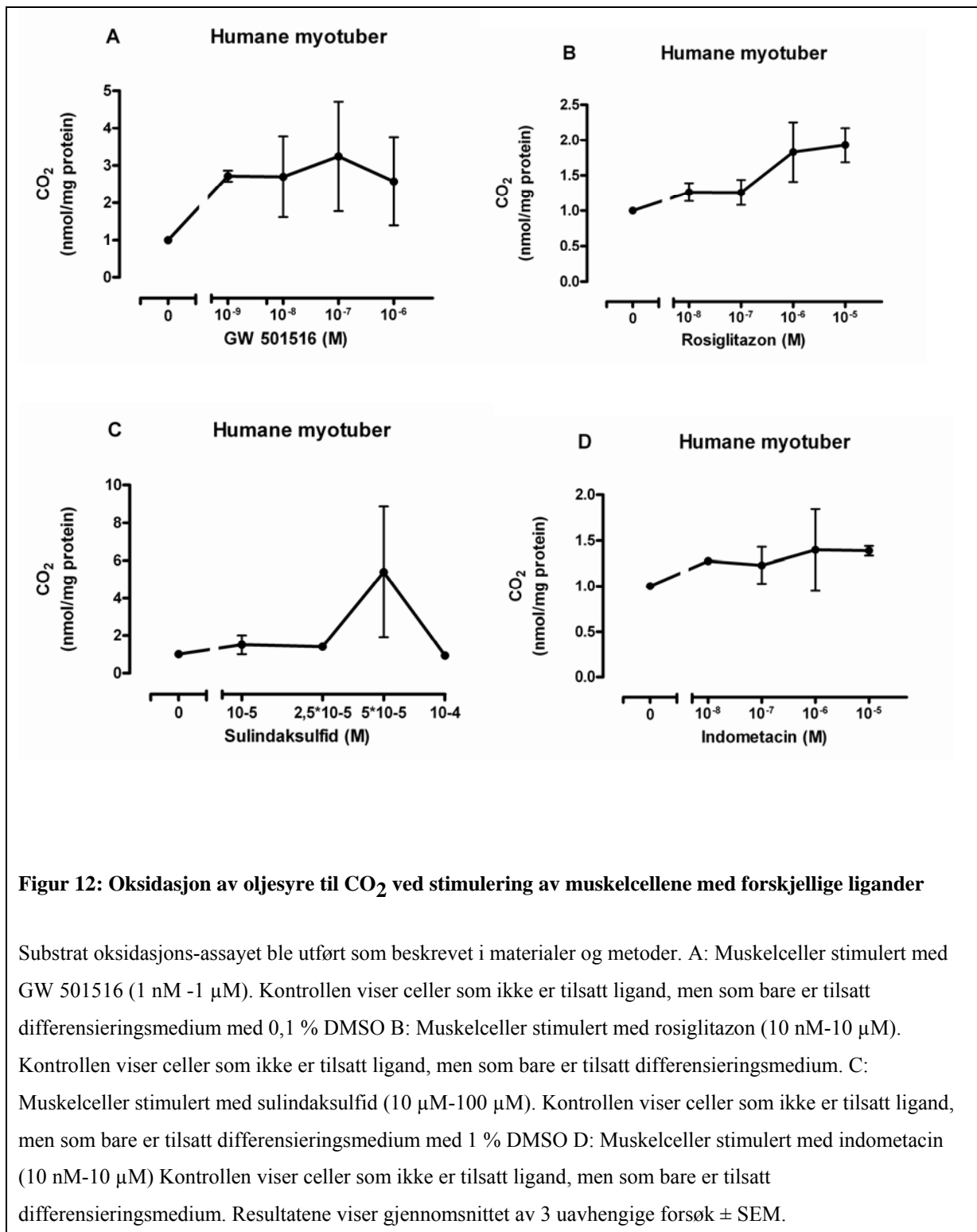
Resultatene viser gjennomsnittet av 4 uavhengige forsøk \pm SEM. Relativ luciferaseaktivitet er beregnet som forholdet mellom ildflue-luciferaserespons og renilla-luciferaserespons. Dataene er normalisert.

3.3 Effekter av forskjellige ligander på PPAR δ i humane myotuber

Som et ledd i undersøkelsen gjorde jeg forsøk i humane myotuber. Det er vist at det er en betydelig ekspresjon av PPAR δ i slike muskelceller [62]. Derfor håpet jeg at effektene på PPAR δ skulle bli mer framtreddende i denne celletypen. Ekspresjonen av gener som er involvert i transport og oksidasjon av fettsyrer øker ved stimulering av PPAR δ . De radioaktive fettsyrene som blir tatt opp i cellene blir metabolisert til CO₂ i mitokondriene. Mengden av [¹⁴C] oljesyre som metaboliseres i cellene er relatert til mengden [¹⁴C] CO₂ som dannes. Vi målte også celleassosiert radioaktiv oljesyre som er et mål på cellenes fettsyreopptak etter endt inkubasjon, men resultatene viste ingen endringer i fettsyreopptaket. (Data ikke vist)

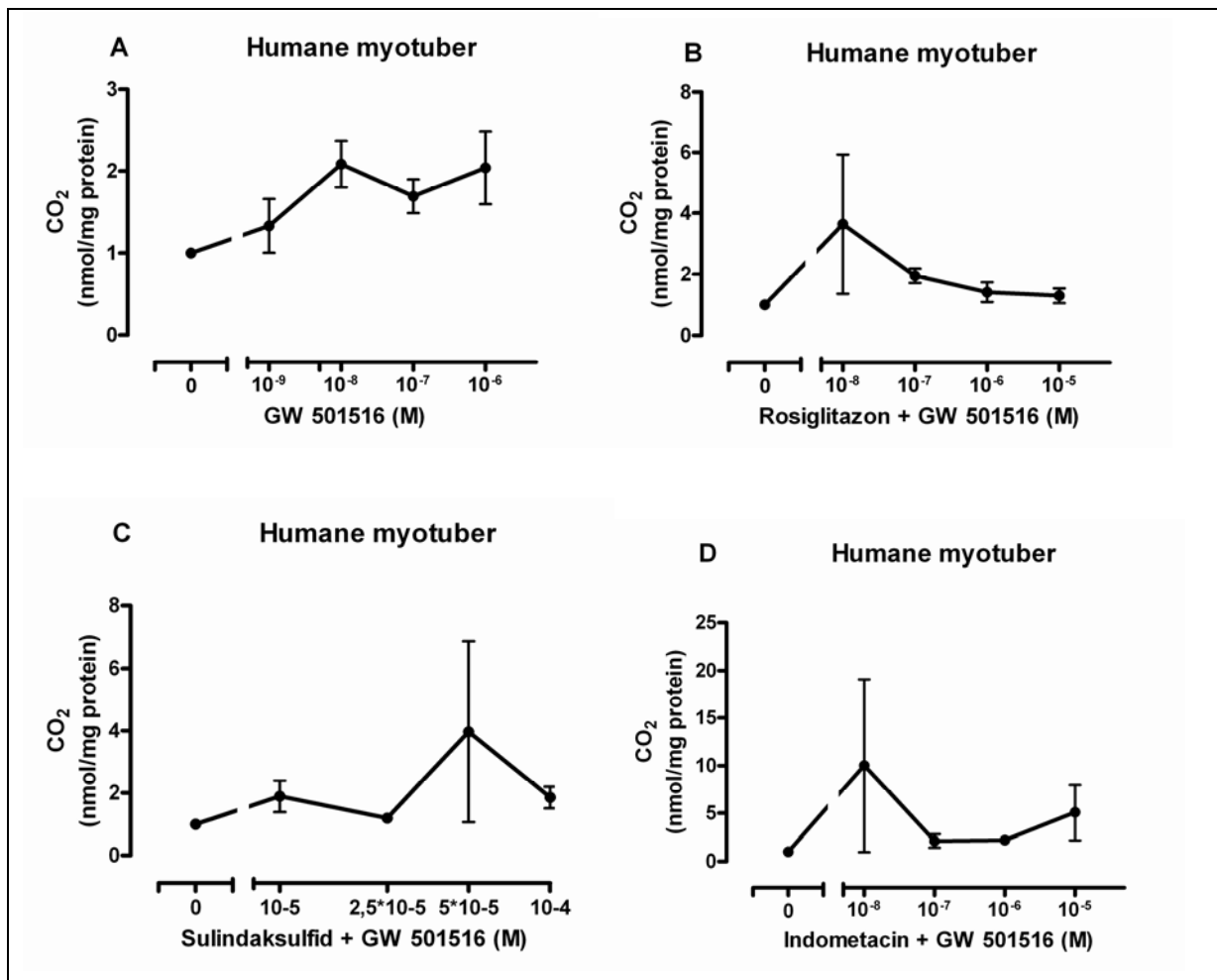
I de tre første forsøkene ble muskelcellene stimulert med forskjellige konsentrasjoner av GW 501516 og NSAID'ene sulindaksulfid og indometacin. Begge NSAID'ene er rapportert å hemme PPAR δ og aktivere PPAR γ [11, 56, 58, 59]. Cellene ble også stimulert med varierende konsentrasjoner av rosiglitazon, som er rapportert å være en agonist på PPAR γ [11].

Resultatene viste at GW 501516 hadde en ca 3 gangers økning i respons ved konsentrasjoner på 1 nM (fig 12A). Ved høyere konsentrasjoner var spredningen stor. Ingen av resultatene ble funnet signifikante. Rosiglitazon ga heller ingen signifikante responser i forhold til kontrollen. Konsentrasjoner på 10 μ M ga den beste responsen (fig 12B) og viste ca 1,5-2,5 gangers økning. Effekten av rosiglitazon tyder på at det kan være PPAR γ tilstede i cellene også. Sulindaksulfid ga ikke så gode responser. Resultatet ved konsentrasjoner på 50 μ M hadde en veldig stor spredning (fig 12C). Sulindaksulfid i høye konsentrasjoner virket toksisk på cellene. Proteinverdiene ved de høyeste konsentrasjonene var veldig lave, og mange av cellene så døde ut i mikroskopet. Indometacin ga den beste responsen ved konsentrasjoner på 10 μ M (fig 12D), men resultatet var ikke signifikant.



Vi ønsket å undersøke om NSAIDs hemmer effekten av GW 501516. Siden vi fant antydning til en PPAR γ aktivitet, måtte vi også undersøke om samtidig aktivering av PPAR γ vil maskere en eventuelt hemmende effekt. Vi stimulerte derfor cellene med 0,1 μM GW

501516 sammen med økende konsentrasjoner av rosiglitazon, sulindaksulfid og indometacin. Stimulering med GW 501516 alene ga som tidligere en konsentrasjonsavhengig økning i oksidasjonsaktivitet med en maksimal dobling (figur 13A). Rosiglitazon hadde nesten ingen økning sammenlignet med GW 501516 alene (figur 13B). Responsen av sulindaksulfid og indometacin økte også lite i forhold til GW 501516 alene (figur 13C og D). Spredningen var også stor ved enkelte konsentrasjoner. Ingen av resultatene ble funnet signifikante.



Figur 13: Oksidasjon av oljesyre til CO₂ ved stimulering av muskelcellene med GW 501516 alene eller i nærvær av forskjellige ligander.

Substrat oksidasjons-assay ble utført som beskrevet i materialer og metoder. A: Muskelceller stimulert med GW 501516 alene (10 nM-10 μM). B: Muskelceller stimulert med GW 501516 (0,1 μM) og rosiglitazon (10 nM-10 μM). C: Muskelceller stimulert med GW 501516 (0,1 μM) og sulindaksulfid (10-100 μM). D: Muskelceller stimulert med GW 501516 (0,1 μM) og indometacin (10 nM-10 μM). I figur 13B-D viser kontrollen (0-verdien) effekten av 0,1 μM GW 501516 som er satt til 1,0. Effekten av økende konsentrasjoner av ligander er normalisert i forhold til dem. Resultatene representerer gjennomsnittet av 3 uavhengige forsøk ± SEM.

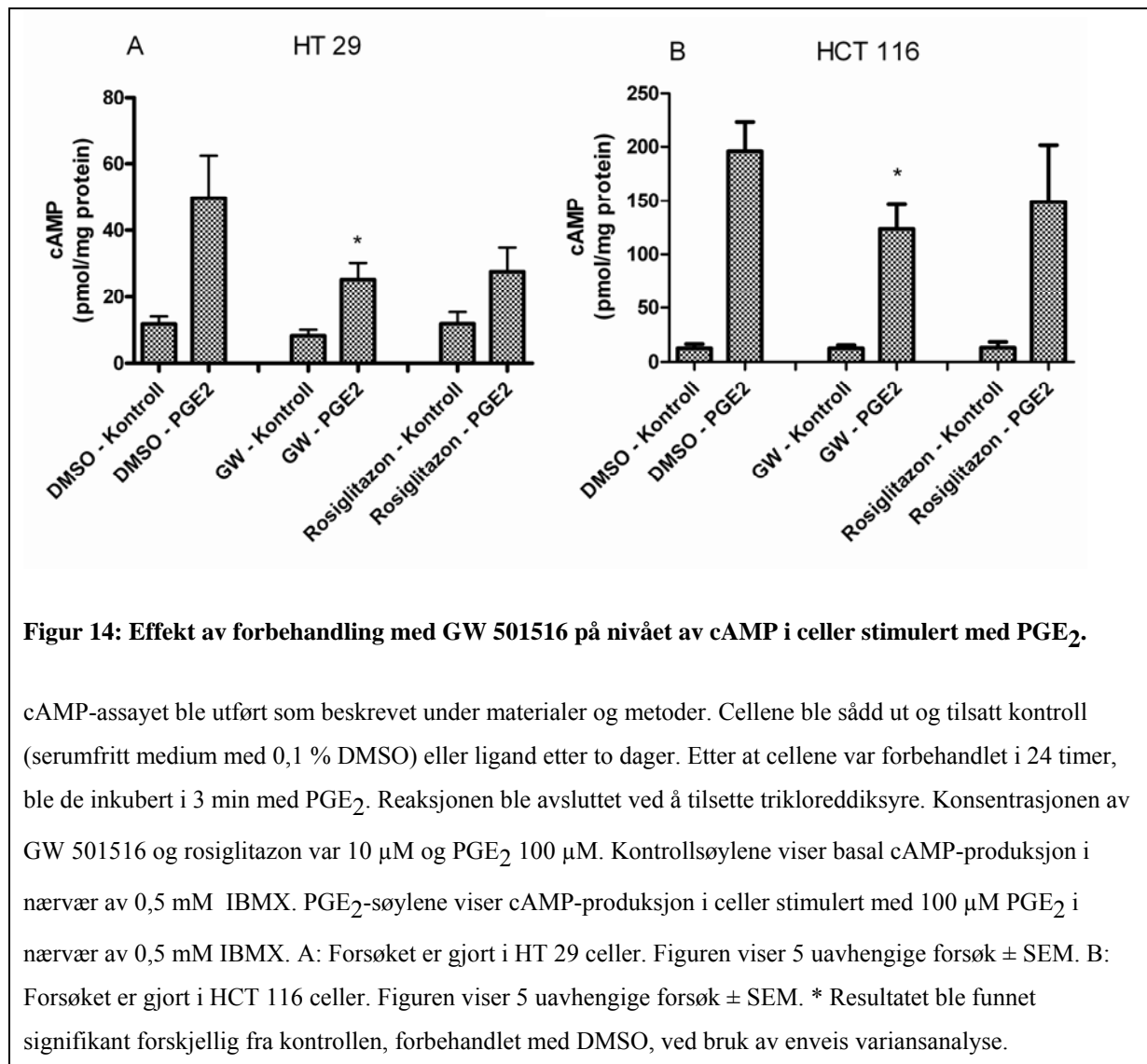
3.4 Effekter av PPAR δ -aktivering på PGE₂-stimulert produksjon av cAMP

3.4.1 Effekter av GW 501516 og indometacin på PGE₂-stimulert produksjon av cAMP

Forsøkene med transfekterte celler viste stor variasjon fra forsøk til forsøk, og effektene var små. PPAR γ stimulering med NSAIDs tydet på at det ville bli vanskelig å studere en eventuell interaksjon mellom NSAIDs og PPAR δ . Vi kunne derfor ikke gå videre med assayet i sin nåværende form. Det ble besluttet å heller studere effekten av PPAR δ agonist og NSAIDs på andre angrepspunkter som i litteraturen har vært foreslått å være regulert av PPAR δ .

Det er rapportert i lungeceller at PPAR δ aktivering kan føre til oppregulering av EP4-reseptorer [63]. PGE₂ binder seg til EP4-reseptorer, noe som fører til økt produksjon av cAMP [3]. Det er også rapportert at stimulering av PPAR γ vil føre til en nedregulering av EP2-reseptorer og mindre produksjon av cAMP [64]. Vi vurderte effekten av forbehandling med GW 501516 og rosiglitazon på PGE₂-stimulert cAMP-akkumulering i begge cellelinjene. Her på laboratoriet er det vist at cAMP-responsen i HT 29 cellene i hovedsak medieres via EP2-reseptorer, mens effekten i HCT 116 cellene hovedsakelig medieres via EP4-reseptorer (data ikke publisert).

Resultatene våre viste at celler som ble forbehandlet med GW 501516 (10 μ M) og stimulert med PGE₂ (100 μ M) ga en nedsatt cAMP-produksjon i forhold til celler som bare var forbehandlet med medium med DMSO (figur 14). I begge celletyper var nedgangen i nivået av cAMP signifikant. Forbehandling med rosiglitazon førte også til en nedregulering av cAMP-produksjonen, men denne nedgangen var ikke signifikant. Tendensen var størst i HT 29 cellene (figur 14A).



Figur 14: Effekt av forbehandling med GW 501516 på nivået av cAMP i celler stimulert med PGE₂.

cAMP-assayet ble utført som beskrevet under materialer og metoder. Cellene ble sådd ut og tilsatt kontroll (serumfritt medium med 0,1 % DMSO) eller ligand etter to dager. Etter at cellene var forbehandlet i 24 timer, ble de inkubert i 3 min med PGE₂. Reaksjonen ble avsluttet ved å tilsette trikloreddiksyre. Konsentrasjonen av GW 501516 og rosiglitazon var 10 μ M og PGE₂ 100 μ M. Kontrollsøylene viser basal cAMP-produksjon i nærvær av 0,5 mM IBMX. PGE₂-søylene viser cAMP-produksjon i celler stimulert med 100 μ M PGE₂ i nærvær av 0,5 mM IBMX. A: Forsøket er gjort i HT 29 celler. Figuren viser 5 uavhengige forsøk \pm SEM. B: Forsøket er gjort i HCT 116 celler. Figuren viser 5 uavhengige forsøk \pm SEM. * Resultatet ble funnet signifikant forskjellig fra kontrollen, forbehandlet med DMSO, ved bruk av enveis variansanalyse.

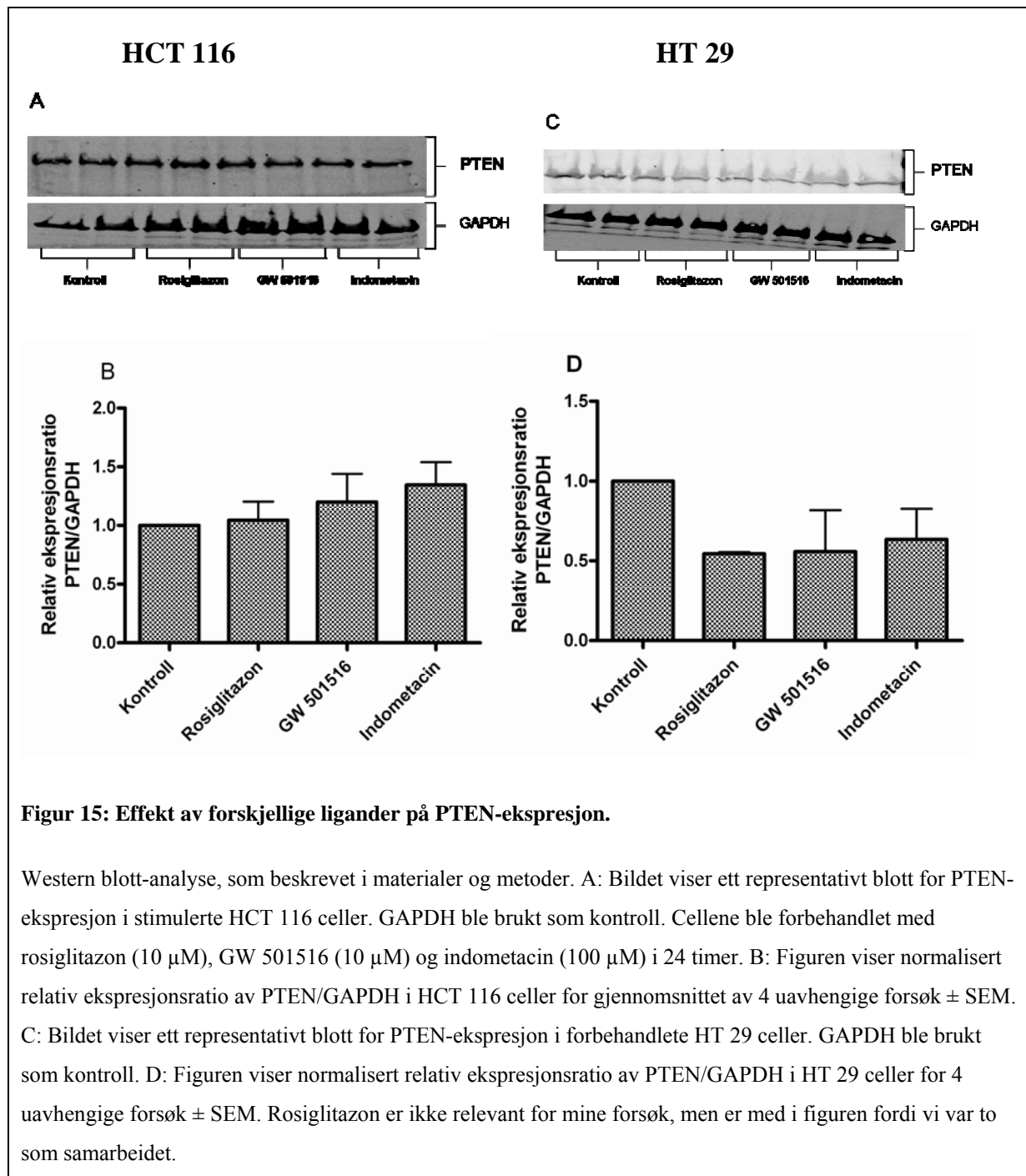
3.5 Ekspresjon av PTEN, COX-2, 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase

3.5.1 PTEN

Vi ønsket å se på ekspresjonen av forskjellige markører som ofte er forandret ved ulike krefttyper. Det er holdepunkter for at aktivering av PPAR δ kan indusere Akt fosforylering via oppregulering av PDK1 og nedregulering av PTEN [23, 31].

Resultatene våre var forskjellige for de to cellelinjene. Figur 15A viser ett representativt blott fra de forsøkene vi gjorde i HCT 116 cellene, og figur 15C viser ett representativt blott fra de forsøkene vi gjorde på HT 29 cellene. Resultatene våre viste at ekspresjonen av PTEN ikke forandret seg i HCT 116 cellene som ble forbehandlet med GW 501516. Vi så imidlertid en liten nedregulering av PTEN i HT 29 cellene ved forbehandling med GW 501516 10 μ M. Det var en tendens til at indometacin ga en liten økning i ekspresjonen av PTEN i HCT 116 cellene. Ingen av resultatene vi fikk ble funnet signifikante.

Vi gjorde også forsøk med sulindaksulfid i konsentrasjonene 100 μ M og 30 μ M, men disse konsentrasjonene er så høye at de virker toksisk på cellene slik at de dør. Fordi det var så få celler igjen i brønnene, var det lite protein som ble overført til nitrocellulosemembranen. Derfor fikk vi veldig svake bånd da vi forsøkte å detektere PTEN-ekspresjon (Data ikke vist).



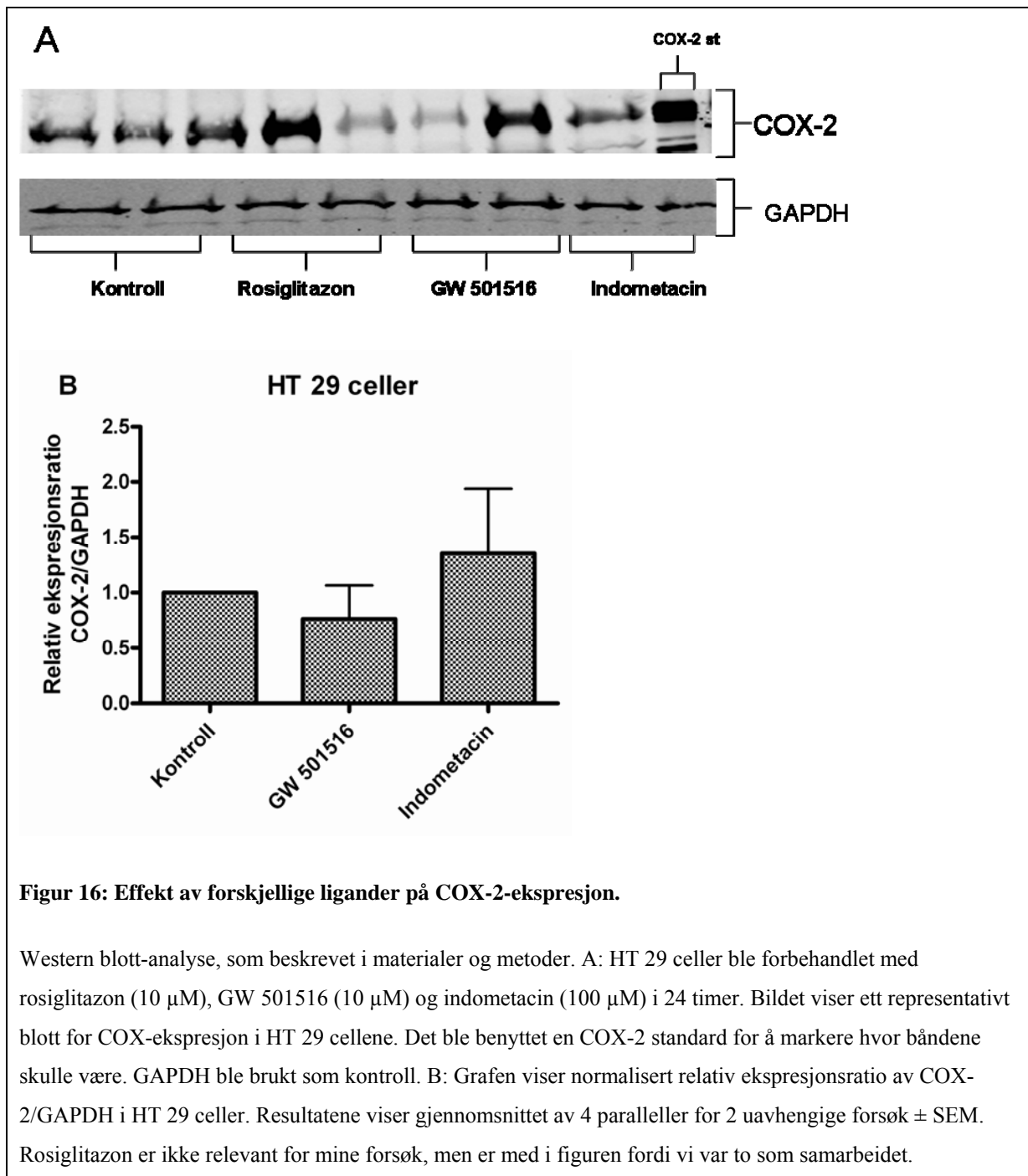
3.5.2 COX-2

Vi ønsket å undersøke nærmere om COX-2 ekspresjonen i HT 29 cellene ble regulert av PPAR δ . Det er i flere krefttyper rapportert at aktivering av PPAR δ resulterer i økt COX-2 promoteraktivitet og induksjon av COX-2 genekspressjon [14, 35, 65]. HCT 116 er en COX-2 negativ cellelinje [60, 66]. HT 29 cellene uttrykker COX-2 [66, 67].

Vi undersøkte derfor om COX-2 ekspresjonen i HT 29 cellene ble påvirket ved stimulering av forskjellige ligander som virker på PPAR δ . Vår resultater viste at aktivering av PPAR δ med GW 501516 (10 μ M) førte til nedregulering av COX-2 uttrykk, mens indometacin (100 μ M) ga økt ekspresjon av COX-2 (figur 16). Resultatene var ikke signifikante. Figuren viser resultater for ett av to forsøk.

HCT 116 cellene viste ingen ekspresjon av COX-2, verken basalt eller etter inkubering med GW 501516 eller indometacin (data ikke vist). Dette samsvarte med det som tidligere er rapportert.

Det ble også gjort forsøk med sulindaksulfid i konsentrasjonen 100 μ M. (Data ikke vist) Denne konsentrasjonen er som beskrevet tidligere toksisk for cellene, så vi fikk bare svake bånd.

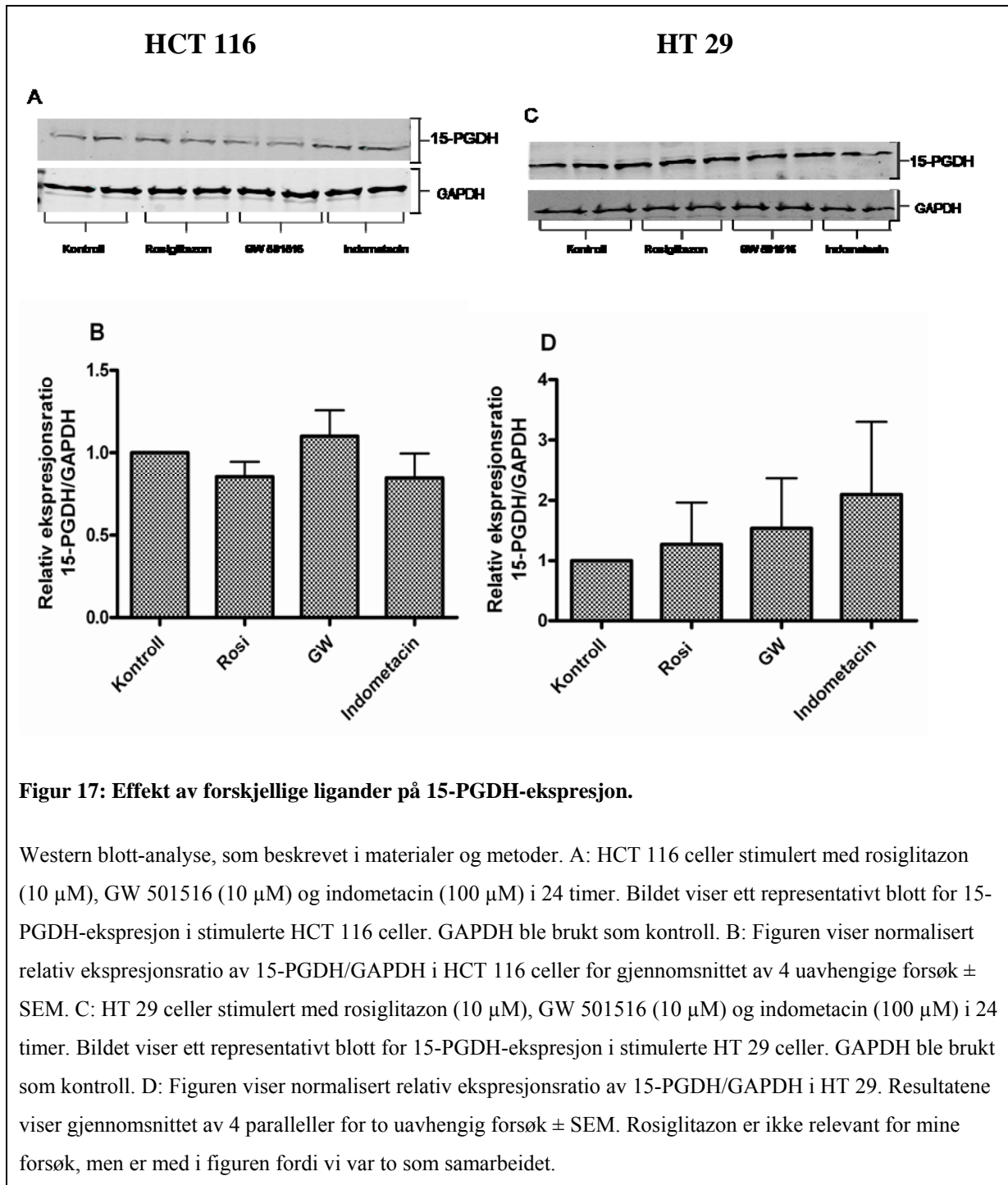


3.5.3 15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase

15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) er et enzym i cytosol som kan omdanne PGE₂ til den inaktive formen 15-keto PGE₂ [3, 68]. I flere typer kreftceller er det rapportert en invers regulering av COX-2 og 15-PGDH [36, 37]. Det er også rapportert at NSAIDs kan oppregulere nivået av 15-PGDH [69]. Vi ønsket å finne ut om aktivering av PPAR δ kan regulere 15-PGDH ekspresjon.

Resultatene våre tydet i HCT 116 cellene på at rosiglitazon og indometacin ga en tendens til lavere ekspresjon av 15-PGDH (figur 17). GW 501516 så ikke ut til å påvirke ekspresjonen av 15-PGDH. I HT29 cellene så det ut til at både rosiglitazon, indometacin og GW 501516 ga økt ekspresjon av 15-PGDH i forhold til kontrollen. Ingen av resultatene var signifikante.

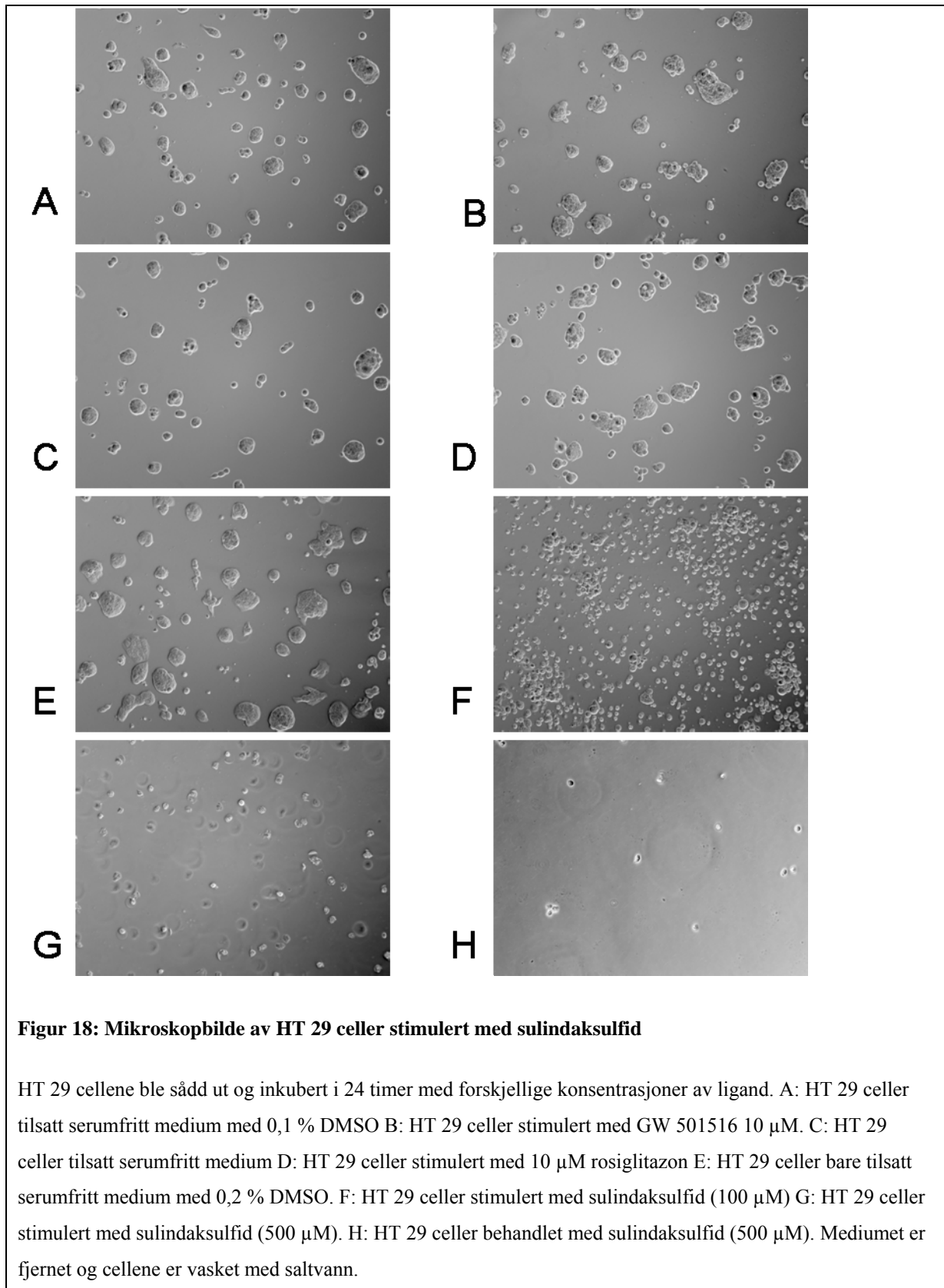
Vi gjorde også forsøk med sulindaksulfid i konsentrasjonene 30 μ M og 100 μ M. Disse konsentrasjonene er som beskrevet tidligere toksisk for cellene, så vi fikk veldig svake bånd. (Data ikke vist)



3.6 Cytotoksiske effekter på celler stimulert med høye konsentrasjoner av sulindaksulfid

Resultatene våre viste sterk aktivering av luciferaseaktivitet med sulindaksulfid i dose-responskurvene, også i høye konsentrasjoner. Vi kunne imidlertid se at det var veldig lite celler igjen i de høyeste konsentrasjonene, sannsynligvis pga. cytotoxicitet. Vi ønsket derfor å dokumentere cytotoxiciteten ved å ta bilde av celler stimulert med forskjellige konsentrasjoner av sulindaksulfid. Vi valgte å ta bilde av HT 29 cellene fordi HCT 116 cellene løsnet så lett. Figur 18 viser at cellene forandret morfologisk karakter når de ble tilsatt høye konsentrasjoner av sulindaksulfid (100 μM og 500 μM) i forhold til kontrollen (figur 18E) som viser at cellene ligger i små kolonier. Mange av cellene løsnet og ble liggende i mediet, noe som tydet på at de var på vei til å dø, eller allerede var døde. Ved vasking forsvant nesten alle cellene.

Vi tok også bilde av celler stimulert med GW 501516 (10 μM) og rosiglitazon (10 μM) (figur 18E-H). Disse cellene forandret seg ikke i så stor grad ved høye konsentrasjoner av ligand.



4. Diskusjon

4.1 Metodologiske aspekter

Luciferase-assayet var lite utprøvd på avdelingen før vi startet våre forsøk. Western blotting og cAMP-assay er veletablerte metoder ved Farmakologisk institutt. Substrat oksidasjons-assay er en veletablert metode ved laboratoriet på Farmasøytisk institutt.

Serum inneholder mange vekstfaktorer, og er kjent for å gi optimal vekst i mange celletyper når det tilsettes dyrkningsmediet. Problemet med serum er at serumet kan variere fra en batch til en annen. Serumfritt medium gjør at man unngår slike problemer, og at man kan få en mer synkronisert cellevekst ved stimulering. Derfor benyttet vi serumfritt medium da vi stimulerte cellene med de forskjellige ligandene. Problemet med serumfritt medium er at HCT 116 cellene løsnet lettere.

DMSO ble benyttet som løsemiddel for stoffer som var vanskelige å løse opp. Vi benyttet 0,1 % DMSO for GW 501516, mens vi måtte opp i 1 % DMSO for sulindaksulfid og sulindaksulfon. For å få løst opp NS-398 måtte vi benytte 2 % DMSO. I kontrollene til ligandene benyttet vi serumfritt medium med samme konsentrasjon av DMSO som for de respektive ligandene. Vi tilstrebet å holde konsentrasjonen av DMSO så lav som mulig fordi DMSO kan påvirke cellene.

4.1.1 Luciferase-assay

Noe av problemet med luciferase-assayet var at transfeksjonseffektiviteten, spesielt i HT 29 cellene, var lav. Manipuleringen av cellene kan være noe av årsaken til at resultatene viste stor variasjon. For å løse dette problemet kunne vi benyttet oss av et mer robust system. En mulighet hadde vært å transfektere PPAR δ inn i cellene slik at de ble i stand til å uttrykke denne reseptoren i større grad. Høy ekspresjon av PPAR δ ville gitt et høyere og mer robust nivå av responsen. En annen mulighet er å benytte en stabilt transfektert cellelinje. Da kunne vi selektert ut de cellene som uttrykte et konstant nivå av PPAR δ , og derfor fått en jevn høy ekspresjon av reseptoren. Vi kunne også lagd et artifielt system ved å benytte en cellelinje

uten endogen ekspresjon av PPAR δ . I denne cellelinjen kunne vi, enten ved transient eller stabil transfeksjon, transfektert inn PPARE, PPAR δ og renilla.

En annen årsak til den dårlige transfeksjonseffektiviteten kan være at cellene ikke trivdes i 96-brønners brettene. Vi så at cellene vokste veldig ujevnt, og det var særlig en tendens til at cellene vokste mest i kanten av brønnene. Dette gjaldt stort sett de ytterste brønnene i brettet. For å få en jevnere vekst byttet vi til 96-brønners Costarbrett, men også i disse brettene vokste cellene mest i kantene. For å få en jevnere vekst kunne vi forsøkt brett med litt større brønner. Dette ville kanskje ført til at cellene trivdes bedre. Ulempen er at det blir vanskeligere å prøve ut mange konsentrasjoner av forskjellige ligander på en gang, fordi det blir flere brett å forholde seg til. Dessuten er det en dyrere prosess fordi det krever større mengder av de forskjellige ligandene, lipofektamin og reagensene i luciferase-assayet.

Vi observerte gode effekter av sulindaksulfid i dose-responskurvene, men vi så også at de høye konsentrasjonene virket toksisk på cellene. Renilla-aktiviteten skal være en jevn grunnlinjerespons, men ved høye konsentrasjoner av sulindaksulfid så vi at renilla-aktiviteten falt. Det blir derfor stor usikkerhet i disse resultatene fordi de kun bygger på de få cellene som var igjen i brønnene. Generelt sett er det ikke kommentert cytotoxiskitet ved så høye konsentrasjoner i andre publikasjoner.

4.1.2 Western blott

Ved Western blott er det viktig å korrigere for en eventuell ujevn proteinmengde i brønnene. Det gjorde vi ved å måle mengden GAPDH, som er et protein som anses å ha en konstant ekspresjon.

Det ble benyttet egne geler for GAPDH til Western blottingen. Dette er ikke helt ideelt fordi det kan føre til forskjeller i "loading" og proteinoverføring, noe som kan gi en betydelig variasjon mellom forskjellige blott. Ved "stripping" av membranen er det mulig å bruke samme membran til både antistoff og GAPDH. Dette kan imidlertid føre til tap av protein som igjen kan påvirke kvantifiseringen. Vi forsøkte å "strippe" membranene ett par ganger i begynnelsen, men det fungerte ikke så bra i våre forsøk.

Deteksjon ved kjemiluminescens har til nå vært den mest sensitive metoden for å detektere proteiner her på instituttet. Prinsippet er at en enzymatisk reaksjon produserer dynamisk lys

som kan detekteres i et CCD kamera. Signalet som avgis er tidsbegrenset, og bildet må tas innen en time. Fluorescensdeteksjon med antistoffer som avgir infrarød fluorescens gir en mer objektiv vurdering av styrken på båndene enn det som er mulig ved kjemiluminescens. Signalet er stabilt over lang tid og kvantiterbart. En annen fordel med fluorescensdeteksjon er at vi kunne bruke høyere fortyninger av antistoff og at det ble mindre bakgrunnsstøy.

4.2 Utøver NSAIDs noen av sine effekter ved hemming av PPAR δ aktivitet?

Bakgrunnen for at jeg ønsket å studere effekten av NSAIDs på PPAR δ -aktivitet var et arbeid som viste at NSAIDs utøver noe av sin virkning ved å hemme binding av PPAR δ til DNA [9]. Resultatene våre fra dose-responskurvene viste stort sett PPAR γ effekter av NSAIDs. For å få fram en eventuell hemmende effekt på PPAR δ var planen å stimulere cellene med GW 501516 i nærvær av økende konsentrasjon av NSAID. Fordi responsene var små og variable, og effekten på PPAR γ ble såpass fremtredende, var ikke HT 29 og HCT 116 cellelinjene egnet til å studere NSAIDs effekt på hemming av PPAR δ aktivitet. Det samme viste seg å være problemet i de humane myotubene. Vi trodde at PPAR δ responsen ville være mer uttalt i disse cellene. Vi så en antydning til økt respons av rosiglitazon, noe som kan tyde på at myotubene også uttrykte PPAR γ i lave nivåer. Da vi stimulerte myotubene med GW 501516 i kombinasjon med økende konsentrasjon av andre NSAIDs, så vi også en svak økning av responsen, noe som antakelig skyldes en PPAR γ effekt. Resultatene var ikke signifikante. Hvis NSAID'ene hadde fungert som hemmere på PPAR δ ville responsen av GW 501516 avtatt når den var tilsatt i kombinasjon med NSAID i forhold til GW 501516 alene. Substrat oksidasjons-assay gir ikke veldig reseptornære effekter, så det må tas i betraktning at flere ting kan spille inn når en måler effekter av ligand på denne måten.

GW 501516 er en potent PPAR δ agonist med en nesten 1000 ganger høyere affinitet for PPAR δ enn PPAR γ . EC₅₀ i et reporterassay var 1 nM for PPAR δ og 0,85 μ M for PPAR γ [70]. Hvis affiniteten antas å være omtrent lik EC₅₀, vil det medføre at ca 90 % av PPAR γ har bundet GW 501516 ved en konsentrasjon på 10 μ M. Det kan derfor ikke utelukkes at noen av effektene av GW 501516 skyldes aktivisering av PPAR γ . Dette bør undersøkes i videre studier, f.eks i cellelinjer som ikke uttrykker PPAR γ , eller ved siRNA mediert

knockdown av henholdsvis PPAR γ og PPAR δ . Å studere interaksjonen av PPAR δ og NSAIDs ser ikke ut til å være gjennomførbart i celler som også uttrykker PPAR γ endogen.

4.2.1 PPRE aktiveres av PPAR γ og PPAR δ

I luciferase-assayet målte vi aktivering av et PPRE-luciferasekonstrukt ved forskjellige konsentrasjoner av ligand. Dette responselementet kan aktiveres av alle PPAR subtypene. Aktivering av PPRE-luciferasekonstruktet skiller derfor ikke mellom agonistbinding til PPAR δ eller PPAR γ . Det er uklart om det finnes gener som er regulert av bare en type PPAR. Svakheten ved mange publiserte studier er at de ikke tar i betraktning at flere PPAR-reseptorer kan være uttrykt i cellene og at alle kan virke på PPRE i ulike målgener. For eksempel er aktivering av adipocyttdifferensieringsrelatert protein, ADRP, ofte brukt som mål på PPAR δ aktivering [71]. Det er funnet PPRE i den humane ADRP promoteren og det er vist eksperimentelt at ADRP kan oppreguleres av PPAR γ i hepatocytter [72]. Det er også vist at ADRP-genespresjon er regulert av alle de tre PPAR-typerne [73].

Det er rapportert at HCT 116 og HT 29 cellelinjene vi har benyttet inneholder både PPAR δ og PPAR γ [9, 54]. Derfor kan vi ikke fastslå om effekten vi ser av ligandene skyldes ligandbinding til PPAR δ eller PPAR γ . Dette er noen av årsakene til at HCT 116 og HT 29 cellene ikke egner seg så bra til å studere interaksjonen mellom NSAIDs og PPAR δ .

4.3 Kan PPAR δ aktivering regulere nivået av EP-reseptorer?

I celler fra ikke-småcellet lungekreft er det rapportert at PPAR δ -aktivering øker ekspresjonen av EP4-reseptorer ved å øke bindingen av C/EBP til NF-IL6-setet i promoteren. Det ble dessuten observert en synergistisk effekt ved samtidig aktivering av EP4-reseptoren og PPAR δ [63].

Resultatene våre viste for begge celletyper at forbehandling med GW 501516 og stimulering med PGE₂ ga en signifikant nedsatt cAMP-produksjon i forhold til celler som ikke var forbehandlet. Disse resultatene samsvarer ikke med det som tidligere er rapportert i lungekreftceller. En av årsakene til dette kan være at GW 501516-konsentrasjonen var så høy at vi ikke kan utelukke at effekten vi ser er en PPAR γ effekt. Stimulering av PPAR γ er

rapportert å føre til en nedregulering av EP2-reseptorer og mindre cAMP [64]. Som vi så i figur 14A og B var responsen av GW 501516 og rosiglitazon sammenfallende, spesielt i HT 29 cellene. Resultatet viste at cAMP-produksjonen i HT 29 cellene, som uttrykker mest EP2-reseptorer, ble redusert. Dette støtter hypotesen om at GW 501516 i høye konsentrasjoner kan virke på PPAR γ . Vi burde benyttet en lavere konsentrasjon av GW 501516 og utført flere typer forsøk for å undersøke nærmere om stimulering av PPAR δ fører til oppregulering av EP4-reseptorer. Det er også mulig at effekten av PPAR δ -aktivering på EP4-ekspresjon er celleavhengig, siden effekten i lungecellene ikke var mediert via et PPRE, men indirekte, via oppregulering og økt binding av C/EBP til NF-IL6 setet i promoteren [63]. Måling av cAMP respons er dessuten en relativt indirekte måte å måle nivået av EP-reseptorer på. Det hadde vært bedre å måle relativ EP4-ekspresjon ved kvantitativ PCR. En annen mulighet kunne vært å måle ekspresjonen av EP4-reseptorprotein ved Western blott eller i bindingsstudier.

4.4 Regulerer PPAR δ nivået av PTEN?

Normal aktivitet av PTEN hemmer vekst og overlevelsessignaler i celler. Dette skjer hovedsakelig ved å hemme aktiviteten til PI3K/Akt-veien [22]. Vi fant ingen signifikante forskjeller i ekspresjonen av PTEN i HCT 116 celler som var forbehandlet med GW 501516 og indometacin (figur 15A og B). I HT 29 cellene så vi antydning til nedregulering av PTEN i celler forbehandlet med GW 501516, men resultatet var ikke signifikant. I keratinocytter er det rapportert at aktivering av PPAR δ førte til nedregulering av PTEN, men dette var en indirekte effekt, avhengig av proteinsyntese [31]. Nedregulering av PTEN er også beskrevet i lungekreftceller [23, 38]. Andre studier har imidlertid ikke kunnet bekrefte at PPAR δ -aktivering nedregulerer PTEN-ekspresjon eller øker Akt-fosforylering i flere typer tumorceller, som også inkluderte HT 29 og HCT 116 celler [34, 54, 71]

Våre resultater viste også at indometacin nedregulerte PTEN (figur 15C og D). Dette resultatet var heller ikke signifikant. Indometacin er rapportert å være en agonist på PPAR γ [59] og antagonist på PPAR δ [9]. Patel og medarbeidere (2001) viste at PTEN er oppregulert av PPAR γ agonisten rosiglitazon i humane primære makrofager, kreftceller fra tykk/endetarm og brystkreftceller [74]. Disse forfatterne mente også å ha påvist to PPRE i promoteren til PTEN, men endelig bevis for at PPAR regulerer transkripsjonen av PTEN direkte mangler.

Foruten direkte effekt på PPRE kan PPAR også regulere gentranskripsjon ved interaksjon med andre transkripsjonsfaktorer. En slik mekanisme kan bidra til å forklare hvorfor funn i ulike celler tildels er motstridende. Hvis effekten av indometacin er mediert via PPAR γ , viser våre resultater det motsatte av det som tidligere er rapportert om at aktivering av PPAR γ oppregulerer PTEN. Dersom effekten av indometacin er mediert via hemming av PPAR δ , er det også motstridene i forhold til tidligere studier som rapporterer at aktivering av PPAR δ fører til nedregulering av PTEN. Det er usikkert om effektene vi ser er en antydning til reseptormediert eller om de skyldes andre mekanismer. En sikrere statistisk vurdering av resultatene krever flere forsøk.

4.5 Regulerer PPAR δ nivået av COX-2?

Rollen til COX-2 i kreftutvikling er svært kompleks. COX-2 har blitt vist å ha en antiapoptotisk effekt i mange krefttyper, og det er data som knytter PPAR δ aktivering til COX-aktivitet [14, 75, 76]. Forsøkene i HT 29 cellene viste at aktivering av PPAR δ med GW 501516 førte til en nedregulering av COX-2 uttrykk (figur 16). Nedreguleringen var ikke signifikant. Resultatet vi så en antydning til samsvarer ikke med det som tidligere er rapportert. Xu og medarbeidere (2006) studerte effekten av PPAR δ ved gallegangskreft [35]. De fant at overekspresjon av PPAR δ eller aktivering av PPAR δ med GW 501516 fremmet vekst av cellene, og at effekten var mediert ved induksjon av COX-2 genekspresjon [35]. Tilsvarende funn er rapportert i lungekreftceller [23] og leverkarsinomceller [65].

PPAR γ -aktivering er rapportert både å oppregulere [77] og nedregulere [78] COX-2. Det er slående at PPAR γ og PPAR δ aktivering er rapportert å ha motsatte effekter på ekspresjon av PTEN og COX-2. En direkte effekt via PPRE synes lite forenlig med at de har motsatte effekter, mens en indirekte effekt via interaksjon med andre transkripsjonsfaktorer lettere kan forklare forskjeller, i hvertfall mellom ulike celler.

Sammenhengen mellom COX-2 ekspresjon og PPAR δ er etablert i kreftceller fra tykktarm, magekreft, gallegangskreft, lungekreft og livmorhalskreft. Yu og medarbeidere (2005) undersøkte ekspresjonen av PPAR δ i magekrefttilfeller. Hemming av COX-2 resulterte i en tids- og dose-avhengig undertrykking av PPAR δ ekspresjon [79]. Gupta og medarbeidere (2009) rapporterte at ekspresjonen av PPAR δ er oppregulert i kreftceller fra tykktarm [80].

Analyse av PPAR δ og COX-2 mRNA antydnet at de var ko-lokalisert i samme region i tumoren. De konkluderte med at PPAR δ , akkurat som COX-2, er uttrykt i tumorer fra tykktarm [80]. Det er også rapportert at Akt-signalering gjennom NF-kB veien induerte COX-2 ekspresjon ved PTEN-muterte tilfeller av livmorhalskreft [81]. Hemming av PI3K reduserte NF-kB nukleær aktivitet, reduserte COX-2 ekspresjon og induerte apoptose [81]. Høye ekspresjonsnivåer av COX-2 og PPAR δ ved livmorhalskreft er også rapportert av Tong og medarbeidere (2006) [82].

Det er uavklart om COX-2 promoteren har PPRE, selv om noen hevder at det finnes [77]. Det er mulig at PPAR medierer sin transkripsjonelle aktivitet gjennom interaksjon med andre transkripsjonsfaktorer for COX-2, som NF-kB og C/EBP [75]. Det kan heller ikke utelukkes at PPAR δ binder til andre uidentifiserte DNA-elementer i COX-2 genet. Vi fikk bare utført to uavhengige forsøk, så for å styrke resultatene våre burde vi utført flere forsøk. HCT 116 cellene viste ingen ekspresjon av COX-2, verken basalt eller etter inkubering med GW 501516 eller indometacin. Fordi det ikke er sikre holdepunkter for at PPRE finnes i COX-2 promoteren [83], er det også usikkert om effektene vi så antydning til i HT 29 cellene er reseptormediert eller går via andre mekanismer.

4.6 Regulerer PPAR δ nivået av 15-hydroksyprostaglandinsyntase?

15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) er et enzym i cytosol som kan degradere PGE₂ til den inaktive formen 15-keto PGE₂ [68]. I normalt tykktarmsvev er det funnet høye nivåer av 15-PGDH. I kreftceller fra tykktarm, bryst og lunge er imidlertid ekspresjonen av 15-PGDH redusert [25]. Det er rapportert en invers regulering av COX-2 og 15-PGDH i magekreftceller [36] og lungekreftceller [37]. Det er også rapportert at NSAIDs kan oppregulere nivået av 15-PGDH i hjernesvulster [69]. Hazra og medarbeidere (2007) rapporterte at PPAR γ ligandene pioglitazon og rosiglitazon økte nivåene av 15-PGDH i lungekreftceller, men at effekten var uavhengig av PPAR γ [84].

Aktivering av PPAR δ er rapportert å øke ekspresjonen av COX-2 via Akt-veien [23]. Basert på det som tidligere er rapportert om sammenhengen mellom COX-2 og 15-PGDH er det nærliggende å tro at HT 29 celler som er forbehandlet med PPAR δ agonisten GW 501516 vil

kunne få en økt ekspresjon av COX-2, og nedregulerte nivåer av 15-PGDH. Det samme vil vi ikke kunne forvente å se i HCT 116 celler fordi de ikke har basal ekspresjon av COX-2.

Resultatene som fremkom i denne oppgaven ga ingen svar på om det er en sammenheng mellom PPAR δ -aktivering og ekspresjon av 15-PGDH. HCT 116 celler forbehandlet med GW 501516 så ikke ut til å påvirke ekspresjonen av 15-PGDH (figur 17A og B). Det var imidlertid en antydning til at GW 501516 og indometacin ga økt ekspresjon av 15-PGDH i HT 29 cellene i forhold til kontrollen (figur 17C og D), men spredningen var stor. Ingen av resultatene var signifikante.

4.6.1 Regulerer PPAR δ nivået av mikrosomal prostaglandin E syntase-1?

I tillegg til å undersøke ekspresjonen av PTEN, COX-2 og 15-PGDH ønsket vi å undersøke ekspresjonen av mPGES-1 i HT 29 og HCT 116 cellene. mPGES-1 danner PGE₂ og er knyttet til induserbare COX-2 nivåer [68]. Derfor ville vi se om aktivering av PPAR δ påvirket nivået av mPGES. Vi fikk ingen spesifikke bånd da vi undersøkte ekspresjonen av mPGES med Western blott-analyse i de forskjellige celletypene. Årsaken til dette er at antistoffet ikke fungerte.

4.7 Forskjell i responser mellom HT 29 og HCT 116

Ulike nivå av proteinene i de forskjellige cellelinjene kan ha påvirket resultatet slik at responsene ble forskjellige. Derfor er resultatene i de to cellelinjene ikke alltid sammenlignbare. Basalnivået av PPAR δ og PPAR γ i de to cellelinjene er dårlig beskrevet i litteraturen. Dette bør undersøkes nærmere. Responser i HCT 116 cellene var stort sett bedre enn i HT 29 cellene. Dette skyldes antakelig at transfeksjonsgraden var bedre i HCT 116 cellene.

Nivået av EP-reseptorer varierte for de to cellelinjene. HCT 116 cellelinjen inneholder flest EP4-reseptorer, mens HT 29 cellelinjen inneholder flest EP2-reseptorer (Upubliserte data) I HCT 116 cellene så vi at GW 501516 signifikant nedregulerte cAMP produksjon, selv om nivået av EP4-reseptorer i denne cellelinjen er høyest. Det samme observerte vi i HT 29 cellelinjen som inneholder mest EP2-reseptorer. Fordi vi benyttet en høy konsentrasjon av

GW 501516, kan vi ikke utelukke at årsaken til et lavere nivå av cAMP var at GW 501516 virket på PPAR γ reseptorer.

En annen viktig forskjell mellom de to cellelinjene er ekspresjonen av COX-2. HCT 116 er en COX-2 negativ cellelinje, mens HT 29 cellelinjen uttrykker COX-2 [60, 66, 67]. Det er sett at det er en sammenheng mellom COX-2 ekspresjon og PPAR δ i kreftceller fra tykktarm, magekreft, gallegangskreft, lungekreft og livmorhalskreft [79-82]. De forskjellige uttrykkene av COX-2 i de to cellelinjene vil påvirke effektene som medieres via COX-2. Det er også en mulighet at COX-2 har indirekte effekter på cellene. I flere typer kreftceller er det rapportert en invers regulering av COX-2 og 15-PGDH [36, 37]. Derfor er det holdepunkter for at HT 29 celler, som uttrykker COX-2, kan ha et lavere nivå av 15-PGDH enn HCT 116 celler. En lignende sammenheng mellom PTEN og COX-2 kan heller ikke utelukkes, men det er lite undersøkt og krever flere studier. Aktivering av PPAR δ er vist å hemme ekspresjonen av PTEN noe som resulterte i økt Akt-signalering [31]. Det er også rapportert at Akt-signalering gjennom NF-kB veien induserer COX-2 ekspresjon i bl.a. livmorhalskreft [81].

5. Konklusjon

Basert på funnene i denne oppgaven, er hovedkonklusjonen at vi ikke har funnet noen holdepunkter for en effekt av NSAIDs på PPAR δ i celler som uttrykker både PPAR δ og PPAR γ . Dette skyldes at aktivisering av PPAR γ med NSAIDs dominerer, og maskerer en eventuell hemmende effekt på PPAR δ aktivitet. For å kunne studere effekten av NSAIDs på PPAR δ -stimulert aktivitet er det nødvendig å utvikle systemer der PPAR γ ikke er uttrykt.

Referanser

1. Turini, M.E. and R.N. DuBois, *Cyclooxygenase-2: A therapeutic target*. Annual Review of Medicine, 2002. **53**: p. 35-57.
2. Nesbakken, A. and M. Gaard, *Kirurgisk behandling av tykktarmskreft*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2007. **127**: p. 2942-2945.
3. Wang, M.T., K.V. Honn, and D. Nie, *Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression*. Cancer and Metastasis Reviews, 2007. **26**(3-4): p. 525-534.
4. Tegeder, I., J. Pfeilschifter, and G. Geisslinger, *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors*. FASEB Journal, 2001. **15**(12): p. 2057-2072.
5. Prescott, S.M. and R.L. White, *Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2*. Cell, 1996. **87**(5): p. 783-786.
6. Piazza, G.A., et al., *Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels*. Cancer Research, 1997. **57**(14): p. 2909-2915.
7. Piazza, G.A., et al., *Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis*. Cancer Research, 1995. **55**(14): p. 3110-3116.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.
9. He, T.C., et al., *PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Cell, 1999. **99**(3): p. 335-345.
10. Wu, G.D., *A nuclear receptor to prevent colon cancer*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(9): p. 651-3.
11. 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.
12. DuBois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB Journal, 1998. **12**(12): p. 1063-1073.
13. Eibl, G., et al., *COX and PPAR: possible interactions in pancreatic cancer*. Pancreas, 2004. **29**(4): p. 247-53.
14. Glinghammar, B., et al., *PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **308**(2).
15. Wang, D., et al., *Prostaglandin E2 promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 285-295.
16. Katoh, H., et al., *Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP1 subtype in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells*. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1995. **1244**(1): p. 41-48.
17. Castellone, M.D., H. Teramoto, and J.S. Gutkind, *Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer chemoprevention: The beta-catenin connection*. Cancer Research, 2006. **66**(23): p. 11085-11088.
18. Fujino, H. and J.W. Regan, *EP4 prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein*. Molecular Pharmacology, 2006. **69**(1): p. 13-18.
19. Fujino, H., W. Xu, and J.W. Regan, *Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(14): p. 12151-12156.

20. Cheng, C.K., Q.W. Fan, and W.A. Weiss, *PI3K signaling in glioma - Animal models and therapeutic challenges*. *Brain Pathology*, 2009. **19**(1): p. 112-120.
21. Leslie, N.R., et al., *Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability*. *Oncogene*, 2008. **27**: p. 5464-5476.
22. Sansal, I. and W.R. Sellers, *The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway*. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. **22**(14): p. 2954-2963.
23. Pedchenko, T.V., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta expression and activation in lung cancer*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2008. **39**(6): p. 689-696.
24. Pham, H., et al., *15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase suppresses K-RasV12-dependent tumor formation in Nu/Nu mice*. *Molecular Carcinogenesis*, 2008. **47**(6): p. 466-477.
25. Backlund, M.G., et al., *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(5): p. 3217-3223.
26. Michalik, L., B. Desvergne, and W. Wahli, *Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: Complex stories*. *Nature Reviews Cancer*, 2004. **4**(1): p. 61-70.
27. Tachibana, K., et al., *The role of PPARs in cancer*. *PPAR Research*, 2008(102737).
28. Yang, L., et al., *RNA interference against peroxisome proliferator-activated receptor delta gene promotes proliferation of human colorectal cancer cells*. *Diseases of the Colon and Rectum*, 2008. **51**(3): p. 318-326.
29. Kim, D.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits epidermal cell proliferation by down-regulation of kinase activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(10): p. 9519-9527.
30. Cutler, N.S., et al., *Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells*. *Cancer Research*, 2003. **63**(8): p. 1748-1751.
31. Di-Poi, N., et al., *Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway*. *Molecular Cell*, 2002. **10**(4): p. 721-733.
32. Hao, C.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation promotes cell survival following hypertonic stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(24): p. 21341-21345.
33. Hatae, T., et al., *Prostacyclin-dependent Apoptosis Mediated by PPARdelta*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(49): p. 46260-46267.
34. Marin, H.E., et al., *Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis*. *Cancer Research*, 2006. **66**(8): p. 4394-4401.
35. Xu, L., C. Han, and T. Wu, *A novel positive feedback loop between peroxisome proliferator-activated receptor-delta and prostaglandin E2 signaling pathways for human cholangiocarcinoma cell growth*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(45): p. 33982-33996.
36. Liu, Z., et al., *Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(6): p. 1219-1227.
37. Tong, M., Y. Ding, and H.H. Tai, *Reciprocal regulation of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in A549 human lung adenocarcinoma cells*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(11): p. 2170-2179.
38. Han, S., et al., *PPARbeta/delta agonist stimulates human lung carcinoma cell growth through inhibition of PTEN expression: The involvement of PI3K and NF-kappaB signals*. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2008. **294**(6): p. L1238-L1249.

39. 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**: p. 200-204.
40. Meng, L.H., et al., *Tetrandrine 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.
41. Hsi, L.C., et al., *15-Lipoxygenase-1 Metabolites Down-regulate Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma via the MAPK Signaling Pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(37): p. 34545-34552.
42. Li, Q. and R.H. Dashwood, *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. 45669-45675.
43. 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. 4816-4820.
44. 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. 19861-19869.
45. Klampfer, L., et al., *Oncogenic Ras promotes butyrate-induced apoptosis through inhibition of gelsolin expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(35): p. 36680-36688.
46. Forman, B.M., et al., *15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPARgamma*. *Cell*, 1995. **83**(5): p. 803-812.
47. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. *Science*, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
48. Promega, *Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System*, in *Technical Manual*, Promega, Editor. 2006, Promega Corporation: Madison.
49. Voet, D. and J. G. Voet, in *Biochemistry*. 1995, John Wiley & Sons: USA. p. 91-93.
50. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. *Apmis*, 2001. **109**(11): p. 735-744.
51. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. *Journal of Lipid Research*, 2007. **48**(4): p. 961-7.
52. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**: p. 248-54.
53. 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.
54. Hollingshead, H.E., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(12): p. 2641-9.
55. *Norsk legemiddelhandbok for helsepersonell 2007*. 2007, Fagbokforlaget AS: Oslo. p. 1113-1114.
56. Nixon, J.B., et al., *Evaluation of eicosanoids and NSAIDs as PPARgamma ligands in colorectal carcinoma cells*. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003. **68**(5): p. 323-330.

57. 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. 47762-47775.
58. Glazer, R.I., et al., *PPARgamma and PPARdelta as modulators of neoplasia and cell fate*. PPAR Research, 2008. **2008**(247379).
59. 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. 3406-3410.
60. Banu, N., et al., *Inhibition of COX-2 with NS-398 decreases colon cancer cell motility through blocking epidermal growth factor receptor transactivation: Possibilities for combination therapy*. Cell Proliferation, 2007. **40**(5): p. 768-779.
61. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. Carcinogenesis, 2009. **30**(3): p. 377-386.
62. Sprecher, D.L., *Lipids, Lipoproteins, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor-delta*. American Journal of Cardiology, 2007. **100**(11 SUPPL. 1): p. S20-S24.
63. Han, S., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha/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.
64. Han, S. and J. Roman, *Suppression of prostaglandin E2 receptor subtype EP2 by PPARgamma ligands inhibits human lung carcinoma cell growth*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **314**(4): p. 1093-1099.
65. Xu, L., et al., *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and cytosolic phospholipase A2 alpha/cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells*. Cancer Research, 2006. **66**(24): p. 11859-11868.
66. Smith, M.L., G. Hawcroft, and M.A. Hull, *The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cell evidence of different mechanisms of action*. European Journal of Cancer, 2000. **36**(5): p. 664-674.
67. Shao, J., et al., *Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(43): p. 33951-33956.
68. Cha, Y.I. and R.N. DuBois, *NSAIDs and cancer prevention: Targets downstream of COX-2*. Annual Review of Medicine, 2007. **58**: p. 239-252.
69. Wakimoto, N., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress glioma via 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*. Cancer Research, 2008. **68**(17): p. 6978-6986.
70. Sznajdman, M.L., et al., *Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) - Synthesis and biological activity*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2003. **13**(9): p. 1517-1521.
71. Borland, M.G., et al., *Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/ delta inhibits cell proliferation in human HaCaT keratinocytes*. Molecular Pharmacology, 2008. **74**(5): p. 1429-1442.
72. Motomura, W., et al., *Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **340**(4): p. 1111-1118.
73. Tachibana, K., et al., *Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing PPAR isoforms*. Nuclear Receptor, 2005. **3**(3).

-
74. 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.
 75. Muller, R., *Crosstalk of oncogenic and prostanoid signaling pathways*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2004. **130**(8): p. 429-444.
 76. Burdick, A.D., et al., *The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epithelial cell growth and differentiation*. *Cellular Signalling*, 2006. **18**(1): p. 9-20.
 77. Meade, E.A., et al., *Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(12): p. 8328-8334.
 78. 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. 1379-1383.
 79. Yu, J., et al., *Expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta in human gastric cancer and its response to specific COX-2 inhibitor*. *Cancer Letters*, 2005. **223**(1): p. 11-17.
 80. Gupta, R.A., et al., *Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(24): p. 13275-13280.
 81. St.-Germain, M.E., et al., *Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway*. *Molecular Cancer*, 2004. **3**(11).
 82. Tong, B.J., et al., *Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta human endometrial adenocarcinoma*. *Neoplasia*, 2000. **2**(6): p. 483-490.
 83. 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. 709-717.
 84. 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. 1715-1720.