

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Transkriptionsregulation der
Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 (PDK4),
einem zentralen Schalter des Glukosestoffwechsels,
durch Zelladhäsion und onkogene Signalwege beim
humanen Ovarialkarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Evelyn Schnitzer

aus Speyer

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 18.08.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach

1. Korreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Tumormetabolismus	3
2.2 Pyruvatdehydrogenase-Kinasen (PDKs)	5
2.2.1 Expressionsprofil der PDKs	5
2.2.2 Funktion im zellulären Energiestoffwechsel	6
2.2.3 Rolle der PDKs im Tumormetabolismus	7
2.2.4 PDK4	8
2.2.4.1 Regulation der Expression von PDK4	8
2.2.4.1.1 Regulation der PDK4-Expression im Energiestoffwechsel	8
2.2.4.1.2 Regulation der PDK4-Expression bei Stoffwechselerkrankungen	10
2.2.4.2 Rolle von PDK4 im Tumor	11
2.3 Integrine	12
2.3.1 Rolle der Integrine im Ovariakarzinom	13
2.3.2 Integrinvermittelte Signalwege	13
2.3.2.1 FAK-Aktivierung.....	14
2.3.2.2 Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs.....	14
2.3.2.3 Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs	15
2.4 Ziel der Arbeit	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3 Chemikalien.....	20
3.1.4 Puffer und Lösungen	23
3.1.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen	23
3.1.4.2 Spezielle Puffer und Lösungen	24
3.1.5 Kits	28
3.1.6 Primer und Oligonukleotide.....	28
3.1.7 Antikörper	32
3.1.8 Computerprogramme und Datenbanken.....	33

3.2	Methoden	33
3.2.1	Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.1.1	Isolierung von RNA aus Zellkulturen.....	33
3.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
3.2.1.3	cDNA-Synthese	34
3.2.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
3.2.1.5	Quantitative Echtzeit-PCR (Real-time-qPCR).....	35
3.2.1.6	Chromatin-Immunpräzipitation.....	37
3.2.1.7	Analyse der DNA durch Agarosegelelektrophorese	39
3.2.1.8	Herstellung von Proteinextrakten.....	39
3.2.1.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	40
3.2.1.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.2.1.11	Western Blot Analyse	41
3.2.1.12	Bestimmung der Glukoseaufnahme in Zellen	43
3.2.1.13	Bestimmung der L-Lactatsekretion von Zellen	44
3.2.2	Zellbiologische Methoden	45
3.2.2.1	Verwendete Zelllinien	45
3.2.2.2	Der Umgang mit Zellen: Passagieren, Kryokonservierung, Auftauen und Zählen von Zellen.....	46
3.2.3	Beschichtung von Zellkulturschalen.....	47
3.2.4	Mycoplasmentest.....	47
3.2.5	siRNA-Transfektion.....	47
3.2.6	Computerauswertungen und Datenbankanalysen	49
3.2.7	RNA-Sequenzierung.....	50
3.2.8	Statistische Auswertung	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Analyse der Genexpression unter verschiedenen Adhärenzbedingungen für das Ovarialkarzinom	51
4.1.1	Analyse der Expression von metabolisch aktiven Genen im Ovarialkarzinom.....	51
4.1.2	Analyse der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Repression in Ovarialkarzinomzelllinien.	54
4.1.3	Kinetische Analyse der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	56
4.1.4	Analyse des Glukosemetabolismus in adhärennten und nicht- adhärennten SKOV-3 Zellen.....	57
4.1.5	Einfluss integrinvermittelter Adhäsion auf die <i>PDK4</i> -Expression.....	58

4.1.6	Untersuchungen zur Auswirkung von Hypoxie, Serumdepletion und Zelldichte auf die <i>PDK4</i> -Expression.....	60
4.2	Analysen zur Beteiligung putativer Signalwege an der <i>PDK4</i>-Regulation durch Adhärenz.....	62
4.2.1	Untersuchungen zur Beteiligung des MEK-ERK-Signalwegs an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	62
4.2.2	Analyse der Aktivität verschiedener Signalwege in Abhängigkeit der Adhärenz	63
4.2.3	Untersuchungen zur Beteiligung des Transkriptionsfaktors CREB an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	65
4.2.4	Untersuchungen zur Beteiligung des PI3K-AKT-Signalwegs an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	67
4.2.4.1	Einfluss der Adhärenz auf die aktivierende Ser473-Phosphorylierung der Kinase AKT.....	67
4.2.4.2	Auswirkungen der Inhibition des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs auf die <i>PDK4</i> -Expression	69
4.2.4.3	Untersuchungen zum Einfluss von FOXO-Transkriptionsfaktoren auf die <i>PDK4</i> -Expression in SKOV-3 Zellen mittels CHIP-Analyse	75
4.2.5	Untersuchungen zur Beteiligung GSK3-abhängiger Signalwege an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	77
4.2.5.1	Einfluss der GSK3-Inhibition auf die <i>PDK4</i> -Expression.....	79
4.2.5.2	Untersuchungen zum Einfluss von β -Catenin auf die adhärenzvermittelte <i>PDK4</i> -Regulation	79
4.2.5.3	Analyse der Rekrutierung von β -Catenin und TCF4 an putative TCF4-Bindestellen des <i>PDK4</i> -Lokus	82
4.2.6	Untersuchungen zum Einfluss von Kernrezeptoren auf die adhärenzvermittelte <i>PDK4</i> -Regulation	85
4.2.6.1	Untersuchungen zur Beteiligung des Estrogenrezeptors an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation.....	86
4.2.6.2	Untersuchungen zur Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	88
4.2.6.3	Untersuchungen zur Beteiligung von PPAR β/δ („ <i>peroxisome proliferator-activated receptor δ/β</i> “) an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	90
4.2.7	Untersuchungen zur Beteiligung des Transkriptionsfaktors C/EBP β an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	94

4.2.8 Einfluss der Organisation des Aktinzytoskeletts auf adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation	95
5 Diskussion	98
5.1 Einfluss von Adhärenz und Adhärenzverlust auf Genexpression und Metabolismus in Ovarialkarzinomzellen.....	98
5.1.1 Identifizierung von <i>PDK4</i> als ein durch Adhärenz reprimiertes Gen im Ovarialkarzinom.....	98
5.1.2 Einfluss von Adhärenz und Adhärenzverlust auf den Glukosemetabolismus von SKOV-3 Zellen	99
5.1.3 Die Aktivierung integrinabhängiger Signalwege vermittelt die <i>PDK4</i> -Repression	100
5.1.4 Einflüsse von Hypoxie, Serumdepletion und Zelldichte auf die <i>PDK4</i> -Expression.....	100
5.2 Analyse der Beteiligung putativer Signalwege an der <i>PDK4</i>-Regulation durch Adhärenz.....	102
5.2.1 Der MEK-ERK-Signalweg ist an der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation nicht beteiligt.....	102
5.2.2 Einfluss des Transkriptionsfaktors CREB auf die <i>PDK4</i> -Expression	103
5.2.3 Einfluss des PI3K-AKT-Signalwegs auf die adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation.....	104
5.2.3.1 Die adhärenzabhängige Aktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs vermittelt die <i>PDK4</i> -Repression adhärenter Ovarialkarzinomzellen	104
5.2.3.2 Einfluss der FOXO-Transkriptionsfaktoren auf die <i>PDK4</i> -Aktivierung durch Inaktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs	106
5.2.4 Einfluss GSK3-abhängiger Signalwege auf die <i>PDK4</i> -Expression in SKOV-3 Zellen.....	108
5.2.4.1 Einfluss der GSK3- β -Catenin-TCF-Signalachse auf die adhärenzvermittelte <i>PDK4</i> -Regulation	109
5.2.5 Einfluss von Kernrezeptoren auf die <i>PDK4</i> -Expression in SKOV-3 Zellen	111
5.2.5.1 Der Estrogenrezeptor kann partiell an der <i>PDK4</i> -Induktion nach Adhärenzverlust beteiligt sein.....	112
5.2.5.2 Einfluss des Glukokortikoidrezeptors auf die <i>PDK4</i> -Expression in SKOV-3 Zellen	113

5.2.5.3	PPAR β/δ ist nicht in die <i>PDK4</i> -Expressionsregulation in Abhängigkeit der Adhärenz involviert	114
5.2.6	C/EBP β kann ein kooperierender Faktor bei der <i>PDK4</i> -Induktion durch Adhärenzverlust sein	115
5.2.7	Störungen der Aktinpolymerisation des Zytoskeletts aktivieren die <i>PDK4</i> -Expression	115
5.3	Modell zur komplexen Transkriptionsregulation von <i>PDK4</i> in SKOV-3 Zellen	116
5.4	Ausblick	118
6	Literaturverzeichnis	120
7	Lebenslauf (Diese Seite enthält persönliche Daten und ist nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung).....	133
8	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	134
9	Publikationen.....	135
10	Danksagung.....	136
11	Ehrenwörtliche Erklärung.....	137

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Warburg Effekt in Tumorzellen.	5
Abb. 2.2	Regulation des Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDC)	7
Abb. 2.3	Transkriptionelle Regulation von <i>PDK4</i> .	12
Abb. 2.4	Aktivierung integrinvermittelter Signalwege.	16
Abb. 4.1	Vergleich der Expressionsmuster von Metabolismusgenen aus Ovarialkarzinompatientinnen (Auszug aus RNA-Sequenzierung).	53
Abb. 4.2	Vergleich der adhärenzvermittelten <i>PDK4</i> -Regulation in Ovarialkarzinomzelllinien und MCF-10A Zellen.	54
Abb. 4.3	Repression der <i>PDK4</i> -Expression durch Adhärenz.	55
Abb. 4.4	Kinetik der adhärenzregulierten <i>PDK4</i> -Expression.	57
Abb. 4.5.	Effekte der Adhärenz auf den Glukosemetabolismus	58
Abb. 4.6	Regulation der <i>PDK4</i> -Expression durch Zelladhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix.	60
Abb. 4.7	Einfluss von Hypoxie, Serumdepletion und Zelldichte auf die <i>PDK4</i> -Expression.	61
Abb. 4.8	Einfluss von MEK-Inhibitoren auf die <i>PDK4</i> -Expression in MCF-10A und SKOV-3 Zellen.	63
Abb. 4.9	Analyse des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalproteine in Abhängigkeit der Adhärenz.	65
Abb. 4.10	Induktion der <i>PDK4</i> -Expression durch Aktivierung des Adenylylcyclasen-cAMP-PKA-Signalwegs.	66
Abb. 4.11	Analyse der AKT-Phosphorylierung in adhärennten und nicht-adhärennten SKOV-3 Zellen und nach SRC-Inhibitorbehandlung.	68
Abb. 4.12	Schema zur Kultivierung und Behandlung von Zellen.	70
Abb. 4.13	Transkriptionelle Aktivierung von <i>PDK4</i> durch Inhibition des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs in SKOV-3 Zellen.	71
Abb. 4.14	Aktivierung der <i>PDK4</i> -Expression durch Inhibition des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs in MCF-10A Zellen.	74
Abb. 4.15	ChIP-Analyse zur Rekrutierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren an relevante regulatorische Bereiche des <i>PDK4</i> -Gens.	76
Abb. 4.16	Transkriptionelle <i>PDK4</i> -Aktivierung durch GSK3-Inhibition.	79
Abb. 4.17	Einfluss von β -Catenin auf die <i>PDK4</i> -Induktion in nicht-adhärennten SKOV-3 Zellen.	81

Abb. 4.18	Analyse der Rekrutierung von β -Catenin und TCF4 an putative TCF4-Bindestellen des <i>PDK4</i> -Lokus.	84
Abb. 4.19	Signalweganalyse von BC21-reprimierten Genen in nicht-adhären SKOV-3 Zellen (Auszug aus RNA-Sequenzierung).	86
Abb. 4.20	<i>PDK4</i> -Regulation durch estrogenrezeptorabhängige Transkription.	87
Abb. 4.21	Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf die <i>PDK4</i> -Expression.	89
Abb. 4.22	Einfluss von PPAR β/δ auf die <i>PDK4</i> -Induktion in nicht-adhären SKOV-3 Zellen.	93
Abb. 4.23	ChIP-Analyse zur adhärenzabhängigen Rekrutierung von C/EBP β an den <i>PDK4</i> -Lokus.	95
Abb. 4.24	Regulation der <i>PDK4</i> -Expression durch Störung der Aktinpolymerisation in SKOV-3 Zellen.	96
Abb. 5.1	Modell zur differentiellen Regulation der <i>PDK4</i> -Genexpression bei adhären und nicht-adhären SKOV-3 Zellen in Bezug auf den SRC-PI3K-AKT-Signalweg.	108
Abb. 5.2	Modell zur komplexen Transkriptionsregulation von <i>PDK4</i> in SKOV-3 Zellen.	118

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A.a.i.	Aqua ad iniectabilia
a.b	Aqua bidest
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AKT/PKB	„ <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i> “/„ <i>proteinkinase B</i> “
AMPK	„ <i>AMP-activated protein kinase</i> “
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	„ <i>B-cell lymphoma 2</i> “
bp	Basenpaar
BSA	„ <i>Bovine serum albumin</i> “
bzw.	beziehungsweise
C/EBPβ	„ <i>CCAAT-enhancer-binding protein β</i> “
ca.	Circa
CaMKII	„ <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i> “
cDNA	„ <i>complementary DNA</i> “
cm	Zentimeter
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRE	„ <i>cAMP response element</i> “
CREB	„ <i>cAMP-response element-binding protein</i> “
Crk	„ <i>CT10 regulator of kinase</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„ <i>Desoxyribonuclein Acid</i> “ (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK	„ <i>DNA-dependent protein kinase</i> “
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E2	17β-Estradiol
ECL	<i>enhanced</i> Chemolumineszenz
EGF	„ <i>epidermal growth factor</i> “
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERE	„ <i>estrogen responsive element</i> “,

ERK/MAPK	„ <i>extracellular signal-regulated kinase</i> “/„ <i>mitogen-activated protein kinase</i> “
ERR	„ <i>estrogen-related receptor</i> “
ERRE	„ <i>estrogen-related receptor response element</i> “
ERα (ESR1)	Estrogenrezeptor α
et al.	Et alii („und andere“)
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	„ <i>focal adhesion kinase</i> “
FC	<i>fold change</i>
FCS	„ <i>fetal calf serum</i> “ (Fetales Kälberserum)
FOXO	„ <i>forkhead box protein O</i> “
GH	„ <i>growth hormone</i> “
GR	Glukokortikoidrezeptor
Grb2	„ <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> “
GRE	„ <i>glucocorticoid-response elements</i> “
GSK3α/β	„ <i>glycogen synthase kinase 3α/β</i> “
h	Stunden
H₂O	Wasser
HIF-1α	„ <i>hypoxia inducible factor 1α</i> “
HRP	„ <i>horseradish peroxidase</i> “ (Meerrettich-Peroxidase)
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IGF-1R	„ <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> “
ILK	„ <i>integrin-linked kinase</i> “
IMT	Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (Universität Marburg)
IκBα	„ <i>inhibitor of kappa B</i> “
Jak2	„ <i>janus kinase 2</i> “
JNK	„ <i>c-Jun N-terminal kinase</i> “
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LKB1	„ <i>liver kinase B1</i> “
m	milli
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	„ <i>mitogen activated protein kinase</i> “
MEK	„ <i>mitogen/extracellular signal-regulated kinase</i> “

mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MP	Milchpulver
mTORC2	„ <i>mammalian target of rapamycin complex 2</i> “
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NFAT	„ <i>nuclear factor of activated T-cells</i> “
NF-κB	„ <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> “
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p130CAS	„ <i>Crk-associated substrate</i> “
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ (Polymerasekettenreaktion)
PDC	„ <i>pyruvate dehydrogenase complex</i> “,
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PDP	Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen
PGC1α	„ <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α</i> “
pH	Wasserstoffexponent (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PI3K	„ <i>phosphatidylinositol-3-kinases</i> “
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKM2	Pyruvatkinase M2
PPAR	„ <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> “
PPRE	„ <i>peroxisome proliferator response element</i> “
PTEN	„ <i>phosphatase and tensin homolog</i> “
PVDF	Polyvinylidfluorid
RT-qPCR	Quantitative PCR (Realtime-PCR)
Raf	„ <i>rat fibrosarcoma</i> “
Ras	„ <i>rat sarcoma</i> “
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat

RNA	„ <i>ribonuclein acid</i> “ (Ribonukleinsäure)
ROS	„ <i>reactive oxygen species</i> “
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Ser	Serin
SFK	„ <i>Src-family kinases</i> “
SMAD2	„ <i>Sma and Mad related protein</i> “
Stat5	„ <i>signal transducer and activator of transcription 5</i> “
TCA-Zyklus	„ <i>tricarboxylic acid cycle</i> “
TCF/LEF	„ <i>T-cell factor/lymphoid enhancer factor</i> “
Thr	Threonin
TIC	„ <i>tumor-initiating cells</i> “
TPM	„ <i>transcripts per million</i> “
TS	Transkriptionsstart
u. a.	unter anderem
UE	„ <i>Upstream-Enhancer</i> “
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen/Volumen)
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel
ZTI	Zentrum für Tumor und Immunbiologie
α	Anti

1 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist die gynäkologische Krebserkrankung mit der höchsten Letalität, was vor allem durch die passive Metastasierung über den Peritonealraum bedingt ist. Dabei breiten sich Tumorzellen als Einzelzellen oder mehrzellige Sphäroide über die Peritonealflüssigkeit aus, um an anderer Stelle Metastasen auszubilden. Der damit einhergehende Adhärenzverlust dieser Zellen ist demnach von großer klinischer Relevanz und bedarf weiterer funktioneller Analysen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit *PDK4* erstmals ein Gen in primären humanen Ovarialkarzinomzellen und in der Modellzelllinie SKOV-3 identifiziert werden, dessen Expression stark von Adhärenz und Adhärenzverlust beeinflusst wird. Die mit dem Adhärenzverlust einhergehende Induktion scheint mit dem glykolytischen Metabolismus dieser Zellen funktionell in Verbindung zu stehen, im Einklang mit der zentralen Rolle von PDKs als negative Regulatoren der Pyruvatdehydrogenase und somit der Energiegewinnung aus Glukose durch oxidative Phosphorylierung.

Eine detaillierte Untersuchung der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation zeigte, dass Interaktionen zwischen Komponenten der Extrazellulärmatrix und Integrinen dafür verantwortlich sind. Der weitere Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der detaillierten mechanistischen Aufklärung dieser transkriptionellen Kontrolle und die damit verbundene Identifizierung der verantwortlichen Signalwege anhand der Modellzelllinie SKOV-3. Hierzu wurde nach pharmakologischer Modulation bestimmter Signalwege oder einer RNAi-vermittelten Inhibition spezifischer Signalproteine die Phosphorylierung kritischer Signalkomponenten, Chromatinbindung und Regulation von *PDK4* untersucht. Die hierbei erzielten Ergebnisse deuten auf eine Kooperation mehrerer Signalwege bei der Regulation des *PDK4*-Gens durch Adhärenzverlust hin. Hierzu zählen der SRC-PI3K-AKT-Signalweg, die GSK3- β -Catenin-Signalkaskade, der Estrogenrezeptor, der Transkriptionsfaktor C/EBP β und Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts.

Über die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation hinaus liefern die Ergebnisse dieser Arbeit ein Bild zur Transkriptionsregulation des *PDK4*-Gens durch tumorbiologisch relevante Signale im humanen Ovarialkarzinom. So führen die Aktivierung des Adenylylcyclase-cAMP-PKA-Signalwegs, die Inhibition des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs sowie Estrogen, Glukokortikoid und Zell-Zell-Kontakte zu einer Induktion der *PDK4*-Expression.

Die komplexe Regulation von *PDK4*, insbesondere auch durch onkogene Signalwege, und die zentrale Funktion im Glukosemetabolismus unterstreichen die essentielle Rolle von *PDK4* im Tumormetabolismus und weisen auf *PDK4* als mögliches therapeutisches Ziel bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms hin.

Summary

Ovarian cancer is the most lethal of all gynecologic malignancies mainly due to the passive dissemination of cancer cells within the peritoneal cavity. Thereby tumor cells detach as single cells or multicellular spheroids from the solid tumor nodules and spread via the peritoneal fluid to form metastases. Matrix detachment is therefore of high clinical relevance and thus warrants further investigations of the molecular mechanisms.

The present work identified *PDK4* as a gene that is strongly upregulated in primary human ovarian cancer cells and the ovarian carcinoma cell line SKOV-3 upon detachment. Moreover, the induction of *PDK4* could be linked to the glycolytic metabolism in these cells consistent with the known function PDKs to inactivate pyruvate dehydrogenase and thereby suppress oxidative phosphorylation.

It is also shown that interactions between components of the extracellular matrix and integrins regulate adhesion-dependent *PDK4* expression. Therefore, a main part of this work focuses on a detailed interrogation of transcriptional control mechanisms acting on the *PDK4* gene and the identification of signaling pathways controlled by adherent or non-adherent conditions in SKOV-3 cells. Following pharmacological modulation of different signaling pathways or siRNA-mediated silencing of specific signaling proteins, the phosphorylation of critical signaling components, chromatin binding and transcriptional *PDK4* activity were determined. These studies showed that multiple pathways might cooperate in *PDK4* induction upon detachment, including the SRC-PI3K-AKT-pathway, the GSK3- β -Catenin pathway, the estrogen receptor, the transcription factor C/EBP β and cytoskeletal rearrangements.

Beyond *PDK4* regulation under different adhesion conditions this work revealed a complex transcriptional control of *PDK4* expression by oncogenic signaling in ovarian cancer cells. Thus, activation of the adenylyl cyclase-PKA-cAMP pathway, inhibition of the SRC-PI3K-AKT pathway as well as estrogen, glucocorticoids and cell-cell contacts were found to induce *PDK4* expression.

Taken together, the complex regulation of *PDK4*, including its induction by oncogenic pathways, and its central position in glucose metabolism point to a pivotal role of PDK4 in tumor metabolism and its potential as a therapeutic target for ovarian carcinoma.

2 Einleitung

Nach Herz-Kreislaufkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2015). Das Ovarialkarzinom ist dabei, mit mehr als 40.000 Neuerkrankungen pro Jahr in der EU, die fünfthäufigste Krebsart bei Frauen (Colombo et al., 2010). Aufgrund der oft unspezifischen Symptome wird die Erkrankung häufig erst spät diagnostiziert und ist daher die gynäkologische Krebserkrankung mit der höchsten Letalität (Kurman and Shih 2010). Durch die Diagnose in späten Stadien hat zu diesem Zeitpunkt häufig schon eine Metastasierung in den Peritonealraum stattgefunden. Es ist daher von besonderer Bedeutung für die Therapie des Ovarialkarzinoms, die Folgen des Adhärenzverlustes bei Tumorzellen auf molekularer Ebene aufzuklären. Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass der Adhärenzverlust zu einem veränderten Glukosemetabolismus in Zellen führt (Grassian et al., 2011; Kamarajugadda et al., 2012). Vermittelt wird dies durch die Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 (PDK4), einem Vertreter der Familie der Pyruvatdehydrogenase-Kinasen, die am glykolysezentrierten Metabolismus in Tumorzellen beteiligt ist.

Da sich die vorliegende Arbeit im Kern mit der transkriptionellen Regulation von *PDK4* durch den mit der Metastasierung einhergehenden Adhärenzverlust bei Ovarialkarzinomzellen befasst, wird in den ersten Kapiteln der Einleitung zum einen auf den Metabolismus in Tumorzellen eingegangen. Zum anderen befassen sich weitere Kapitel der Einleitung mit der Funktion von PDK4 und dessen Genregulation, auch in Abhängigkeit von Adhärenz und Adhärenzverlust. In diesem Zusammenhang werden auch die an der Metastasierung beteiligten Integrine in ihrem Aufbau und ihrer Funktion thematisiert.

2.1 Tumormetabolismus

In der Tumorforschung der letzten Jahre wurde sich vermehrt, im Hinblick auf neue Therapieansätze, mit dem veränderten Stoffwechsel in Tumorzellen beschäftigt. Normale Zellen verstoffwechseln unter aeroben Bedingungen Glukose in der Glykolyse und dem TCA-Zyklus („*tricarboxylic acid cycle*“) und gewinnen ihren Energieträger Adenosintriphosphat (36 mol ATP pro mol Glukose) in der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Nur unter anaeroben Bedingungen produzieren differenzierte Zellen Lactat und decken ihren Energiebedarf mit der ATP-Bildung aus der Glykolyse (Soga, 2013). Schon in den 1920er Jahren entdeckte Otto Warburg, dass Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen bevorzugt ATP über die Glykolyse und anschließende Lactatproduktion generieren. Man spricht vom sogenannten „Warburg Effekt“ oder der

„Aeroben Glykolyse“ (Warburg, 1956; Warburg 1924). Das in der Glykolyse entstandene Pyruvat wird in diesem Fall nur zu einem geringen Anteil durch den mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-Komplex („*pyruvate dehydrogenase complex*“, PDC) in Acetyl-CoA umgewandelt und in den TCA-Zyklus eingeschleust (Soga, 2013; Vander Heiden et al., 2009; Zhang, 2015). Stattdessen katalysiert die L-Lactatdehydrogenase (LDH) die Umwandlung von einem Großteil des Pyruvats zu Lactat im Cytosol (Abb. 2.1). Dieses Lactat wird anschließend von den Zellen sezerniert. Die Ursachen und Vorteile der Aeroben Glykolyse bei Tumorzellen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Trotz der schnellen aber ineffizient erscheinenden ATP-Gewinnung (~ 4 mol ATP pro mol Glukose) hat der glykolytische Metabolismus einen Vorteil für die Synthese neuer Makromoleküle, die stark proliferierende Zellen benötigen. Die Glukose kann über Intermediate zur Fettsäure-, Aminosäure- und Nucleotidsynthese genutzt werden (Vander Heiden et al., 2009). Die schnellere ATP-Gewinnung in der Glykolyse kann außerdem ein Wachstumsvorteil sein, solange die Verfügbarkeit der Glukose kein limitierender Faktor ist (Cairns et al., 2011). Als Ursache für die Umstellung auf den glykolytischen Metabolismus wird unter anderem eine Anpassung an die hypoxischen Bedingungen zu Beginn der Tumorentwicklung diskutiert (Gatenby and Gillies, 2004). Unter Hypoxie oder durch Aktivierung onkogener Signalwege werden Pyruvatdehydrogenase-Kinasen (PDKs) aktiviert bzw. verstärkt exprimiert, die den PDC und damit die weitere Verstoffwechslung des Pyruvats im TCA-Zyklus hemmen (Kim et al., 2006a; Lee et al., 2012; Lu et al., 2008; Papandreou et al., 2006). PDKs inhibieren daher auch die OXPHOS und fördern den glykolytischen Phänotyp. Detaillierter wird auf die Rolle der PDKs im Tumor in Kapitel 2.2.3 eingegangen. Des Weiteren ist bekannt, dass auch der PI3K-Signalweg, p53, MYC und der LKB1-AMPK-Signalweg („*liver kinase B1*“-„*AMP-activated protein kinase*“) am Warburg Effekt in Tumorzellen beteiligt sein können (Bensaad et al., 2006; Elstrom et al., 2004; Fan et al., 2010; Shackelford and Shaw, 2009). Zudem sind an der Umprogrammierung des Stoffwechsels auch die Enzyme Pyruvatkinase M2 (PKM2), Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) und Glutaminase beteiligt (Christofk et al., 2008; Levine and Puzio-Kuter, 2010; Soga, 2013).

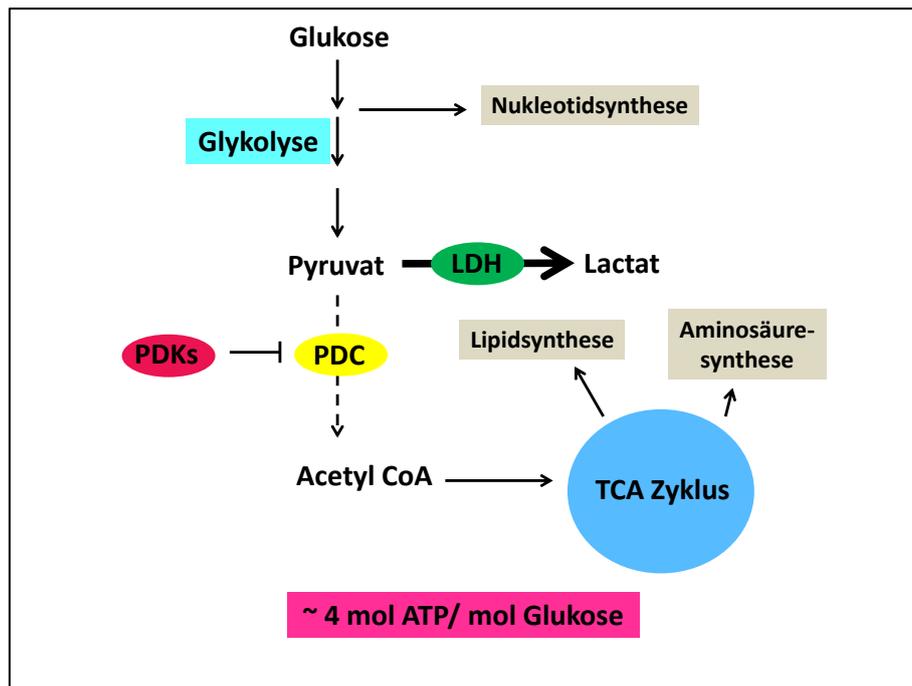


Abb. 2.1 Warburg Effekt in Tumorzellen.

Schematische Darstellung. Tumorzellen verstoffwechseln Glukose bevorzugt in der „Aeroben Glykolyse“ zu Lactat. PDKs sind verstärkt exprimiert und inaktivieren den PDC durch Phosphorylierung, woraufhin weniger Acetyl-CoA im TCA-Zyklus metabolisiert wird. Die stark proliferierenden Tumorzellen nutzen Intermediate des Glukosemetabolismus für anabole Prozesse wie die Nukleotidsynthese, Lipidsynthese und Aminosäuresynthese. LDH: Lactatdehydrogenase, PDC: „*pyruvate dehydrogenase complex*“; PDKs: Pyruvatdehydrogenase-Kinasen; TCA-Zyklus: „*tricarboxylic acid cycle*“.
Modifiziert nach Zhang, 2015

2.2 Pyruvatdehydrogenase-Kinasen (PDKs)

Die Mitglieder der PDK-Familie gelten als Schlüsselenzyme des Glukosemetabolismus und sind daher auch an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt (Zhang W, 2015). Sie ermöglichen der Zelle auf verschiedene Stoffwechselsituationen wie Fasten oder fettreiche Ernährung flexibel zu reagieren und sind außerdem in Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes involviert. Zunehmend wurde sich in den letzten Jahren auch mit ihrer Rolle im Tumor befasst. Die PDKs stellen daher auch ein wichtiges therapeutisches Ziel bei der Behandlung dieser Erkrankungen dar.

2.2.1 Expressionsprofil der PDKs

Bei den PDKs handelt es sich um mitochondriale Serinkinasen mit gewebsspezifischen Expressionsmustern. Die Expression von PDK1 beschränkt sich auf Herz und Pankreas, während PDK3 fast nur im Hoden und der Niere exprimiert ist. PDK2 und PDK4 weisen dagegen ein breites Expressionsprofil auf (Bowker-Kinley et al., 1998;

Holness and Sugden, 2003). Besonders stark ist PDK2 in Leber, Niere und Herz nach Hungern oder durch Insulinresistenz exprimiert (Harris et al., 2001; Wu et al., 2000). PDK4 ist am stärksten im Skelettmuskel, aber auch in Herz und Leber exprimiert (de Lange et al., 2007; Holness et al., 2003; Wu et al., 1999; Wu et al., 1998).

2.2.2 Funktion im zellulären Energiestoffwechsel

Im gesunden Organismus ist die Balance zwischen Energiebedarf und Angebot von entscheidender Bedeutung. Als zentrales Schlüsselenzym im Glukosestoffwechsel katalysiert der Pyruvatdehydrogenase-Komplex die Umwandlung von Pyruvat, Coenzym A und NAD^+ in Acetyl-CoA, NADH und CO_2 (Abb. 2.2) (Sugden and Holness, 2006). Acetyl-CoA, das aus dieser oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat oder durch β -Oxidation von Fettsäuren entsteht, wird anschließend im TCA-Zyklus weiter verstoffwechselt und somit zur ATP-Bildung genutzt oder zur Synthese von Fettsäuren und Cholesterin verwendet (Strumilo, 2005). Der PDC ist ein mitochondrialer Multi-Enzym-Komplex, bestehend aus drei Untereinheiten, der zum einen durch seine Endprodukte Acetyl-CoA und NADH in einer allosterischen Feedback-Hemmung reguliert wird (Sugden and Holness, 2006). Zum anderen lässt sich die Aktivität des PDC durch Phosphorylierung der $\text{E1}\alpha$ -Untereinheit regulieren. Vier humane PDKs (PDK1-4) phosphorylieren und inaktivieren und zwei PDPs (Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen, PDP1 und PDP2) dephosphorylieren und reaktivieren die Pyruvatdehydrogenase (Gudi et al., 1995; Huang et al., 1998; Rowles et al., 1996). Die Aktivität der Kinasen wird dabei auch durch die Substrate und Produkte der PDC-katalysierten Reaktion beeinflusst. Die Produkte Acetyl-CoA, und NADH aktivieren die PDKs, während die Substrate eine hemmende Wirkung haben (Behal et al., 1993; Jeoung and Harris, 2010; Ravindran et al., 1996). Durch die Inhibition des PDC wird die weitere Verstoffwechselung des Pyruvates im TCA-Zyklus, und damit die ATP-Bildung in der Atmungskette, durch die PDKs negativ reguliert. PDKs sind demnach wichtige Regulatoren des Glukosemetabolismus. So beschäftigen sich die Studien der letzten zwanzig Jahre vorrangig mit der Regulation und Expression der PDKs, während über die PDPs nur vergleichsweise wenig bekannt ist. Bei PDP1 handelt es sich um eine Ca^{2+} -sensitive Isoform, die im Herz, Gehirn und Hoden exprimiert ist. PDP2 ist die Ca^{2+} -insensitive Isoform, exprimiert in Niere, Leber, Herz und Gehirn (Huang et al., 2003).

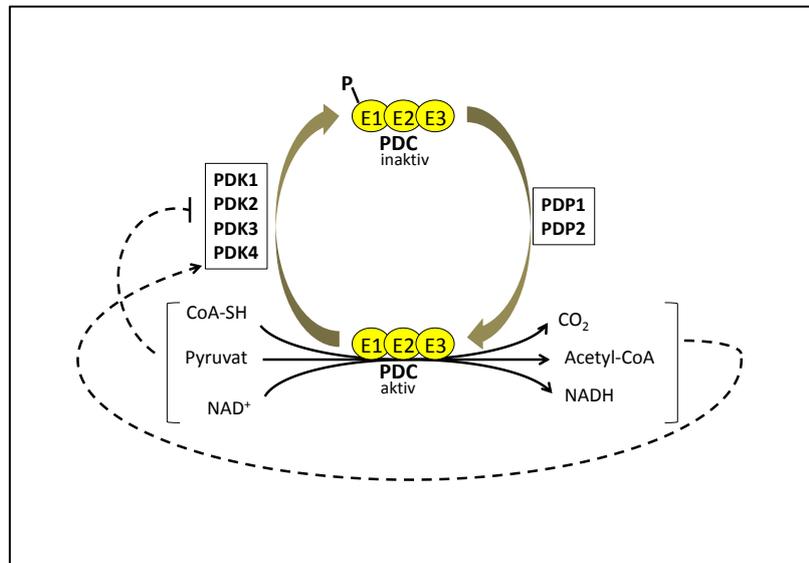


Abb. 2.2 Regulation des Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDC).

Schematische Darstellung. Der PDC besteht aus drei Untereinheiten (E1, E2, E3) und seine Aktivität wird durch den Phosphorylierungsstatus der E1 α -Untereinheit reguliert. PDKs (Pyruvatdehydrogenase-Kinasen) inaktivieren und die Dephosphorylierung durch PDPs (Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen) reaktiviert den PDC. Substrate der durch PDC katalysierten Reaktion hemmen die Aktivität der PDKs, Produkte steigern die Aktivität. Modifiziert nach Jeoung, 2010.

2.2.3 Rolle der PDKs im Tumormetabolismus

Wie bereits erwähnt, wirken PDKs an der zentralen Schaltstelle zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus und sind daher auch am Warburg Effekt in Tumorzellen beteiligt. Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass eine hohe PDK Aktivität, und die damit einhergehende niedrige PDC Aktivität, mit einer erhöhten Tumorigenität korreliert (Jha and Suk, 2013; Zhang W, 2015). Außerdem sind PDKs insbesondere PDK1, PDK2 und PDK3, in vielen Tumoren überexprimiert und mit einer schlechten Prognose für die Heilung der Patienten assoziiert (Zhang W, 2015). Speziell PDK1 konnte als Biomarker für eine ungünstige Prognose bei Magenkrebs, Melanomen und dem multiplen Myelom identifiziert werden (Fujiwara et al., 2013; Hur et al., 2013; Kaplon et al., 2013). Auf molekularer Ebene führt Hypoxie oder die Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs in Tumoren dazu, dass der „*hypoxia inducible factor 1 α* “ (HIF-1 α) sein Zielgen *PDK1* induziert, woraufhin die Inaktivierung des PDC zum glykolytischen Phänotyp führt und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“, ROS) reduziert. Dies schützt die Tumorzellen vor ROS-induzierter Apoptose (Papandreou et al., 2006). Außer HIF-1 α aktiviert auch der onkogene Transkriptionsfaktor MYC die *PDK1*-Transkription (Kim et al., 2007; Li et al., 2003). PDK2 ist die wichtigste PDK bei der Regulation des PDCs in der Leber (Jeoung, 2015) und beeinflusst daher auch den Tumormetabolismus im Leberzellkarzinom (Byun et al., 2015). Aufgrund des niedrigen Expressionslevels in vielen Geweben, außer im Hoden,

ist über die Rolle von PDK3 nur wenig bekannt. Nachgewiesen werden konnte jedoch, dass PDK3 ebenfalls durch HIF-1 in Tumorzellen und Stammzellen induziert wird (Lu et al., 2008; Prigione et al., 2014). Obwohl sich bei Tumoren Veränderungen in der PDK4-Expression nachweisen lassen, konnte der Kinase bisher diesbezüglich keine eindeutige Rolle zugesprochen werden (siehe Kapitel 2.2.4.2).

Durch ihre Beteiligung an Tumorerkrankungen sind PDKs auch ein attraktives pharmakologisches Ziel in deren Therapie. Allerdings befindet sich nach derzeitigem Stand nur Dichloracetat (DCA) in einer klinischen Phase II Studie (Dunbar et al., 2014). Bei DCA handelt es sich um einen PDK-Inhibitor, der das Tumolvolumen und die Proliferationsrate senken kann (Zhang W, 2015). DCA fördert die Glukoseoxidation und damit die OXPHOS und ROS-Produktion, was unter anderem zur Apoptose der Tumorzellen führt (Sutendra and Michelakis, 2013).

Im Folgenden wird auf die komplexe Rolle von PDK4, einem wichtigen Vertreter der PDK-Familie, in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und seine transkriptionelle Regulation genauer eingegangen.

2.2.4 PDK4

PDK4 ist von allen PDKs das am besten charakterisierte Isoenzym und gilt als wichtigster Regulator der PDC-Aktivität (Hsieh et al., 2008). Durch die Inaktivierung des PDC nimmt PDK4 daher eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Glukosestoffwechsels und damit bei der Energiegewinnung durch OXPHOS oder Lactatproduktion ein.

Die Expression von PDK4 ist stark abhängig von verschiedenen physiologischen Bedingungen wie beispielsweise der Verfügbarkeit von Energiequellen oder Insulin. Auch bei Stoffwechselerkrankungen und in Tumoren zeigen sich Veränderungen in der PDK4-Expression. Im Folgenden wird auf die Regulation der Expression detailliert eingegangen. Abschließend fasst Abb. 2.3 die bisherigen Erkenntnisse aus verschiedenen Spezies und unterschiedlichen Geweben zusammen.

2.2.4.1 Regulation der Expression von PDK4

2.2.4.1.1 Regulation der PDK4-Expression im Energiestoffwechsel

Ist die Verfügbarkeit von Glukose durch Nahrungsmangel oder niedrige Insulinkonzentrationen gering, wird der Energiebedarf durch die Oxidation langkettiger Fettsäuren gedeckt. Die Aktivität des PDCs im Skelettmuskel ist dabei durch PDK4-

vermittelte Hyperphosphorylierung stark gemindert (Holness and Sugden, 2003). So konnte bei gehungerten Ratten ein Anstieg der muskulären Pdk4-Expression nachgewiesen werden. PPAR α („*peroxisome proliferator-activated receptor α* “), ein Regulator während des Fastens, ist an dieser Regulation beteiligt (Wu et al., 1999). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Agonisten von PPAR β/δ und PPAR γ ebenfalls die Expression von PDK4 steigern können (Cadoudal et al., 2008; Degenhardt et al., 2007; Jeong et al., 2012).

Außerdem kann die transkriptionelle Induktion von *PDK4* während des Hungerns auch durch induzierte Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie vermittelt werden. In diesem Fall führen erhöhte Glukokortikoidmengen über eine kooperative Aktivierung von Glukokortikoidrezeptor (GR) und FOXO-Faktoren zu einer Aktivierung der PDK4-Expression (Connaughton et al., 2010; Furuyama et al., 2003; Kwon et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass längeres Fasten bei Mäusen zu einem Anstieg der Pdk4-Expression in der Leber führt, woraufhin das Pyruvat zur Gluconeogenese genutzt wird. In diesem Fall vermittelt das „*growth hormone*“ (GH) über eine Aktivierung des Jak2-Stat5-Signalwegs („*janus kinase 2*“-„*signal transducer and activator of transcription 5*“) die Aktivierung der Pdk4-Expression (Kim et al., 2012; Zhang et al., 2014).

Die geringere Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch Hemmung des PDC senkt außerdem das Level von Malonyl-CoA, dem Inhibitor der β -Oxidation, und steigert dadurch den Fettsäureabbau (Foster, 2012; Zhang et al., 2014). Gehungerte Pdk4-*knockout*-Mäuse, zeigen daher keine Umsteuerung des Stoffwechsels von Glukoseoxidation zu β -Oxidation, sondern stattdessen eine hohe PDC-Aktivität und einen niedrigen Blutglukosespiegel (Jeoung et al., 2006).

Ein Anstieg von *Pdk4* auf mRNA-Ebene konnte weiterhin auch im Skelettmuskel trainierter Mäuse nachgewiesen werden (Pilegaard and Neuffer, 2004).

Ratten, die über vier Wochen mit einer fettreichen Diät ernährt wurden, zeigten ebenfalls eine verstärkte Expression von Pdk4, aber auch von Pdk2, im Muskel und eine damit verbundene gesteigerte β -Oxidation (Holness et al., 2000). Es wird angenommen, dass unter diesen Umständen FOXO1 der induzierende Transkriptionsfaktor ist (Constantin-Teodosiu et al., 2012). Aber auch der Kernrezeptor ERR α („*estrogen-related receptor α* “) ist bei einer fettreichen Diät induziert und reguliert mit dem Ko-Faktor PGC1 α („*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α* “) die Pdk4-Expression unabhängig von FOXO1 (Araki and Motojima, 2006; Rinnankoski-Tuikka et al., 2012; Wende et al., 2005).

Die PDK4-Expression wird außerdem auch durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff reguliert. Unter hypoxischen Bedingungen induziert der Transkriptionsfaktor HIF-1 α die

Genexpression von *ERRγ* („*estrogen-related receptor γ*“). Dieser Kernrezeptor bindet im Promotorbereich und führt zur transkriptionellen Aktivierung von *PDK4*. Die ATP-Produktion in der anaeroben Glykolyse wird somit gefördert, um den Energiebedarf der Zellen zu decken (Lee et al., 2012).

2.2.4.1.2 Regulation der PDK4-Expression bei Stoffwechselerkrankungen

Unter physiologischen Bedingungen inhibiert Insulin die PDK4-Expression durch Aktivierung der Kinase AKT/PKB („*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*“/„*proteinkinase B*“). Die resultierende Phosphorylierung der FOXO-Faktoren führt zu ihrem Ausschluss aus dem Zellkern und einer gehemmten Genexpression (Barthel et al., 2005). In Zusammenhang mit Diabetes und einer Insulinresistenz steht daher ebenfalls ein erhöhtes PDK4-Expressionsniveau und die damit einhergehende niedrige Aktivität des PDC und verminderte Glukoseoxidation (Harris et al., 2001; Holness et al., 2003; Wu et al., 2000). Insulin ist nicht mehr in der Lage die Expression von PDK4 zu vermindern und so zeigen Typ II Diabetes Patienten gegenüber gesunden Probanden eine erhöhte Transkriptmenge von *PDK4* und *PDK2* im Skelettmuskel (Kulkarni et al., 2012). Neben FOXO Transkriptionsfaktoren sind auch Glukokortikoide an dieser Induktion von PDK4 beteiligt (Kwon et al., 2004).

Im Herzmuskel ist metabolische Flexibilität zwischen niedriger PDC Aktivität bei geringem Energiebedarf und induzierter PDC Aktivität bei hohem Energiebedarf besonders wichtig, um eine Kardiomyopathie zu vermeiden (Roche and Hiromasa, 2007). Eine spezifische Überexpression von Pdk4 im Herzen von Mäusen verhindert einen effektiven Glukoseabbau, fördert den Fettsäureabbau und verschlimmert Herzleiden (Zhao et al., 2008).

Auch bei einer Schilddrüsenüberfunktion ist neben Pdk2 die Pdk4-Expression in der Leber gesteigert. PGC1α und „*CCAAT-enhancer-binding protein β*“ (C/EBPβ) sind als Ko-Aktivatoren an dieser Thyroidhormon-(T₃)vermittelten Transkriptionsaktivierung beteiligt (Attia et al., 2010; Attia et al., 2011).

Durch die Beteiligung an Stoffwechselerkrankungen werden PDK-Inhibitoren auch in deren Therapie eingesetzt. AZD7545, Nov3r oder Radicol sind Inhibitoren, die für die Therapie von Typ II Diabetes mellitus oder Adipositas entwickelt wurden (Mayers et al., 2003; Zhang W, 2015).

2.2.4.2 Rolle von PDK4 im Tumor

Wie bereits erwähnt, ist die Rolle von PDK4 im Tumor bisher noch unklar. Zum einen wurde eine pro-tumorigene Wirkung von PDK4 beschrieben, die zudem noch unabhängig von der Aktivitätsregulation des PDC ist. Hierbei führt die Interaktion von PDK4 mit dem „*cAMP-response element-binding protein*“ (CREB) zu dessen Stabilisierung. Dies steigert die Aktivität der CREB-RHEB-mTORC1-Signalkaskade und fördert die Tumorzellproliferation (Liu et al., 2014).

Andererseits ist die PDK4-Expression, im Gegensatz zu anderen PDKs (siehe Kapitel 2.2.3), in vielen Tumoren, wie auch im Ovarialkarzinom, herunterreguliert. In diesem Zusammenhang ist PDK4 beim Lungenkarzinom als Tumorsuppressor beschrieben, wobei ein niedriges PDK4-Level bei Patienten mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Nikolova et al., 2009; Sun et al., 2014). Demgegenüber steht jedoch die ungünstigere Prognose bei Ovarialkarzinompatientinnen mit einer starken PDK4-Expression (Gyorffy et al., 2012).

Interessanterweise wurde in den letzten Jahren bekannt, dass die Expression von PDK4 auch durch Kontakte zwischen Zellen und der Extrazellulärmatrix gesteuert werden kann. Dies spielt eine wichtige Rolle im Tumor, da die Resistenz gegen Anoikis, den Zelltod nach Verlust der Zell-Matrixkontakte, ein zentraler Schritt in der Tumorprogression ist. Übereinstimmend konnte bisher gezeigt werden, dass der Kontaktverlust an die Extrazellulärmatrix die Expression von PDK4 induziert (Grassian et al., 2011; Kamarajugadda et al., 2012). Uneinigkeit besteht jedoch in der Literatur darüber, über welche Signalwege diese Regulation stattfindet und ob die PDK4-Induktion eine pro- oder anti-tumorigene Wirkung hat. Dies verdeutlicht noch einmal, dass PDK4 bisher keine eindeutige Rolle im Tumor einnimmt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die PDK4-Induktion den Umsatz des PDC und damit die Lipogenese und Zellproliferation verringert. Regulierend auf die PDK4-Expression wirkt dabei der MEK-ERK-Signalweg. Matrixkontakte, das Onkogen ErbB2 und der Wachstumsfaktor EGF („*epidermal growth factor*“) hemmen über die Signalwegaktivierung die PDK4-Expression. In Tumoren verhindert ErbB2 daher die durch PDK4-Induktion bedingte Hemmung der Zellproliferation bei Adhärenzverlust (Grassian et al., 2011; Huddleston, 2011). Dies unterstützt die Befunde der anti-tumorigenen Wirkung von PDK4. Andererseits konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die PDK4-Induktion die Metastasierung fördert, indem die Hemmung der Glukoseoxidation die Zellen vor Anoikis schützt. Dabei induziert ERR γ die PDK4-Expression nach Verlust der Matrixkontakte (Kamarajugadda et al., 2012).

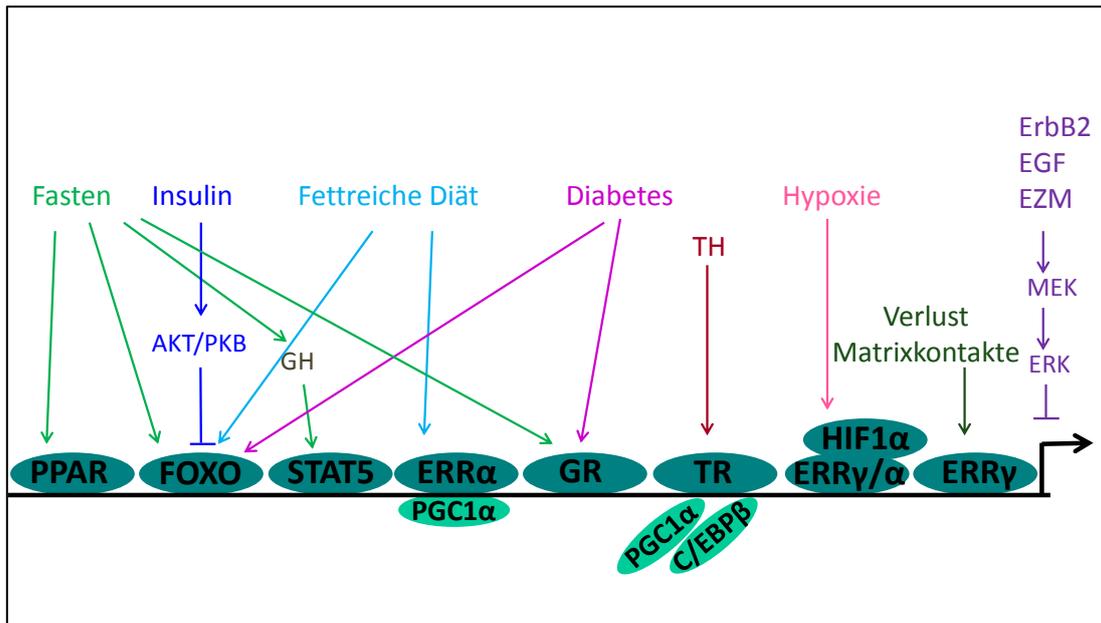


Abb. 2.3 Transkriptionelle Regulation von PDK4.

Schematische Darstellung. Die Transkription von *PDK4* wird durch verschiedene Faktoren, wie z. B. den Ernährungszustand (Fasten, fettreiche Diät) reguliert. Fasten, eine fettreiche Diät, Diabetes und Schilddrüsenhormone aktivieren die Expression, während Insulin über den AKT-Signalweg die Transkription hemmt. Tumorrelevante Faktoren, wie Verlust der Matrixkontakte oder Hypoxie steigern die *PDK4*-Expression. An der Regulation der Expression ist eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren beteiligt, die an regulatorische Bereiche des *PDK4*-Gens binden.

AKT/PKB: „*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*“/„*protein kinase B*“; C/EBPβ: „*CCAAT/enhancer-binding protein β*“; EGF: „*epidermal growth factor*“; ERK: „*extracellular-signal-regulated kinase*“; ERR: „*estrogen-related receptor*“; EZM: Extrazellulärmatrix; FOXO: „*forkhead box protein O*“; GH: „*growth hormone*“; GR: „*glucocorticoid receptor*“; HIF-1α: „*hypoxia-inducible factor 1-α*“; MEK: „*mitogen/extracellular signal-regulated kinase*“; PGC1α: „*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α*“; PPAR: „*peroxisome proliferator-activated receptor*“; STAT5: „*signal transducer and activator of transcription 5*“; TH: „*thyroid hormones*“; TR: „*thyroid hormone receptor*“;

Modifiziert nach Jeong, 2012

Da die Expressionsregulation von *PDK4*, wie in diesem Abschnitt beschrieben, von der Zelladhärenz stark beeinflusst ist, wird in den folgenden Kapiteln genauer auf die daran beteiligten Integrine in ihrem Aufbau und ihrer Funktion eingegangen.

2.3 Integrine

Bei den sogenannten Integrinen handelt es sich um an der Zelloberfläche lokalisierte, heterodimere Transmembranrezeptoren, die aus einer α- und einer β-Untereinheit bestehen. Im humanen System bilden Kombinationen aus 18 α-Untereinheiten und 8 β-Untereinheiten 24 verschiedene, funktionelle Integrine, die die Adhäsion der Zellen an die Extrazellulärmatrix (EZM) vermitteln (Hynes, 2002). Als Liganden für Integrine dienen dabei die Proteine der Extrazellulärmatrix, wie beispielsweise Fibronectin, Kollagen, Laminin und Vitronectin. Spezifische Integrin-Heterodimere binden bevorzugt an definierte Proteine der EZM, wie das α5β1-Integrin an die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) von Fibronectin (Pytela et al., 1985).

Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung, die bereits sehr gut untersucht ist (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Guo and Giancotti, 2004). Dies wird im Folgenden am Beispiel des Ovarialkarzinoms genauer beschrieben.

2.3.1 Rolle der Integrine im Ovarialkarzinom

Integrine wurden als wichtige Mediatoren in der Metastasierung des Ovarialkarzinoms beschrieben. Um zu metastasieren, durchlaufen die Ovarialkarzinomzellen die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Dabei kommt es zu einem Verlust der epithelialen Zell-Zell-Adhäsion und die Zellen erwerben einen migrierenden, invasiven mesenchymalen Charakter (Kalluri and Weinberg, 2009; Sawada et al., 2011). Tumorstammzellen, die an der hohen Rezidivrate und Chemoresistenz des Ovarialkarzinoms beteiligt sind, weisen ebenfalls diesen mesenchymalen Charakter auf (Ricci et al., 2012). Bei der Ausbreitung des Tumors lösen sich Tumorzellen vom Oberflächenepithel des Ovars, breiten sich über die Peritonealflüssigkeit als Einzelzellen oder mehrzellige Sphäroide aus und heften sich am Mesothel des Peritoneums an, um dort Metastasen zu bilden (Cannistra, 2004). Diese Anheftung wird über die Interaktion zwischen $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und Fibronektin vermittelt (Casey et al., 2001; Strobel and Cannistra, 1999). Das Mesothel ist außerdem auch reich an Kollagen Typ I und die Bindung der Tumorzellen über $\alpha 2 \beta 1$ -Integrine trägt ebenfalls zur Metastasierung bei (Moser et al., 1996). Des Weiteren sind auch $\alpha 4 \beta 1$ - und $\alpha \nu \beta 3$ -Integrine bei der Tumorausbreitung von Bedeutung (Kaur et al., 2009; Lengyel, 2010; Slack-Davis et al., 2009). Aus therapeutischer Sicht ist es daher nicht verwunderlich, dass sich vielversprechende monoklonale Antikörper und RGD-Mimetika, die als Integrinantagonisten die Tumorausbreitung hemmen, bereits in Testphasen klinischer Studien befinden (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Sawada et al., 2011).

2.3.2 Integrinvermittelte Signalwege

Integrine sind Signalmoleküle, die in zwei Richtungen funktionieren (Hynes, 2002). Zum einen wird die Konformation und Affinität der Integrine durch intrazelluläre Signalwege („*inside-out signaling*“) beeinflusst. Und zum anderen führt die Ligandenbindung bei der Zelladhäsion zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege („*outside-in signaling*“). Über diese Signalkaskaden regulieren Integrine auch Migration, Invasion, Proliferation und das Überleben von gesunden Zellen und Tumorzellen, womit sich im Folgenden genauer befasst wird.

2.3.2.1 FAK-Aktivierung

Durch die Bindung der Integrine an die EZM bilden sich in der Zellmembran adhärenter Zellen sogenannte Fokale Adhäsionen („*focal adhesion*“) aus. Dies sind Anhäufungen von Integrinen, Signal- und Adaptorproteinen. An diese Strukturen wird die „*focal adhesion kinase*“ (FAK) rekrutiert und durch Autophosphorylierung aktiviert (Schaller et al., 1992). Die Phosphorylierung ist eine Andockstelle für „*Src-family kinases*“ (SFKs), zu denen u. a. die Kinasen SRC, FYN und YES gehören (Schlaepfer and Hunter, 1998). Sie phosphorylieren weitere Tyrosine der FAK und steigern damit deren Aktivität (Lee and Juliano, 2004; Schaller, 2001). Der aktive FAK/SFK-Komplex vermittelt die Signalweiterleitung an verschiedene Signalwege, wie den ERK/MAPK-Signalweg („*extracellular signal-regulated kinase*“/„*mitogen-activated protein kinase*“) und PI3K-AKT-Signalweg („*phosphatidylinositol-3-kinases*“-„*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*“) (Abb. 2.4). Der Komplex kontrolliert auch die Aktivität der Rho-GTPasen, die an der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmotilität beteiligt sind, worauf im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer eingegangen werden kann (Huveneers and Danen, 2009).

2.3.2.2 Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs

Integrine steuern über den ERK/MAPK-Signalweg die von Wachstumsfaktoren abhängige Zellproliferation (Danen et al., 2000; Danen and Yamada, 2001). In diesem Fall bindet das Adaptorprotein Grb2 („*growth factor receptor-bound protein 2*“) an die phosphorylierte FAK und aktiviert über weitere Signalmoleküle den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg („*rat sarcoma*“-„*rat fibrosarcoma*“-„*mitogen/extracellular signal-regulated kinase*“-„*extracellular-signal-regulated kinase*“) (Schlaepfer et al., 1994). Zusätzlich kann die ERK-Aktivierung auch über das mit der FAK-assoziierte Gerüstprotein („*scaffolding protein*“) p130CAS („*Crk-associated substrate*“), das Adaptorprotein Crk („*CT10 regulator of kinase*“) und weitere Signalmoleküle stattfinden (Lee and Juliano, 2004). Nicht nur die aktive ERK, sondern auch die FAK-vermittelte Aktivierung der „*c-Jun N-terminal kinase*“ (JNK) sind an der transkriptionellen Induktion von *Cyclin D1* beteiligt und tragen damit zur Progression durch den Zellzyklus bei (Igishi et al., 1999; Lee and Juliano, 2004; Oktay et al., 1999; Wisdom et al., 1999). Die Zelladhäsion über Integrine und die damit verbundene Aktivierung der ERK fördern demnach die Zellproliferation. Zudem wirkt der ERK/MAPK-Signalweg anti-apoptotisch durch Induktion der Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie („*B-cell lymphoma 2*“) (Paoli et al., 2013; Schlaepfer et al., 1999).

2.3.2.3 Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs

Von Bedeutung ist auch der Einfluss der Integrine auf das Überleben von Zellen. Dies zeigt sich indem Endothel- und Epithelzellen beim Verlust der Adhäsion an die EZM apoptotisch werden. Diesen Prozess nennt man „Anoikis“. Integrine vermitteln über den PI3K-AKT-Signalweg das Überleben adhärenter Zellen (Frisch and Ruoslahti, 1997). Die PI3K bindet an die aktive FAK und katalysiert die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Die Kinasen AKT/PKB und PDK1 („*3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*“) werden durch die Bindung an PIP₃ zur Plasmamembran rekrutiert und, bedingt durch die räumliche Nähe, phosphoryliert PDK1 die AKT an der Aminosäure Threonin 308 und aktiviert sie damit partiell (Alessi et al., 1997). Die Phosphorylierung am Serinrest 473 der AKT, durch den Komplex mTORC2 („*mammalian target of rapamycin complex 2*“) und die Kinase DNA-PK („*DNA-dependent protein kinase*“), führt zu ihrer vollständigen Aktivierung (Feng et al., 2004; Sarbassov et al., 2005). Die Ser473-Phosphorylierung kann auch direkt durch die „*integrin-linked kinase*“ (ILK) erfolgen (Attwell et al., 2000). Dies hat die Phosphorylierung verschiedener, weiterer Proteine zur Folge. Der aktive PI3K-AKT Signalweg fördert das Überleben der Zellen, indem er pro-apoptische Proteine („*Bcl-2-associated death promotor*“, „*Bcl2-like protein 11*“) negativ reguliert und zum Beispiel die Expression des anti-apoptischen Transkriptionsfaktor NF-κB („*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*“) induziert (Huang et al., 2007; Kennedy et al., 1997; Paoli et al., 2013). Zu den regulierten pro-apoptischen Proteinen zählen auch die FOXO-Proteine („*forkhead box protein O*“), deren Phosphorylierung zu ihrem Ausschluss aus dem Kern führt und die Expression ihrer Zielgene hemmt (Barthel et al., 2005). Im Zusammenhang mit der PI3K-AKT-Signalkaskade ist es wichtig zu erwähnen, dass die Aktivität des Signalwegs nicht nur durch Integrine, sondern zum Beispiel auch durch verschiedene Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Zudem reguliert der Signalweg neben der Apoptose beispielsweise auch den Zellmetabolismus, die Proteinsynthese oder den Zellzyklus (Hemmings and Restuccia, 2012).

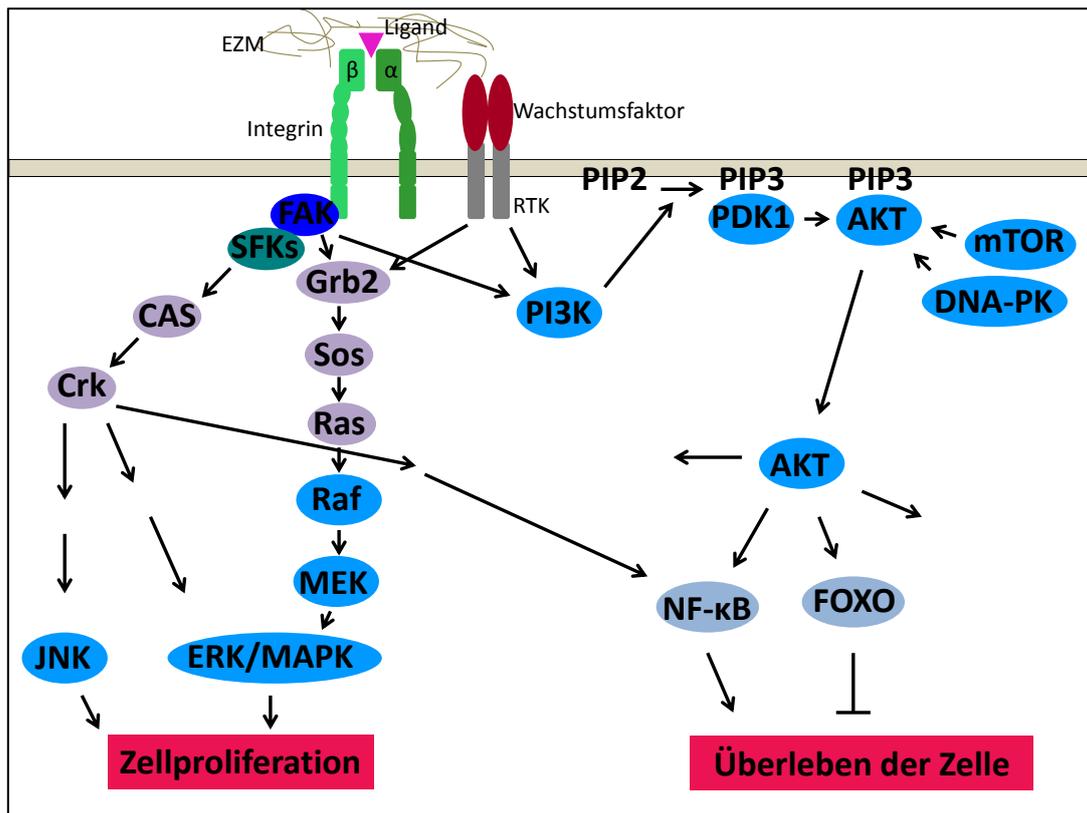


Abb. 2.4 Aktivierung integrinvermittelter Signalwege.

Schematische Darstellung. Bestandteile der EZM werden als Liganden von Integrinen gebunden woraufhin FAK und SFKs rekrutiert und aktiviert werden. Durch die Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs und der JNK fördert Adhäsion die Zellproliferation. Das Überleben adhärenter Zellen wird durch Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs vermittelt. Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) führt ebenfalls zur Aktivierung der Signalwege und ist nötig für die Zellproliferation und das optimale Überleben der Zellen. Nähere Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach Guo und Giacotti, 2004 und Hemmings, 2012.

2.4 Ziel der Arbeit

Trotz intensiver Forschung handelt es sich beim Ovarialkarzinom nach wie vor um eine Tumorerkrankung, die aufgrund der starken Neigung zur Metastasierung, sowie durch die oft späte Diagnosestellung aufgrund unspezifischer Symptome, eine hohe Letalität aufweist. Initial lösen sich bei der Metastasierung Tumorzellen aus dem epithelialen Zellverband, breiten sich anschließend als Einzelzellen oder mehrzellige Sphäroide im Aszites, einer pathologischen Flüssigkeitsansammlung im Peritonealraum, aus und bilden Metastasen. Bei diesen metastasierenden Zellen handelt es sich demnach um Zellen, die resistent gegen den Zelltod nach Verlust der Zell-Matrixkontakte („Anoikis“) sind (Carduner et al., 2014). Unter diesen Zellen können sich auch Tumorstammzellpopulationen (TICs, „*tumor-initiating cells*“) befinden, die die hohe Rezidivrate der Erkrankung bedingen (Bapat et al., 2005).

Diese Erkenntnisse zeigen, wie wichtig es ist, die Folgen des Adhärenzverlustes bei Ovarialkarzinomzellen auf molekularer Ebene für ein therapeutisches Eingreifen genauer zu analysieren.

Da Tumorzellen, wie einleitend erwähnt, einen veränderten Metabolismus aufweisen und der Adhärenzverlust bei Zellen ebenfalls mit Veränderungen im Energiestoffwechsel in Zusammenhang steht, wurde eingangs untersucht, wie sich Adhärenz und Adhärenzverlust bei Ovarialkarzinomzellen auf die Expression metabolisch aktiver Gene auswirken. In diesem Zusammenhang konnte mit *PK4* ein Gen identifiziert werden, dessen Expression auch beim Ovarialkarzinom stark von Adhärenzbedingungen beeinflusst wird. Ziel dieser Arbeit war es, diese Genregulation genauer zu beleuchten und mechanistisch aufzuklären.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Autoklaven Bioclav und Fedegari	Schütt, Olching
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Brutschrank BBD6220 (CO ₂ -begasbar, 37°C)	Heraeus, Hanau
Cellometer Auto X 400	Nexcelom Bioscience, USA
ChemiDoc Universalhood III	BioRad, München
Einfrierbox Nalgene Cryo	Neerijse, Belgien
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Electroblotter	PeqLab, Erlangen
Electrophoresis Power Supply 1000/500	Bio Rad, München
Electrophoresis Power Supply E815+E835	Consort, Tumahout (Belgien)
ELISA-Reader SPECTRA MAX340	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Experion electrophoresis station	Bio Rad, München
Feinwaage Sartorius Research R200D	Sartorius, Göttingen
Heizblock HBT 130	HLC, Göttingen
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
Kühlzentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JA-20	Beckmann, München
Magnetrührer MR2002 und MR3001 (beheizbar)	Heidolph, Schwabach
Mikroliter-Spritze	Hamilton, Bonaduz (Schweiz)
Mikrowellengerät Privileg 7533P	Quelle, Fürth

Milli-Q Water System	Millipore, Eschborn
Monitor und Videoprinter Modell PG8E	Mitsubishi, Japan
Multifuge 3L-R (Kühlzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Multilabel Counter Victor3V 1420	Perkin Elmer, Turku (FI)
Mx3000P qPCR System	Stratagene (Niederlande)
NanoDrop ND-1000	PeqLab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
PCR Gerät Robocycler Gradient 96	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Perfect Blue™ Gelsystem Mini S+L	PeqLab, Erlangen
pH-meter Inolab	Inolab, Weilheim
Pipetboy Acu	Integra Bioscience GmbH, Fernwald
Pipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Entwicklermaschine X-Omat 2000 Processor	Kodak, Rochester (USA)
Schüttelinkubator AJ112	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Sterilbank LaminAir HA2448	Heraeus, Hanau
Stickstofftank Chronos Biosafe	Active motif, Carlsbad (USA)
Überkopftrotierer für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße	Heidolph, Schwabach
Universalwaage Scout Pro	Ohaus, Pine Brook (USA)
UV-Transluminator mit Videokamera	IVP, San Gabriel (USA)
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Adhesive PCR-Verschlussfolie	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Immobilon P	Millipore, Bedford (USA)
PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid)	
Kyrorröhrchen 1 ml	Nunc, Wiesbaden

Parafilm	American National Can™, Neenah (USA)
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen-Reaktionsgefäße 14 ml	Greiner, Solingen
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml + 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml + 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	PfM AG, Köln
Steritop Express Plus-Filter (0,22 µm)	Millipore, Bedford (USA)
Thermo-Fast 96 PCR Plate in weiß	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturplatten 6-well, 12-well, 24-well, 48-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 6 cm, 10 cm und 15 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Chemikalien

17β-Estradiol	Cayman Chemical, Tallinn (Estland)
4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
8-Br-cAMP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese 37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Ampicillin	Serva, Heidelberg
BC21	Merck, Darmstadt
<i>Bovines</i> Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Benzonase	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
CHIR99021	Cayman Chemical, Tallinn (Estland)
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cyclosporin A	Santa Cruz, Heidelberg
Cytochalasin D	Focus Biomolecules, Plymouth Meeting (USA)
Deoxyribonucleinsäure, niedermolekular aus Lachssperma	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Epidermal growth factor</i> (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Riedel-de Haën, Seelze
Ethylendiamin Tetraacetat (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Forskolin	Cayman Chemical, Tallinn (Estland)
Fulvestrant	Cayman Chemical, Tallinn (Estland)
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
H1004	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
H-89	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
Hepes	Gerbu, Gaiberg
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim
IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin (<i>bovin</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin (human, recombinant)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
KN-62	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
Kollagen Typ I	Invitrogen, Karlsruhe

L165,041	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Latrunculin A	Cayman Chemical, Tallinn (Estland)
Lithiumchlorid (LiCl)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Lactate	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-LDH	ROCHE Penzberg,
LY294002	Cayman Chemical, Tallinn (Estland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Matrigel	BD Biosciences, Erembodegem (Belgien)
Methanol	Merck, Darmstadt
Mifepristone	Cayman Chemical, Tallinn (Estland)
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nicotinamadenindinukleotid (NAD)	ROCHE Penzberg,
NP40	Applichem, Darmstadt
PD-98059	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
PIPES	Carl Roth, Karlsruhe
POLY(2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PP1	Focus Biomolecules, Plymouth Meeting (USA)
PP2	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Bioline, London (UK)
PT-S264	AG Diederich, Pharmazie, Universität Marburg
PT-S58	AG Diederich, Pharmazie, Universität Marburg
RGD peptide (GRGDNP)	Santa Cruz, Heidelberg

RNase A	Macherey-Nagel, Düren
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SB202190	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
SB203580	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Triciribine	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
Trishydroxymehtylaminomethan (Tris Base)	Acros Organics (Belgien)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Merck, Darmstadt
U0126	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)
Wortmannin	Enzo Life Sciences, Farmingdale (USA)

3.1.4 Puffer und Lösungen

3.1.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Sofern nicht ausdrücklich vermerkt, wurden die folgenden Puffer und Lösungen in Milli-Q-Wasser angesetzt.

H ₂ O	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
H ₂ O (RNase und DNase-frei)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS <i>„Phosphate buffered saline“</i>	Invitrogen, Karlsruhe
TE-Puffer (Tris/EDTA)	Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM autoklaviert, pH 7
TBS <i>„Tris buffered saline“</i>	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl

3.1.4.2 Spezielle Puffer und Lösungen

Agarosegel-Lösung	1-2 % Agarose 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung 1x TAE-Puffer
-------------------	--

50x TAE-Laufpuffer	Tris Base 2 M Essigsäure 250 mM EDTA 50 mM autoklaviert, pH 8,0
--------------------	--

Ethidiumbromid Stammlösung 6x <i>Orange Loading Dye Solution</i>	10 mg/ml Fermentas, St. Leon-Rot
---	-------------------------------------

Transfektion

Viromers® <i>Green</i>	Lipocalyx, Halle
HiPerfect	Qiagen, Hilden

Herstellung von Proteinextrakten

FLAG-Lysepuffer	60 mM Tris pH 7,5 30 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100
-----------------	--

SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgellösung	4 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese 37,5:1) 188 mM Tris pH 6,8 Kurz vor Gebrauch hinzugefügt: 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,01 % TEMED
-----------------	---

Trenngellösung	8-12 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese 37,5:1) 188 mM Tris pH 8,9 Kurz vor Gebrauch hinzugefügt:
----------------	--

	0,1 % SDS
	0,1 % APS
	0,01 % TEMED
1x Laufpuffer	50 mM Tris 380 mM Glycin; 0,2 % (w/v) SDS
2x SDS-Probenpuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
4x SDS-Probenpuffer „Roti-Load“	Carl Roth, Karlsruhe
Western Blot Analyse	
TBST	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Towbin-Puffer (Transferpuffer)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol, pH 8,3
Luminata forte	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Chromatin-Immunpräzipitation	
ChIP-Lysepuffer I	5 mM PIPES pH 8,0 85 mM KCl 0,5 % (v/v) NP40 Zugabe Protease Inhibitor Cocktail direkt vor Gebrauch (1:1000)
ChIP-Lysepuffer II	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP40 1 % (w/v) Natriumdeoxycholate 0,1 % (w/v) SDS 1mM EDTA Zugabe Protease Inhibitor Cocktail direkt

	vor Gebrauch (1:1000)
Elutionspuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM NaHCO ₃
ChIP-Waschpuffer I	20 mM Tris pH 8,1 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0.1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer II	20 mM Tris pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0.1 % SDS 1 % (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer III	10 mM Tris pH 8,1 250 mM LiCl 1 % (v/v) NP40 1 % (w/v) sodium deoxycholate 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris pH 7,4 1 mM EDTA
Reversionsmix	Frisch angesetzt pro Probe: 20 µl 5 M NaCl 20 µl 1 M Tris pH 6,8 10 µl 0,5 M EDTA 1 µl RNase A (10 g/l stock) 1 µl Proteinase K (20 g/l stock) 42 µl dieses Ansatztes werden zu jeder Probe zugegeben

Bestimmung der Glukoseaufnahme in Zellen

KRPH-Puffer	20 mM Hepes
	5 mM KH_2PO_4
	1 mM MgSO_4
	1 mM CaCl_2
	136 mM NaCl
	4,7 mM KCl pH 7,4
	vor Gebrauch Zugabe von:
	2 % BSA

Bestimmung der L-Lactatsekretion von Zellen

Lactat Assay Puffer	0,5 M Glycin
	0,4 M Hydrazin
	pH 9 – 10 eingestellt mit 4 N KOH

Zellkultur

DMEM mit L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM/F12	Sigma- Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma- Aldrich, Steinheim
McCoy's 5a Medium Modified	Invitrogen, Karlsruhe
McCoy's 5a Medium ohne Phenolrot → 17 β -Estradiolbehandlung	GE-Hyclone, Logan (USA)
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x) (Penicillin 10.000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml)	Sigma- Aldrich, Steinheim
Pferdeserum	Sigma- Aldrich, Steinheim
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

DNA- und Proteinstandards

DNA-Größenstandard	
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St.Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
GeneRuler™ low range DNA-Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
6xOrange Loading Dye Solution	Fermentas, St.Leon-Rot

Protein-Molekulargewichtsstandard

PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
PAGE Ruler™ Prestained Plus Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot

3.1.5 Kits

Bio-Plex Cell Lysis Kit	BioRad, München
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
NUCLEOSPIN RNA II	Macherey-Nagel, Düren
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
ABsolute QPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Protein A-Sepharose	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose Uptake Fluorometric Assay Kit	BioVision, Milpitas (USA)
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

3.1.6 Primer und Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer und Oligonukleotide waren gegen humane Gene gerichtet.

qPCR Primer für Expressionsanalysen

Die Primer für RT-qPCR-Analysen (siehe Kapitel 3.2.1.5) wurden entweder in der Primerdatenbank „*Universal Probe Library*“ gesucht oder sie wurden mit Hilfe der Software ApE (Wayne Davis) selbst erstellt. Hierbei wurde immer darauf geachtet, dass das PCR-Produkt über Exon-Exon-Grenzen lag, damit nur Transkripte amplifiziert werden und nicht genomische DNA. Die Amplifikate waren nicht länger als 300 bp. Die Synthese und Reinigung (HPLC) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) durchgeführt. Die Primer wurden im lyophilisierten Zustand geliefert und in RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst. Die Stammkonzentration betrug 100 µM. Die Primer wurden bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Genname	Primernamen	Sequenz 5' - 3' Orientierung
<i>L27</i>	hRPL27cDNAfw	aaagctgtcatcgtgaagaac
	hRPL27cDNAfw	Gctgtcactttgcggggtag
<i>PDK1</i>	hPDK1_qfor	catgtcacgctgggtaatga
	hPDK1_qrev	acacgaggtcttggtgcagt
<i>PDK2</i>	hPDK2_qfor	agatcaacctgctcccgac
	hPDK2_qrev	ggaactccatgatgtccagg
<i>PDK3</i>	hPDK3_qfor	acagccaagatgctgtgtga
	hPDK3_qrev	tatgaaacagatgtgagggcac
<i>PDK4</i>	hPDK4fw_12	ttgagtgtcaaggatgctctg
	hPDK4rv_12	tgcccgcattgcattctaaata
	hPDK4CCfw	ttatacactccactgcacca
	hPDK4CCrv	atagactcagaagacaaagcct
<i>AXIN2</i>	hAxin2_for	gctgacggatgattccatgt
	hAxin2_rev	actgcccacacgataaggag
<i>VEGFA</i>	hVEGFA_qfor	ctacctccaccatgccaaagt
	hVEGFA_qrev	ccatgaactcaccacttctgt
<i>ERa</i>	ESR1_for	gctcgaaagggtccatgctc
	ESR1_rev	tttgcttactccttctagtttc
<i>CTNNB1</i>	hCTNNB1_for	tgtaaattcttgctattacgaca
	hCTNNB1_rev	ccaccactagccagtatgatga
<i>PPARD</i>	PPARb_neu for	cgggtttcatgcatgtgag
	PPARb_neu rev	agctgcgctcacacttctc
<i>C/EBPβ</i>	hCEBPB_for	aactctctgcttctccctctg
	hCEBPB_rev	aagcccgtaggaacatcttt

qPCR Primer für genomische Bereiche nach einer Chromatin-Immünpräzipitation

Die Primer wurden mit Hilfe der Genom-Datenbank „UCSC *Genome Browser*“ erstellt. Neben genomischen DNA-Sequenzen lässt sich mit dieser Datenbank auch herausfinden, ob bereits eine Anreicherung bestimmter Proteine an definierten genomischen Regionen für einzelne Zelllinien nachgewiesen wurde. Wenn bereits Informationen über die Anreicherung des Zielproteins am Zielgen vorlagen, wurden Primer für die entsprechende genomische Regionen erstellt. Die Amplifikate waren ebenfalls nicht länger als 300 bp. Die Synthese und Reinigung (HPLC) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) durchgeführt. Die Primer wurden im lyophilisierten Zustand geliefert und in RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst.

Die Stammkonzentration betrug auch hier 100 μ M. Die Primer waren bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Lokus	Primername	Sequenz 5' - 3' Orientierung
hPDK4 -250	hPDK4-250fw1a	tgggctaagattagcctcttg
	hPDK4-250rv1b	cattgagacagcctccgagtt
hPDK4 -630	gPDK4_-630_for	gcaaaaggtaagccaaaactgac
	gPDK4_-630_rev	tcctgtggaataaaaaggcca
hPDK4 -420	gPDK4_-420_for	gcgcaggtctttaggttgtt
	gPDK4_-420_rev	gcgttcaaaagtatgggcttc
hPDK4 -12000 (PPRE)	hPDK4PPRE952fw1	gcagagtcaacaaggggaag
	hPDK4PPRE952rv1	actagatgcctgggagctga
hPDK4 -4500 (con)	hPDK4RE1fw	gtatgtgtactggggggac
	hPDK4RE1rv	cagatggctctttcgttcc
hPDK4 0	gPDK4_TS_for	tgcagtggttcgagattcaa
	gPDK4_TS_rev	gagtgcggggagacaaataa
hPDK4 -400	gPDK4_-400_for	gcgttcaaaagtatgggcttc
	gPDK4_-400_rev	gcgcaggtctttaggttgtt
hPDK4 +6000	gPDK4_+6000_for	gctcagagatacgttcattc
	gPDK4_+6000_rev	gttgctcaaagagtagcctaac
hAXIN2 -800	hAxin2_-800_for	gcaccaaagtctctccggg
	hAxin2_-800_rev	gctcgcgcctttgaagtgc

Die Primer zur Detektion der Mycoplasmenkontamination lauten (5' - 3' Orientierung):

tgcacatctgtcactctgttaacctc

actcctacgggaggcagcagta

siRNA-ds Oligonukleotide

Zielgen	siRNA	Sequenz 5' - 3' Orientierung	Firma
Negativkontrolle	2' ACE-scramble-2	cagucgcguuugcgacugg	GE Dharmacon, Lafayette (USA)
Negativkontrolle	ON-TARGETplus Non-targeting pool	ugguuuacaugucgacuaa	GE Dharmacon, Lafayette (USA)
		ugguuuacauguuguguga	
		ugguuuacauguuuucuga	
		ugguuuacauguuuuccua	
<i>PPARD</i>	Hs_PPARD_2	cacagactgacgaaactttaa	Qiagen, Hilden
	Hs_PPARD_3	cagtgatcattgagcctaa	
	Hs_PPARD_5	cagcggatcaagaagaccgaa	
	Hs_PPARD_6	caggtacccttctcaagtat	
<i>CTNNB1</i>	J-003482-09	gauccuagcuaucguucuu	GE Dharmacon, Lafayette (USA)
	J-003482-10	uaaugaggaccuauacuua	
	J-003482-11	gcguuuggcugaaccauca	
	J-003482-12	Gguacgagcugcuauguuc	
<i>C/EBPβ</i>	J-006423-05	ccucgcaggucaagagcaa	GE Dharmacon, Lafayette (USA)
	J-006423-06	cugcuuggcugcugcguac	
	J-006423-07	gcgcuuaccucggcuacca	
	J-006423-08	gcaccucggaacuuguu	

Die siRNAs wurden lyophilisiert geliefert und anschließend gelöst. siRNAs der Firma Qiagen wurden in RNase-freiem Wasser gelöst, siRNAs der Firma Dharmacon in 1x siRNA-Puffer (GE Dharmacon, Lafayette, USA). Die Konzentration der siRNAs wurde auf 20 µM eingestellt. Sie wurden bei -80 °C gelagert.

3.1.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
AKT (C-20; sc-1618)	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt (#7074)	Ziege	Cell signaling, Danvers (USA)
anti-Maus, HRP-gekoppelt (#7076)	Pferd	Cell signaling, Danvers (USA)
Anti-Ziege, HRP-gekoppelt (sc-2020)	Esel	Santa Cruz, Heidelberg
C/EBP β (C-19; sc-150)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
CREB (86B10; #9104)	Maus	Cell signaling, Danvers (USA)
CREB-1 (X-12; sc-240)	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
ERK (K-23.; sc-94)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
FOXO1 (FKHR) (H-128; sc 11350)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
FOXO3 (FKHRL1) (H-144; sc-11351)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
LDH (H-160; sc-33781)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
P-AKT (Ser473; #9271)	Kaninchen	Cell signaling, Danvers (USA)
P-CREB (Ser133) (87G3; #9198)	Kaninchen	Cell signaling, Danvers (USA)
PDK4 (1C2BG5)	Maus	Abcam, Cambridge (UK)
P-ERK (E-4; sc-7383)	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
PPARD (F-10; sc-74517)	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
PPARD (H-74; sc-7197)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
TCF4 (C48H11; #2569)	Kaninchen	Cell signaling, Danvers (USA)
β -Aktin (Clone AC-15)	Maus	Sigma-Aldrich (Steinheim)
β -Catenin (H-102; sc-7199)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg

3.1.8 Computerprogramme und Datenbanken

Auswerteprogramme

ApE	Wayne Davis
Analyse Software NanoDrop 3.01	PeqLab, Erlangen
Microsoft Office 2008 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft, Unterschleißheim
Mx3000P Betriebs- und Analysesoftware	Stratagene (Niederlande)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Image Lab 5.0	BioRAD, München
Ingenuity Upstream Regulator Analysis in IPA	http://pages.ingenuity.com/IngenuityUpstreamRegulatorAnalysisWhitepaper.html

Genom und Proteindatenbanken

Ensembl <i>Genome Browser</i>	http://www.ensembl.org
<i>US National Center for Biotechnology Information</i>	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
UCSC <i>Genome Browser</i>	http://genome-euro.ucsc.edu

Primerdesign

<i>Universal ProbeLibrary Assay Design Center</i>	https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1
---	---

3.2 Methoden

3.2.1 Biochemische und molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Beim Arbeiten mit RNA ist die Gefahr der schnellen Degradation durch RNAsen besonders zu beachten. Es ist daher darauf zu achten, dass die Proben semisteril bearbeitet und auf Eis gehalten werden. Zur Isolierung der RNA aus Zellen wurde das „NUCLEOSPIN RNA II“ Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Aufreinigung der RNA mittels Säulenchromatographie wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte in 40 µl RNase-freiem Wasser. Die RNA wurde bis

zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Ihre Qualität wurde mit der „Experion electrophoresis station“ der Firma BioRad (München) überprüft.

3.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund ihrer heterozyklischen Basen absorbieren Nukleinsäuren Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch diese Eigenschaft lassen sie sich photometrisch quantifizieren. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei dem Gehalt von ca. 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger-DNA (dsDNA). Um die Reinheit der Nukleinsäureprobe zu bestimmen, wird zusätzlich die OD bei 280 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge Proteine das UV-Licht absorbieren. Der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ ergibt somit ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte durch Messung der Absorption von 1 µl der Probe am NanoDrop (Peqlab, Erlangen). Die Konzentration konnte direkt aus der Software (NanoDrop 3.01) abgelesen werden, die diese mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Konz. dsDNA [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

$$\text{Konz. RNA [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

3.2.1.3 cDNA-Synthese

Um die Transkription eines Gens quantitativ nachzuweisen wird die Methode der quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) angewendet (siehe Kapitel 3.2.1.5). Zuvor muss jedoch das Transkriptom der Zelle in komplementäre DNA (cDNA, „*complementary DNA*“) umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ der Firma BioRad (München). Es wurde so viel RNA wie möglich in die cDNA-Synthese eingesetzt, jedoch maximal 800 ng.

Reverse Transkription cDNA-Synthese-Mix:

4 µl 5x iScript reaction mix

1 µl iScript reverse transcriptase

x µl RNA

ad 15 µl RNase-freies Wasser

Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 42 °C. Danach wurden die Proben noch für 5 min bei 85 °C inkubiert.

3.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR („*polymerase chain reaction*“) gelingt es durch spezifisch gewählte Primer definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren. Thermostabile DNA-Polymerasen sorgen für eine exponentielle Vermehrung eines DNA-Bereichs in mehreren Zyklen. Im Reaktionsansatz müssen dafür kurze Oligonukleotidprimer, Puffer und Desoxynukleotidtriphosphate vorhanden sein. Ein initialer Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C trennt die Nukleinsäure-Doppelstränge. Danach erfolgt die zyklische Reaktion aus Denaturierung (30s 95 °C), sequenzspezifische Anlagerung der Primer („*annealing*“: 30 s 54-62 °C) und anschließendem Polymerisationsschritt (72 °C; 1min/1kb). Ein finaler Elongationsschritt dient der Vervollständigung der Doppelstränge (72 °C 10 min).

3.2.1.5 Quantitative Echtzeit-PCR (Real-time-qPCR)

Der quantitativen Echtzeit-PCR (RT-qPCR) liegt das ursprüngliche Prinzip der Polymerasekettenreaktion zu Grunde. Mit der quantitativen Echtzeit-PCR (RT-qPCR) lassen sich Expressionsprofile von Genen erstellen und analysieren. Eine kontinuierliche Messung von Laser-induzierten Fluoreszenzsignalen ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse. Voraussetzung für diese Methode ist das Umschreiben von mRNA durch reverse Transkription in cDNA (siehe Kapitel 3.2.1.3). Die durchgeführten RT-qPCRs basieren auf dem Farbstoff SYBR *Green*, der unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert und fluoresziert. Die Fluoreszenzsignale werden nach jedem Amplifikationsschritt gemessen. Eine quantitative Aussage über das Expressionsniveau eines Gens ist möglich, da die Zunahme an Fluoreszenz und die Menge an neusynthetisierten PCR-Produkten über einen weiten Bereich proportional zueinander sind. Aus den Fluoreszenzdaten kann die Ausgangsmenge an cDNA und damit die Menge an mRNA bestimmt werden. Durch die unspezifische Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffs werden neben den spezifischen Amplifikaten auch unspezifische Amplifikate und Primer-Dimere detektiert. Eine abschließende Schmelzkurvenanalyse muss daher durchgeführt werden, um die Spezifität des gemessenen Amplifikats zu garantieren. Kleinere PCR-Produkte wie beispielsweise Primer-Dimere haben eine niedrigere Schmelztemperatur.

Anwendung der quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) bei Expressionsanalysen

Für den Reaktionsansatz wurde der Fertigmix „Absolute QPCR SYBR Green Mix“ (Thermo Fisher Scientific, Hamburg) eingesetzt. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

5 µl Absolute QPCR SYBR Green Mix
0,25 µl Primermix (je 10 µM)

Dieser Mix wurde in die Vertiefungen einer 96- well- Platte vorgelegt und 4,75 µl einer vorverdünnten cDNA (1:20 oder 1:50) zupipettiert. Eine Normalisierung der Werte wurde über das Haushalts-Gen *L27* vorgenommen. Jede Probe wurde standardmäßig als technisches Triplikat angesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden stets gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Die Messung wurde mit dem „Mx3000P qPCR System“ (Stratagene (Niederlande)) durchgeführt.

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm benutzt:

Initiale Denaturierung und Aktivierung der <i>hot-start</i> - Polymerase	15 min 95 °C	
Denaturierung	15 s 95 °C	40 Zyklen
<i>Annealing</i>	20 s 60 °C	
Elongation	30 s 72 °C	

Anwendung der quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) nach ChIP

Nach einer Chromatin-Immünpräzipitation (siehe Kapitel 3.2.1.6) wurde zur Analyse der präzipitierten DNA ebenfalls die RT-qPCR verwendet. Hierbei fand eine spezifische Amplifikation eines definierten genomischen Bereichs statt. Der Reaktionsansatz sah dabei wie folgt aus:

5 µl Absolute QPCR SYBR Green Mix
0,5 µl Primermix (je 5 pmol/µl)
3,5 µl A. a. i
1 µl präzipitierte DNA

Das hierfür genutzte PCR-Profil sah wie folgt aus:

Initiale Denaturierung und Aktivierung der <i>hot-start</i> - Polymerase	15 min 95 °C	
Denaturierung	15 s 95 °C	40 Zyklen
<i>Annealing</i>	20 s 60 °C	
Elongation	15 s 72 °C	

In der Auswertung wird der Anteil der präzipitierten DNA relativ zur eingesetzten DNA-Menge bestimmt. Wenn 1 % der Gesamtchromatinmenge als Input-DNA-eingesetzt wurden, entspricht der Anteil der präzipitierten DNA:

$$\text{Anteil}_{\text{Input}} (\%) = \frac{1}{2^{(CT_{\text{Probe}} - CT_{\text{Input}})}}$$

Der Fehler der Messung wurde nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung berechnet. Die Standardabweichung der Einzelmessung aus den technischen Triplikaten wurde einbezogen.

3.2.1.6 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation wird angewendet, um die direkte oder indirekte Bindung von Proteinen an bestimmte Bereiche der DNA zu bestimmen. Zellen wurden hierbei in größerem Maßstab, auf 15 cm-Zellkulturschalen, kultiviert. Für eine Kreuzvernetzung von Proteinen an die DNA, wurden die Zellen mit 1 % Formaldehyd für 10 min fixiert. 125 mM Glycin für eine Inkubationszeit von 5 min ließen das verbliebene Formaldehyd abreagieren. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Abschaben geerntet. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 4 °C innerhalb von 5 min pelletiert und dann weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen zunächst mit ChIP-Lysepuffer I behandelt (1 ml pro Schale). Um ungewünschtem Abbau von Proteinen entgegenzuwirken, wurde der Lysepuffer mit einem Gemisch aus Proteaseinhibitoren (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Nach mindestens 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellkerne mit ChIP-Lysepuffer II (1 ml pro Schale) aufgeschlossen. Die Inkubation auf Eis sollte dabei mindestens 10 min dauern. ChIP-Lysepuffer II wurde ebenfalls mit einem Gemisch aus Proteaseinhibitoren (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Zum Scheren des Chromatins wurden die Proben sonifiziert (20 % Amplitude, 60 Pulse, 1 s Puls, 2-5 s Pause). Die

entstandenen DNA-Fragmente waren dabei zwischen 500 und 1000 bp groß. Überprüft wurde die Schereffizienz durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.2.1.7). Während des Schallvorgangs mussten die Proben stark gekühlt werden. Das Chromatin wurde bei 13.500 rpm 4 °C für 15 min zentrifugiert und so von Zelltrümmern befreit. Zum Klären des Chromatins („*preclearing*“) wurde es mit einem unspezifischen IgG-Pool auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Pro 100 µl Protein A-Sepharose (50 % Gemisch) wurden 10 µg unspezifischer IgG-Pool mit der Sepharose für mindestens 30 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend zweimal mit ChIP-Lysepuffer II gewaschen, ein 50 % Gemisch wiederhergestellt und zum Chromatin gegeben. 1 ml Chromatin wurde dabei mit 100 µl IgG-gekoppelter Protein A-Sepharose für 30 - 60 min auf dem Überkopfschüttler geklärt. Danach wurden die Proben bei 2000 rpm 1 min zentrifugiert und das geklärte Chromatin in die Bindungsreaktion mit spezifischen Antikörpern eingesetzt. Bei der verwendeten Protein A-Sepharose wurden im Vorhinein unspezifische Bindungsstellen für DNA und Proteine blockiert. Die Sepharose wurde dafür mit 1 mg/ml BSA und 400 µg/ml Lachssperma-DNA und Proteaseinhibitoren über Nacht auf dem Überkopfschüttler inkubiert. 300-500 µl Chromatin wurden mit 4 µg Antikörper versetzt und über Nacht auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Zuvor wurden 1 % des in die Bindungsreaktion eingesetzten Gesamtchromatins als Input abgenommen. Am nächsten Tag wurden für die Immunpräzipitation 50 µl blockierte Protein A-Sepharose zu jeder Probe hinzugegeben und die Proben anschließend erneut 1 bis 3 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Proben wurden nun gewaschen. Mit je 1 ml fanden zuerst ein Waschschrift mit ChIP-Waschpuffer I, ein Waschschrift mit ChIP-Waschpuffer II und zwei Waschschriffe mit ChIP-Waschpuffer III statt. Es folgten zwei Waschschriffe mit TE-Puffer. Die Elution erfolgte mit frisch angesetztem ChIP-Elutionspuffer. Die Proben wurden hierbei zweimal mit 200 µl ChIP-Elutionspuffer unter starkem Schütteln für 15 min bei 65 °C inkubiert. Die abgenommene Inputprobe wurde ebenfalls mit 400 µl Elutionspuffer versetzt und allen Proben wurde Reversionsmix, der die Kreuzvernetzungen zwischen DNA und Proteinen wieder löst, zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 65 °C. Zur DNA-Reinigung wurde das „PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Jede Probe wurde mit 2,2 ml Bindungspuffer (PB) versetzt es folgte eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Nach einem Waschschrift mit 550 µl Waschpuffer PE wurden die Säulen trocken zentrifugiert und es folgten zwei Elutionsschriffe mit jeweils 50 µl Puffer EB. Die Säule wurde dabei 5 min mit dem Puffer inkubiert und 1 min bei 13.500 rpm zentrifugiert.

Um die spezifische Anreicherung von Proteinen an definierten Regionen im Genom zu untersuchen, wurde eine RT-qPCR Analyse (siehe Kapitel 3.2.1.5) durchgeführt. Neben der zu analysierenden Region im Genom sollte immer auch eine negative Kontrollregion, an der der Faktor bekanntermaßen nicht bindet, untersucht werden.

3.2.1.7 Analyse der DNA durch Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lässt sich negativ geladene DNA der Größe nach auftrennen. Durch die Siebstruktur der Agarose wandern große DNA-Fragmente langsamer entlang des elektrischen Feldes als kleine. Es wurden, je nach Fragestellung, 1-2%ige Agarosegele verwendet. Als Größenstandards dienten die Kapitel 3.1.4.2 vermerkten DNA-Größenstandards. Die angelegte Spannung wurde variabel zwischen 50 und 140 V gewählt und die Auftrennung erfolgte mit 1x TAE als Laufpuffer. Die Proben wurden mit den entsprechenden Mengen Ladepuffer („6x Orange Loading Dye Solution“, Fermentas) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach der gewünschten Laufzeit konnte durch die interkalierende Eigenschaft des Ethidiumbromids, welches im Gel enthalten ist, die aufgetrennte DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe einer Video- und Printanlage (Mitsubishi, Japan) wurde das Ergebnis abschließend dokumentiert.

3.2.1.8 Herstellung von Proteinextrakten

Zum einen wurden denaturierte Gesamtzell-Extrakte zur weiteren Analyse im SDS-PAGE und Western Blot Verfahren hergestellt. Hierbei wurden Zellen, nachdem sie mit PBS gewaschen wurden, direkt in 2x SDS-Probenpuffer (Sigma-Aldrich, Steinheim) abgeschabt, lysiert und 5 – 10 min bei 95 °C erhitzt. Das Volumen richtete sich dabei nach der Größe der Kulturschale und der Anzahl der Zellen und betrug zwischen 30 und 150 µl. Zum Verdau der Nukleinsäuren wurde vor dem Erhitzen der Proben noch Benzonase zugefügt und bei RT für 10 min inkubiert.

Als weitere Methode zur Proteinextraktion für die SDS-PAGE wurde der FLAG-Lysepuffer verwendet. Die Zellen wurden ebenfalls mit PBS gewaschen und in Lysepuffer abgeschabt. Das Volumen richtete sich erneut nach der Größe der Kulturschale und der Anzahl der Zellen und betrug zwischen 30 µl und 500 µl. Um einen Abbau der Proteine zu verhindern wurde der Lysepuffer mit einem Gemisch aus Proteaseinhibitoren (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt (1 µl pro 1 ml Lysepuffer).

Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Überstände 15 min bei 13500 rpm und 4 °C abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen in der Western Blot Analyse wurden entweder denaturierte Extrakte im SDS-Probenpuffer eingesetzt oder das „Bio-Plex Cell Lysis Kit“ (BioRad, München) verwendet. In diesem Fall wurde der Lysepuffer mit den Zusätzen des Herstellers versetzt und die Zellen darin aufgenommen. 3×10^6 Zellen auf einer 10 cm-Kulturschale wurden in 300 µl Lysepuffer aufgenommen. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei -80 °C und anschließendes Auftauen für 15 min auf Eis. Die Proben wurden nun 10 min im Ultraschallbad sonifiziert. Dieser Zyklus aus einfrieren, auftauen und sonifizieren wurde wiederholt, um einen kompletten Zellaufschluss zu garantieren. In einem 20-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13500 rpm (4 °C) wurden die Lysate von Zelltrümmern befreit und die Überstände bei -20 °C gelagert.

3.2.1.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Konzentration von Proteingemischen wurde nach Bradford bestimmt. Hierbei bindet der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 an Proteine. Dies führt zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm. Durchgeführt wurde die Messung mit dem kommerziell verfügbaren „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (BioRad, München). Bevor die Proteinextrakte gemessen wurden, wurde eine Eichkurve mit BSA erstellt, um die Konzentration der Extrakte zu ermitteln. Die Extrakte wurden 1:10 verdünnt und 4 µl zu 200 µl der Farbstoff-Reagenz (1:5 Verdünnung des Farbstoffkonzentrats) zupipettiert. Die Messung der Absorption erfolgte in Duplikaten oder Triplikaten und wurde bei 595 nm mit dem „ELISA-Reader SPECTRA MAX340“ (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

3.2.1.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können die einzelnen Komponenten eines Proteingemisches aufgetrennt und analysiert werden. Die Eigenladung der Proteine wird durch das anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) maskiert, welches sich in die Proteine einlagert. Somit erfolgt innerhalb eines elektrischen Feldes eine Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes.

Als Trägermatrix dient Polyacrylamid, welches ein Polymerisationsprodukt aus Acrylsäureamid und N,N'-Methylenbisacrylsäureamid ist. Diese Vernetzung wird durch APS (Ammoniumpersulfat) in Gang gesetzt, indem es freie Radikale bildet, die mit Acrylamid reagieren. Als Katalysator der Polymerisation dient TEMED (Tetramethylethyldiamin), da es die Radikalbildung von APS erleichtert.

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wandern die Proteine zuerst in ein Sammelgel ein (pH 6,8) und werden fokussiert. Die Auftrennung der Proteine findet anschließend im Trenngel (pH 8,8) statt, wobei sich die Acrylamidkonzentration nach dem Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins richtet. In der Regel wurden 8 % oder 10 %ige Trenngelle verwendet, die für eine gute Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 120 kDa sorgen. Proteine kleineren Molekulargewichtes wurden in 12%igen Trenngelen aufgetrennt.

Die aufzutrennenden Proteinproben waren entweder direkt in 2x SDS-Probenpuffer (Sigma-Aldrich, Steinheim) geerntet oder wurden zusätzlich zum Lysepuffer noch mit 4x SDS-Probenpuffer „Roti-Load“ (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben 5 min bei 95 °C erhitzt. In der Regel wurden 10 - 30 µg Gesamtprotein zur Analyse eingesetzt. Zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden wurde neben den Proben ein Molekulargewichtsmarker („Prestained Protein ladder“, Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Je nach Größe der Gelapparatur (PeqLab, Erlangen) erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 20 - 40 mA für 1,5 - 2h. Die weitere Analyse der Proteine erfolgte im Western Blot Verfahren.

3.2.1.11 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegtes elektrisches Feld auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) transferiert. Anschließend können die Proteine mittels spezifischer Antikörper in einer enzymatischen Nachweisreaktion detektiert werden.

Elektrotransfer

Der Elektrotransfer erfolgte nach dem SemiDry-Verfahren. Whatman-Papiere und PVDF-Membran wurden in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zuvor noch mit Methanol benetzt. Whatman-Papiere, Membran und Gel wurden im Elektroblocher folgendermaßen unter Vermeidung von Luftblasen angeordnet:

Kathode
2 Lagen Whatman-Papier
Gel
Membran
2 Lagen Whatman-Papier
Anode

Die Transferzeit betrug, je nach Prozentigkeit des Trenngels, 60 - 90 min bei 1,3 mA/cm² Membranfläche.

Immunoblot

Die spezifische Detektion bestimmter Proteine erfolgte dann in einem indirekten Enzym-Immunoassay. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran zunächst für mindestens 1 h bei RT mit 5 % (w/v) Magermilchpulver oder 3 % (w/v) BSA in PBS oder TBST inkubiert. Die spezifische Bindung des Erstantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran in drei Waschschritten von ungebundenem Antikörper befreit und anschließend für mindestens 1 h bei 4 °C mit dem HRP-gekoppelten („*horseradish peroxidase*“, Peroxidase aus dem Meerrettich) Zweitantikörper inkubiert. Der spezifische Nachweis des Proteins beruht auf der Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form durch das Enzym HRP. Bei dieser Reaktion kommt es zur Emission von Licht (Chemolumineszenz), was von der „ChemiDoc Universalhood III“ (BioRad, München) detektiert wurde. Es wurde eine kommerziell erhältliche Chemolumineszenzlösung („Luminata forte“, Millipore Corporation (USA)) verwendet, deren Inkubation 5 min betrug. Die Expositionsdauer richtete sich nach dem Antikörper und dauerte zwischen 2 s und 20 min. Zur Quantifizierung der Chemolumineszenzsignale wurde die Software „Image Lab 5.0“ (BioRad, München).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper wie folgt verwendet:

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-PDK4 1:1000 in 3 % BSA-TBST	Anti-Maus 1:5000 in 3 % BSA-TBST
Anti- β -Aktin 1:10.000 in 5 % MP-TBST	Anti-Maus 1:10.000 in 5 % MP-TBST
Anti-phospho-AKT (Ser473) 1:1000 in 3 % BSA-TBST	Anti-Kaninchen 1:4000 in 5 % MP-TBST
Anti-AKT 1:1000 in 5 % MP-TBST	Anti-Ziege 1:3000 in 5 % MP-TBST
Anti-LDH 1:1000 in 5 % MP-TBST	Anti-Kaninchen 1:10.000 in 5 % MP-TBST
Anti-ERK 1:2000 in 5 % MP-TBST	Anti-Kaninchen 1:4000 in 5 % MP-TBST
Anti-phospho-ERK 1:4000 in 3 % BSA-TBST	Anti-Maus 1:3000 in 5 % MP-TBST
Anti-CREB 1:1000 in 5 % MP-TBST	Anti-Maus 1:3000 in 5 % MP-TBST
Anti-phospho-CREB (Ser133) 1:1000 in 3 % BSA-TBST	Anti-Kaninchen 1:4000 in 5 % MP-TBST

3.2.1.12 Bestimmung der Glukoseaufnahme in Zellen

Die Aufnahme der Glukose durch Zellen liefert wichtige Hinweise über deren Glukosemetabolismus. Es wurde hierfür das „Glucose Uptake Fluorometric Assay Kit“ der Firma BioVision (USA) verwendet. Da die aufgenommene Glukose in den Zellen weiter verstoffwechselt wird, wird die Aufnahme von 2-Deoxyglukose (2-DG) innerhalb von 20 min gemessen. Nach der Aufnahme durch Glukosetransporter wird 2-DG durch die Hexokinase in 2-DG-6-phosphat (2-DG6P) umgewandelt. Dies kann in der Glykolyse nicht weiter metabolisiert werden, akkumuliert in der Zelle und ist somit ein Maß für die 2-DG-Aufnahme und damit für die Glukoseaufnahme in die Zelle. 2-DG6P wird enzymatisch oxidiert und ein Indikator emittiert in Anwesenheit von NADPH (Nicotinamidenindinukleotidphosphat) fluoreszentes Licht. Die Fluoreszenzsignale sind im linearen Messbereich ein Maß für die Menge an aufgenommener Glukose. Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Volumenangaben aus dem Herstellerprotokoll beziehen sich auf das 96-well-Format. Sie wurden für das verwendete 48-well-Format übernommen. Es wurden 25 μ l Extrakt in die Messung eingesetzt. Die Messung erfolgte in Replikaten mit dem „Multilabel Counter Victor3V

1420“ (Perkin Elmer, Turku, FI). Im Anschluss wurde mit den Extrakten eine Bradfordmessung zur Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kapitel 3.2.1.9) durchgeführt. Somit konnte eine Normalisierung auf die Proteinmenge vorgenommen werden. Zusätzlich wurden die ermittelten Glukosekonzentrationen auf die Zellzahl normiert.

3.2.1.13 Bestimmung der L-Lactatsekretion von Zellen

Nach der Verstoffwechslung von Glukose zu Pyruvat in der Glykolyse kann das Enzym L-Lactatdehydrogenase (LDH) die Reaktion von Pyruvat zu L-Lactat katalysieren. Dabei wird der Ko-Faktor NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) oxidiert. Diese Reaktion kann in Zellen sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen (Warburg-Effekt) stattfinden. Das L-Lactat wird von den Zellen sezerniert und kann im Überstand gemessen werden.

Bei der Lactatbestimmung wird das sezernierte L-Lactat durch die L-LDH im Reaktionsansatz oxidiert. Dabei wird NAD zu NADH reduziert, welches ein Absorptionsmaximum bei 340 nm aufweist. Die Absorption bei 340 nm ist proportional zur NADH-Menge und damit ein Maß für die L-Lactatmenge in der Probe.

Zu einem definierten Zeitpunkt wurde ein Mediumwechsel bei den kultivierten Zellen (48-well-Format) durchgeführt und die Lactatsekretion nach 6 h gemessen.

In die Vertiefungen einer 96-well-Platte wurden 200 µl des folgenden Ansatzes vorgelegt:

250 µl Lactat Assay Puffer

25 µl NAD (Ausgangskonzentration: 17 mg/ml)

0,5 µl L-LDH (Ausgangskonzentration: 5 mg/ml)

5 µl Zellüberstand (Medium) wurden zupipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende Messung bei einer Wellenlänge von 340 nm mit dem „ELISA-Reader SPECTRA MAX340“ (MWG Biotech, Ebersberg). Um die Lactatkonzentration in den Proben zu ermitteln, wurde eine Lactat-Standardreihe mitgeführt.

Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 50 µl Puffer (10 mM Tris, 0,1 % Triton X-100) lysiert und 600 µl einer Bradfordlösung („Protein Assay Dye Reagent Concentrate“, BioRad, München; Verdünnung 3:10) zur Bestimmung der Proteinkonzentration zugegeben. Zusätzlich zur Normierung auf die so ermittelte

Proteinkonzentration nach Bradford bei 595 nm, wurden die Lactatkonzentrationen auf die Zellzahl normiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen fanden an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 statt. Um Kontamination zu vermeiden herrschten sterile Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten bzw. sterilisierten Materialien.

3.2.2.1 Verwendete Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden standardmäßig bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem CO₂-begasbaren Inkubator (5 % CO₂) in 10 cm-Zellkulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht) kultiviert und je nach Wachstumseigenschaften alle 3 bis 5 Tage passagiert.

Zelllinie	Herkunft	Zelltyp	Kulturbedium
SKOV-3	ATCC-HTB-77	humane, ovariäre Adenokarzinomzellen	McCoy's 5a Medium Modified 10 % FCS
IGROV-1	T. Hagemann	humane, ovariäre Karzinomzellen	RPMI 1640 10 % FCS 2 g/l NaHCO ₃
OVCAR-3	ATCC-HTB-161	humane, epitheliale, ovariäre Adenokarzinomzellen	RPMI 1640 20 % FCS 0,01 mg/ml bovines Insulin
HEY	Frauenklinik UKGM	humane, ovariäre Karzinomzellen	DMEM 10 % FCS
MCF-10A	ATCC- CRL-10317	nicht-tumorigene Brustepithelzelllinie	DMEM/F12 5 % Pferdeserum 20 ng/ml EGF 0,5 µg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Choleratoxin 10 µg/ml Insulin

3.2.2.2 Der Umgang mit Zellen: Passagieren, Kryokonservierung, Auftauen und Zählen von Zellen

Passagieren

Um die Zellen zu passagieren, wurden sie zunächst durch einen Waschschrift mit PBS von Mediumrückständen befreit und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für eine 10 cm-Schale vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Dabei findet ein enzymatischer Verdau des Zell-Zell-Adhäsionsapparates statt und die Zellen lösen sich voneinander und vom Boden der Zellkulturschale. Die Zellen wurden in Serum-haltigen Kulturmedium resuspendiert. Dies führt zu einem Abstoppen des enzymatischen Verdau und die Zellen wurden je nach ihrem Wachstumsverhalten im Verhältnis 1:3 bis 1:8 ausplattiert.

Kryokonservierung

Auch bei der Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA vorsichtig vom Boden gelöst. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm wurde das Zellpellet im Einfriermedium (Zelllinienspezifisches Zellkulturmedium mit 20 % Serum und 7,5 % DMSO) resuspendiert und in 1 ml Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Um zu verhindern, dass die Zellen durch das zu schnelle Einfrieren platzen, wurde eine langsame Abkühlung in mehreren Schritten durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zunächst für zwei bis drei Tage bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bevor sie endgültig im Stickstofftank aufbewahrt wurden.

Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen fand im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Inkubator für 10 min statt. Je nach Menge der eingefrorenen Zellen wurde der Inhalt des Einfrierröhrchens auf eine der Zellzahl entsprechenden Zellkulturschale mit frischem Zellkulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um DMSO-Rückstände, welche das Zellwachstum beeinflussen, zu beseitigen. Oder die Zellen wurden nach dem Auftauen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der DMSO-haltige Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in frischem Kulturmedium ausplattiert.

Zählen von Zellen

Um eine definierte Zellzahl auszusäen erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe des Zellzählers „Cellometer Auto X 400“ (Nexcelom Bioscience, USA). Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA von den Kulturschalen abgelöst und gegebenenfalls gepoolt. Nach Aufnahme im

Zellkulturmedium wurde die Zellsuspension unter Berücksichtigung des Zelltyps quantifiziert.

3.2.3 Beschichtung von Zellkulturschalen

Zusätzlich zur adhärennten Kultivierung auf Standardzellkulturschalen wurden die Zelllinien versuchsabhängig auch auf beschichteten Zellkulturschalen für eine definierte Zeitdauer kultiviert.

Zum einen wurden Zellschalen mit Kollagen Typ I beschichtet (Invitrogen, Karlsruhe). Kollagen Typ I mit der Konzentration 50 µg/ml in 20 mM Eisessig wurde 1 h bei Raumtemperatur auf der Zellschale inkubiert. Bevor die Zellen darauf ausplattiert wurden, wurde die Beschichtung mehrfach mit PBS gewaschen.

Eine Beschichtung mit Matrigel (Corning, USA) erfolgte nach Herstellerangaben.

Um Zellen unter nicht-adhärennten Bedingungen zu kultivieren, wurden Zellkulturschalen mit 20 mg/ml POLY(2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE) (Poly-HEMA) beschichtet. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellkulturschalen mit PBS gewaschen.

3.2.4 Mycoplasmentest

Um einen unerwünschten Befall der verwendeten Zelllinien zu detektieren wurde in regelmäßigen Abständen von 4 Wochen ein Mycoplasmentest durchgeführt. Positiv getestete Zelllinien wurden umgehend sachgemäß entsorgt.

100 µl Zellkulturüberstand wurden 5 min bei 95 °C aufgeköcht und im Anschluss bei 13000 rpm für einige Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 10 µl Tris/HCl (10 mM, pH 8,8) zugefügt. Durch Mischen und anschließendem zentrifugieren bei 13.000 rpm erfolgte die Präzipitation. 1 µl des Überstandes wurden zur Detektion einer Kontamination durch Mycoplasmen in die PCR eingesetzt (Primer siehe Kapitel 3.1.6).

3.2.5 siRNA-Transfektion

siRNAs (19 - 21 bp) sind kleine, doppelsträngige RNA-Moleküle, die sich in den sogenannten RISC-Komplex („*RNA-induced silencing complex*“) einlagern. Die Ziel-mRNA aus der Zelle bindet, woraufhin es zu deren Degradation bzw. Inhibition der Translation kommt. Diese Technologie der RNA-Interferenz erlaubt es, die Expression eines bestimmten Gens zeitlich begrenzt zu hemmen. siRNAs sind für eine Vielzahl an

Genen kommerziell erhältlich und können durch Transfektion in die Zellen eingebracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden siRNAs der Firma Qiagen (Hilden) und GE Dharmacon (USA) verwendet. Soweit nicht anders vermerkt, wurde ein Pool aus vier verschiedenen Einzelsequenzen in die Transfektion eingesetzt.

Die Transfektion von siRNA erfolgte versuchsabhängig mit zwei verschiedenen Transfektionsreagenzien.

Zum einen erfolgte dies mit der Transfektionsreagenz „HiPerfect“ (Qiagen, Hilden). Hierbei wurden Zellen 1 - 4 h vor dem Transfektionsschritt ausgesät, sodass die ungefähre Konfluenz 60 - 80 % betrug. Die Zellen wurden daher wie folgt ausplattiert:

Zelllinie	Zellkulturschale	Zellzahl
SKOV-3	12-well Zellkulturplatten	2×10^5
	6-well Zellkulturplatten	8×10^5
	6 cm-Zellkulturschalen	$2,5 \times 10^6$
	10 cm- Zellkulturschalen	4×10^6

Die siRNA wurde in Opti-MEM-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt. Nach Zugabe des Transfektionsreagenz wurde 5 s gevortext. In einer Inkubationsphase von 5 – 10 min erfolgte die Komplexbildung und die Lösung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die finale Konzentration der siRNA betrug dabei standardmäßig 25 nM. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit Standardkulturmedium. Um eine effektive Depletion zu garantieren wurde die Transfektion nach 48 h wiederholt. Nach weiteren 48 h erfolgte die Ernte der Zellen.

Zellkulturschale	Medium pro Schale	Hiperfect pro Schale	siRNA-Lösung pro Schale
12-well Zellkulturplatten	1 ml	5 μ l	375 ng siRNA + 100 μ l Opti-MEM
6-well Zellkulturplatten	2 ml	10 μ l	750 ng siRNA + 100 μ l Opti-MEM
6 cm-Zellkulturschalen	4 ml	15 μ l	1280 ng siRNA + 100 μ l Opti-MEM
10 cm-Zellkulturschalen	8 ml	30 μ l	3000 ng siRNA + 200 μ l Opti-MEM

Für eine andere Variante der siRNA-Transfektion wurde das Reagenz „Viromers[®] Green“ (Lipocalyx, Halle) verwendet. Dieses Reagenz macht sich einen viralen Fusionsmechanismus zu Nutze. Nach der Aufnahme des Transfektionskomplexes in die Endosomen der Zelle, verlieren virale Fusionsproteine aufgrund des niedrigen pH-Wertes in den Endosomen ihre Ladung und inserieren in die endosomale Membran. Dies führt zur effektiveren Freisetzung der siRNA ins Cytosol.

Am Tag der Transfektion wurden die Zellen für eine Konfluenz zwischen 60 und 80 % ausplattiert. 1 - 4 h später erfolgte die Transfektion der siRNA.

Hierbei wird die siRNA in Opti-MEM Medium verdünnt und zum Viromer hinzupipettiert. Durch auf- und abpipettieren wird die Lösung gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die siRNA-Viromer-Komplexe werden anschließend auf die Zellen getropft. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und weitere 48 h später die Ernte.

Die genaueren Reaktionsansätze lauteten wie folgt:

Zellkulturschale	Medium pro Schale	Viromers[®] Green pro Schale	siRNA-Lösung pro Schale
12-well Zellkulturplatten	1 ml	0,75 µl	0,28 µM siRNA in 35,4 µl Opti-MEM
6 cm-Zellkulturschalen	4 ml	3,9 µl	0,28 µM siRNA in 195 µl Opti-MEM
10 cm-Zellkulturschalen	8 ml	7,8 µl	0,28 µM siRNA in 390 µl Opti-MEM

Soweit nicht anders vermerkt wurde bei siRNA-Transfektionen stets ein Pool aus 4 verschiedenen Sequenzen zur Hemmung der Expression eines Gens verwendet

3.2.6 Computerauswertungen und Datenbankanalysen

Für Datenbankanalysen und Homologievergleiche wurden die frei zugänglichen Datenbanken des NCBI („*US National Center for Biotechnology Information*“; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) und der „*Ensembl Genome Browser*“

(<http://www.ensembl.org>) genutzt. Insbesondere bei Recherchen nach genomischen Bereichen für die Auswertung von Chromatin-Immunpräzipitationen wurde mit dem „*UCSC Genome Browser*“ (<http://genome-euro.ucsc.edu>) gearbeitet.

3.2.7 RNA-Sequenzierung

Nach Isolierung der RNA fand ein DNase-Verdau („NUCLEOSPIN RNA II“, Macherey-Nagel, Düren) statt. Die darauffolgende RNA-Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben mit dem „RNeasy MinElute Cleanup Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Anschließend wurde die mRNA mit Hilfe des „TruSeq Stranded mRNA Library Prep“ (Illumina, San Diego (USA)) aufgereinigt und fragmentiert. Die Sequenzierung fand auf einem Illumina HiSeq 1500 im *Rapid Run Modus* nach Herstellerangaben statt. Die erhaltenen Sequenzfragmente wurden mittels der Software STAR („*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*“) auf das humane Genom (GrCH38, Ensembl Revision 81) aligniert. Die Anzahl der Fragmente pro Gen wurde bestimmt, aber nur die Treffer innerhalb der Exone Protein-kodierender Gene berücksichtigt. Da die Proben auf eine Million Treffer normalisiert wurden, erhält man die Einheit *transcripts per million*. Je nach Fragestellung wurden die Daten im Anschluss anhand der *IPA Upstream Regulator Analysis* analysiert.

Die RNA-Sequenzierung wurde in der *Genomics Unit* des ZTI Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Stiewe durchgeführt. Die biostatistische Auswertung übernahmen Prof. Dr. Rolf Müller und Florian Finkernagel.

3.2.8 Statistische Auswertung

Um Signifikanzen zu berechnen wurde in der Regel ein ungepaarter, zweiseitiger t-test mit Hilfe der Software „GraphPad t-test calculators“. (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD>) angewendet

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Genexpression unter verschiedenen Adhärenzbedingungen für das Ovarialkarzinom

4.1.1 Analyse der Expression von metabolisch aktiven Genen im Ovarialkarzinom

Wie einleitend beschrieben, sind die Folgen des Adhärenzverlustes von Tumorzellen maßgeblich für die hohe Letalität bei Ovarialkarzinompatientinnen verantwortlich.

Wichtige Aspekte, die daher eingangs untersucht werden sollten, waren die Auswirkungen von Adhärenz und Adhärenzverlust auf die Genexpression bezüglich des Metabolismus in diesen Zellen. Begründet ist dies im entscheidenden Anteil metabolischer Veränderungen an der Tumorprogression (siehe Kapitel 2.1).

Das Loslösen der Ovarialkarzinomzellen in den Aszites könnte den Metabolismus beeinflussen, beispielsweise als Anpassung an die hypoxische Umgebung des Aszites (Kim et al., 2006b). In der Literatur finden sich für die nicht-tumorigene Brustepithelzelllinie MCF-10A zudem Hinweise auf Veränderungen des metabolischen Phänotyps durch alleinigen Verlust der Adhärenz (Grassian et al., 2011). Es ist außerdem bereits aus Mausmodellen bekannt, dass Ovarialkarzinomzellen in fortgeschrittenen Tumorstadien und Tumorstammzellen einen glykolytischen Metabolismus aufweisen (Anderson et al., 2014; Anderson et al., 2013).

Um einen Eindruck vom Expressionsstatus metabolismusrelevanter Gene bei Adhärenz und Adhärenzverlust zu bekommen, wurden primäre Tumorzellen aus dem Aszites von zwei Ovarialkarzinompatientinnen (nach arbeitsgruppeninterner Nomenklatur: Proben OC38 und OC122) isoliert und die Genexpression mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Die Primärzellen wurden adhärent und als Sphäroide in für humane Ovarialkarzinomzellen optimiertem OCMI-Medium oder in Aszites-haltigem Zellkulturmedium kultiviert (Ince et al., 2015). Die Kultivierung und Präparation der Proben erfolgte in der AG um Dr. Silke Reinartz. Die Analyse des Transkriptoms wurde in der *Genomics Unit* des ZTI Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Thorsten Stiewe durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.7). Die bioinformatische Datenauswertung erfolgte durch Prof. Dr. Rolf Müller und Florian Finkernagel. Abbildung 4.1A zeigt die Genexpression in primären Tumorzellen aus zwei Patientinnen, die adhärent und als Sphäroide in den zwei Medien kultiviert waren. In Abbildung 4.1B wurde der Faktor der Expressionsänderung bei Sphäroiden im Vergleich zu adhärennten Zellen aus Abbildung 4.1A ermittelt und unter Berücksichtigung der Kultivierung in OCMI-Medium

oder in Aszites-haltigem Zellkulturmedium dargestellt. Es stellte sich heraus, dass von den untersuchten Genen, deren Produkte an metabolischen Prozessen wie beispielsweise der Glykolyse, dem TCA-Zyklus oder der Fettsäuresynthese beteiligt sind, einzig *PDK4* in seiner Expression von Adhärenz und Adhärenzverlust beeinflusst war. Die Expression in adhärennten Zellen war demnach gegenüber Sphäroiden deutlich reprimiert (Abb. 4.1A). Die Kultivierung in OCMI-Medium oder Aszites-haltigem Medium hatte, auf die dem Umkehrschluss nach induzierte *PDK4*-Expression in Sphäroiden, keinen Einfluss (Abb. 4.1B).

Da *PDK4* als wichtigster Regulator des PDC gilt, diesen inaktiviert und damit den Glukosestoffwechsel an entscheidender Stelle zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus beeinflusst, stellt sich aufgrund der starken Beeinflussung der *PDK4*-Expression die Frage nach deren funktioneller Relevanz. Sollte der Glukosemetabolismus in Ovarialkarzinomzellen durch Veränderungen in den Adhärenzbedingungen beeinflusst sein, könnte dies auf die Veränderungen der *PDK4*-Expression zurückgeführt werden. Diesem Aspekt wird in Kapitel 4.1.4 nachgegangen. Hinweise hierfür finden sich in der Literatur, wo in nicht-transformierten MCF-10A Zellen gezeigt werden konnte, dass die *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust den Umsatz des PDC herabsetzt (Grassian et al., 2011; Kamarajugadda et al., 2012). Die *PDK4*-Expressionsänderung könnte daher besonders in Bezug auf Therapieansätze wichtig sein. Der Fokus der vorliegenden Arbeit richtete sich demnach auf eine genaue Analyse der an der Expressionsregulation durch Adhärenz und Adhärenzverlust beteiligten Mechanismen.

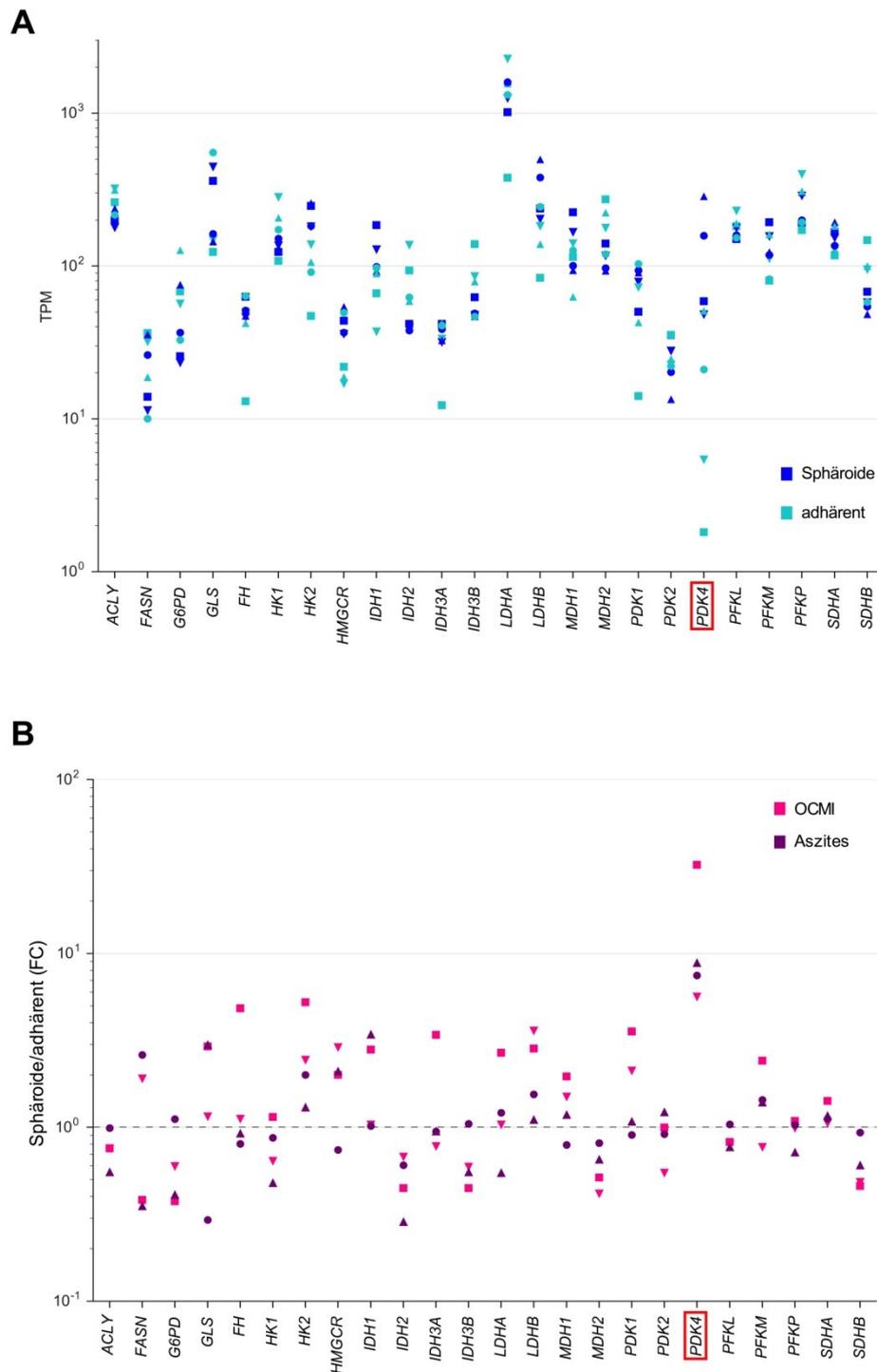


Abb. 4.1. Vergleich der Expressionsmuster von Metabolismusgenen aus Ovarialkarzinompatientinnen (Auszug aus RNA-Sequenzierung).

Primäre Tumorzellen wurden aus dem Aszites von zwei Ovarialkarzinompatientinnen isoliert und als adhärenente Zellen oder Sphäroide in OCMI-Medium oder Aszites-haltigem Medium kultiviert. Die Analyse der isolierten RNA erfolgte anhand RNA-Sequenzierung in der *Genomics Unit* des ZTI Marburg und die Daten wurden anschließend durch Prof. Dr. Rolf Müller und Florian Finkernagel bioinformatisch ausgewertet. **A)** Dargestellt sind die Expressionslevel ausgewählter Metabolismusgene in adhärenenten Zellen und Sphäroiden, ungeachtet ihres Kulturmediums. Symbole kennzeichnen die zusammengehörenden Proben. **B)** Dargestellt ist der Quotient der Expression von Sphäroiden zu adhärenenten Zellen unter Berücksichtigung des Kulturmediums, ermittelt aus A).

TPM: *transcripts per million*; FC: *fold change*

4.1.2 Analyse der adhärenzvermittelten *PDK4*-Repression in Ovarialkarzinomzelllinien.

Die Verwendung von Primärmaterial für die nachfolgenden Analysen ist nicht zielführend, da sich die aus dem Aszites isolierten Zellen zeitlich nur sehr begrenzt in Kultur halten und sich nicht in dem Maße expandieren lassen, wie es die folgenden Experimente erfordern würden. Es wurde daher nach einer geeigneten Ovarialkarzinomzelllinie gesucht. Ein langfristiges Ziel ist es, die daraus gewonnenen Erkenntnisse in Primärzellen zu verifizieren und für therapeutische Zwecke anzuwenden.

Um herauszufinden, welche Ovarialkarzinomzelllinie sich dazu eignet, die adhärenzvermittelte Genregulation von *PDK4* zu untersuchen, wurden einige gängige humane Ovarialkarzinomzelllinien analysiert. SKOV-3, HEY, IGROV-1 und OVCAR-3 Zellen wurden 24 h unter adhärenten und nicht-adhärenten Bedingungen kultiviert und die *PDK4*-Genexpression nach RNA-Extraktion (siehe Kapitel 3.2.1.1) und cDNA-Synthese (siehe Kapitel 3.2.1.3) in der RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.5) ermittelt. MCF-10A Zellen dienten als Positivkontrolle, da für sie eine niedrigere *PDK4*-Expression in adhärennten Zellen vergleichend zu nicht-adhärennten Zellen bereits bekannt ist (Grassian et al., 2011).

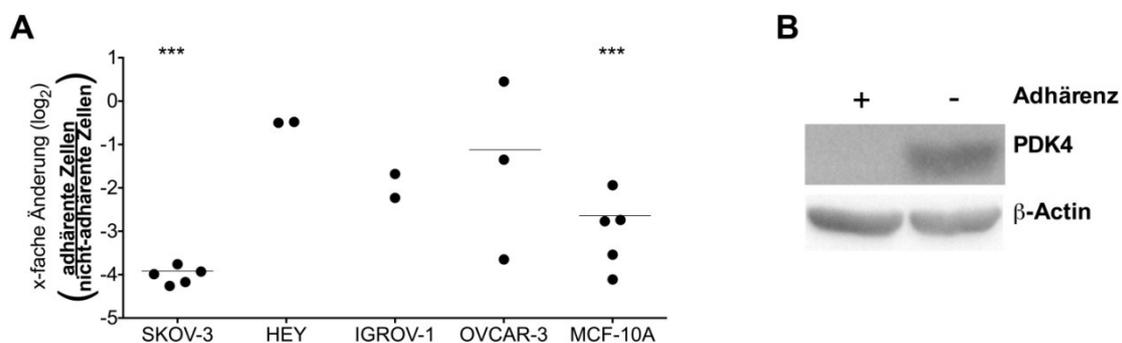


Abb. 4.2 Vergleich der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation in Ovarialkarzinomzelllinien und MCF-10A Zellen.

A) Humane Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV-3, HEY, IGROV-1, OVCAR-3) und die nicht-tumorigene Brustepithelzelllinie MCF-10A wurden 24 h unter adhärennten bzw. nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert. Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte die cDNA-Synthese und die Analyse der *PDK4*-Expression in der RT-qPCR. Die Abbildung zeigt die relative Änderung der *PDK4*-Expression zwischen adhärennten und nicht-adhärennten Zellen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus technischen Replikaten dar und horizontale Striche kennzeichnen den Median aus biologischen Replikaten. *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zu nicht-adhärennten Zellen (t-Test) **B)** Die Genexpression von *PDK4* auf Proteinebene in SKOV-3 Zellen wurde durch Western Blot Analyse mittels *PDK4*-spezifischem Antikörper ermittelt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde ein β -Aktin-spezifischer Antikörper verwendet.

In Abbildung 4.2A ist die relative Expressionsänderung bei adhärennten Zellen gegenüber nicht-adhärennten Zellen dargestellt. Es stellte sich heraus, dass SKOV-3 Zellen die deutlich stärkste *PDK4*-Repression durch Adhärenz gegenüber IGROV-1 und OVCAR-3 Zellen aufwiesen. Die Analyse der funktionell relevanten *PDK4*-Expression auf Proteinebene in SKOV-3 Zellen (Abb. 4.2B) zeigte zudem im Western Blot Verfahren eine bis unter die Detektionsgrenze reduzierte Expression in adhärennten Zellen. Die transkriptionelle *PDK4*-Expression in HEY Zellen blieb dagegen durch Adhärenz unbeeinflusst (Abb. 4.2A). SKOV-3 Zellen bilden daher als einzige dieser Zelllinien die deutliche *PDK4*-Regulation der primären Ovarialkarzinomzellen ab. Zur detaillierten Untersuchung der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz im Ovarialkarzinom eignen sie sich demnach als Modellzelllinie. Bei SKOV-3 Zellen handelt es sich außerdem um die am häufigsten verwendete Modellzelllinie für *in vitro* Studien zum Ovarialkarzinom. Dass diese Zellen ursprünglich aus dem Aszites isoliert wurden, unterstreicht zusätzlich ihre Eignung als Modellzelllinie zu klinisch relevanten Phänomenen wie dem Adhärenzverlust (Beaufort et al., 2014; Domcke et al., 2013). Neben *PDK4* sind auch noch die Kinasen *PDK1*, *PDK2* und *PDK3* Vertreter der *PDK*-Familie. Sie sind ebenfalls in der Lage Einfluss auf den Glukosemetabolismus in Zellen zu nehmen, sodass auch ihre Expression in Abhängigkeit verschiedener Adhärenzbedingungen analysiert wurden. Hierfür wurden SKOV-3 Zellen 24 h unter adhärennten und nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert. In Abbildung 4.3 wurde die Expression der Gene *PDK1*, *PDK2*, *PDK3* und *PDK4* in der RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.) untersucht. Es wurde die x-fache Änderung der Genexpression bei adhärennten Zellen zu nicht-adhärennten Zellen ermittelt.

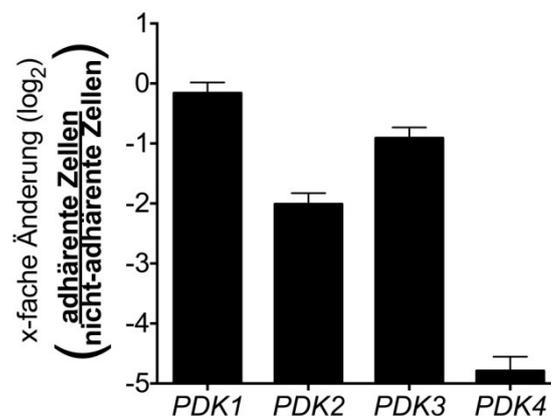


Abb. 4.3 Repression der *PDK4*-Expression durch Adhärenz.

SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter adhärennten oder nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert. Nach RNA-Isolierung und anschließender cDNA-Synthese wurde die Expression von *PDK1*, *PDK2*, *PDK3* und *PDK4* mittels RT-qPCR ermittelt. Dargestellt ist die relative Änderung der *PDK*-Expression zwischen adhärennten und nicht-adhärennten Zellen.

Es zeigte sich, dass die Expression von *PDK1* unter beiden Bedingungen weitgehend unverändert blieb. Die Gene *PDK2*, *PDK3* und *PDK4* waren in adhärennten Zellen gegenüber nicht-adhärennten Zellen weniger stark exprimiert, wobei die *PDK4*-Expression am stärksten durch Adhärenz vermindert war. Dies stimmt weitgehend mit den Ergebnissen der primären Tumorzellen überein (Abb. 4.1).

4.1.3 Kinetische Analyse der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Bisher konnte gezeigt werden, dass SKOV-3 Zellen, die 24 h unter adhärennten Bedingungen kultiviert wurden, eine reprimierte *PDK4*-Expression gegenüber Zellen aufwiesen, die über den gleichen Zeitraum in Suspension kultiviert wurden. Beziehungsweise ist dem Umkehrschluss nach die *PDK4*-Transkription in nicht-adhärennten Zellen im Vergleich zu adhärennten Zellen induziert. Um den Einfluss von Adhärenz und Adhärenzverlust auf die *PDK4*-Genexpression im zeitlichen Verlauf genauer zu charakterisieren, wurden kürzere Zeiträume analysiert.

Zum einen wurde die transkriptionelle *PDK4*-Aktivierung in nicht-adhärennten SKOV-3 Zellen kinetisch genauer untersucht. Dafür wurden Zellen für die angegebene Zeitdauer unter nicht-adhärennten Wachstumsbedingungen gehalten und die relative Expression von *PDK4* in der RT-qPCR ermittelt (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.) Im Vergleich zur bekannten *PDK4*-Induktion nach 24 h Adhärenzverlust zeigte sich die *PDK4*-Expression bereits zu früheren Zeitpunkten, nach 1 h und 3 h, induziert (Abb. 4.4A).

Zum anderen sollte die Kinetik der *PDK4*-Repression durch Adhärenz genau analysiert werden. SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert (Adhärenz 0 h) und adhärennten anschließend für die angegebenen Zeiträume (Abb. 4.4B). Die Kinetik zeigte, dass die *PDK4*-Transkription bekanntermaßen nach 24 h, aber bereits auch nach 3 h Adhärenz stark reprimiert war.

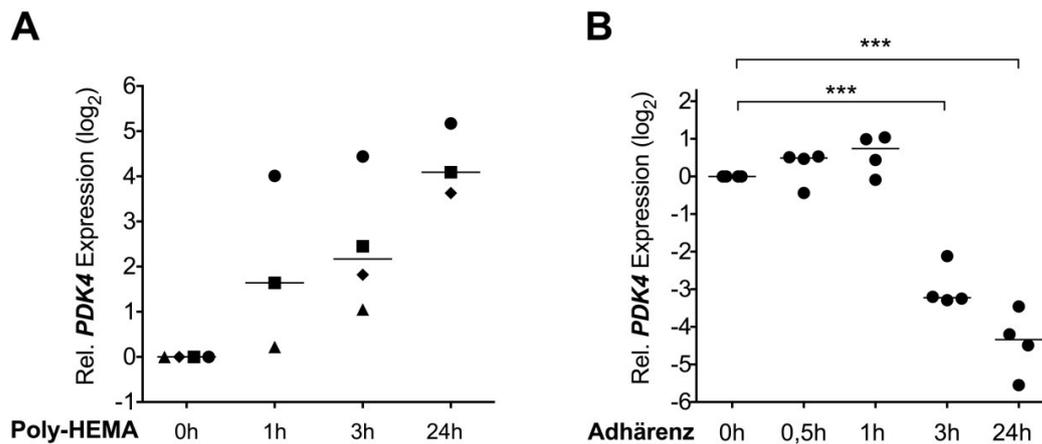


Abb. 4.4 Kinetik der adhärenzregulierten *PDK4*-Expression.

A) SKOV-3 Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer auf Poly-HEMA-beschichteten Zellkulturschalen unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert. In der RT-qPCR wurde die relative *PDK4*-Expression bezogen auf adhärenente Zellen (0 h) ermittelt. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus technischen Replikaten dar. Verschiedene Symbole kennzeichnen die verschiedenen biologischen Replikate. Horizontale Striche kennzeichnen den Median der biologischen Replikate. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf adhärenente Zellen (0 h). **B)** SKOV-3 Zellen, die 24 h unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert wurden (Adhärenenz 0 h), wurden erneut ausplattiert und adhärenierten für die angegebenen Zeiträume. Die *PDK4*-Expression wurde mit der RT-qPCR-Methode ermittelt. *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zu nicht-adhärenenten Zellen (t-Test).

4.1.4 Analyse des Glukosemetabolismus in adhärenenten und nicht-adhärenenten SKOV-3 Zellen

Nachdem die bisherigen Ergebnisse eine deutliche Regulation der *PDK4*-Expression durch Adhärenenz und Adhärenenzverlust aufgezeigt haben, stellte sich nun die Frage, ob diese veränderte Genexpression auch metabolische Auswirkungen hat, da PDKs die Aktivität des Schlüsselenzyms des Glukosemetabolismus, des PDCs („*pyruvate dehydrogenase complex*“, Pyruvatdehydrogenase-Komplex) hemmen (siehe Kapitel 2.2). An der entscheidenden Schaltstelle zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus katalysiert der Enzymkomplex die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und reguliert damit den Glukosestoffwechsel. Um dieser Frage genauer nachzugehen, wurden SKOV-3 Zellen 24 h unter adhärenenten und nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert und der Glukosemetabolismus unter dem Aspekt der relative Glukoseaufnahme und Lactatsekretion untersucht.

In Abbildung 4.5A ist die relative Glukoseaufnahme, die anhand der 2-Deoxyglukose-Aufnahme innerhalb von 20 min ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.2.1.12), von adhärenenten im Vergleich zu nicht-adhärenenten Zellen dargestellt. Interessanterweise nahmen adhärenente SKOV-3 Zellen signifikant mehr Glukose auf als nicht-adhärenente. Damit einhergehend zeigt Abbildung 4.5B zwar eine leicht verstärkte Lactatsekretion bei adhärenenten Zellen, allerdings nicht im gleichen Maße wie die Glukoseaufnahme steigt. Hierzu wurde die Menge an Lactat, die innerhalb von 6 h ins Medium sezerniert

wurde, gemessen und die relative Lactatsekretion von adhären zu nicht-adhären Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.13). Vergleicht man anschließend den Quotienten von Lactatsekretion zu Glukoseaufnahme (Abb. 4.5C), sank dieser signifikant in adhären gegenüber nicht-adhären Zellen. Dies bedeutet, dass adhäre Zellen weniger Lactat pro aufgenommenes Glukosemolekül produzierten und sezernierten. Im Umkehrschluss heißt dies für nicht-adhäre SKOV-3 Zellen, dass sie Pyruvat bevorzugt in Lactat umwandelten und einen vergleichsweise glykolytischen Phänotyp aufwiesen. Dies könnte mit der erhöhten *PDK4*-Expression in nicht-adhären SKOV-3 Zellen in Zusammenhang stehen, da *PDK4* den *PDC* hemmen und die Energiegewinnung durch Lactatbildung fördern kann.

Für ein besseres Verständnis dieses Prozesses ist es entscheidend, die transkriptionelle Regulation von *PDK4* in Abhängigkeit der Adhärenz genauer zu untersuchen.

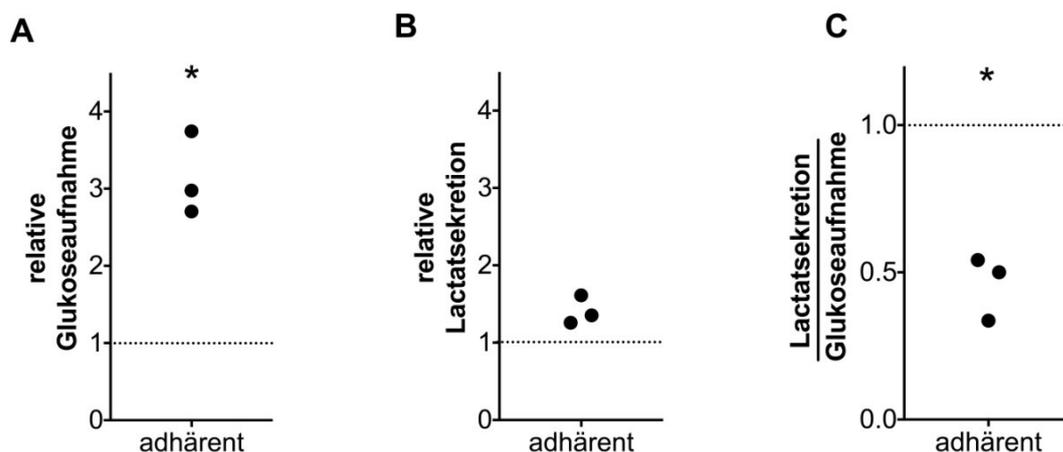


Abb. 4.5 Effekte der Adhärenz auf den Glukosemetabolismus.

SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter adhären bzw. nicht-adhären Bedingungen kultiviert. **A)** Im Anschluss wurde die Glukoseaufnahme anhand der 2-Deoxyglukose-Aufnahme innerhalb von 20 min bestimmt. Dargestellt ist die relative Glukoseaufnahme von adhären Zellen bezogen auf nicht-adhären Zellen. **B)** Die Lactatsekretion innerhalb von 6 h wurde anhand der Lactatmenge im Zellüberstand ermittelt. Daraus wurde die relative Lactatsekretion von adhären im Vergleich zu nicht-adhären Zellen bestimmt. **C)** Dargestellt ist der Quotient von Lactatsekretion zur Glukoseaufnahme bezogen auf nicht-adhären Zellen.

Abgebildet sind die Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten. * $p < 0,05$, signifikanter Unterschied zu nicht-adhären Zellen (Gepaarter t-Test).

4.1.5 Einfluss integrinvermittelter Adhäsion auf die *PDK4*-Expression

Die Beobachtung, dass Adhärenz die *PDK4*-Expression stark beeinflusst, legt nahe, dass integrinvermittelte Signalwege an dieser Transkriptionsregulation beteiligt sind. Wie einleitend beschrieben (siehe Kapitel 2.3.2), aktivieren Interaktionen zwischen Integrinen und ihren Liganden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, welche die

Transkription verschiedener Gene beeinflussen und Prozesse wie Proliferation und Apoptose in den Zellen steuern. Um zu untersuchen, ob die Adhäsion an die EZM über Integrine die Repression von *PDK4* vermittelt, wurden SKOV-3 Zellen, nachdem sie 24 h unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert wurden (Adhärenz 0 h), auf einer Matrigel-beschichteten Zellkulturschale ausplattiert (siehe Kapitel 3.2.3). Bei Matrigel handelt es sich um eine heterogene Mischung aus extrazellulären Matrixproteinen, die hauptsächlich Laminin und Kollagen Typ IV beinhaltet. Nach dreistündiger Adhäsion wurde die *PDK4*-Expression in der RT-qPCR analysiert (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.). In Abbildung 4.6A ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf nicht-adhärenente Zellen (Adhärenz 0 h) dargestellt. Es zeigte sich eine signifikante Repression der *PDK4*-Expression bei Zellen, die sowohl auf unbeschichteten Standard-Zellkulturschalen als auch auf Matrigel adhärerten. Wie Abbildung 4.6B zeigt, wiesen SKOV-3 Zellen nach dreistündiger Adhäsion auf der Extrazellulärmatrixkomponente Kollagen Typ I, vergleichend zu nicht-adhärenenten Zellen (Adhärenz 0 h), ebenfalls eine signifikant reduzierte *PDK4*-Expression auf.

Bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms spielt die Interaktion von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen an das RGD-Motiv von Fibronectin eine wichtige Rolle, worüber u. a. die Metastasierung in den Peritonealraum vermittelt wird (siehe Kapitel 2.3.1). Um zu klären, ob neben Laminin und Kollagen auch die Interaktion mit Fibronectin die *PDK4*-Expression beeinflusst, wurden nicht adhärenente SKOV-3 Zellen mit RGD-Peptid behandelt (Abb. 4.6C und D). RGD-Peptid blockiert die Interaktion zwischen Ligand und Integrin. Dazu wurden nicht-adhärenente SKOV-3 Zellen 30 min mit RGD-Peptid vorinkubiert und konnten anschließend in Anwesenheit von RGD-Peptid 3 h adhärenieren. Abbildung 4.6C zeigt das morphologische Bild von unbehandelten und RGD-Peptid-behandelten Zellen im Lichtmikroskop. In Abbildung 4.6D ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf nicht-adhärenente Zellen dargestellt. Die Behandlung mit RGD-Peptid hemmte zum einen das Anheften der Zellen (Abb. 4.6C) und zum anderen war die mit dem Adhärenieren der Zellen einhergehende *PDK4*-Repression unter RGD-Peptid-Behandlung inhibiert (Abb. 4.6D).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Interaktionen diverser Extrazellulärmatrixproteine mit verschiedenen Integrinen zu einer *PDK4*-Repression zu führen.

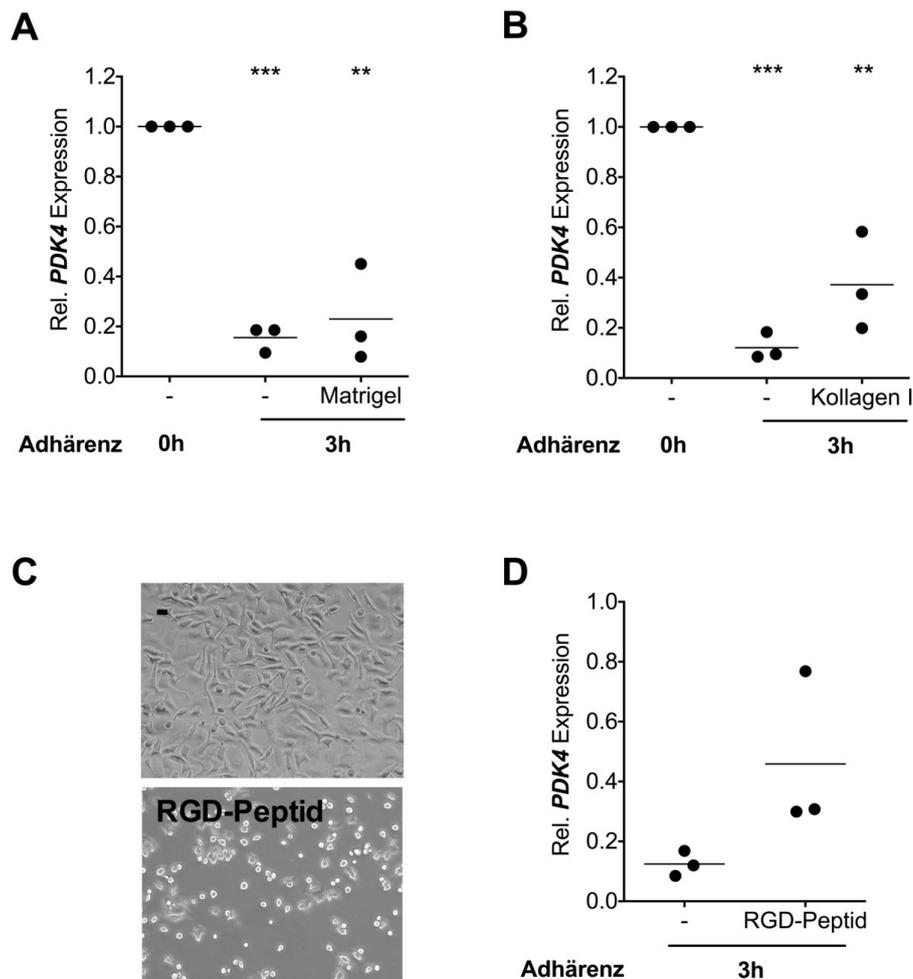


Abb. 4.6 Regulation der *PDK4*-Expression durch Zelladhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix.

SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert und geerntet (Adhärenz 0 h) oder nach anschließender dreistündiger Adhärenz geerntet (Adhärenz 3 h). Die Zellen wurden dabei auf unbeschichteten (-), mit Matrigel (**A**) oder Kollagen Typ I (50 µg/ml) (**B**) beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. Dargestellt ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf nicht-adhärenente Zellen, ermittelt in der RT-qPCR. In Abbildung **C**) und **D**) wurden nicht-adhärenente SKOV-3 Zellen 30 min mit RGD-Peptid (1,25 mM) vorinkubiert und anschließend auf eine Standardzellkulturschale ausplattiert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 3 h. **C**) Lichtmikroskopisches Bild von unbehandelten und RGD-Peptid-behandelten Zellen nach 3 h Adhärenz. **D**) Dargestellt ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf nicht-adhärenente Zellen, ermittelt in der RT-qPCR.

Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus technischen Replikaten dar, während horizontale Striche den Median aus biologischen Replikaten kennzeichnen. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zu nicht-adhärenenten Zellen (t-Test).

4.1.6 Untersuchungen zur Auswirkung von Hypoxie, Serumdepletion und Zelldichte auf die *PDK4*-Expression

Wie einleitend beschrieben, breiten sich beim metastasierenden Ovarialkarzinom vom Epithel losgelöste Tumorzellen als Einzelzellen oder mehrzellige Sphäroide über den Aszites im Peritonealraum aus und adhären an anderer Stelle des Peritoneums, um Metastasen zu bilden. Man geht davon aus, dass in den multizellulären Aggregaten besondere Bedingungen wie Hypoxie, eine nicht optimale Versorgung mit

Wachstumsfaktoren sowie eine hohe Zelldichte herrschen (Grimes et al., 2014; Kim et al., 2006b; Leoni A. Kunz-Schughart, 1998). Es wurde daher untersucht, ob diese Faktoren zusätzlich zu den Integrin-Liganden-Interaktionen einen Einfluss auf die *PDK4*-Expression haben (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.). Hypoxie ist als *PDK4*-induzierender Faktor bereits bekannt (siehe Kapitel 2.2.4.1.1). Allerdings konnte in adhärennten SKOV-3 Zellen für die Genexpression von *PDK4* nach 24 h hypoxischen Wachstumsbedingungen, im Gegensatz zur Positivkontrolle *VEGFA* (Lee et al., 2012), keine Induktion festgestellt werden (Abb. 4.7A).

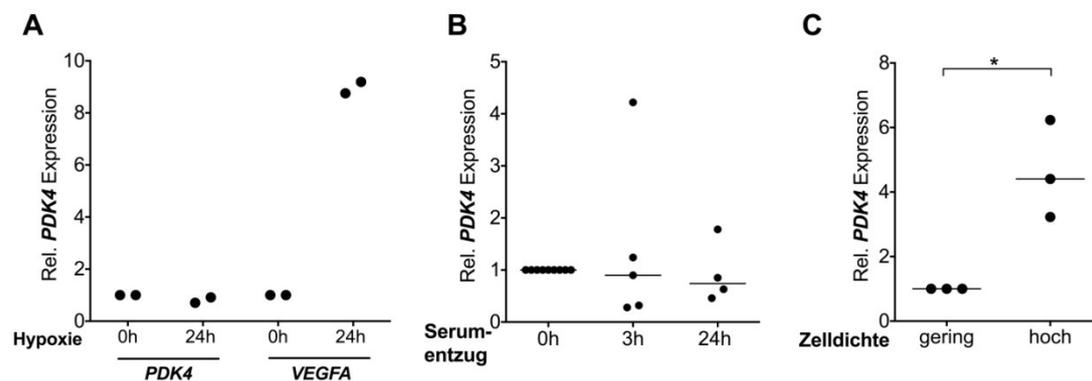


Abb. 4.7 Einfluss von Hypoxie, Serumdepletion und Zelldichte auf die *PDK4*-Expression.

A) Adhärennte SKOV-3 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume unter hypoxischen Bedingungen (0,1 % O₂) kultiviert. Die relative Expression der Gene *PDK4* und *VEGFA* wurde in der RT-qPCR ermittelt und bezieht sich auf Zellen, die unter Normoxie inkubiert waren. **B)** Adhärennte SKOV-3 Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer in Serum-freiem Medium kultiviert. Dargestellt ist die Expression von *PDK4*, die anhand der RT-qPCR ermittelt wurde. Die relative Expression bezieht sich auf Zellen, die in Serum-haltigen Medium inkubiert waren. **C)** SKOV-3 Zellen wurden 24 h in geringer Dichte, ohne Zell-Zell-Kontakte, kultiviert. In hoher Dichte kultivierte Zellen waren konfluent. Die relative *PDK4*-Expression wurde durch RT-qPCR ermittelt und bezieht sich auf in geringer Dichte kultivierte Zellen. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zu in geringer Dichte kultivierten Zellen (t-Test).

Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus technischen Replikaten und horizontale Striche kennzeichnen den Median aus biologischen Replikaten.

Ob die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren die Expression von *PDK4* beeinflusst, wurde untersucht, indem adhärennte SKOV-3 Zellen 3 h und 24 h lang unter Serumentzug gesetzt wurden. Dabei zeigte sich, dass die in der RT-qPCR analysierte *PDK4*-Expression von der Serumdepletion unbeeinflusst war (Abb. 4.7B).

In einem weiteren Ansatz wurden SKOV-3 Zellen 24 h in geringer Zelldichte, ohne Zell-Zell-Kontakte, kultiviert und ihre *PDK4*-Expression mit Zellen, die in hoher Zelldichte kultiviert waren, verglichen. Wie Abbildung 4.7C zeigt, stellte sich heraus, dass die *PDK4*-Expression in konfluenten Zellen deutlich induziert war.

4.2 Analysen zur Beteiligung putativer Signalwege an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz

4.2.1 Untersuchungen zur Beteiligung des MEK-ERK-Signalwegs an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Wichtig für das Verständnis der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz ist die Identifizierung des oder der dafür verantwortlichen Signalwege. Bisher ist bekannt, dass in adhärennten MCF-10A Zellen der aktive MEK-ERK-Signalweg die *PDK4*-Expression reprimiert (Grassian et al., 2011). Um zu klären, ob dieser Signalweg auch die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen reguliert, wurden sowohl adhärennte MCF-10A Zellen (Abb. 4.8A) als auch SKOV-3 Zellen (Abb. 4.8B) 3 h bzw. 24 h mit den gängigen MEK-Inhibitoren PD-98059 (10 μ M) und U-0126 (10 μ M) behandelt, da zu diesen Zeitpunkten eine Induktion der *PDK4*-Expression durch Adhärenzverlust stattgefunden hat (Abb. 4.4A). Die Funktionalität der Inhibitoren wurde im Western Blot (siehe Kapitel 3.2.1.11) mit einer reduzierten Phosphorylierung der Kinase ERK bestätigt (Daten nicht gezeigt) und die relative *PDK4*-Expression mittels RT-qPCR-Analyse ermittelt (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.). Wie Abbildung 4.8A zeigt, war die *PDK4*-Expression in MCF-10A Zellen nach dreistündiger Hemmung des Signalwegs nicht beeinflusst. Allerdings wiesen die Zellen nach 24 h Inhibitorbehandlung die erwartete Aktivierung der *PDK4*-Expression gegenüber unbehandelten Zellen auf. Unbeeinflusst in ihrer *PDK4*-Expression zeigten sich jedoch SKOV-3 Zellen, sowohl nach dreistündiger als auch nach 24-stündiger Inhibitorbehandlung (Abb. 4.8B). Die Inaktivierung des MEK-ERK-Signalwegs reicht demnach nicht aus, die Expression von *PDK4* zu aktivieren. Daher reprimiert der Signalweg die Expression von *PDK4* in adhärennten SKOV-3 Zellen vermutlich nicht oder zumindest nicht allein. Mit der Klärung der Frage, welcher Signalweg für die adhärenzvermittelte *PDK4*-Repression in SKOV-3 Zellen stattdessen mitverantwortlich sein kann, beschäftigen sich somit die nachfolgenden Kapitel.

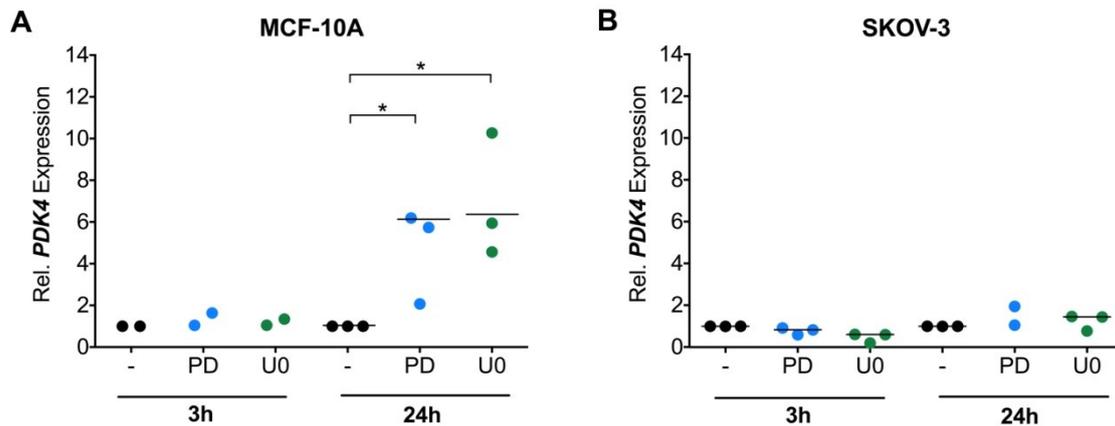


Abb. 4.8 Einfluss von MEK-Inhibitoren auf die *PDK4*-Expression in MCF-10A und SKOV-3 Zellen.

A) Adhärenente MCF-10A Zellen wurden 3 h oder 24 h mit den MEK-Inhibitoren PD-98059 (PD 10 μ M), U-0126 (U0 10 μ M) bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die relative Expression von *PDK4* bezogen auf DMSO wurde anhand der RT-qPCR Analyse ermittelt. **B)** Gleiche Versuchsanordnung wie in A) mit adhärenenten SKOV-3 Zellen.

Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus technischen Replikaten. Horizontale Striche kennzeichnen den Median aus biologischen Replikaten. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (t-Test).

4.2.2 Analyse der Aktivität verschiedener Signalwege in Abhängigkeit der Adhärenz

Um einen Überblick darüber zu erhalten, welche Signalwege an der Regulation der *PDK4*-Expression durch Adhärenz beteiligt sein können, wurde zu Beginn die Aktivität verschiedener Signalwege in einem Screening untersucht. In Kooperation mit Dr. Halama aus dem NCT in Heidelberg wurde der Phosphorylierungsstatus von mehreren Signalproteinen in adhärenenten und nicht-adhärenenten SKOV-3 Zellen bestimmt, was wiederum Rückschlüsse auf die Aktivität der involvierten Signalwege zulässt. Der „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ (BioRad, München) wurde in der Gruppe von Dr. Halama durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.5) und quantifizierte die Menge der in Abbildung 4.9 aufgeführten unphosphorylierten und phosphorylierten Proteine. Dargestellt ist die relative Phosphorylierung der abgebildeten Signalproteine in adhärenenten im Vergleich zu nicht-adhärenenten Zellen aus drei biologischen Replikaten. Durch den Ausfall einiger Proben im Screening waren teilweise jedoch nur zwei Replikate auswertbar. Eine Vielzahl an Phosphoproteinen (p-JNK (Thr183/Tyr185), p-c-JUN (Ser63), p-IGF-1R (Tyr1131) („*insulin-like growth factor 1 receptor*“), p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) („*p38 mitogen-activated protein kinase*“), p-PTEN (Ser380) („*phosphatase and tensin homolog*“), p-SMAD2 (Ser465/Ser467) („*Sma and Mad related protein*“)) scheinen nicht an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz beteiligt zu sein, da ihr Phosphorylierungsstatus durch Adhärenz weitgehend unbeeinflusst war. Dazu zählen auch die Kinasen MEK1 und MEK2, was eine zusätzliche Bestätigung dafür ist, dass der MEK-ERK-Signalweg die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen unter

verschiedenen Adhärenzbedingungen nicht reguliert. Auffällig ist die verstärkte Phosphorylierung der Kinase AKT (Ser473, Thr308) in adhärennten Zellen. Phosphorylierungen an diesen Aminosäuren kennzeichnen eine aktive AKT (siehe Kapitel 2.3.2.3). Interessanterweise war der Phosphorylierungsstatus von getesteten AKT-Substraten (p-GSK3 α/β (Ser21/Ser9) („*glycogen synthase kinase 3 α/β* “), p-mTOR (Ser2448), indirekt auch p-IkBa (Ser32/Ser36) („*inhibitor of kappa B*“)) nicht beeinflusst. Auch die Kinase SRC könnte an der *PDK4*-Regulation beteiligt sein, da eines der beiden Replikate eine verstärkte aktivierende Phosphorylierung (Tyr416) in adhärennten Zellen aufwies. Mit CREB („*cAMP response element-binding protein*“) schien auch ein Transkriptionsfaktor in seiner Phosphorylierung von der Adhärenz beeinflusst zu sein. CREB war in adhärennten Zellen im Vergleich zu nicht-adhärennten Zellen deutlich weniger am Serinrest 133 phosphoryliert. In nicht-adhärennten Zellen könnte daher transkriptionell aktives phospho-CREB (Ser133) putativ die *PDK4*-Expression hoch regulieren (Alberini, 2009; Kornhauser et al., 2002; Mayr and Montminy, 2001; Sun et al., 1994).

Bei der Zusammenfassung der Screening-Ergebnisse lässt sich festhalten, dass Signalwege an denen die aktive Kinase AKT beteiligt ist, die Repression von *PDK4* in adhärennten Zellen vermitteln könnten. Ausgenommen davon scheinen allerdings einige der zahlreichen AKT-abhängigen Signalwege zu sein, bei denen GSK3 α/β , mTOR und IkBa eine Rolle spielen. Die Kinase SRC könnte ebenfalls zur *PDK4*-Repression beitragen und auch der Transkriptionsfaktor CREB könnte potentiell als Regulator der *PDK4*-Expression fungieren. In den folgenden Kapiteln sollte daher eine mögliche Beteiligung dieser Proteine an der Transkriptionsregulation von *PDK4* durch Adhärenz detailliert überprüft werden.

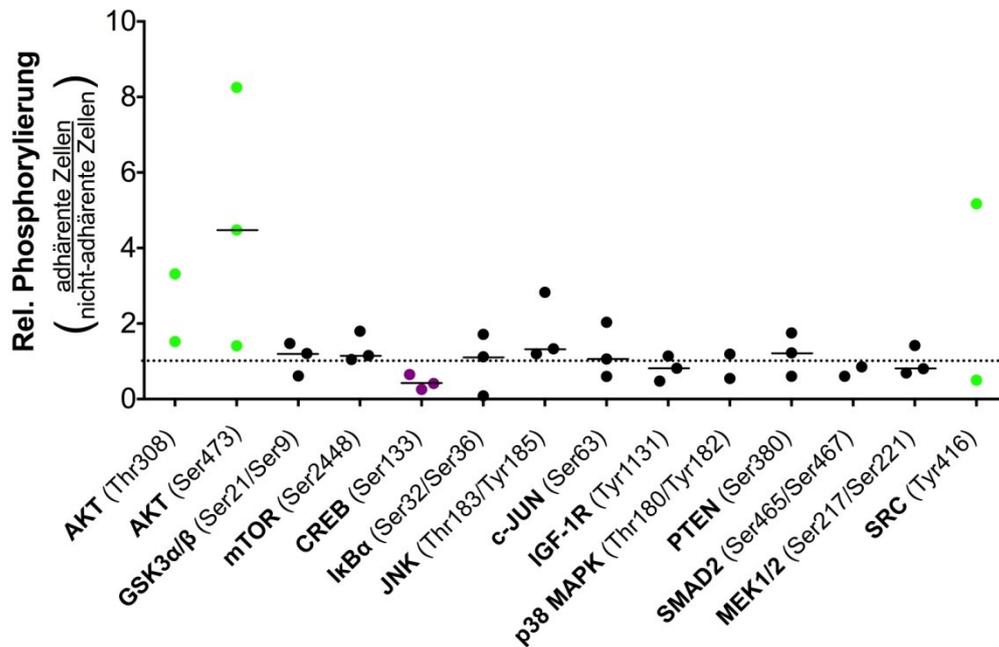


Abb. 4.9 Analyse des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalproteine in Abhängigkeit der Adhärenz.

SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter adhärenenten bzw. nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert. Es wurde die Menge an phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein mit Hilfe des „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ (BioRad, München) quantifiziert und der Anteil an phosphoryliertem Protein aus drei biologischen Replikaten bestimmt. Die Durchführung erfolgte durch Mitglieder der Gruppe um Dr. Halama (NCT, Heidelberg). Dargestellt ist die relative Phosphorylierung der Proteine bei adhärenenten im Vergleich zu nicht-adhärenenten Zellen. Horizontale Striche kennzeichnen den Median der biologischen Replikate.

AKT: „*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*“, GSK3α/β: „*glycogen synthase kinase 3α/β*“, mTOR: „*mammalian target of rapamycin*“, CREB: „*cAMP response element-binding protein*“, IκBα: „*inhibitor of kappa B*“, JNK: „*c-Jun N-terminal kinase*“, IGF-1R: „*insulin-like growth factor 1 receptor*“, p38 MAPK: „*p38 mitogen-activated protein kinase*“, PTEN: „*phosphatase and tensin homolog*“, SMAD2: „*Sma and Mad related protein 2*“, MEK: „*mitogen/extracellular signal-regulated kinase*“

4.2.3 Untersuchungen zur Beteiligung des Transkriptionsfaktors CREB an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Zuerst wurde die mögliche Beteiligung von CREB näher untersucht. Die verstärkte Ser133-Phosphorylierung (Abb. 4.9) und damit verbundene Aktivierung von CREB-Zielgenen könnte die Induktion der *PDK4*-Expression in nicht-adhärenenten Zellen ermöglichen. Die verstärkte Ser133-Phosphorylierung bei SKOV-3-Zellen in Suspension ließ sich allerdings im Western Blot Verfahren (siehe Kapitel 3.2.1.11) nicht verifizieren (Daten nicht gezeigt). Zudem wurden nicht-adhärenente SKOV-3 Zellen mit den PKA („*protein kinase A*“)-Inhibitoren H-89 und H1004, den p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und SB202190 und dem CaMKII („*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*“)-Inhibitor KN-62 behandelt und die *PDK4*-Expression in der RT-qPCR analysiert. Diese Kinasen vermitteln die Ser133-Phosphorylierung (Abb. 4.10A) und damit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (Alberini, 2009; Kornhauser et al., 2002; Mayr and Montminy, 2001; Sun et al., 1994). Die transkriptionelle Aktivierung

von *PDK4* in nicht-adhärenenten Zellen war durch die Behandlung mit den Kinaseinhibitoren jedoch nicht inhibiert (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren ließ sich Ser133-phosphoryliertes CREB am *PDK4*-Promotor und *Upstream-Enhancer* in einer ChIP-Analyse nach Adhärenzverlust nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lassen diese Erkenntnisse darauf schließen, dass CREB die transkriptionelle Aktivierung von *PDK4* durch Verlust der Adhärenz nicht vermittelt.

Im Zuge der Untersuchungen, ob CREB an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation beteiligt sein kann, wurde auch der Frage nachgegangen ob CREB prinzipiell in der Lage ist, unabhängig von Veränderungen der Adhärenzbedingungen *PDK4* transkriptionell zu regulieren. Der klassische Weg der CREB-Aktivierung führt dabei über die Aktivierung der Adenylylcyclasen-cAMP-PKA-Signalkaskade (Abb. 4.10A). Adhärenente SKOV-3 Zellen wurden 3 h mit dem Adenylylcyclasen (AC)-Aktivator Forskolin (FSK 10 μ M), dem PKA-Aktivator 8-Bromo-cAMP (8-Br-cAMP 1 mM) oder 8 h mit Cholera toxin (CTX 1 μ g/ml) behandelt. Die Analyse der *PDK4*-Expression mittels RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.) ergab, dass die Aktivierung der Signalkaskade die *PDK4*-Transkription induzierte (Abb. 4.10B).

Da sich transkriptionell aktives phospho-CREB in ChIP-Analysen nach Forskolin-Behandlung an regulatorischen Bereichen des *PDK4*-Gens nicht nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt), ist allerdings von einem CREB-unabhängigen Mechanismus auszugehen.

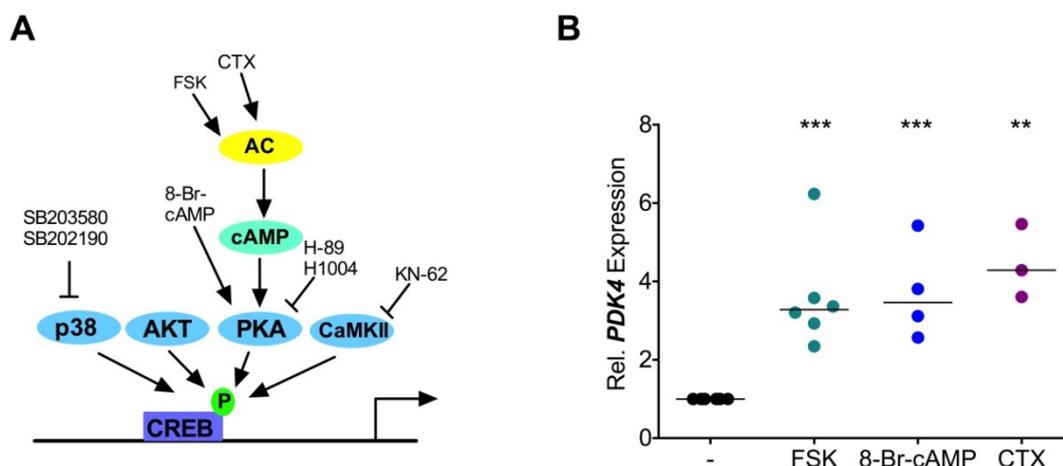


Abb. 4.10 Induktion der *PDK4*-Expression durch Aktivierung des Adenylylcyclasen-cAMP-PKA-Signalwegs.

A) Schematische Darstellung des CREB-Signalwegs mit Aktivatoren und Inhibitoren. Nähere Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach Alberini 2009. **B)** Adhärenente SKOV-3 Zellen wurden 3 h mit Forskolin (FSK 10 μ M) bzw. 8-Bromo-cAMP (8-Br-CAMP 1 mM) oder 8 h mit Cholera toxin (CTX 1 μ g/ml) behandelt. Die Analyse der relativen *PDK4*-Expression erfolgte mit der RT-qPCR. Datenpunkte zeigen den Mittelwert technischer Replikate und horizontale Linien den Median biologischer Replikate. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ signifikante Unterschiede zur DMSO-behandelten Probe (t-Test).

4.2.4 Untersuchungen zur Beteiligung des PI3K-AKT-Signalwegs an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

4.2.4.1 Einfluss der Adhärenz auf die aktivierende Ser473-Phosphorylierung der Kinase AKT

Einen Hinweis dafür, dass der PI3K-AKT-Signalweg an der *PDK4*-Repression in adhärennten Zellen beteiligt ist, lieferte das Screening mittels des „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ (siehe Kapitel 4.2.2). Anhand dessen konnte gezeigt werden, dass in adhärennten SKOV-3 Zellen gegenüber nicht-adhärennten interessanterweise die Kinase AKT verstärkt am Threoninrest 308 und Serinrest 473 phosphoryliert war und damit aktiver sein muss (Abb. 4.9). Außerdem ist aus der Literatur hinreichend bekannt, dass die Expression von *PDK4* durch den PI3K-AKT-Signalweg reguliert werden kann (siehe Kapitel 2.2.4.1.2). Und auch in Bezug auf integrinvermittelte Signalwege ist eine Beteiligung des PI3K-AKT-Signalwegs erwiesen (siehe Kapitel 2.3.2.3). Um den Befund aus dem Screening zu verifizieren, wurden SKOV-3 Zellen 24 h unter adhärennten bzw. nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert und der Phosphorylierungsstatus der AKT-Kinase anschließend im Western Blot Verfahren (siehe Kapitel 3.2.1.11) ermittelt (Abb. 4.11A). Abbildung 4.11B stellt die relative AKT-Phosphorylierung nach Quantifizierung der Chemolumineszenzsignale aus Abbildung 4.11A, abgeglichen auf die jeweilige LDH-Ladekontrolle, dar. Die dreistündige Behandlung von adhärennten Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (20 μ M) diente als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers und überprüfte die Wirksamkeit der PI3K-Inhibition. Erwartungsgemäß reduzierte die Behandlung die Ser473-Phosphorylierung der AKT (Abb. 4.11A und B). Die Abbildungen zeigen weiterhin eine verstärkte Phosphorylierung von AKT an Serin 473 in adhärennten Zellen verglichen mit nicht-adhärennten Zellen und verifizieren damit die Ergebnisse aus dem „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ (Abb. 4.11A und B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass adhärennte Wachstumsbedingungen zu einer Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs führen.

Eine mögliche Verbindung zwischen der Regulation der PI3K-AKT-Signalwegsaktivität und der Adhärenz, beziehungsweise der Adhäsion über Integrine, könnten Mitglieder der „*Src-family kinases*“ (SFKs) sein (siehe Kapitel 2.3.2.1). Als Bestandteil des aktiven FAK/SFK-Komplex vermitteln sie die Signalweiterleitung nach Interaktion zwischen Komponenten der EZM und Integrinen bei Adhäsion. In der Literatur ist außerdem belegt, dass SRC-Kinasen in der Lage sind den PI3K-AKT-Signalweg zu aktivieren (Lei and Ingbar, 2011; Penuel and Martin, 1999; Sun et al., 2003; Thamilselvan et al., 2007). Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden adhärennte SKOV-3 Zellen 3 h mit

einem Inhibitor der SRC-Familie (PP1 5 μM) behandelt. Um den Aktivitätsstatus der AKT-Kinase beurteilen zu können, wurde die Phosphorylierung am Serinrest 473 der Kinase im Western Blot Verfahren untersucht (Abb. 4.11C) und quantifiziert (Abb. 4.11D). Dabei zeigte sich, dass die PP1-Behandlung die AKT- Phosphorylierung und damit einhergehend die AKT-Aktivität deutlich reduzierte. SRC-Kinasen aktivieren demnach den PI3K-AKT-Signalweg in adhärennten SKOV-3 Zellen.

Zusammengefasst deuten die Daten also darauf hin, dass adhärennte Wachstumsbedingungen die SRC-PI3K-AKT-Signalachse in SKOV-3 Zellen aktivieren.

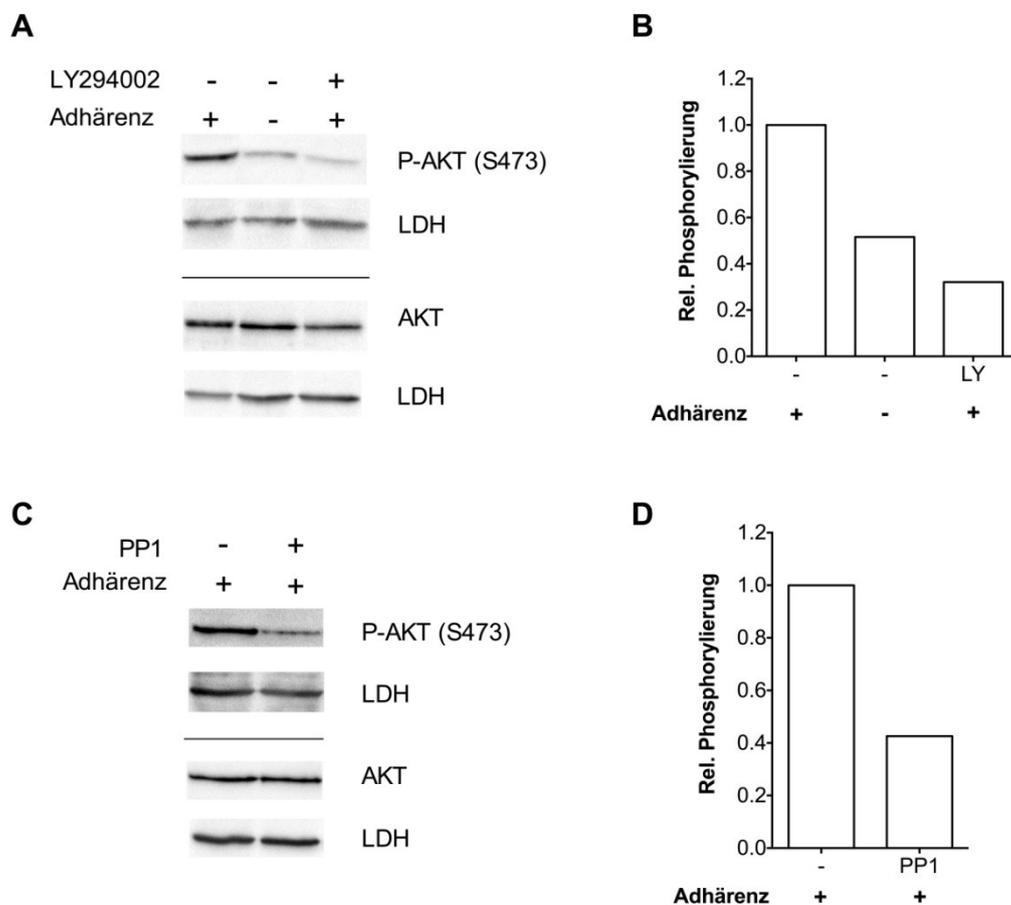


Abb. 4.11 Analyse der AKT-Phosphorylierung in adhärennten und nicht-adhärennten SKOV-3 Zellen und nach SRC-Inhibitorbehandlung.

A) SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter adhärennten (+) bzw. nicht-adhärennten Bedingungen (-) kultiviert. Die Behandlung adhärennter Zellen mit 20 μM LY294002 erfolgte für 3 h. **B)** Relative AKT-Phosphorylierung nach quantitativer Auswertung von A) bezogen auf adhärennte Kontrollzellen. **C)** Adhärennte SKOV-3 Zellen wurden 3 h mit 5 μM des SRC-Inhibitors PP1 behandelt. **D)** Relative AKT-Phosphorylierung nach quantitativer Auswertung von C) bezogen auf Kontrollzellen.

Die Western Blot Analyse wurde mittels spezifischer Antikörper für phospho-AKT (Ser473) und AKT auf zwei verschiedenen Membranen durchgeführt. Zur Kontrolle der Proteinbeladung diente ein LDH-spezifischer Antikörper. Um die relative Phosphorylierung zu bestimmen, wurde das Verhältnis der Signalstärken zwischen phospho-AKT und AKT und den zugehörigen LDH-Ladekontrollen berechnet.

4.2.4.2 Auswirkungen der Inhibition des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs auf die *PDK4*-Expression

Darauffolgend stellte sich die Frage, ob die durch Adhärenz vermittelte Aktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs für die *PDK4*-Repression in adhärennten Zellen verantwortlich sein kann. Zur Klärung dieser Frage wurde der Effekt von Kinaseinhibitoren, die die Aktivität der Signalachse hemmen, auf die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen untersucht. Abbildung 4.12 zeigt das allgemeine Schema, wie Zellen in nachfolgenden Experimenten kultiviert und mit verschiedenen Substanzen behandelt wurden. Zum einen wurden Zellen im ersten Ansatz 24 h unter nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert und waren über diese Zeitdauer mit einer Substanz X oder dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt. Grundlage dieser Behandlung ist es, den Einfluss der Substanz X auf die *PDK4*-Aktivierung durch Adhärenzverlust zu untersuchen. Um auch inhibitorische Effekte auf die *PDK4*-Expression, die sich erst nach längerer Behandlung manifestieren, erfassen zu können, erfolgte die Substanzzugabe für 24 h. Im Folgenden werden diese Zellen mit „Adhärenz 0 h“ bezeichnet. Zum anderen wurden Zellen wie in Ansatz 2 ersichtlich, 21 h unter nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert, anschließend erneut ausplattiert und nach dreistündigem adhärenntem Wachstum geerntet. Um den Einfluss der Substanzen auf den Vorgang der *PDK4*-Repression durch Adhärenz zu untersuchen, erfolgte die Substanzzugabe mit Beginn des adhärennten Wachstums. Der Zeitraum von 3 h wurde gewählt, da die *PDK4*-Expression danach bereits bis fast auf das Basalniveau adhärennter Zellen reprimiert ist (Abb. 4.4B) und um mögliche Sekundär- oder *off-target* Effekte aufgrund einer langen Behandlung zu minimieren. Diese adhärennter Zellen werden im weiteren Verlauf mit „Adhärenz 3 h“ bezeichnet. Um eventuelle dereprimierende Effekte der Substanzen auf *PDK4* zu ermitteln, wurden wie in Ansatz 3 gezeigt, dauerhaft adhärennt wachsende Zellen 3 h bis zur Ernte behandelt. Da SKOV-3 Zellen nach 3 h bereits eine deutliche Derepression der *PDK4*-Transkription durch Adhärenzverlust zeigen (Abb. 4.4A) und um die oben erwähnten unerwünschten Effekte zu minimieren, wurde dieser Zeitraum gewählt. Aufgrund der Kultivierung werden diese Zellen in weiteren Experimenten mit „Adhärenz 24 h“ bezeichnet.



Abb. 4.12 Schema zur Kultivierung und Behandlung von Zellen.

Zellen wurden auf drei Arten kultiviert und behandelt:

1. Zellen wurden 24 h unter nicht-adhärenten Bedingungen kultiviert und zeitgleich mit Substanz X behandelt.
2. Zellen wurden 21 h unter nicht-adhärenten Bedingungen kultiviert, anschließend erneut ausplattiert und nach 3 h adhärentem Wachstum geerntet. Die Behandlung mit Substanz X erfolgte während des adhärenen Wachstums.
3. Adhärente Zellen wurden nach dreistündiger Behandlung mit Substanz X geerntet.

Wie Kinaseinhibitoren des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen beeinflussen zeigt Abbildung 4.13. Die Kultivierung und Behandlung der Zellen erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 4.12. Bei den verwendeten Substanzen handelte es sich um den SRC-Inhibitor PP1 (10 μ M; Abb. 4.13A und D), den PI3K-Inhibitor LY294002 (20 μ M, Abb. 4.13B und E) und den AKT-Inhibitor Triciribine (10 μ M; Abb. 4.13C und F). Die relative *PDK4*-Expression wurde in der RT-qPCR ermittelt (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.). Abbildung 4.13A zeigt, dass die Behandlung von nicht-adhärenen Zellen mit PP1 die *PDK4*-Expression leicht aktivierte. Nach 3 h und 24 h Adhärenz zeigten unbehandelte Zellen die erwartete *PDK4*-Repression. Interessanterweise verhinderte PP1 zum einen die *PDK4*-Repression bei adhärenen Zellen (Ansatz „Adhärenz 3h“) und zum anderen führte die Behandlung zu einer *PDK4*-Derepression bei adhärenen Zellen (Ansatz „Adhärenz 24 h“). Diese Beobachtungen ließen sich auch mit PP2, einen weiteren Inhibitor der „Src-family kinases“ (SFks), bestätigen (Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Effekte ließen sich auch nach Behandlung mit den PI3K-Inhibitoren LY294002 (Abb. 4.13B) und Wortmannin (Daten nicht gezeigt) sowie dem AKT-Inhibitor Triciribine (Abb. 4.13C) beobachten. Es ist also festzuhalten, dass eine Inaktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs zu einer Aktivierung der *PDK4*-Expression führt.

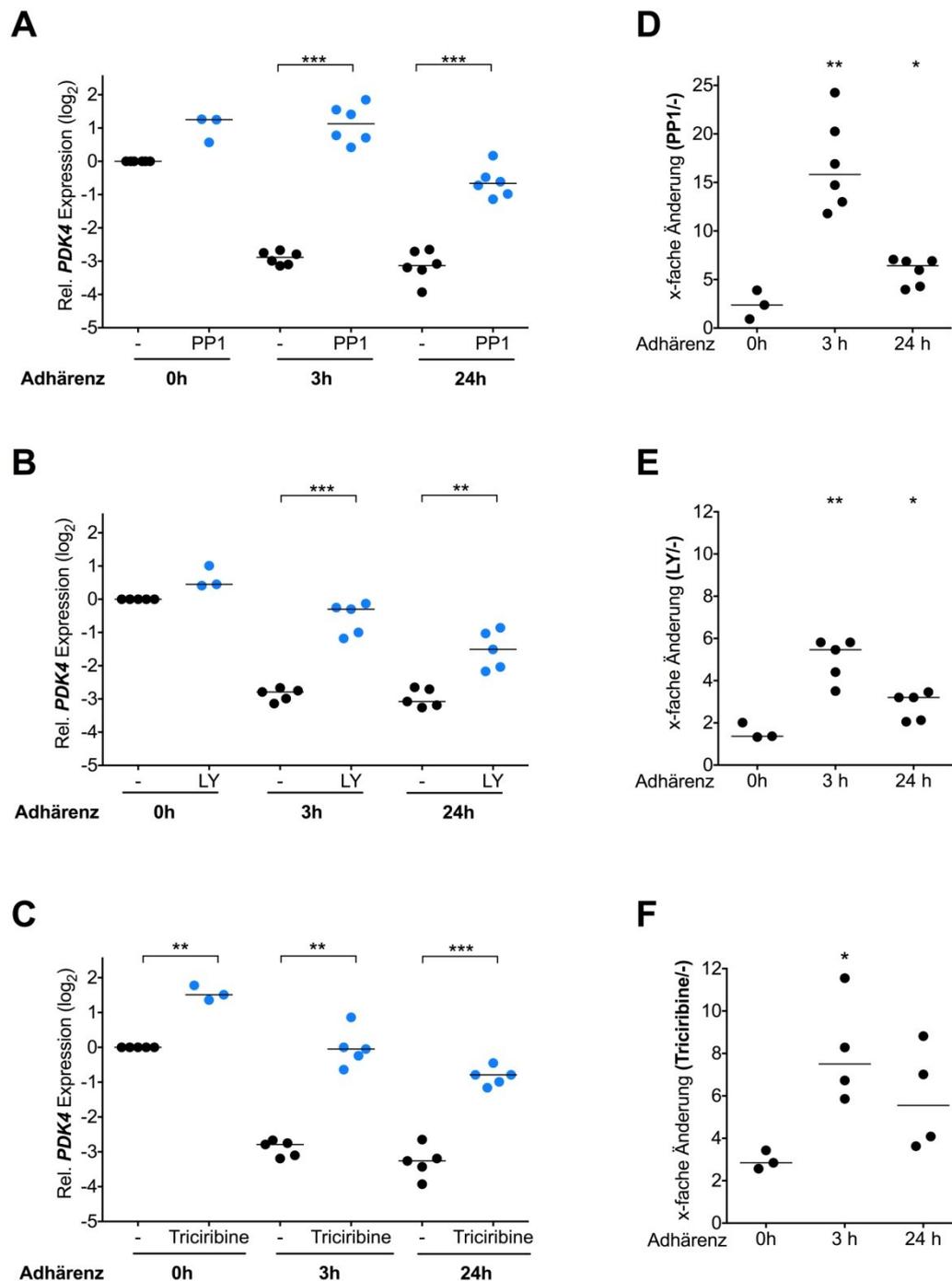


Abb. 4.13 Transkriptionelle Aktivierung von *PDK4* durch Inhibition des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs in SKOV-3 Zellen.

SKOV-3 Zellen wurden nach dem Schema aus Abbildung 4.12 kultiviert und behandelt. **A)** Die Behandlung erfolgte mit dem SRC-Kinasen-Inhibitor PP1 (10 μM) bzw. dem Lösungsmittel DMSO. **B)** Zellen waren mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (LY 20 μM) behandelt. **C)** Zellen wurden mit dem AKT-Inhibitor Triciribine (10 μM) behandelt. Die *PDK4*-Expression wurde anhand der RT-qPCR ermittelt. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf DMSO-behandelte nicht-adhärenente Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus technischen Replikaten und der Median biologischer Replikate ist mit horizontalen Strichen dargestellt. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zu DMSO-behandelten Zellen, (t-Test). **D)** x-fache Änderung der *PDK4*-Expression von PP1-behandelten Zellen zu DMSO-behandelten Zellen, ermittelt aus A). **E)** x-fache Änderung der *PDK4*-Expression von LY294002-behandelten Zellen zu DMSO-behandelten Zellen wurde aus B) ermittelt. **F)** x-fache Änderung der *PDK4*-Expression von Triciribine-behandelten Zellen zu DMSO-behandelten Zellen wurde aus C) ermittelt. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zu nicht-adhärenente Zellen (t-Test).

Um herauszufinden, ob die gegenüber adhärennten Zellen aktivierte *PDK4*-Expression in Suspensionszellen auf die Inaktivierung der SRC-PI3K-AKT-Signalkaskade zurückzuführen ist, wurde die Stärke des Inhibitoreffekts zwischen den verschiedenen Adhärenzbedingungen verglichen. Abbildung 4.13D zeigt die x-fache Änderung der *PDK4*-Expression von PP1-behandelten zu unbehandelten Zellen, die jeweils 0 h, 3 h und 24 h adhärennt waren. Der Änderungsfaktor wurde anhand der relativen *PDK4*-Expression aus Abbildung 4.13A ermittelt. In nicht-adhärennten Zellen steigerte die PP1-Behandlung die *PDK4*-Expression um das 2,4-fache, während in 3 h adhärennten Zellen die *PDK4*-Expression um das 17-fache und in 24 h adhärennten Zellen um das 5,9-fache gesteigert war. Im Vergleich lässt sich also die *PDK4*-Expression in adhärennten Zellen signifikant stärker aktivieren als in nicht-adhärennten Zellen. Die Abbildungen 4.13E und F liefern ähnliche Ergebnisse für die Inhibition der Kinaseaktivität von PI3K und AKT. LY294002 (Abb. 4.13E) und Triciribine (Abb. 4.13F) aktivierten die *PDK4*-Expression in adhärennt wachsenden Zellen ebenfalls deutlich stärker als nicht-adhärennten Zellen (LY: 5- und 2,8-fach im Vergleich zu 1,6-fach; Triciribine: 7,7- und 5,8-fach im Vergleich zu 3-fach). Weiterhin fällt beim Vergleich der Änderungsfaktoren von adhärennt wachsenden Zellen („Adhärenz 3 h“) auf, dass der SRC-Inhibitor PP1 am deutlichsten die *PDK4*-Repression verhinderte (17-fach im Vergleich zu <8-fach bei LY und Triciribine).

Zusammengefasst zeigen die Daten aus Abbildung 4.11 und Abbildung 4.13, dass eine Inaktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs durch Inhibitoren oder nicht-adhärenntes Wachstum mit einer verstärkten *PDK4*-Expression in Zusammenhang steht. In nicht-adhärennten Zellen ließ sich darüber hinaus die *PDK4*-Expression nicht in dem Ausmaß durch Inhibitorbehandlung steigern wie in adhärennten Zellen, da der Signalweg bereits gehemmt ist und damit die *PDK4*-Expression bereits putativ aktiviert hat. Dies deutet darauf hin, dass die gehemmte SRC-PI3K-AKT-Signalkaskade an der gesteigerten *PDK4*-Expression in nicht-adhärennten Zellen beteiligt ist, beziehungsweise die aktive Signalkaskade in adhärennten Zellen einen reprimierenden Effekt auf die *PDK4*-Transkription hat.

Um ein genaueres Bild davon zu erhalten, ob es sich dabei um ein spezifisches Phänomen in SKOV-3 Zellen handelt, wurde die *PDK4*-Expression in MCF-10A Zellen nach dem gleichen Prinzip wie in Abbildung 4.13 analysiert. Es wurden die Effekte in nicht-adhärennten und 24 h adhärennten Zellen untersucht. Bei MCF-10A Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die ebenfalls eine *PDK4*-Repression durch Adhärenz aufwies (Abb. 4.2). Während Abbildung 4.14A keinen Effekt der PP1-Behandlung auf die *PDK4*-Expression in nicht-adhärennten Zellen zeigte, führte die Behandlung mit

LY294002 (Abb. 4.14B) und Triciribine (Abb. 4.14C), wie in SKOV-3 Zellen, zu einer Aktivierung der *PDK4*-Expression. Darüber hinaus hatte die Behandlung adhärenter Zellen mit den drei Inhibitoren einen dereprimierenden Effekt auf die *PDK4*-Expression, der auch in SKOV-3 Zellen zu beobachten war. Beim Vergleich der Änderungsfaktoren (Abb. 4.14D, E, F) ließ sich feststellen, dass die Behandlung mit PP1 und LY294002 wie bei SKOV-3 Zellen einen stärker aktivierenden Effekt auf adhärente Zellen als auf nicht-adhärenente Zellen hatte. Die Änderungsfaktoren wurden anhand der *PDK4*-Expression von behandelten zu unbehandelten Zellen aus den Abbildungen 4.14A bis C berechnet. So zeigt Abbildung 4.14D eine 2,5-fache Derepression der *PDK4*-Expression bei adhärenenten Zellen im Vergleich zu einer 1,3-fachen Änderung der Expression in nicht-adhärenenten nach PP1-Behandlung. LY294002 aktiviert die *PDK4*-Expression in nicht-adhärenenten Zellen nur 1,7-fach, während sich in adhärenenten Zellen die Expression um das 4,4-fache steigern ließ (Abb. 4.14E). Die Triciribine-Behandlung aktiviert die *PDK4*-Expression unter adhärenenten und nicht-adhärenenten Bedingungen allerdings im gleichem Maße (Abb. 4.14F).

Die Ergebnisse der PP1- und LY294002-Behandlung deuten darauf hin, dass der aktive SRC-PI3K-Signalweg an der *PDK4*-Repression in adhärenenten MCF-10A Zellen, wie bei der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3, beteiligt ist. Die Rolle der Kinase AKT lässt sich bei diesem Erkenntnisstand jedoch nicht eindeutig beurteilen.

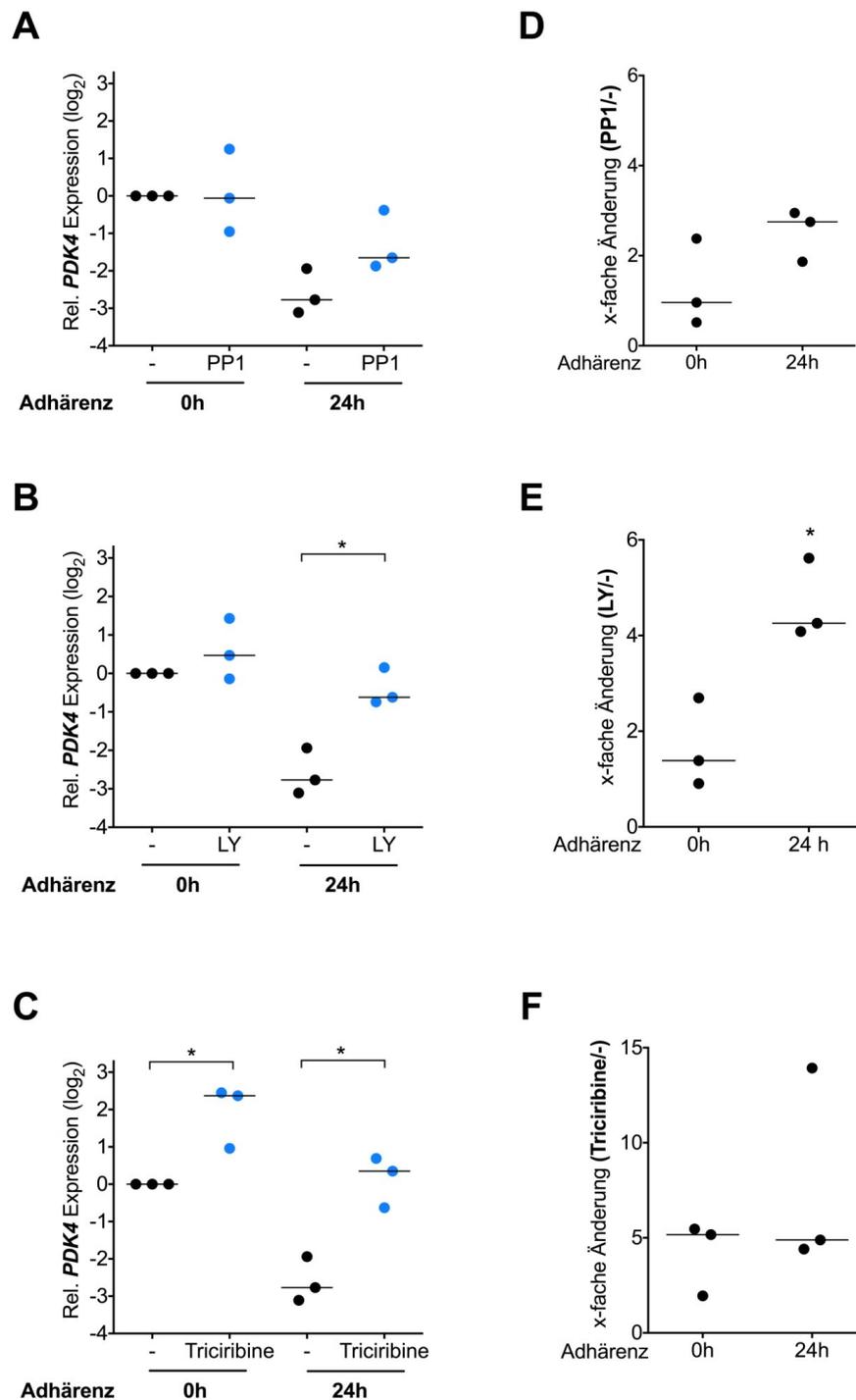


Abb. 4.14 Aktivierung der *PDK4*-Expression durch Inhibition des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs in MCF-10A Zellen.

MCF-10A Zellen wurden gemäß dem Schema aus Abbildung 4.12 kultiviert und mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. mit **A**) dem SRC-Kinase-Inhibitor PP1 (10 μ M), **B**) dem PI3K-Inhibitor LY294002 (LY 20 μ M) oder **C**) dem AKT-Inhibitor Triciribine (10 μ M) behandelt. Die *PDK4*-Expression wurde anhand der RT-qPCR ermittelt. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf DMSO-behandelte nicht-adhärenzte Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus technischen Replikaten und der Median biologischer Replikate ist durch horizontale Striche dargestellt. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zu DMSO-behandelten Zellen (t-Test). **D**) x-fache Änderung der *PDK4*-Expression von PP1-behandelten Zellen zu DMSO-behandelten Zellen. Die x-fache Änderung wurde aus A) ermittelt. **E**) x-fache Änderung der *PDK4*-Expression von LY294002-behandelten Zellen zu DMSO-behandelten Zellen wurde aus B) ermittelt. **F**) x-fache Änderung der *PDK4*-Expression von Triciribine-behandelten Zellen zu DMSO-behandelten Zellen aus C) ermittelt. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zu nicht-adhärenzten Zellen (t-Test).

4.2.4.3 Untersuchungen zum Einfluss von FOXO-Transkriptionsfaktoren auf die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen mittels ChIP-Analyse

Die bisherigen Erkenntnisse deuten daraufhin, dass der aktive SRC-PI3K-AKT-Signalweg die *PDK4*-Expression reprimiert. Bekanntermaßen phosphoryliert die Kinase AKT zahlreiche Substrate, die die Transkription beeinflussen (Hemmings and Restuccia, 2012). Die Ergebnisse des „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ zeigten, dass die Substrate GSK3 und IKK nicht an der *PDK4*-Derepression in nicht-adhärenenten Zellen beteiligt sind (Abb. 4.9). Ein bereits bekannter Weg der *PDK4*-Aktivierung durch den PI3K-AKT-Signalweg wird über die FOXO Transkriptionsfaktoren FOXO1 und FOXO3 vermittelt (Kwon et al., 2004). Der PI3K-AKT-Signalweg reguliert über die Phosphorylierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren ihre Lokalisation und damit ihren Einfluss auf die *PDK4*-Expression (Barthel et al., 2005). Die aktive Kinase AKT phosphoryliert FOXO-Faktoren, was zu ihrem Kernausschluss und damit zur transkriptionellen Hemmung ihrer Zielgene führt (Abb. 4.15A). Es stellte sich somit die Frage, ob die mit Inaktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs, mittels Kinaseinhibitoren oder durch nicht-adhärenente Wachstumsbedingungen, einhergehende *PDK4*-Aktivierung mit FOXO-Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang steht. Um dies zu untersuchen, wurde die Rekrutierung von FOXO-Faktoren an regulatorische Bereiche des *PDK4*-Gens unter diesen Bedingungen analysiert. Abbildung 4.15B zeigt die bereits identifizierten FOXO-Bindestellen in einer Entfernung von -250 bp, -420 bp und -630 bp vom Transkriptionsstart (TS) (Kwon et al., 2004). Der *PDK4*-Upstream-Enhancer ist eine Region, -12000 bp vom TS entfernt, mit Bindestellen für *PDK4*-regulierende Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise PPAR β/δ und RXR (Adhikary et al., 2011; Schumann et al., 2015).

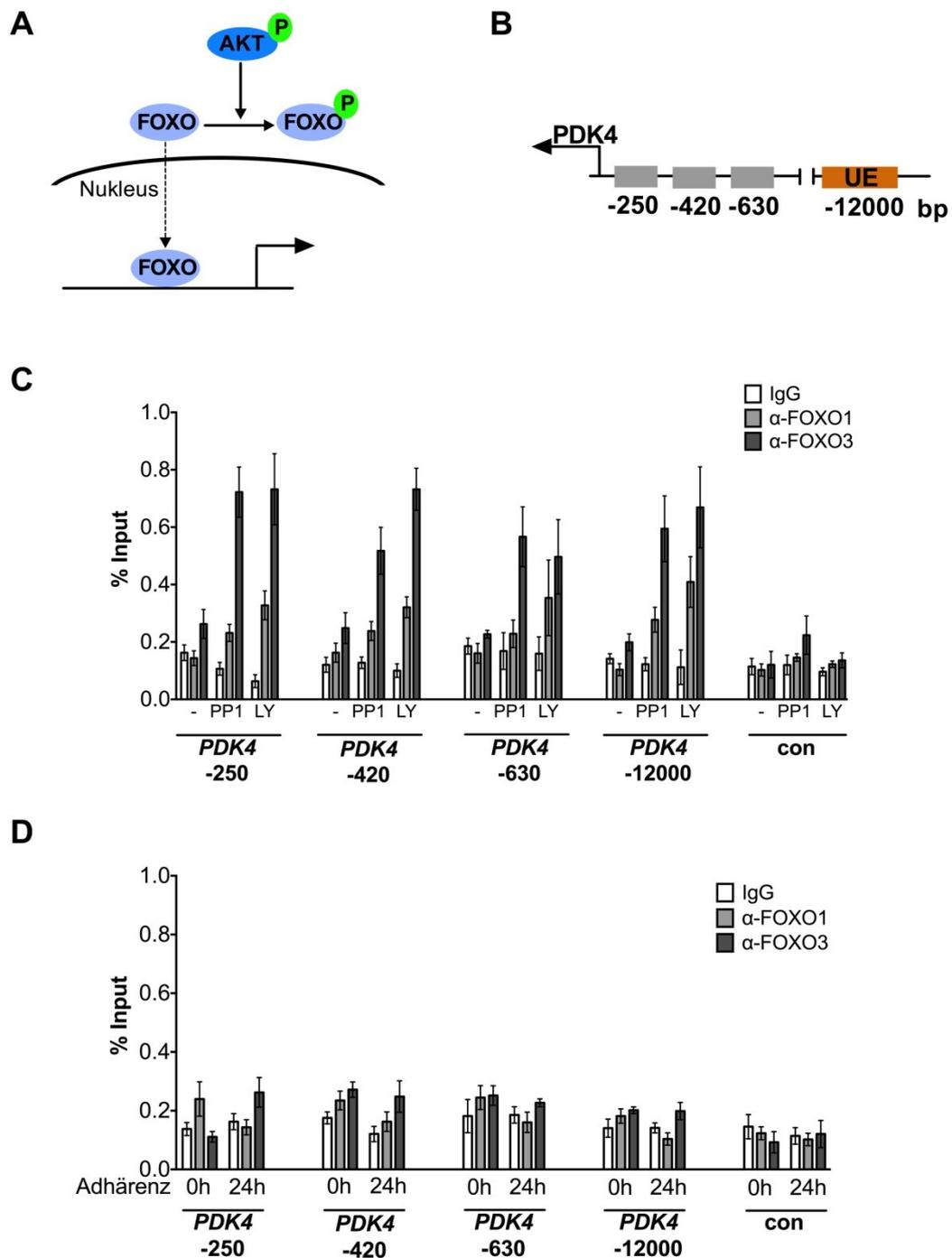


Abb. 4.15 ChIP-Analyse zur Rekrutierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren an relevante regulatorische Bereiche des *PDK4*-Gens.

A) Vereinfachtes Schema der Regulierung von FOXOs durch AKT. **B)** Von Kwon und Kollegen 2004 identifizierte FOXO-Bindestellen auf der DNA in einer Entfernung von -250 bp, -420 bp und -630 bp vom Transkriptionsstart des *PDK4*-Gens. UE bezeichnet den *Upstream-Enhancer* Bereich bei -12000 bp. **C)** Adhärenz SKOV-3 Zellen wurden 3 h mit PP1 (5 μ M) bzw. LY294002 (20 μ M) oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. **D)** SKOV-3 Zellen wurden unter nicht-adhärenz (Adhärenz 0 h) oder adhärenz (Adhärenz 24 h) Bedingungen kultiviert.

Die Chromatin-Immünpräzipitation wurde mit spezifischen Antikörpern gegen FOXO1 bzw. FOXO3 oder mit einem unspezifischen IgG-Pool durchgeführt. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der RT-qPCR-Analyse amplifiziert. Eine bedeutungslose genomische Region (con) wurde als Negativkontrolle amplifiziert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die DNA auszuschließen. Dargestellt ist die Anreicherung relativ zur Input-DNA.

Abbildung 4.15C zeigt das Ergebnis der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit spezifischen Antikörpern gegen FOXO1 sowie FOXO3 in adhärenenten SKOV-3 Zellen, die für 3 h mit dem SRC-Inhibitor PP1 (5 μ M) bzw. dem PI3K-Inhibitor LY294002 (20 μ M) behandelt wurden. Als Negativkontrolle diente ein unspezifischer IgG-Pool (siehe Kapitel 3.2.1.6). Nach Inhibitorbehandlung konnte eine deutliche Rekrutierung von FOXO3 an die publizierten Bindestellen bei -250 bp, -420 bp und -630 bp detektiert werden. FOXO1 war in diesen Bereichen deutlich weniger nachzuweisen. Außerdem zeigte sich zusätzlich zu den erwarteten Bindestellen eine deutliche Anreicherung von FOXO3, und in geringerem Maße auch von FOXO1, am *PDK4-Upstream-Enhancer* nach Inhibitorbehandlung. Dagegen zeigt Abbildung 4.15D, dass in Zellen mit Verlust der Adhärenz (0 h) keine Bindung von FOXO-Transkriptionsfaktoren, weder an den bekannten FOXO-Bindestellen noch am *Upstream-Enhancer*, zu erkennen ist. Für dieses Experiment erfolgte ebenfalls eine Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen FOXO1 und FOXO3 nachdem SKOV-3 Zellen 24 h unter adhärenenten oder nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert wurden. Damit scheinen FOXO-Transkriptionsfaktoren nicht an der gesteigerten *PDK4*-Expression in nicht-adhärenenten Zellen beteiligt zu sein.

Aus den bisherigen Erkenntnissen lässt sich festhalten, dass sich die Inaktivierung des SRC-PI3K-AKT Signalwegs, durch Kinaseinhibitoren oder durch den Verlust der Adhärenz, aktivierend auf die *PDK4*-Expression auswirkt. Dabei vermitteln Kinaseinhibitoren ihre induzierende Wirkung auf *PDK4* über die Rekrutierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren an Bindestellen im *PDK4*-Lokus. Der Mechanismus, der zur *PDK4*-Repression in adhärenenten Zellen und zur Derepression in nicht-adhärenente Zellen führt, scheint dagegen unabhängig von FOXO-Faktoren zu sein.

4.2.5 Untersuchungen zur Beteiligung GSK3-abhängiger Signalwege an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Beteiligung einiger AKT-Substrate an der adhärenzabhängigen *PDK4*-Regulation bereits ausgeschlossen werden kann. Dazu zählen der ERK-Signalweg (Abb. 4.8), der JNK-Signalweg sowie der NF- κ B- Signalweg (Abb. 4.9). Auch für die Transkriptionsfaktoren CREB (Abb. 4.10) und FOXO (Abb. 4.15) konnte eine Beteiligung an dieser Regulation nicht nachgewiesen werden. Abbildung 4.9 zeigte zudem auch keinen Einfluss der Adhärenz auf die AKT-abhängige GSK3-Phosphorylierung. Dennoch kann bei diesem Erkenntnisstand eine Beteiligung der GSK3 an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz noch nicht vollständig ausgeschlossen werden. So kann die Aktivität der GSK3 neben der Kinase AKT auch

von zahlreichen anderen Kinasen aktivierend oder inhibitorisch durch Phosphorylierung an verschiedenen Aminosäureresten beeinflusst werden. Zu diesen Kinasen zählt beispielsweise neben PKA auch die „*integrin-linked kinase*“ (ILK) und Kinasen der SRC-Familie (Medina and Wandosell, 2011).

Die GSK3 selbst reguliert durch Phosphorylierung die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen auch die Transkriptionsfaktoren CREB und NFAT („*nuclear factor of activated T-cells*“) (Hur and Zhou, 2010). Die Phosphorylierung von NFAT führt zu dessen Kernausschluss und verhindert die Zielgeninduktion. Dass NFAT keinen Einfluss auf die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen zu haben scheint, zeigte sich in einem weiteren Experiment, bei dem die Behandlung mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A die *PDK4*-Expression in adhären und nicht-adhären Zellen nicht beeinflusste (Daten nicht gezeigt). Cyclosporin A verhindert die Calcineurin-vermittelte NFAT-Aktivierung und hemmt dadurch die Expression der Zielgene (Muller and Rao, 2010).

Bekanntermaßen ist auch der transkriptionelle Ko-Aktivator β -Catenin ein weiteres GSK3-Substrat. Die in der Wnt-Signalkaskade durch GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung ist ein Polyubiquitinierungssignal und führt zum proteasomvermittelten Abbau von β -Catenin (Aberle et al., 1997; Baron and Kneissel, 2013; Hur and Zhou, 2010). Unphosphoryliertes β -Catenin akkumuliert hingegen und transloziert in den Kern, wo es an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF („*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*“)-Familie bindet, den Ko-Repressor Groucho verdrängt und die Zielgenexpression induziert (Abb. 4.16A) (Daniels and Weis, 2005). Aus der Literatur ist auch bekannt, dass der GSK3- β -Catenin-Signalweg eine wichtige Rolle im Ovarialkarzinom spielt (Arend et al., 2013). So ist bereits publiziert, dass in Langzeit-Sphäroidkulturen bei denen die Ovarialkarzinomzellen permanent in Suspension gehalten wurden, sowohl die Expression von β -Catenin als auch die Expression seiner Zielgene induziert ist (Condello et al., 2014). Diesem Hinweis wurde in den folgenden Experimenten nachgegangen und untersucht, ob die GSK3- β -Catenin-TCF-Signalachse *PDK4* als Zielgen, auch in Abhängigkeit der Adhärenz, reguliert.

4.2.5.1 Einfluss der GSK3-Inhibition auf die *PDK4*-Expression

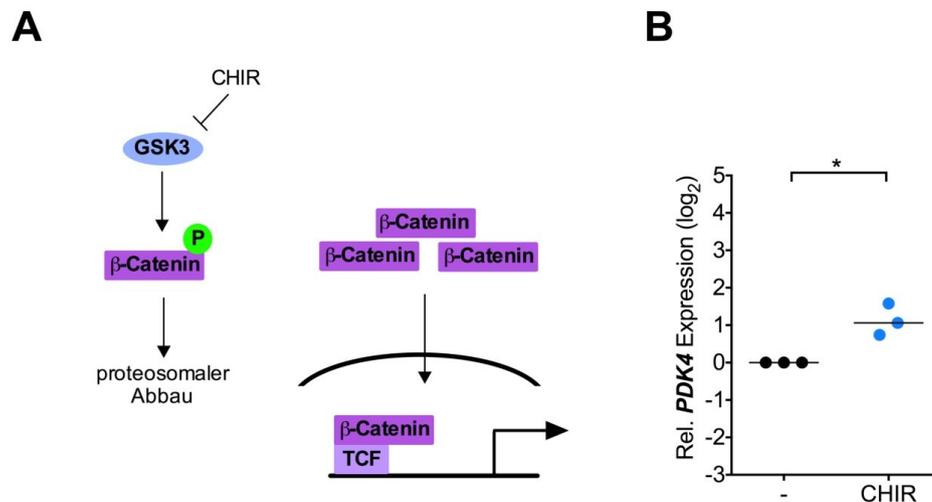


Abb. 4.16 Transkriptionelle *PDK4*-Aktivierung durch GSK3-Inhibition.

A) Vereinfachte schematische Darstellung des GSK3- β -Catenin-Signalwegs nach Hur et al 2010. **B)** Adhärenz SKOV-3 Zellen wurden 3 h mit dem GSK3-Inhibitor CHIR99021 (CHIR 10 μ M) oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die *PDK4*-Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf die Kontrollprobe. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert technischer Replikate dar. Der Median biologischer Replikate ist durch horizontale Striche gekennzeichnet. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (t-Test).

Da der Hypothese nach β -Catenin der Ko-Aktivator für die *PDK4*-Induktion bei Adhärenzverlust wäre, wurden adhärenz SKOV-3 Zellen zuerst 3 h mit dem pan-GSK3-Inhibitor CHIR99021 (CHIR 10 μ M) behandelt, um eine mögliche GSK3-vermittelte Repression des β -Catenin-Signalwegs aufzuheben. Dabei zeigte sich eine signifikante Induktion der *PDK4*-Expression (2-fach) nach CHIR-Behandlung (Abb. 4.16B) in der RT-qPCR-Analyse (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.). Dies legt nahe, dass *PDK4* ein Zielgen der GSK3-vermittelten Transkriptionsregulation ist und die Kinase die *PDK4*-Transkription reprimiert. Darauf aufbauend wurde im folgenden Kapitel untersucht, ob β -Catenin in die adhärenzabhängige *PDK4*-Regulation involviert ist.

4.2.5.2 Untersuchungen zum Einfluss von β -Catenin auf die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation

Zwar wurde eine Induktion der β -Catenin-Expression in nicht-adhärenz SKOV-3 Zellen bei Condello und Kollegen 2014 beschrieben, dies konnte jedoch in eigenen Experimenten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurden, im Gegensatz zu den Langzeit-Sphäroidkulturen von Condello und Kollegen, SKOV-3

Zellen analysiert, die 24 h in Suspension kultiviert waren und dabei die Aktivierung der *PDK4*-Expression aufwiesen.

Ob β -Catenin die transkriptionelle Aktivierung von *PDK4* in nicht-adhärenenten Zellen vermittelt, sollte zum einen mittels β -Catenin-Depletion (Abb. 4.17A) und zum anderen anhand der Behandlung mit einem Inhibitor (BC21), der die β -Catenin-TCF4-vermittelte Transkription (Abb. 4.17B) hemmt, überprüft werden. Handelt es sich bei β -Catenin um den vermittelnden Faktor, wäre der Hypothese, nach eine geringere *PDK4*-Aktivierung unter diesen Bedingungen bei Adhärenenzverlust zu erwarten.

Die Auswirkungen der β -Catenin-Depletion wurden mittels siRNA-Technologie (siehe Kapitel 3.2.5) untersucht, wobei die relative *PDK4*-Expression in der RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.) ermittelt wurde. SKOV-3 Zellen wurden mit einem Pool aus 4 spezifischen siRNAs gegen *CTNNB1* (kodierend für das Protein β -Catenin) und Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 24 h unter nicht-adhärenenten Wachstumsbedingungen kultiviert und mit dem GSK3-Inhibitor CHIR99021 (CHIR 10 μ M) oder DMSO behandelt.

Interessanterweise zeigte sich die *PDK4*-Aktivierung durch Adhärenenzverlust von der β -Catenin-Depletion unbeeinflusst (Bedingung 3 in Vgl. zu Bedingung 1), obwohl β -Catenin als putativer transaktivierender Faktor galt (Abb. 4.17A).

Wie in Abbildung 4.17A außerdem zu sehen ist, wurde die *PDK4*-Expression in nicht-adhärenenten Zellen durch GSK3-Inhibition wie in adhärenenten Zellen (Abb. 4.16) signifikant aktiviert (Bedingung 2 in Vgl. zu Bedingung 1: 1,8-fach). Während eine CHIR-vermittelte Aktivierung der *PDK4*-Expression in β -Catenin-depletierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Bedingung 4 in Vgl. zu Bedingung 3). Dies spricht für einen spezifischen Effekt des Inhibitors auf die GSK3- β -Catenin-vermittelte *PDK4*-Regulation.

Um die Funktionalität der siRNA-Transfektion zu überprüfen, wurde die Expression von *CTNNB1* und des etablierten β -Catenin-Zielgens *AXIN2* („*axin-like protein*“) ebenfalls in der RT-qPCR analysiert. Die erfolgreiche β -Catenin-Depletion konnte mit einer 90%igen Reduktion der *CTNNB1*-Transkriptmenge bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Zudem war auch die basale *AXIN2*-Expression durch β -Catenin-Depletion deutlich reduziert (Bedingung 7 in Vgl. zu Bedingung 5), sowie die Induktion der *AXIN2*-Expression durch CHIR in den depletierten Zellen verringert (Bedingung 8 gegenüber Bedingung 7 in Vgl. zu Bedingung 6 gegenüber Bedingung 5). Diese Befunde lassen auf eine funktionelle β -Catenin-Depletion schließen.

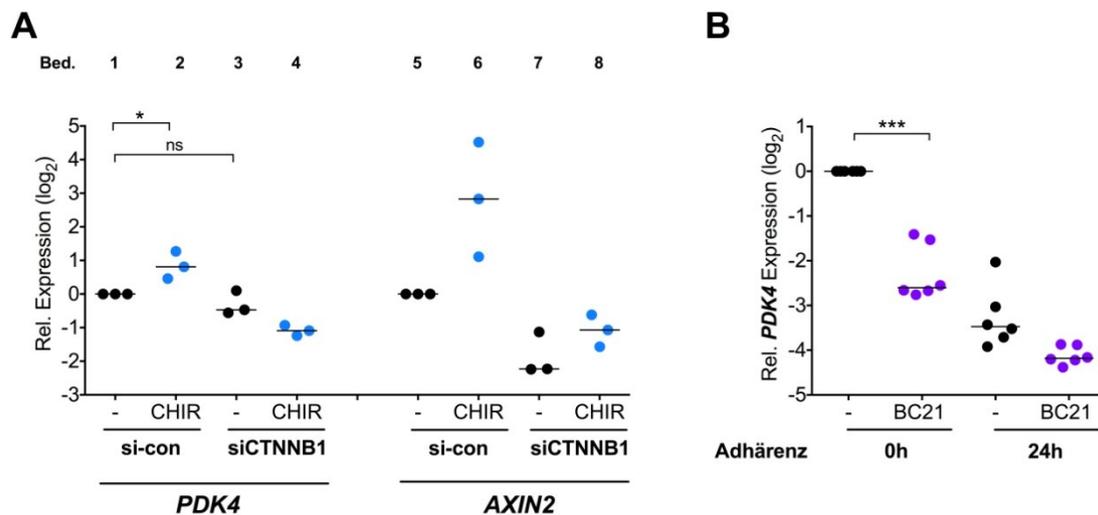


Abb. 4.17 Einfluss von β -Catenin auf die *PDK4*-Induktion in nicht-adhärenenten SKOV-3 Zellen.

A) Nach Transfektion von siRNA gegen *CTNNB1* bzw. einer Kontroll-siRNA (si-con) wurden SKOV-3 Zellen 24 h unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert. Die Zellen waren mit 10 μ M CHIR99021 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Expression von *PDK4* und dem β -Catenin-Zielgen *AXIN2* wurde in der RT-qPCR ermittelt. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf Kontrollzellen (si-con-transfizierte DMSO-behandelte Zellen). Ziffern nummerieren die verschiedenen Probenbedingungen (Bed.) **B**) SKOV-3 Zellen wurden unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert (Adhärenz 0 h) und mit 20 μ M BC21 bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Adhärenente Zellen (Adhärenz 24 h) waren 3 h mit 20 μ M BC21 bzw. dem Lösungsmittel behandelt. Abgebildet ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf die Kontrollzellen (DMSO-behandelte nicht-adhärenente Zellen).

Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus technischen Replikaten und der Median biologischer Replikate ist durch horizontale Striche dargestellt. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe, ns (nicht signifikant), (t-Test).

Wie bereits angedeutet, bietet die Behandlung der Zellen mit der Substanz BC21 eine weitere Möglichkeit, den Einfluss von β -Catenin auf die *PDK4*-Induktion nach Adhärenzverlust zu untersuchen. Dabei handelt es sich um einen Inhibitor, der die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF4 stört und damit die Zielgenexpression supprimiert (Tian et al., 2011). Nachdem SKOV-3 Zellen mit BC21 (20 μ M) behandelt wurden (siehe Schema nach Abb. 4.12), erfolgte die Messung der *PDK4*-Expression in der RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.). Die inhibitorische Wirkung von BC21 auf die β -Catenin-abhängige TCF4-vermittelte Zielgenexpression ließ sich in Kontrollproben bestätigen, da der induzierende Effekt von CHIR auf die Expression von *AXIN2* und *PDK4* unter gleichzeitiger BC21-Behandlung aufgehoben war (Daten nicht gezeigt). Dies untermauert zusätzlich die spezifische Wirkung der CHIR-Behandlung (Abb. 4.16B und Abb. 4.17A) auf die *PDK4*-Regulation über den GSK3– β -Catenin-Signalweg.

Interessant ist jedoch, dass, obwohl die Ergebnisse der β -Catenin-Depletion (Abb. 4.17A) nicht auf β -Catenin als Vermittler der transkriptionellen *PDK4*-Aktivierung in nicht-adhärenenten Zellen hinweisen, die BC21-Behandlung diese Aktivierung

signifikant (Abb. 4.17B) verhinderte. Dies spricht wiederum für β -Catenin als Ko-Aktivator in der *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust.

4.2.5.3 Analyse der Rekrutierung von β -Catenin und TCF4 an putative TCF4-Bindestellen des *PDK4*-Lokus

Einen weiteren Hinweis darauf, dass die GSK3- β -Catenin-TCF-Signalachse die *PDK4*-Expression beeinflussen könnte, lieferte auch die Analyse genomweiter Datenbanken hinsichtlich der TCF4-Bindung am *PDK4*-Lokus. Prinzipiell sind TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren dauerhaft in einem Kernkomplex an die DNA ihrer Zielgene gebunden, deren Transkription über die Rekrutierung von Ko-Repressoren und Ko-Aktivatoren reguliert wird (Daniels and Weis, 2005). Abbildung 4.18A zeigt das *PDK4*-Gen und seine chromosomale Lokalisation, sowie die Anreicherung von TCF4 anhand von Peaks aus verschiedenen CHIP-Sequenzierungen unterschiedlicher humaner Zelllinien (HepG2, HeLa-S3, HEK293, PANC1). Die *in silico* Analyse des *PDK4*-Lokus („UCSC Genome Browser“) lieferte eine Anreicherung des Transkriptionsfaktors TCF4 am Transkriptionsstart (0 bp), -400 bp und +6000 bp vom Transkriptionsstart (TS) entfernt. Außerdem ließ sich TCF4 auch im Bereich des *PDK4*-Upstream-Enhancers (-12 kb) nachweisen. Des Weiteren wurde TCF4 in der Leber auch schon mit der Regulation der *PDK4*-Expression in Zusammenhang gebracht (Oh et al., 2012).

Mit Hilfe der folgenden CHIP-Experimente sollte geklärt werden, ob β -Catenin und TCF4 an der adhärenzabhängigen *PDK4*-Regulation beteiligt sein können. Um hierfür eine Rekrutierung von β -Catenin an die putativen TCF4-Bindestellen im *PDK4*-Lokus zu untersuchen, wurden SKOV-3 Zellen 24 h adhärenz oder unter Verlust der Adhärenz (Adhärenz 0 h) kultiviert. Als Positivkontrolle erfolgte eine Behandlung mit dem GSK3-Inhibitor CHIR99021 (CHIR 10 μ M) bei adhärenz Zellen für 3 h. Anschließend wurde die Chromatin-Immunpräzipitation (siehe Kapitel 3.2.1.6) mit spezifischen Antikörpern gegen β -Catenin beziehungsweise einem unspezifischen IgG-Pool durchgeführt. Abbildung 4.18B zeigt keine relevante β -Catenin-Anreicherung unter den verschiedenen Adhärenzbedingungen an den putativen Bindestellen in der Umgebung des Transkriptionsstarts, +6000 bp vom TS entfernt oder im Bereich des *Upstream-Enhancers*. Als Positivkontrolle wurde der *AXIN2*-Lokus analysiert. Wie Abbildung 4.17A zeigt, ist die *AXIN2*-Expression nach CHIR-Behandlung induziert und unter diesen Bedingungen konnte auch die erwartete β -Catenin-Bindung am *AXIN2*-Lokus nachgewiesen werden (Abb. 4.18B). Allerdings ließ sich eine Anreicherung von β -Catenin am *PDK4*-Lokus unter CHIR99021-Behandlung nicht beobachten, obwohl

die *PDK4*-Expression nachweislich unter diesen Bedingungen induziert war (Abb. 4.16B).

Zudem war auch keine TCF4-Anreicherung an den putativen Bindestellen im *PDK4*-Lokus bei nicht-adhärenenten und adhärenenten SKOV-3 Zellen festzustellen, während sich der Transkriptionsfaktor eindeutig am *AXIN2*-Lokus als Positivkontrolle nachweisen ließ (Abb. 4.18C).

Es ist daher festzuhalten, dass am *PDK4*-Lokus und am *Upstream Enhancer* weder eine Bindung von TCF4 noch eine Rekrutierung von β -Catenin nach Adhärenzverlust nachgewiesen werden konnte. Dies spricht gegen eine Beteiligung beider an der *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust.

Zusammengefasst lässt sich anhand dieser Ergebnisse keine gesicherte Aussage darüber treffen, ob die GSK3- β -Catenin-Signalachse in der Lage ist die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen abhängig von Adhärenz und Adhärenzverlust zu regulieren. β -Catenin-Depletionsexperimente (Abb. 4.17A) sowie ChIP-Analysen (Abb. 4.18) sprechen dagegen, die Inhibition der Bindung zwischen β -Catenin und TCF4 (Abb. 4.17B) jedoch dafür.

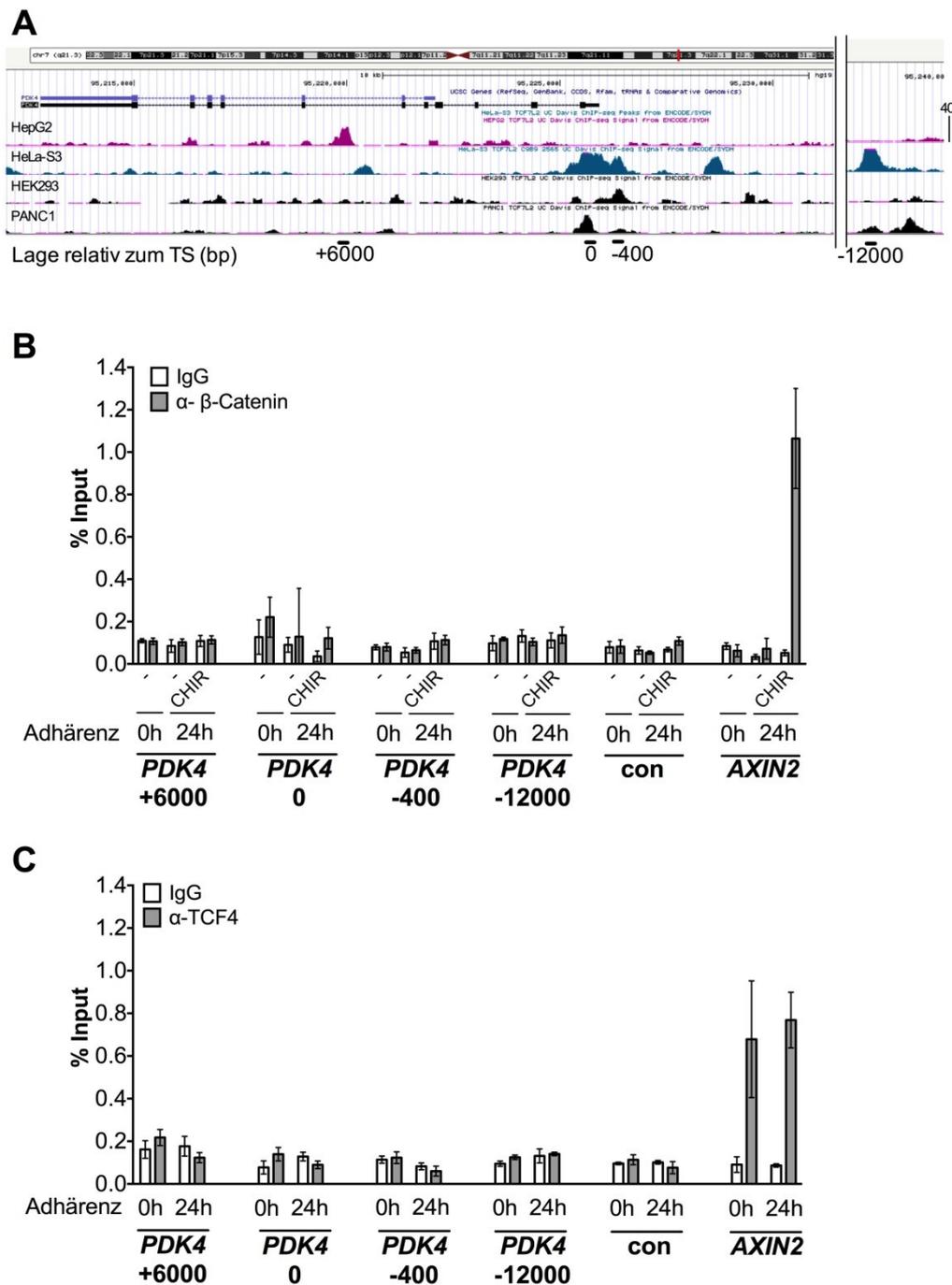


Abb. 4.18 Analyse der Rekrutierung von β -Catenin und TCF4 an putative TCF4-Bindestellen des *PDK4*-Lokus.

A) *In silico* Analyse des *PDK4*-Lokus und Identifizierung putativer TCF4-Bindestellen („UCSC Genome Browser“). Dargestellt ist das *PDK4*-Gen mit seiner chromosomalen Lokalisation. Peaks kennzeichnen DNA-Bereiche mit einer TCF4-Anreicherung aus ChIP-Sequenzierungen verschiedener humaner Zelllinien (HepG2, HeLa-S3, HEK293, PANC1). Gekennzeichnet sind die in B) und C) amplifizierten Bereiche und ihre Lokalisation relativ zum Transkriptionsstart (TS). **B)** SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter nicht-adhären (Adhärenz 0 h) oder adhären (Adhärenz 24 h) Bedingungen kultiviert. Die Behandlung adhärenter Zellen mit CHIR99021 (CHIR 10 μ M) erfolgte für 3 h. Mit Antikörpern gegen β -Catenin oder einem unspezifischen IgG-Pool wurde die Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt. **C)** SKOV-3 Zellen wurden unter Verlust der Adhärenz (Adhärenz 0 h) oder adhären (Adhärenz 24 h) kultiviert. Die ChIP-Analyse erfolgte mit Antikörpern gegen TCF4 oder einem unspezifischen IgG-Pool.

Die Amplifikation der putativen TCF4-Bindestelle erfolgte mittels RT-qPCR. Als Negativkontrolle wurde ein irrelevantes genomisches Fragment amplifiziert. Dargestellt ist die Anreicherung relativ zur Input-DNA.

4.2.6 Untersuchungen zum Einfluss von Kernrezeptoren auf die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation

Nachdem sich aus den bisherigen Ergebnissen noch kein Signalweg, der die adhärenzabhängige *PDK4*-Regulation vermittelt, sicher identifizieren ließ, sollte eine RNA-Sequenzierung Hinweise auf involvierte Signalwege geben. Ziel dieser Transkriptomanalyse war es, Gene zu finden, die wie *PDK4* in nicht-adhärenenten Zellen induziert sind, aber durch BC21 nach Adhärenzverlust reprimiert bleiben (Abb. 4.17B) und damit vermeintlich nach dem gleichen Mechanismus wie *PDK4* reguliert werden. Dafür wurde die RNA aus *CTNNB1*-depletierten SKOV-3 Zellen, die entweder unter adhärenenten oder unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert und mit BC21 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt waren, isoliert und analysiert. Die RNA-Sequenzierung wurde in der *Genomics Unit* des ZTI Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Thorsten Stiewe durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.7). Die bioinformatische Datenauswertung erfolgte durch Prof. Dr. Rolf Müller und Florian Finkernagel. Angewendet wurde die *IPA Upstream Regulator Analysis* (siehe Kapitel 3.1.8) mit der sich Signalwege identifizieren lassen, die die beobachteten Expressionsmuster erklären können (Kramer et al., 2014). Der p-Wert gibt dabei den Überlapp zwischen den eingespeisten Datensätzen und bekannten Zielgenen von Transkriptionsregulatoren an. Bei der Analyse der Genexpressionsmuster ließen sich unter den BC21-reprimierten Genen in nicht-adhärenenten Zellen verschiedene Gengruppen und damit potentielle Regulatoren identifizieren (Abb. 4.19). Als beste Regulatoren fielen 17 β -Estradiol und der Estrogenrezeptor α (ER α , ESR1) sowie das synthetische Glukokortikoid Dexamethason auf. Im Folgenden wurde sich daher damit beschäftigt, ob Estrogen- und Glukokortikoidrezeptoren in die adhärenzabhängige *PDK4*-Regulation involviert sind. Diese Annahme ist prinzipiell denkbar, da für beide Transkriptionsfaktoren ligandenunabhängige Aktivierungsmechanismen bekannt sind (Maggi, 2011; Vandevyver et al., 2012).

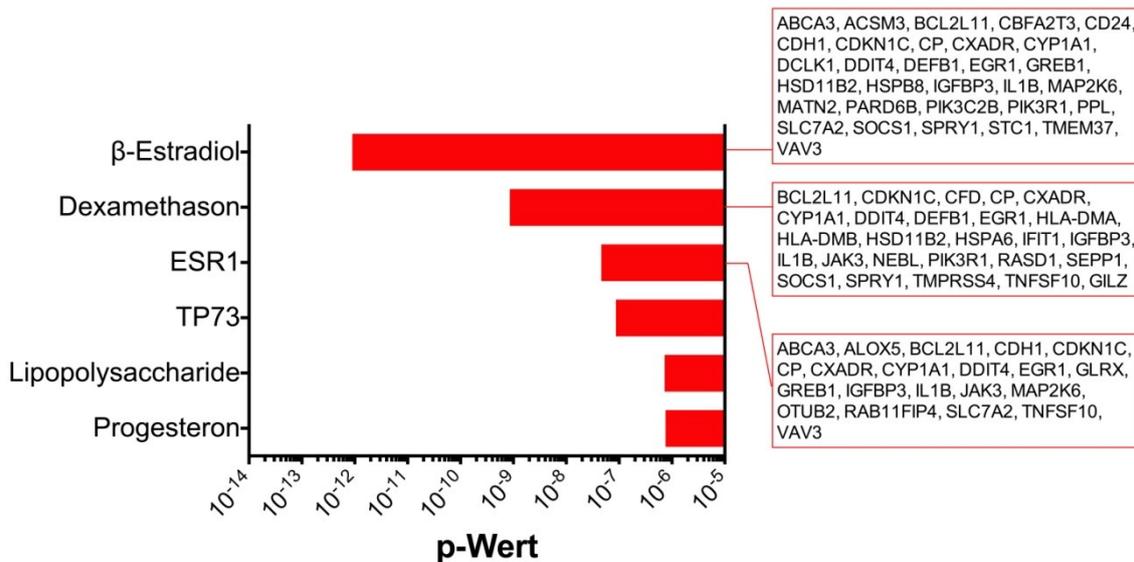


Abb. 4.19 Signalweganalyse von BC21-reprimierten Genen in nicht-adhärenen SKOV-3 Zellen (Auszug aus RNA-Sequenzierung).

Dargestellt sind die identifizierten Signalwege aus der *IPA upstream regulator analysis* (beste 6 Regulatoren anhand des p-Werts). Ein Auszug der regulierten Gene ist ebenfalls abgebildet.

4.2.6.1 Untersuchungen zur Beteiligung des Estrogenrezeptors an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Bei der Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung und anschließender Signalweganalyse waren 17β-Estradiol- und Estrogenrezeptor α (ER)-Zielgene die größte Gengruppe, deren Mitglieder wie *PDK4* durch BC21-Behandlung in nicht-adhärenen Zellen reprimiert blieben.

Der ER ist ein Kernrezeptor, der nach Ligandenbindung Homo- oder Heterodimere bildet, in den Zellkern transloziert und an spezifische genomische Sequenzen („*estrogen responsive element*“, ERE) seiner Zielgene bindet (Maggi, 2011; Pettersson et al., 1997; Pratt and Toft, 1997). Die Rolle des ER in der *PDK4*-Regulation ist bisher nicht eindeutig. Einerseits ist die Induktion der *Pdk4*-Expression nach Estradiolgabe im Muskel von Ratten beschrieben und zudem die Rekrutierung von ERα an den *Pdk4*-Promotor in der Mausleber bekannt (Campbell et al., 2003; Gao et al., 2008). Andererseits konnten Cheng und Kollegen 2009 zeigen, dass Estradiol die *Pdk4*-Expression im Hypothalamus von Mäusen inhibiert.

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist über die Rolle von *PDK4* als ER-Zielgen im Ovar nichts bekannt. Es sollte daher im Folgenden erst einmal untersucht werden, ob der ER als Transkriptionsfaktor allgemein in der Lage ist, die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen zu beeinflussen. Und zum anderen sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich eine Beteiligung des ER an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz ergibt.

Um der ersten Fragestellung nachzugehen, wurden adhärenente SKOV-3 Zellen 3 h mit 100 nM 17 β -Estradiol (E2) behandelt. In der RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.) ließ sich in adhärenenten Zellen eine signifikante *PDK4*-Aktivierung nach Behandlung feststellen (Abb. 4.20A). *PDK4* lässt sich demnach hormonabhängig durch den ER regulieren.

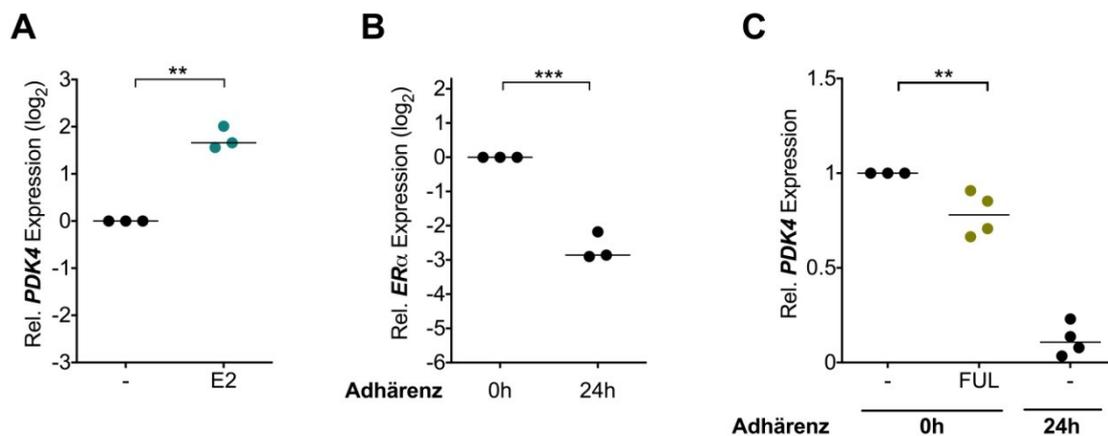


Abb. 4.20 *PDK4*-Regulation durch estrogenrezeptorabhängige Transkription.

A) Adhärenente SKOV-3 Zellen wurden 3 h mit 100 nM 17 β -Estradiol (E2) behandelt. Die relative *PDK4*-Expression wurde in der RT-qPCR ermittelt und bezieht sich auf Lösungsmittel-behandelte Zellen. **B)** Die *ER α* -Expression wurde in nicht-adhärenenten (Adhärenz 0 h) und adhärenenten (Adhärenz 24 h) SKOV-3 Zellen mit Hilfe der RT-qPCR ermittelt. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf nicht-adhärenente Zellen. **C)** Nicht-adhärenente SKOV-3 Zellen (Adhärenz 0 h) wurden 24 h mit Fulvestrant (FUL 1 μ M) behandelt. Mit dem Lösungsmittel waren nicht-adhärenente und adhärenente (Adhärenz 24 h) Zellen als Kontrolle behandelt. Die relative *PDK4*-Expression wurde in der RT-qPCR ermittelt und bezieht sich auf die Kontrollprobe (Lösungsmittel-behandelte nicht-adhärenente Zellen).

Jeder Datenpunkt steht für den Mittelwert technischer Replikate. Der Median der biologischen Replikate ist durch horizontale Striche abgebildet. *** p <0,001, ** p <0,01 signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (t-Test).

In Bezug auf die Expressionsregulation von *PDK4* durch Adhärenz und Adhärenzverlust wurden hormonunabhängige Regulationsmechanismen untersucht. Dabei zeigte sich interessanterweise die Expression von *ER α* von diesen Kulturbedingungen beeinflusst (Abb. 4.20B). Die *ER α* -Expression wurde in nicht-adhärenenten und adhärenenten SKOV-3 Zellen mittels RT-qPCR bestimmt. Der Transkriptionsfaktor *ER α* ist in adhärenenten Zellen auf transkriptioneller Ebene signifikant weniger nachweisbar. Dieser Effekt korreliert mit der *PDK4*-Expression unter diesen Bedingungen. Um näher zu untersuchen, ob der ER in die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation involviert ist, wurden nicht-adhärenente SKOV-3 Zellen (Adhärenz 0 h) 24 h mit der Substanz Fulvestrant (FUL 1 μ M) behandelt (Abb. 4.20C). Dabei handelt es sich nicht nur um einen hochaffinen ER-Antagonisten, sondern die Substanz führt auch zur Degradation des Estrogenrezeptors α (Wakeling et al., 1991; Yeh et al., 2013). Diese Wirkung wurde sich zunutze gemacht, um zu untersuchen, ob der ER α

die *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust vermittelt. Die anhand der RT-qPCR ermittelte *PDK4*-Expression zeigt sich durch Fulvestrant leicht aber signifikant reduziert.

Diese Ergebnisse lassen auf eine hormon-unabhängige Beteiligung des ER α an der *PDK4*-Induktion nach Adhärenzverlust schließen.

Neben dem ER ist von den verwandten „*estrogen-related receptor α* “ (ERR α) und „*estrogen-related receptor γ* “ (ERR γ) bereits bekannt, dass sie die *PDK4*-Expression durch Bindung an ein spezifisches DNA-Element („*estrogen-related receptor response element*“, ERRE) induzieren können (van den Berg et al., 2008). Zudem vermittelt der ERR γ die transkriptionelle *PDK4*-Aktivierung in MCF-10A Zellen nach Verlust der Adhärenz (Kamarajugadda et al., 2012). Allerdings ist ERR γ in SKOV-3 Zellen auf transkriptioneller Ebene kaum nachweisbar und die Behandlung mit dem Rezeptorantagonisten 4-OHT beeinflusste die *PDK4*-Expression nach Adhärenzverlust nicht (Daten nicht gezeigt). Es liegt daher kein Hinweis vor, der auf ERR γ als Regulator der *PDK4*-Expression bei Adhärenz und Adhärenzverlust hindeutet.

4.2.6.2 Untersuchungen zur Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Die Signalweganalyse ermittelte anhand des Glukokortikoids Dexamethason mit dem GR einen weiteren putativen Regulator für die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation (Abb. 4.19).

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Glukokortikoide die Induktion von *PDK4* bei Diabetes und beim Fasten vermitteln, um die Glukoseoxidation zu inhibieren (siehe Kapitel 2.2.4.1.1). Diese *PDK4*-Regulation ist bisher primär in Leberzellen bekannt, wo die Glukoseoxidation zu Gunsten der Gluconeogenese gehemmt wird, und im Herzen von Ratten (Puthanveetil et al., 2010; Qi et al., 2004).

Generell binden Glukokortikoide an den Glukokortikoidrezeptor (GR) im Zytoplasma was über Konformationsänderungen zur Translokation des Rezeptors in den Zellkern führt. Dort bindet er über sogenannte GREs („*glucocorticoid-response elements*“) an die DNA seiner Zielgene und reguliert ihre Expression (Kadmiel and Cidlowski, 2013). Ein solches GRE wurde im Promotorbereich des *PDK4*-Lokus bereits identifiziert. Unter Glukokortikoidbehandlung bindet der GR an dieses DNA-Element und führt in Kooperation mit FOXO-Faktoren zur Induktion der *PDK4*-Expression in Leberkarzinomzelllinien (Connaughton et al., 2010; Kwon et al., 2004).

4.2.6.3 Untersuchungen zur Beteiligung von PPAR β/δ („*peroxisome proliferator-activated receptor δ/β* “) an der adhärenzvermittelten *PK4*-Regulation

In der Literatur und aus früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte *PK4* bereits als Zielgen des Kernrezeptors „*peroxisome proliferator-activated receptor δ/β* “ (PPAR β/δ), der auch im Lipid- und Glukosemetabolismus eine wichtige Rolle spielt, identifiziert werden (Adhikary et al., 2011; Degenhardt et al., 2007; Kramer et al., 2007). Bei PPAR β/δ handelt es sich um einen ubiquitär exprimierten, ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktor, der mit seinem Heterodimerisierungspartner RXR an „*PPAR response elements*“ (PPRE) auf der DNA bindet und die Expression seiner Zielgene reguliert (Miyata et al., 1994; Peters et al., 2012). In Abwesenheit von Liganden reprimiert PPAR β/δ im Komplex mit Ko-Repressoren basal die Expression seiner Zielgene, während die Bindung natürlicher oder synthetischer Agonisten die Zielgenexpression durch Rekrutierung von Ko-Aktivatoren induziert (Ricote and Glass, 2007; Shi et al., 2002; Yu and Reddy, 2007) (Abb. 4.22A). Zu den endogenen Liganden zählen ungesättigte Fettsäuren, Triglyceride, Prostaglandine und Retinsäure (Berger et al., 1999; Shaw et al., 2003; Sznajdman et al., 2003; Wagner and Wagner, 2010; Xu et al., 1999). Mit 15-HETE konnte unsere Arbeitsgruppe einen weiteren natürlichen endogenen Agonisten identifizieren (Naruhn et al., 2010). Inverse Agonisten, wie die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten ST247 oder DG172, verstärken die Zielgenrepression durch Rekrutierung verschiedener Ko-Repressoren (Lieber et al., 2012; Naruhn et al., 2011). Bei PT-S58 handelt es sich hingegen um einen Antagonisten, der keinen Einfluss auf die basale Zielgenexpression hat, aber Agonisten-vermittelte Effekte blockiert (Naruhn et al., 2011). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben *PK4* als PPAR β/δ -Zielgen der Klasse II in SKOV-3 Zellen identifiziert, da es sich durch Ligandenbehandlung regulieren und durch PPAR β/δ -Depletion dereprimieren lässt (Adhikary et al., 2011). Zudem konnte die Bindung von PPAR β/δ in der *Upstream-Enhancer*-Region des *PK4*-Gens nachgewiesen werden (Adhikary et al., 2011; Degenhardt et al., 2007; Schumann et al., 2015). Es stellte sich daher die Frage, ob PPAR β/δ die adhärenzabhängige *PK4*-Regulation vermitteln kann. Vorstellbar wäre, dass durch Veränderung in der Adhärenz Signalwege beeinflusst werden, die die Expression von Enzymen regulieren, welche an der Metabolisierung von endogenen Liganden beteiligt sind. Zu diesen Enzymen zählen beispielsweise Cyclooxygenasen, die durch Synthese von Prostaglandinen den Rezeptor stimulieren und deren Expression, wie für die Cyclooxygenase-2 (COX-2) bekannt, durch verschiedene Signalwege (u.a. AKT, PKC (Proteinkinase C)) reguliert wird (Gupta et al., 2000; Pausawasdi et al., 2002; St-Germain et al., 2004).

Um der Hypothese nachzugehen, ob ligandenabhängige PPAR β/δ -vermittelte Transkriptionseffekte für die *PDK4*-Regulation durch Adhärenz verantwortlich sind, wurden SKOV-3 Zellen in den folgenden Experimenten mit siRNA gegen *PPARD* transfiziert oder mit Liganden behandelt, und die *PDK4*-Expression unter verschiedenen Adhärenzbedingungen (Abb. 4.12) untersucht. Die *PDK4*-Expression wurde in der RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.) bestimmt.

In nicht-adhärenenten Zellen (Adhärenz 0 h) wurde *PDK4* sowohl durch die Derepression aufgrund der PPAR β/δ -Depletion, als auch durch Adhärenzverlust transkriptionell aktiviert (Abb. 4.22B). Die *PDK4*-Derepression lieferte gleichzeitig auch den Beweis einer effizienten PPAR β/δ -Depletion. Zudem war die Induktion und Repression durch exogene Liganden in den depletierten Zellen aufgehoben (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 4.22C wurden SKOV-3 Zellen gemäß dem Schema aus Abbildung 4.12 kultiviert und waren 24 h mit dem Agonisten L165,041 (L165 300 nM) behandelt. Neben der gesteigerten *PDK4*-Expression in nicht-adhärenenten Zellen (Adhärenz 0 h), im Vergleich zu adhärrierenden (Adhärenz 3 h) und adhärenenten (Adhärenz 24 h) Zellen, induzierte die L165,041-Behandlung die *PDK4*-Expression in nicht-adhärenenten Zellen noch zusätzlich deutlich signifikant. Die Repression in adhärrierenden Zellen (Adhärenz 3 h) wurde außerdem signifikant verhindert und die Expression in adhärenenten Zellen (Adhärenz 24 h) ebenfalls signifikant induziert.

Diesen Experimenten zufolge, lässt sich die *PDK4*-Transkription neben der Aktivierung durch Adhärenzverlust, noch durch PPAR β/δ -abhängige Mechanismen wie die *PPARD*-Depletion und Agonistenbehandlung steigern, was gegen eine Beteiligung des Kernrezeptors bei dieser Regulation spricht.

Um die Annahme der ligandenabhängigen PPAR β/δ -vermittelte *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust weiter ausschließen zu können, wurden SKOV-3 Zellen mit einem Antagonisten behandelt. Wie oben erwähnt, ist es denkbar, dass mit dem Adhärenzverlust einhergehend die Expression von Enzymen stimuliert wird, welche endogene PPAR β/δ -Liganden synthetisieren. Dieser Hypothese nach würde PPAR β/δ durch Agonisten-Bindung bei Adhärenzverlust die *PDK4*-Induktion vermitteln. Die Behandlung von nicht-adhärenenten Zellen mit einem Antagonisten würde in diesem Fall die Induktion negativ beeinflussen. Wie Abbildung 4.22D allerdings zeigt, hatte die Behandlung mit dem Antagonisten PT-S58 keinen Einfluss auf die *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust, was gegen eine Agonisten-vermittelte Rekrutierung von Ko-Aktivatoren durch Adhärenzverlust spricht.

Da die gesteigerte *PDK4*-Expression bei SKOV-3 Zellen in Suspension vermeintlich den glykolysezentrierten Metabolismus bedingt und diesen Zellen einen Wachstumsvorteil im Aszites verleiht, könnte die Behandlung mit einem inversen

Agonisten durch die *PDK4*-Repression einen therapeutischen Nutzen darstellen. Wie Abbildung 4.22E zeigt, beließ der inverse Agonist PT-S264, ein weiterentwickeltes ST247-Derivat (Toth et al., 2016), die *PDK4*-Expression auch nach Adhärenzverlust auf dem reprimierten Basalniveau adhärenter Zellen und liefert damit die erwähnte Grundvoraussetzung für einen potentiellen klinischen Einsatz.

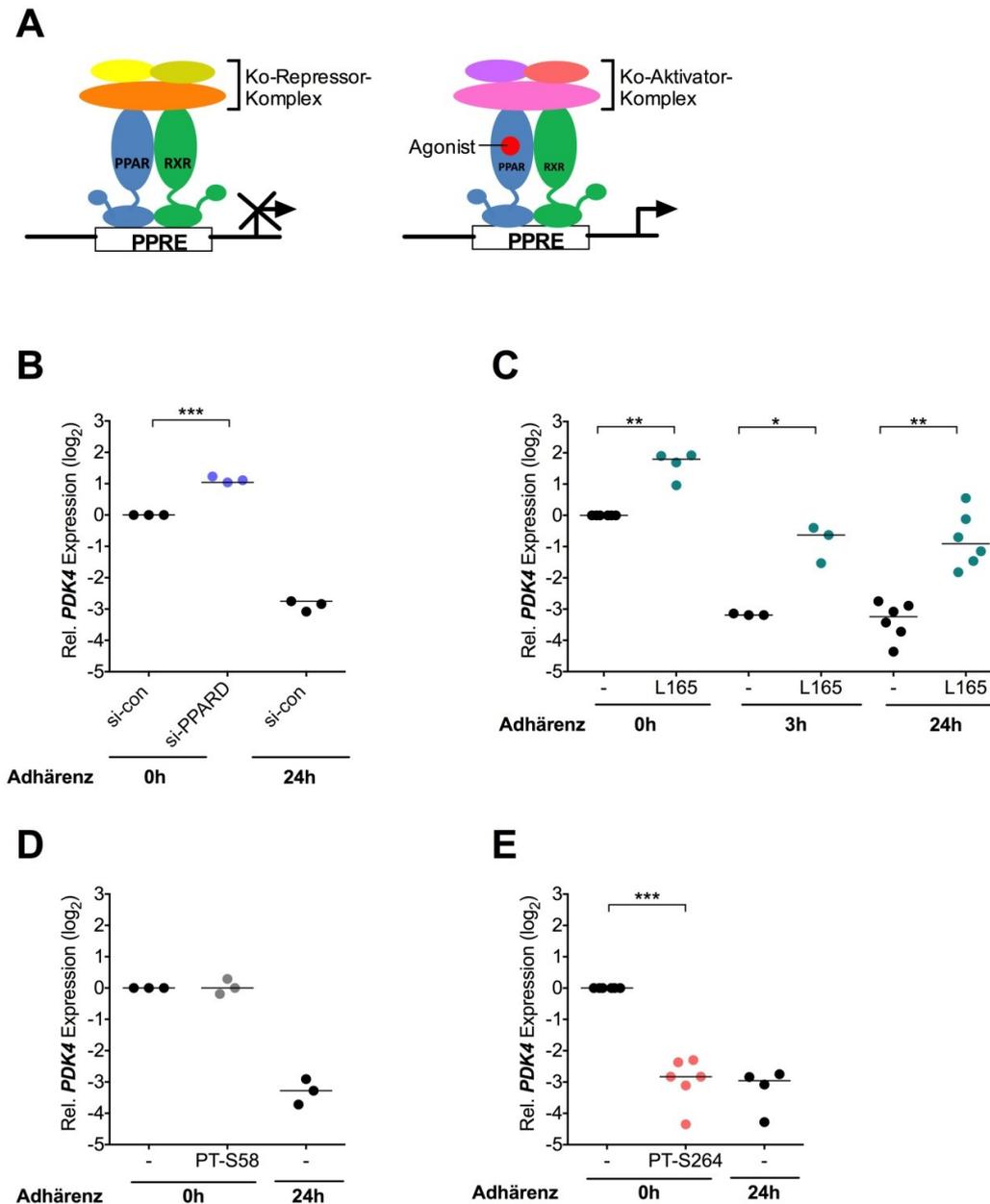


Abb. 4.22 Einfluss von PPAR β/δ auf die *PDK4*-Induktion in nicht-adhärenenten SKOV-3 Zellen.

A) Schematische Darstellung der ligandenabhängigen Transkriptionsregulation durch PPAR β/δ . Modifiziert nach Ricote und Glass 2007. **B)** SKOV-3 Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (si-con) oder einem siRNA-Pool gegen *PPARD* transfiziert. Nachdem die Zellen 24 h unter nicht-adhärenenten (Adhärenz 0 h) oder adhärenenten (Adhärenz 24 h) Bedingungen kultiviert waren, wurde die *PDK4*-Expression in der RT-qPCR bestimmt. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf die Kontrollprobe (nicht-adhärenente si-con-transfizierte Zellen). **C)** SKOV-3 Zellen wurden nach dem Schema aus Abbildung 4.12 kultiviert und waren 24 h mit dem PPAR β/δ -Agonisten L165,041 (L165 300 nM) oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Dargestellt ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf DMSO-behandelte nicht-adhärenente Zellen. **D)** Nicht-adhärenente (Adhärenz 0 h) Zellen wurden 24 h mit dem PPAR β/δ -spezifischen Antagonisten PT-S58 (300 nM) oder DMSO behandelt. Adhärenente SKOV-3 Zellen (Adhärenz 24 h) waren mit DMSO behandelt. Dargestellt ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf die Kontrollprobe (DMSO-behandelte nicht-adhärenente Zellen). **E)** Nicht-adhärenente (Adhärenz 0 h) SKOV-3 Zellen waren 24 h mit dem inversen Agonisten PT-S264 (300 nM) oder DMSO behandelt. Adhärenente SKOV-3 Zellen (Adhärenz 24 h) waren mit DMSO behandelt. Dargestellt ist die relative *PDK4*-Expression bezogen auf die Kontrollprobe (DMSO-behandelte nicht-adhärenente Zellen).

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (t-Test).

4.2.7 Untersuchungen zur Beteiligung des Transkriptionsfaktors C/EBP β an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Mit C/EBP β ist ein weiterer Transkriptionsfaktor bekannt, der die Genexpression von *PDK4* regulieren kann. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass C/EBP β an der thyroidhormonabhängigen *Pdk4*-Induktion in der Leber von Ratten beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurden auch zwei C/EBP β -Bindestellen in der Nähe des *Pdk4*-Promotors bei Ratten identifiziert (Attia et al., 2011; Zhang et al., 2014). C/EBP β kommt daher potenziell als Regulator der adhärenzvermittelten *PDK4*-Expression in Frage. Folglich wurde mittels ChIP-Analyse (siehe Kapitel 3.2.1.6) die Rekrutierung von C/EBP β an den *PDK4*-Lokus, in Abhängigkeit von Adhärenz und Adhärenzverlust, untersucht. SKOV-3 Zellen wurden 24 h unter adhärenzten oder nicht-adhärenzten Bedingungen kultiviert und die darauffolgende Chromatin-Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen C/EBP β beziehungsweise einem unspezifischen IgG-Pool durchgeführt (Abb. 4.23.) Allerdings konnte unter beiden Bedingungen keine C/EBP β -Anreicherung am Transkriptionsstart (TS) des *PDK4*-Gens (0 bp) und in dessen Umgebung (-400 bp) festgestellt werden. Stattdessen zeigte sich eine Bindung von C/EBP β an den *PDK4*-Upstream-Enhancer (-12000 bp) nach Adhärenzverlust. Dennoch scheint der Faktor nicht für die aktive *PDK4*-Transkription in nicht-adhärenzten Zellen notwendig zu sein, da eine siRNA-vermittelte C/EBP β -Depletion diese Aktivierung nicht beeinflusste (Daten nicht gezeigt).

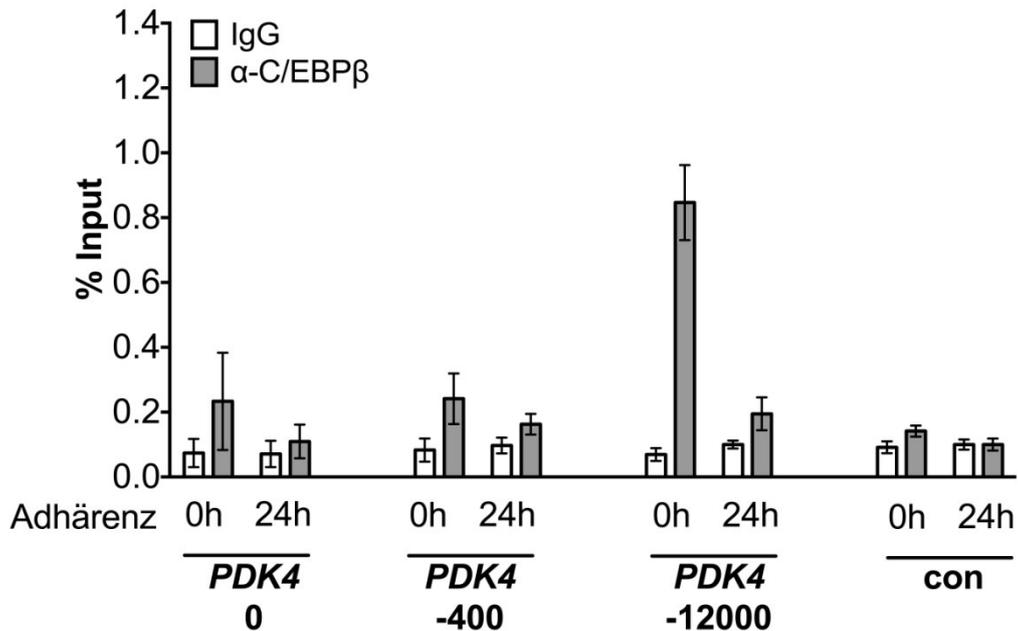


Abb. 4.23 ChIP-Analyse zur adhärenzabhängigen Rekrutierung von C/EBPβ an den *PDK4*-Lokus. SKOV-3 Zellen wurden nach 24-stündiger Kultivierung unter Adhärenzverlust (Adhärenz 0 h) oder Adhärenz in der Chromatin-Immünpräzipitation analysiert. Diese erfolgte mit Antikörpern gegen C/EBPβ oder einem unspezifischen IgG-Pool. Eine mögliche C/EBPβ-Anreicherung wurde am Transkriptionsstart (0 bp), in dessen Umgebung (-400 bp) und am *Upstream-Enhancer* (-12000 bp) des *PDK4*-Gens untersucht. Die Amplifikation dieser genomischen Bereiche und einer Negativkontrollregion (con) wurde mittels RT-qPCR durchgeführt. Dargestellt ist die Anreicherung relativ zur Input-DNA.

4.2.8 Einfluss der Organisation des Aktinzytoskeletts auf die adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

Integrine sind nicht nur, wie in Kapitel 2.3.2 erwähnt, in der Lage über die Aktivierung von Signalwegen Prozesse wie Zellproliferation und das Überleben von Zellen zu steuern, sondern sie sind auch an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt. Die Ausbildung von Fokalen Adhäsionen fördert dabei die Anordnung der Aktinfilamente (F-Aktin) in der Zelle (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Die Verbindungen von Integrinen mit dem Aktinzytoskelett werden über zahlreiche Proteine wie beispielsweise Talin, Paxillin, α -Actinin oder Vinculin vermittelt (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Wiesner et al., 2005). Es ist bereits beschrieben, dass es bei Verlust der Adhärenz zu einer Depolymerisation des F-Aktin in der Zelle kommen kann (Rullo et al., 2012; Van de Water et al., 1994). Da Veränderungen im Aktinzytoskelett auch Auswirkungen auf die Genexpression haben können (Olson and Nordheim, 2010), wurde überprüft, ob *PDK4* dieser transkriptionellen Kontrolle unterliegt. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden SKOV-3 Zellen mit Substanzen behandelt, die die Aktinpolymerisation stören (Cooper, 1987; Spector et al., 1983). Die Kultivierung und

Behandlung mit Cytochalasin D (CytoD 1 μM) und Latrunculin A (LatA 0,5 μM) erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 4.12.

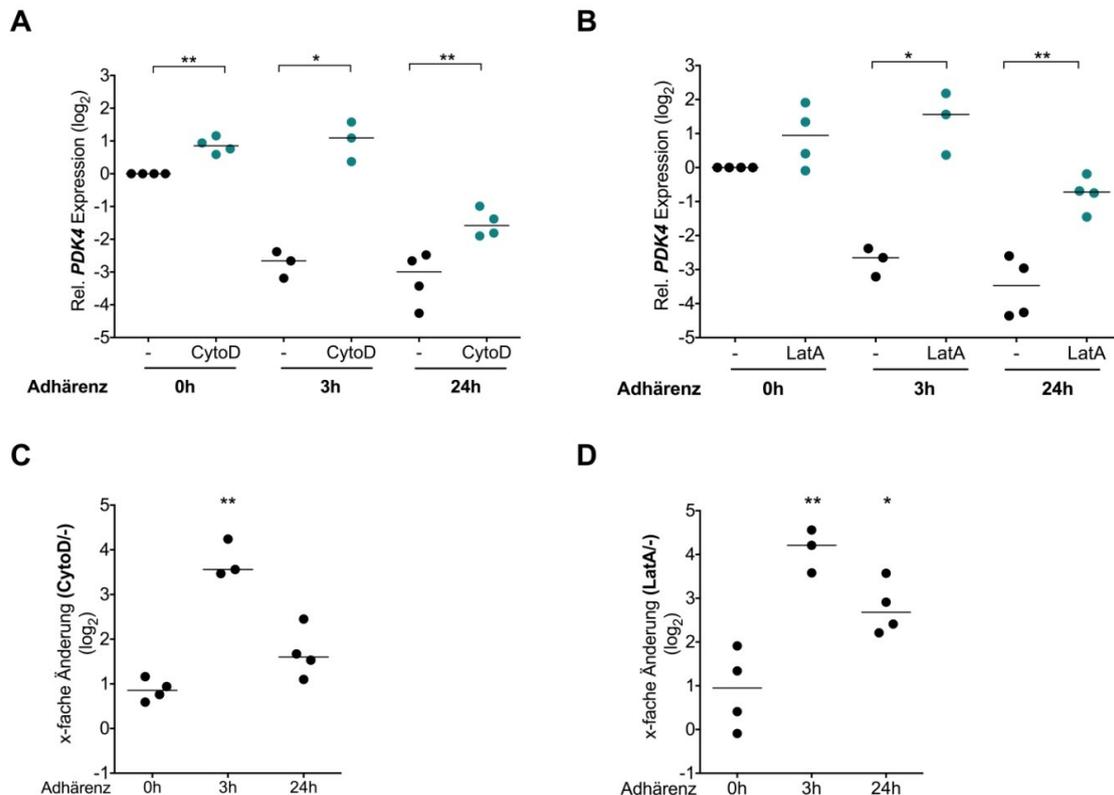


Abb. 4.24 Regulation der *PDK4*-Expression durch Störung der Aktinpolymerisation in SKOV-3 Zellen.

SKOV-3 Zellen wurden nach dem Schema aus Abbildung 4.12 kultiviert und behandelt. **A)** Zellen wurden mit Cytochalasin D (CytoD 1 μM) bzw. dem Lösungsmittel behandelt. **B)** Die Behandlung erfolgte mit 0,5 μM Latrunculin A (LatA).

Die *PDK4*-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Dargestellt ist die auf Lösungsmittel-behandelte nicht-adhärenente Zellen bezogene relative *PDK4*-Expression. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus technischen Replikaten und horizontale Striche stellen den Median der biologischen Replikate dar. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (t-Test). **C)** x-fache Änderung CytoD-behandelter Zellen zu Lösungsmittel-behandelten Zellen. Der Faktor wurde aus A) ermittelt. **D)** x-fache Änderung LatA-behandelter Zellen zu Lösungsmittel-behandelten Zellen. Der Faktor wurde aus B) ermittelt. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied zu nicht-adhärenenten Zellen (t-Test).

Betrachtet man die Morphologie der Zellen, ließ sich feststellen, dass die adhärenenten Zellen, wie erwartet, ihre ursprüngliche Form verloren und sich deutlich abgekugelt hatten (Daten nicht gezeigt). Anhand der *PDK4*-Expressionsanalyse mittels RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.3 und 3.2.1.5.) zeigte sich eine signifikante Aktivierung der *PDK4*-Transkription durch CytoD-Behandlung unter allen Adhärenzbedingungen (Abb. 4.24A). Wie Abbildung 4.24B zeigt, ließen sich vergleichbare Effekte auch durch LatA-Behandlung erzielen: LatA- und CytoD-Behandlung induzierten die *PDK4*-Expression in nicht-adhärenenten Zellen (Adhärenz 0h) und verhinderten die *PDK4*-Repression in adhärenierenden Zellen (Adhärenz 3 h). Des Weiteren dereprimierten die

Behandlungen die *PDK4*-Expression in adhärenen Zellen (Adhärenz 24 h). Beim Vergleich der Änderungsfaktoren aus Abbildung 4.24C und D, fällt auf, dass sich die gestörte Aktinpolymerisation durch beide Substanzen am deutlichsten auf die *PDK4*-Expression adhärerender Zellen auszuwirken schien und dort zur stärksten Aktivierung führte.

5 Diskussion

Bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms lösen sich, wie einleitend erwähnt (siehe Kapitel 2.3.1), Tumorzellen als Einzelzellen oder mehrzellige Sphäroide in den Aszites im Peritonealraum und bilden an anderer Stelle Metastasen aus. Diese Zellen sind nicht nur resistent gegenüber Anoikis, unter ihnen können sich auch chemoresistente, rezidivauslösende Tumorstammzellpopulationen (TICs, „*tumor-initiating cells*“) befinden (Bapat et al., 2005; Carduner et al., 2014; Meng et al., 2012). Aus diesen Fakten ergibt sich die Notwendigkeit, die konkreten Folgen des Adhärenzverlustes in Ovarialkarzinomzellen genauer zu untersuchen.

5.1 Einfluss von Adhärenz und Adhärenzverlust auf Genexpression und Metabolismus in Ovarialkarzinomzellen

5.1.1 Identifizierung von *PDK4* als ein durch Adhärenz reprimiertes Gen im Ovarialkarzinom

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Folgen von Adhärenz und Adhärenzverlust auf die Expression von für den Metabolismus relevanten Genen analysiert.

Mit *PDK4* konnte erstmals ein Gen für das Ovarialkarzinom identifiziert werden, dessen Expression stark von den Adhärenzbedingungen beeinflusst wird. In primären Ovarialkarzinomzellen zeigte sich, dass die *PDK4*-Expression in adhärenz wachsenden Zellen gegenüber Sphäroiden deutlich reprimiert war (Abb. 4.1). Die anderen untersuchten Gene, die für Proteine kodieren, welche an zahlreichen metabolischen Prozessen beteiligt sind, waren in ihrer Expression dagegen nicht beeinflusst. Die starken Effekte auf die *PDK4*-Expression weisen auf eine funktionelle und damit therapeutische Relevanz der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation hin. Die Literaturlage unterstützt diese These, da in nicht-transformierten MCF-10A Zellen bereits gezeigt werden konnte, dass die *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust den Umsatz des PDC und damit die Glukoseoxidation hemmt (Grassian et al., 2011; Kamarajugadda et al., 2012). Um diese Aspekte genauer zu untersuchen, erwiesen sich SKOV-3 Zellen als geeignete Modellzelllinie. Im Vergleich zu den anderen Ovarialkarzinomzelllinien HEY, IGROV-1 und OVCAR-3 zeigte sich ihre *PDK4*-Expression am deutlichsten durch Adhärenz reprimiert (Abb. 4.2). Zudem war die Expression der anderen *PDKs* in SKOV-3 Zellen, wie bei Primärzellen, deutlich geringer von den verschiedenen Adhärenzbedingungen beeinflusst (Abb. 4.3).

Lässt sich der Mechanismus der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation in SKOV-3 Zellen aufklären, könnte dieses Wissen zukünftig auf Primärmaterial angewendet und damit therapeutisch nutzbar gemacht werden. Dieser klinische Aspekt ist zudem von besonderer Relevanz, da eine starke *PDK4*-Expression mit einer ungünstigen Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen in Zusammenhang steht (siehe Kapitel 2.2.4.2).

5.1.2 Einfluss von Adhärenz und Adhärenzverlust auf den Glukosemetabolismus von SKOV-3 Zellen

Funktionell können Veränderungen in der *PDK4*-Expression Einfluss auf die Aktivität des PDC, ein Schlüsselenzym des Glukosestoffwechsels, nehmen und zu einer Umsteuerung des Metabolismus führen. Es wurde daher der Einfluss der Adhärenz auf den Metabolismus in SKOV-3 Zellen untersucht.

In Bezug auf den Glukosemetabolismus nahmen adhärente Zellen signifikant mehr Glukose auf als nicht-adhärente. Die stärkere Glukoseaufnahme (Abb. 4.5A) lässt sich durch den aktiven PI3K-AKT-Signalweg in adhärennten Zellen erklären (Abb. 4.11), der unter anderem die Lokalisation von Glukosetransportern zur Zellmembran induziert (Hennessy et al., 2005; Rathmell et al., 2003). Beim Vergleich der Rate von Lactatsekretion zu Glukoseaufnahme produzierten und sezernierten adhärennte Zellen weniger Lactat pro aufgenommenes Glukosemolekül, sodass nicht-adhärennte Zellen im Umkehrschluss Glukose bevorzugt in Lactat umwandelten und damit den vergleichsweise glykolytischeren Phänotyp besitzen (Abb. 4.5B und C). Diese Befunde stimmen mit Literaturdaten überein, die einen glykolysezentrierten Metabolismus in Ovarialkarzinomzellen aus fortgeschrittenen Tumorstadien und aus dem Aszites sowie in Tumorstammzellen zeigen (Anderson et al., 2014; Anderson et al., 2013). Zudem weisen die hier gezeigten Daten darauf hin, dass SKOV-3 Zellen flexibel in der Umsteuerung ihres Stoffwechsels sind und sich damit schnell an verändernde Bedingungen anpassen können. Dies kann ihre Überlebensrate erhöhen, was wiederum die Tumorprogression begünstigt. Ein glykolytischer Stoffwechsel kann nicht-adhärennten Ovarialkarzinomzellen beispielsweise das Überleben in der hypoxischen Umgebung des Aszites ermöglichen (Kim et al., 2006a).

In Übereinstimmung mit den Genexpressionsdaten könnte die erheblich aktivierte *PDK4*-Expression in nicht-adhärennten SKOV-3 Zellen durch Inhibition des PDC die Umsteuerung des Metabolismus zu einem glykolytischeren Phänotyp bewirken.

Während in der Brustepithelzelllinie MCF-10A *PDK4* bereits als ein durch Adhärenz reprimiertes Gen identifiziert wurde, dessen Induktion nach Adhärenzverlust die

Lactatproduktion fördert und die Glukoseoxidation hemmt, und zudem Resistenz gegenüber Anoikis verleiht, wird im Ovarialkarzinom bisher lediglich eine moderate Induktion von *PDK1* mit dem glykolytischen Metabolismus in fortgeschrittenen Tumorstadien und TICs in Verbindung gebracht (Anderson et al., 2014; Anderson et al., 2013; Grassian et al., 2011; Kamarajugadda et al., 2012). Erstmals konnte in dieser Arbeit *PDK4* als ein durch Adhärenz reguliertes Gen für das humane Ovarialkarzinom nachgewiesen und mit dem glykolytischen Phänotyp adhärenzloser Zellen in Zusammenhang gebracht werden.

5.1.3 Die Aktivierung integrinabhängiger Signalwege vermittelt die *PDK4*-Repression

Da *PDK4* vermeintlich an der Umsteuerung des Metabolismus nach Adhärenzverlust beteiligt ist, ist es von besonderer Wichtigkeit den Mechanismus der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation mit Hilfe der SKOV-3 Zellen als Modellsystem aufzuklären.

Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass die *PDK4*-Expression unter der Kontrolle integrinvermittelter Signalwege steht (siehe Kapitel 4.1.5), wodurch sich die adhärenzabhängigen Expressionsunterschiede erklären lassen. Die Regulation der *PDK4*-Transkription wird dabei nicht von einer definierten Integrin-Ligand-Interaktion bestimmt, sondern es scheint sich um einen generalisierten Mechanismus zu handeln. Adhärenz Zellen auf Matrigel, das vor allem Laminin und Kollagen Typ IV beinhaltet, war die *PDK4*-Expression ebenso reprimiert (Abb. 4.6A) wie durch das Anheften auf Kollagen Typ I (Abb. 4.6B). Wurde die Interaktion zwischen Ligand und RGD-Rezeptoren blockiert, war sowohl das Anheften der Zellen als auch die *PDK4*-Repression gestört (Abb. 4.6C und D). Diese Befunde sprechen dafür, dass die *PDK4*-Expression durch einen allgemeinen Mechanismus reprimiert wird, der unabhängig von der spezifischen Integrin-Ligand-Interaktion abläuft.

5.1.4 Einflüsse von Hypoxie, Serumdepletion und Zelldichte auf die *PDK4*-Expression

Nach bisherigen Erkenntnissen aktiviert der Verlust der Integrin-Ligand-Interaktionen zwischen SKOV-3 Zellen und der EZM die *PDK4*-Expression. In den multizellulären Sphäroiden, die sich beim metastasierenden Ovarialkarzinom in den Peritonealraum ausbreiten und Metastasen bilden, herrschen zudem besondere Bedingungen. Die ungünstige Versorgung mit Sauerstoff in den mehrzelligen Aggregaten und die

hypoxische Umgebung der Aszitesflüssigkeit bei Ovarialkarzinompatientinnen (Grimes et al., 2014; Kim et al., 2006b; Leoni A., 1998) könnten *PDK4* ebenfalls transkriptionell aktivieren. Obwohl bereits eine induzierende Wirkung von Hypoxie auf die *PDK4*-Transkription in der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 aus der Literatur bekannt ist (Lee et al., 2012), konnte eine Aktivierung der *PDK4*-Transkription in SKOV-3 Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.7A). Es scheint sich daher bei der *PDK4*-Induktion durch Hypoxie nicht um einen universellen, sondern um einen zelltypspezifischen Effekt in HepG2 Zellen zu handeln, der weder in SKOV-3 Zellen noch in MCF-10A Zellen (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden konnte. Außerdem ist bisher bekannt, dass bei Hypoxie die Umstellung auf eine anaerobe ATP-Gewinnung mittels Lactatproduktion durch Inhibition des PDC vorwiegend durch PDK1 und PDK3 vermittelt wird, sodass eine *PDK4*-Aktivierung nicht zwangsläufig zu erwarten war (Lu et al., 2008; Wigfield et al., 2008). Der Transkriptionsfaktor HIF-1, der die Induktion von *PDK1* und *PDK3* sowie von *PDK4* in HepG2 Zellen vermittelt (Lee et al., 2012), scheint daher kein Regulator der *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen zu sein.

Da es sich bei Sphäroiden um multizelluläre Aggregate handelt, ist die Versorgung mit Wachstumsfaktoren gerade im Inneren dieser Aggregate nicht optimal. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die *PDK4*-Expression, wie Experimente mit Serumdepletion gezeigt haben (Abb. 4.7B). Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.2.4.1.2), inhibiert Insulin durch Aktivierung des AKT-Signalwegs die *PDK4*-Expression. Die Insulindepletion durch Serumentzug blieb in SKOV-3 Zellen aber folgenlos für die *PDK4*-Expression. Dies lässt sich dadurch erklären, dass SKOV-3 Zellen auch unter serumfreier Kultivierung eine konstitutiv aktive AKT besitzen (Altomare et al., 2004). Grund hierfür könnte das geringe Proteinlevel der Phosphatase PTEN in SKOV-3 Zellen sein, die die Inhibition des AKT-Signalwegs vermittelt (Arboleda et al., 2003). Eine starke basale Ser473-Phosphorylierung der AKT in adhärenen SKOV-3 Zellen (Abb. 4.11) unterstützt die Ergebnisse aus der Literatur. Die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen wäre demnach unabhängig von Insulin. Experimente, bei denen die Insulinstimulation gehungerter Zellen keinen Effekt auf die *PDK4*-Expression zeigte, sprechen dafür (Daten nicht gezeigt).

In den multizellulären Sphäroiden liegen Zellen in hoher Zelldichte vor, was die *PDK4*-Expression ebenfalls aktivieren kann (Abb. 4.7C). Für Ovarialkarzinomzellen ist bekannt, dass beispielsweise E-Cadherine an der Bildung von Sphäroiden beteiligt sind (Xu et al., 2014). Dabei besitzen SKOV-3 Zellen aufgrund ihres hohen E-Cadherin-Levels besonders viele Zell-Zell-Kontakte in den dreidimensionalen Sphäroiden. Offenbar beeinflussen interzelluläre Kontakte durch beispielsweise „*adherens junctions*“ oder „*tight junctions*“ (Bissell and Radisky, 2001) auch die *PDK4*-

Transkription in diesen Zellen. Dies könnte möglich sein, indem die Aktivität von Signaltransduktionskaskaden in der Zelle durch Zell-Zell-Kontakte reguliert wird (Nelson and Chen, 2002; Nelson and Daniel, 2002).

5.2 Analyse der Beteiligung putativer Signalwege an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Kapitel sei ein Hinweis auf die schematische Zusammenfassung der Erkenntnisse in Abb. 5.2 gegeben.

5.2.1 Der MEK-ERK-Signalweg ist an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation nicht beteiligt

Nach bisherigen Erkenntnissen führt der Verlust der Adhärenz in SKOV-3 Zellen zu einer Aktivierung der *PDK4*-Expression, wodurch der glykolytische Phänotyp in diesen Zellen erklärt werden könnte. Es ist daher wichtig diesen tumorrelevanten Mechanismus der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz aufzuklären, um ihn auch therapeutisch nutzbar machen zu können. Einen ersten Hinweis auf einen verantwortlichen Signalweg lieferten 2004 Grassian und Kollegen. Sie identifizierten den MEK-ERK-Signalweg, der in adhären MCF-10A Zellen aktiv ist und die *PDK4*-Expression hemmt, unter anderem in dem die 24-stündige Behandlung mit den MEK-Inhibitoren U-0126 und PD-98059 die *PDK4*-Expression induzierte. Dies ließ sich im Zuge dieser Arbeit reproduzieren, allerdings führte eine dreistündige Inhibitorbehandlung nicht zur transkriptionellen *PDK4*-Induktion in MCF-10A Zellen (Abb. 4.8A). Dies könnte dagegen sprechen, dass der MEK-ERK-Signalweg die *PDK4*-Expression direkt reprimiert und stattdessen auf Sekundäreffekte hinweisen. Generell sind Behandlungen mit Kinaseinhibitoren über einen längeren Zeitraum aufgrund unerwünschter Nebeneffekte (*off-target* Effekte) kritisch zu sehen (Anastassiadis et al., 2011). Auch für die MEK-Inhibitoren PD-98059 und U-0126 sind solche Effekte bekannt (Wauson et al., 2013), sodass die Induktion der *PDK4*-Expression in MCF-10A Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Vorsicht zu betrachten ist. Grassian und Kollegen konnten darüber hinaus jedoch durch Überexpression des Onkogens ErbB2 in nicht-adhären MCF-10A Zellen die hemmende Wirkung des aktiven MEK-ERK-Signalwegs auf die *PDK4*-Expression verifizieren.

Dass diese transkriptionelle Regulation des *PDK4*-Gens durch den MEK-ERK-Signalweg kein Zelltyp-übergreifender Mechanismus ist, zeigte sich als adhären

SKOV-3 Zellen keine Aktivierung *PDK4*-Transkription nach Inhibitorbehandlung aufwiesen (Abb. 4.8B). Der Befund, dass die Kinasen MEK1 und MEK2 in ihrem Phosphorylierungsstatus an den Serinresten 217/221 und damit in ihrer Aktivität von Adhärenz und Verlust der Adhärenz unbeeinflusst sind (Abb. 4.9), unterstützt die Aussage, dass der MEK-ERK-Signalweg die *PDK4*-Regulation durch Adhärenz in SKOV-3 Zellen nicht vermitteln kann.

Anzumerken ist allerdings, dass die ERK-vermittelte Repression von *PDK4* durch Überexpression des Onkogens ErbB2 unter Adhärenzverlust (Grassian et al., 2011) und damit die Rolle des Signalwegs bei Adhärenz für SKOV-3 Zellen nicht geklärt ist.

5.2.2 Einfluss des Transkriptionsfaktors CREB auf die *PDK4*-Expression

Der Transkriptionsfaktor CREB scheint aus mehreren Gründen nicht an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz beteiligt zu sein. Zum einen konnte der anfängliche Hinweis, einer verstärkten Ser133-Phosphorylierung von CREB in nicht-adhären Zellen aus dem „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ (Abb. 4.9), im Western Blot nicht verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Transkriptionell aktives phospho-CREB (Ser133) hätte in diesem Zusammenhang die Aktivierung der *PDK4*-Expression in nicht-adhären Zellen vermitteln können. Zum anderen führte die Hemmung der Ser133-Phosphorylierung durch Inhibitorbehandlung der vermittelnden Kinasen PKA, p38 MAPK und CaMKII (Alberini, 2009; Mayr and Montminy, 2001) nicht zu einer Inhibition der *PDK4*-Induktion in Zellen nach Adhärenzverlust (Daten nicht gezeigt). CREB ist außerdem auch ein Substrat der Kinase AKT (Du and Montminy, 1998), die in adhären Zellen aktivierend phosphoryliert war (Abb. 4.11). Eine AKT-vermittelte Ser133-Phosphorylierung unter Adhärenz würde jedoch im Widerspruch zur reduzierten CREB-Phosphorylierung aus dem „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ und zur *PDK4*-Repression in adhären Zellen stehen. Es kann daher weitgehend ausgeschlossen werden, dass die AKT-CREB-Signalachse an der adhärenvermittelten *PDK4*-Regulation beteiligt ist (Abb. 5.1).

Zudem sind in der Literatur und in genomweiten Datenbanken keine DNA-Bindestellen des Transkriptionsfaktors CREB zur Regulation des *PDK4*-Gens bekannt und transkriptionell aktives phospho-CREB ließ sich an regulatorischen Bereichen des *PDK4*-Gens mittels ChIP-Analyse in Suspensionszellen ebenfalls nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Abschließend liegt daher die Vermutung nahe, dass es sich bei der reduzierten CREB-Phosphorylierung in adhären SKOV-3 Zellen um ein falsch positives Ergebnis aus dem „Bio-Plex Cell Signaling Assay“ handelt.

Neben CREB ist bei weiteren Signalproteinen eine Beteiligung an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation ebenfalls als unwahrscheinlich einzuschätzen, da sich ihr Phosphorylierungs- und damit verbunden ihr Aktivitätsstatus als von Adhärenz unbeeinflusst herausstellte. Hierzu zählen beispielsweise die Signalproteine JNK, c-JUN oder SMAD2 (Abb. 4.9).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte aber erstmals gezeigt werden, dass die Aktivierung des Adenylylcyclasen-cAMP-PKA-Signalwegs *PDK4* transkriptionell induzierte (Abb. 4.10B). Die Stimulation dieses Signalwegs führt zwar klassischerweise zu einer Aktivierung der CREB-vermittelten Transkription (Alberini, 2009). Wie die beobachtete Induktion der Transkription vermittelt wird, ist allerdings unklar, da wie oben beschrieben keine DNA-abhängige Transkriptionsregulation von *PDK4* durch CREB bekannt ist und transkriptionell aktives phospho-CREB an regulatorischen Bereichen des *PDK4*-Gens mittels ChIP-Analyse bei Stimulation der Signalkaskade nicht nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt). CREB kann als aktivierender Transkriptionsfaktor daher weitgehend ausgeschlossen werden. Denkbar ist dagegen, dass die PKA, unterstützt durch AKAPs („*A-kinase anchoring proteins*“), andere Substrate phosphoryliert, welche die *PDK4*-Transkription aktivieren. Die GSK3 β (siehe Kapitel 4.2.5) könnte in diesem Zusammenhang als Substrat in Betracht gezogen werden und auch ein Einfluss der PKA auf die Organisation des Zytoskeletts (siehe Kapitel 5.2.7) könnte sich regulierend auf die *PDK4*-Transkription auswirken (Diviani et al., 2001; Tanji et al., 2002; Wong and Scott, 2004). Dies liefert Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen.

5.2.3 Einfluss des PI3K-AKT-Signalwegs auf die adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation

5.2.3.1 Die adhärenzabhängige Aktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs vermittelt die *PDK4*-Repression adhärenter Ovarialkarzinomzellen

Ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Aufklärung des Mechanismus zur adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation ist der PI3K-AKT-Signalweg. Adhärenente SKOV-3 Zellen wiesen ein hohes Basallevel an aktivierend phosphorylierter AKT auf (Abb. 4.11), was sie von anderen Ovarialkarzinomzelllinien unterscheidet (Altomare et al., 2004). Erklärbar ist dies durch ein niedriges PTEN Level in dieser Zelllinie (Arboleda et al., 2003). In nicht-adhärenenten SKOV-3 Zellen war AKT deutlich geringer an den aktivierenden Aminosäureresten Thr308 und Ser473 phosphoryliert (Abb. 4.9 und Abb. 4.11). Dieser Befund war nicht unerwartet, da durch den Adhärenzverlust die

integrinvermittelte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs, der das Überleben adhärenter Zellen sichert, entfällt (siehe 1.1.2.3). Allerdings sind metastasierende Tumorzellen durch eine abnorme Aktivierung diverser Signalwege, besonders des PI3K-AKT-Signalwegs, meist resistent gegen Anoikis (Kim et al., 2013; Koci et al., 2011). Von SKOV-3 Zellen ist jedoch bekannt, dass die Aktivierung der p38 MAPK sie vor Anoikis schützt und so die Kultivierung unter Adhärenzverlust über mehrere Wochen möglich macht (Carduner et al., 2014).

Die Inhibition der SRC-Kinase reduzierte zudem die aktivierende AKT-Phosphorylierung (Abb. 4.11C und D) und spricht für eine integrinvermittelte Aktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalfads durch Adhärenz in SKOV-3 Zellen.

Weiter zeigte sich, dass die *PDK4*-Repression in adhären SKOV-3 Zellen durch die adhärenzbedingte Aktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs vermittelt zu werden scheint. Sowohl Inhibitoren der SRC-Kinasen als auch Inhibitoren der PI3K und der AKT dereprimierten die *PDK4*-Expression in adhären Zellen (Ansatz Adhärenz 24 h) und hemmten den Repressionsvorgang in adhären Zellen (Ansatz Adhärenz 3 h) (Abb. 4.13 A-C). Dies steht im Widerspruch zu Literaturdaten aus HUVECs („*human umbilical vein endothelial cells*“), in denen die integrinvermittelte Aktivierung der AKT1 zur *PDK4*-Induktion führt (Beeson et al., 2012). Dennoch scheint es sich um einen Effekt zu handeln, der nicht nur spezifisch für SKOV-3 Zellen ist. Adhären MCF-10A Zellen, deren *PDK4*-Expression ebenfalls basal reprimiert ist (Abb. 4.2), wiesen ähnliche Effekte auf (Abb. 4.14 A-C). Bisher haben Grassian und Kollegen 2011 einen Einfluss des PI3K-Signalwegs auf die *PDK4*-Expression in MCF-10A Zellen ausgeschlossen.

Zudem gibt es weitere Hinweise darauf, dass die Inaktivierung der SRC-PI3K-AKT-Signalachse durch Verlust der Adhärenz an der *PDK4*-Induktion in diesen Zellen beteiligt sein könnte. Vergleicht man den Einfluss der Kinaseinhibitoren auf nicht-adhären, adhären und adhären SKOV-3 Zellen (Abb. 4.13D-F) stellte sich heraus: Inhibitoren des Signalwegs konnten die *PDK4*-Expression in nicht-adhären Zellen nicht in dem Maße steigern wie in adhären und adhären Zellen. Erklärt werden könnte dies, indem der Signalweg durch Adhärenzverlust bereits gehemmt ist und damit womöglich die *PDK4*-Expression bereits aktiviert hat. Dieser Hypothese nach konnte erstmals gezeigt werden, dass die *PDK4*-Repression adhären Ovarialkarzinomzellen mechanistisch über die integrinabhängige Aktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs vermittelt werden kann.

Dass die SRC-Inhibition am deutlichsten die *PDK4*-Repression in adhären SKOV-3 Zellen verhindert (17-fach im Vergleich zu <8-fach bei LY und Triciribine, (Abb. 4.13D-F)), könnte dafür sprechen, dass SRC-Kinasen die *PDK4*-Expression nicht

nur über die PI3K-AKT-Achse sondern auch noch über andere Signalproteine reprimieren.

Beim Vergleich der Änderungsfaktoren hatte die Inhibition der SRC-Kinasen und der PI3K auf die *PDK4*-Expression adhärenter MCF-10A Zellen ebenfalls einen stärkeren Einfluss als auf nicht-adhärenente Zellen (Abb. 4.14D und E). Dies spricht auch in MCF-10A Zellen dafür, dass die Inaktivierung des Signalwegs durch Adhärenzverlust bereits die *PDK4*-Transkription aktiviert hat. In MCF-10A Zellen könnte damit auch der SRC-PI3K-Signalweg die *PDK4*-Expression adhärenzabhängig regulieren. Bisher war dies nur für den MEK-Signalweg und den Transkriptionsfaktor ERR γ bekannt (Grassian et al., 2011; Kamarajugadda et al., 2012).

5.2.3.2 Einfluss der FOXO-Transkriptionsfaktoren auf die *PDK4*-Aktivierung durch Inaktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs

Darüber hinaus stellte sich die Frage, über welche nachgeschalteten Signalproteine der SRC-PI3K-AKT-Signalweg die *PDK4*-Transkriptionsregulation vermitteln kann. Generell steuert AKT über eine Vielzahl an Signalproteinen unterschiedliche Prozesse in der Zelle (Hemmings and Restuccia, 2012). Beispielsweise reguliert AKT die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB. Allerdings würde, wie bereits erwähnt, die aktive AKT in adhärenenten Zellen die Transkriptionsaktivität von CREB durch die Ser133-Phosphorylierung positiv beeinflussen, was der *PDK4*-Repression in diesen Zellen entgegen steht. Außerdem konnte bereits in Kapitel 5.2.2 gezeigt werden, dass eine Beteiligung von CREB an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Expression nicht als wahrscheinlich gilt. Auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt damit nicht als Regulator der *PDK4*-Expression in Frage, denn die benötigte Phosphorylierung von I κ B- α war von adhärenenten und nicht-adhärenenten Wachstumsbedingungen unbeeinflusst (Abb. 4.9). Weitere AKT-Substrate, die die Genexpression beeinflussen können, sind FOXO-Transkriptionsfaktoren. Dabei wird über die AKT-vermittelte Phosphorylierung die Kerntranslokation der FOXO-Faktoren und damit die Zielgenexpression verhindert (Barthel et al., 2005). Wie bereits bekannt, sind FOXOs in der Lage die *PDK4*-Expression zu aktivieren, indem sie an den Promotor binden (Kwon et al., 2004). Allerdings ist die FOXO-abhängige *PDK4*-Induktion bisher nur im Skelettmuskel, sowie in Leberkarzinomzellen und in Kardiomyozyten beschrieben. In diesen Fällen gilt FOXO1 als Hauptregulator (Puthanveetil et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte daher erstmals eine FOXO-vermittelte *PDK4*-Aktivierung in Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden. Die Inaktivierung des SRC-PI3K-Signalwegs durch Kinaseinhibitoren in adhärenenten

SKOV-3 Zellen führt zu einer Rekrutierung von FOXO3 und in deutlich geringerem Maße auch von FOXO1 an die bekannten Bindestellen (Abb. 4.15C). In humanen SKOV-3 Zellen wird die transkriptionelle *PDK4*-Aktivierung demnach hauptsächlich durch FOXO3 vermittelt, während bisher vor allem bei Mäusen und Ratten Foxo1 als Regulator beschrieben ist (Furuyama et al., 2003; Kim et al., 2006c; Piao et al., 2013; Shin et al., 2012). Zudem ließ sich aus der ChIP-Analyse ableiten, dass Kinaseinhibitoren die *PDK4*-Expression in adhärenenten Zellen nicht dereprimieren, sondern dem Mechanismus nach eine Induktion durch Rekrutierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren stattfindet. Unerwartet ließen sich die FOXO-Faktoren nach Inhibitorbehandlung am *PDK4-Upstream-Enhancer* in einer Entfernung von -12 kb vom Transkriptionsstart nachweisen. Dies könnte auf die Ausbildung eines *Loops* zwischen der *Enhancer*-Region und dem Promotorbereich hinweisen.

Im Gegensatz zur Behandlung mit Kinaseinhibitoren hatte die Inaktivierung des SRC-PI3K-AKT-Signalwegs durch Verlust der Adhärenz unerwartet keine nachweisbare Rekrutierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren an den *PDK4*-Lokus zur Folge (Abb. 15D). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein Komplex aus mehreren Transkriptionsfaktoren und assoziierten Proteinen liefern, der die Transkription von *PDK4* durch Adhärenzverlust aktiviert, und indem FOXO-Faktoren für die ChIP-Analyse nicht zugänglich aber vorhanden sind. Allerdings könnten die Befunde auch bedeuten, dass nicht FOXO-Transkriptionsfaktoren sondern andere durch AKT beeinflusste Transkriptionsfaktoren an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation beteiligt sind. Gestützt wird diese Annahme zum einen dadurch, dass eine Kerntranslokation von FOXO3 in SKOV-3 Zellen nach Adhärenzverlust nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren waren klassische FOXO-Zielgene (*FASL*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *BCL2L11*, *GADD45A*) durch Adhärenzverlust, wie RNA-Sequenzierungsanalysen zeigten, uneinheitlich untereinander sowie im Vergleich zu *PDK4* reguliert (unveröffentlichte eigene Daten und von Dr. Verena Rohnalter). Dies spricht ebenfalls gegen eine FOXO-abhängige *PDK4*-Regulation bei verschiedenen Adhärenzbedingungen.

Zusammengefasst würde dies bedeuten, dass die Inaktivierung der SRC-PI3K-AKT-Signalkaskade über verschiedene Mechanismen die Aktivierung der *PDK4*-Transkription bei Adhärenzverlust und Kinaseinhibitorbehandlung vermittelt (Abb. 5.1). Durch welche Faktoren diese adhärenzvermittelte Transkriptionsregulation abläuft, ist noch völlig unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

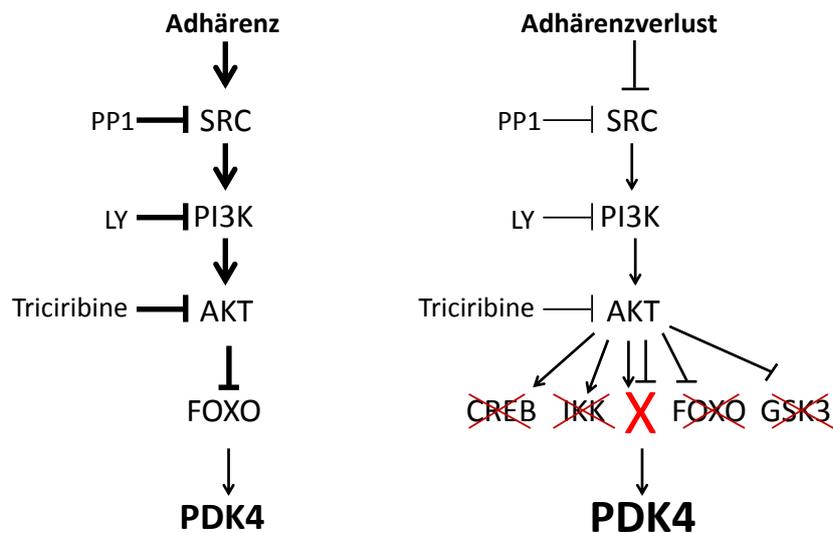


Abb. 5.1 Modell zur differentiellen Regulation der *PDK4*-Genexpression bei adhärennten und nicht-adhärennten SKOV-3 Zellen in Bezug auf den SRC-PI3K-AKT-Signalweg. Nähere Erläuterungen siehe Text. X steht für einen noch unbekanntem Faktor.

5.2.4 Einfluss GSK3-abhängiger Signalwege auf die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen

Bekanntermaßen kann Genexpression auch über die AKT-GSK3-Signalachse gesteuert werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten sprechen jedoch aus verschiedenen Gründen gegen eine Beteiligung dieser Signalachse an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation in SKOV-3 Zellen (Abb. 5.1). Unter anderem war die AKT-abhängige GSK3-Phosphorylierung (GSK3 α/β (Ser21/Ser9)) von den Adhärenzbedingungen nicht beeinflusst (Abb. 4.9). Bei dieser Phosphorylierung handelt es sich im Übrigen um eine inaktivierende Modifikation (Cross et al., 1995). GSK3 kann außerdem die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFAT und CREB sowie des transkriptionellen Ko-Aktivators β -Catenin (durch *CTNNB1*-Gen kodiert) regulieren (Hur and Zhou, 2010). Die Phosphorylierung von NFAT hat seinen Kernausschluss und damit die Hemmung seiner Zielgene zur Folge. Wird β -Catenin phosphoryliert, führt dies zur proteasomvermittelten Proteolyse und die TCF/LEF-abhängige Zielgeninduktion wird verhindert. Eine Inaktivierung der GSK3 durch die aktive AKT in adhärennten Zellen hätte über diese Faktoren vermeintlich eine Induktion der *PDK4*-Expression bedeutet. Dies widerspricht dem Befund einer reprimierten *PDK4*-Expression in diesen Zellen (Abb. 4.2). All diese Befunde schließen eine Beteiligung der AKT-GSK3-Signalachse an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation in SKOV-3 Zellen weitestgehend aus.

Zudem konnte NFAT als *PDK4*-regulierender Transkriptionsfaktor gänzlich ausgeschlossen werden, da die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen von der Cyclosporin A-Behandlung, welche die Calcineurin-vermittelte NFAT-Aktivierung verhindert (Muller and Rao, 2010), nicht beeinflusst war (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivität der GSK3 kann zusätzlich zur Kinase AKT auch von zahlreichen anderen Kinasen aktivierend oder inhibitorisch an anderen Aminosäureresten beeinflusst werden. So kann die durch Integrin-Liganden-Interaktionen aktivierte ILK die GSK3 inhibitorisch phosphorylieren (Delcomenne et al., 1998). Allerdings ist auch bekannt, dass SRC-Kinasen die GSK3-Kinaseaktivität im Zuge der integrinvermittelten Signalwegaktivierung steigern können (Goc et al., 2014; Medina and Wandosell, 2011; Sayas et al., 1999). Eine Beteiligung der GSK3 an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz wäre also durchaus denkbar. Zumal sowohl die Expression von β -Catenin, als auch die Expression seiner Zielgene in Langzeit-Sphäroidkulturen aus Ovarialkarzinomzellen induziert ist (Condello et al., 2014). Außerdem identifizierten *in silico* Analysen verschiedener ChIP-Sequenzierungen potentielle TCF4-Bindestellen am humanen *PDK4*-Lokus (Abb. 4.18A).

5.2.4.1 Einfluss der GSK3- β -Catenin-TCF-Signalachse auf die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation

Zuerst sollte geklärt werden, ob *PDK4* ein Zielgen des GSK3- β -Catenin-TCF-Signalwegs in SKOV-3 Zellen sein kann. Einerseits induzierte die GSK3-Inhibition die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen und dieser Effekt lässt sich durch β -Catenin-Depletion aufheben (Abb. 4.16B und Abb. 4.17A), was *off-target* Effekten des Inhibitors entgegen spricht. Dies lässt vermuten, dass die GSK3- β -Catenin-Signalachse prinzipiell in der Lage ist *PDK4* transkriptionell in SKOV-3 Zellen zu regulieren. Bisher wurde *PDK4* lediglich als mögliches Zielgen des Wnt- GSK3- β -Catenin-Signalwegs im Kolonkarzinom erwähnt (Pate et al., 2014). Andererseits ließ sich β -Catenin nicht an den putativen Bindestellen am *PDK4*-Lokus nachweisen (Abb. 4.18B), wenn die *PDK4*-Expression durch den GSK3-Inhibitor aktiviert war (Abb. 4.17B). Es könnte sich hierbei lediglich um ein Nachweisproblem handeln, bei dem β -Catenin zwar an die DNA gebunden hat, aber aufgrund des gebildeten Transkriptionskomplexes für die Präzipitation durch die Antikörper bei der ChIP-Analyse nicht zugänglich ist. Obwohl die *in silico* Analyse auf die putativen TCF4-Bindestellen hinweist, lässt sich jedoch nicht mit Sicherheit sagen, ob es sich dabei um reale TCF4 und β -Catenin-Bindestellen handelt. Denn die TCF4-Anreicherungen aus den ChIP-Sequenzierungen verschiedener Zelllinien unterscheiden sich und sind zudem auch nicht sonderlich stark

(Abb. 4.18A). Gegen eine Regulation von *PDK4* durch β -Catenin und TCF4 spricht in diesem Zusammenhang, dass sich eine Anreicherung von TCF4 an den putativen Bindestellen nicht verifizieren ließ (Abb. 4.18C).

Die Untersuchungen, ob die GSK3- β -Catenin-TCF-Signalachse an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation beteiligt ist, lieferten ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis. So aktivierte der GSK3-Inhibitor CHIR99021 die *PDK4*-Transkription bei adhärennten (Abb. 4.16B: 2-fach) und nicht-adhärennten Zellen (Abb. 4.17A: 1,8-fach) in annähernd gleichem Ausmaße. Dies könnte so gedeutet werden, dass die GSK3 in gleichem Maße gehemmt wird und sich somit ihre Aktivität zwischen Adhärenz und Adhärenzverlust nicht maßgeblich unterscheidet. Dies würde einer Beteiligung der GSK3 an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation entgegensprechen. Gegen β -Catenin als Ko-Aktivator in der transkriptionellen Aktivierung von *PDK4* nach Adhärenzverlust sprechen außerdem zum einen die Ergebnisse aus den β -Catenin-Depletionsexperimenten (Abb. 4.17A). Dabei war die *PDK4*-Induktion in nicht-adhärennten Zellen durch die Depletion von β -Catenin weitgehend unbeeinflusst. Und zum anderen konnte ein Anstieg der *CTNNB1*-Transkriptmenge in nicht-adhärennten SKOV-3 Zellen, wie bei Condello und Kollegen 2014 beschrieben, nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die Literaturdaten auf Langzeit-Sphäroidkulturen beziehen, während in der vorliegenden Arbeit die *PDK4*-Aktivierung und damit die *CTNNB1*-Expression in Zellen untersucht wurde, die lediglich 24 h unter nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert wurden. Außerdem ließen sich sowohl β -Catenin als auch TCF4 nicht an den putativen Bindestellen am *PDK4*-Lokus nicht-adhärenter Zellen nachweisen (Abb. 4.18B und C). Allerdings spricht die Behandlung von SKOV-3 Zellen mit der Substanz BC21 für eine Beteiligung der GSK3- β -Catenin-Signalachse an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation. Diese Substanz stört die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF4 und inhibiert die Zielgenexpression (Tian et al., 2011). Für *PDK4* als Zielgen der β -Catenin- und TCF4-vermittelten Transkription spricht in diesem Zusammenhang auch, dass die BC21-Behandlung die Induktion von *PDK4* nach GSK3-Inhibition aufheben konnte (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswerterweise blieb die *PDK4*-Expression in nicht-adhärennten Zellen reprimiert, wenn die Signalweiterleitung zwischen β -Catenin und TCF4 durch BC21-Behandlung inhibiert war (Abb. 4.17B). Dies steht im Gegensatz zu den erwähnten Experimenten, bei denen die *PDK4*-Expression durch β -Catenin-Depletion in Zellen nach Adhärenzverlust nicht reprimiert geblieben war (Abb. 4.17A). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte damit erklärt werden, dass der Inhibitor stärkere Auswirkungen auf die β -Catenin-TCF4-Signalweiterleitung hat als die siRNA-vermittelte β -Catenin-Depletion. Die Anwendung der siRNA-Technologie kann immer

nur lediglich eine Reduktion des funktionellen Proteins zur Folge haben, obwohl eine effiziente Depletion anhand der *AXIN2*-Induktion funktionell überprüft wurde (Abb. 4.17A). Die übrigen Proteine können weiterhin ihre Funktion ausüben und damit unter Umständen die Zielgenexpression nicht effektiv verändern. Nicht unerwähnt bleiben soll aber auch die Möglichkeit, dass es sich bei den detektierten Auswirkungen der Substanz BC21 um *off-target* Effekte handelt. Gerade weil es sich um einen neu identifizierten Inhibitor handelt, sind seine möglichen β -Catenin-unabhängigen Effekte noch unerforscht und unbekannt.

Zusammengefasst zeigen die Befunde der GSK3-Inhibition zwar, dass *PDK4* ein Zielgen der GSK3- β -Catenin-Signalachse ist und die Inhibition der β -Catenin-TCF4-Interaktion deutet auf eine Beteiligung der GSK3- β -Catenin-TCF-Signalachse an der adhärenzabhängigen Transkriptionsregulation hin. Dennoch sprechen die Depletionsexperimente und vor allem die genomischen Analysen des *PDK4*-Lokus gegen diese Annahme. Die Rückschlüsse, die aufgrund der Inhibition der GSK3 unter Adhärenz und Adhärenzverlust bezüglich ihrer annähernd gleichen Aktivität geschlossen werden können, legen ebenfalls nahe, dass diese Signalachse nicht an der Vermittlung der adhärenzabhängigen Transkriptionsregulation von *PDK4* beteiligt ist. Aufgrund der Ambivalenz der Ergebnisse kann jedoch keine abschließende Aussage getroffen werden.

5.2.5 Einfluss von Kernrezeptoren auf die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen

Eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung ergab Hinweise auf die beiden Kernrezeptoren Glukokortikoid (GR)- und Estrogenrezeptor α (ER α) als Vermittler der adhärenzabhängigen *PDK4*-Regulation (Abb. 4.19). Dabei wurde in β -Catenin-depletierten, adhärenzten und nicht-adhärenzten SKOV-3 Zellen nach Genen gesucht, die wie *PDK4* nach Adhärenzverlust aktiviert waren (Abb. 4.2) und deren Expression nach BC21-Behandlung unter nicht-adhärenzten Bedingungen ebenfalls reprimiert blieb (Abb. 4.17B). Es wird daher angenommen, dass diese Gene durch den gleichen transkriptionellen Mechanismus nach Adhärenzverlust reguliert werden wie *PDK4*. Bei Genen, die das gleiche Expressionsverhalten wie *PDK4* zeigten, handelte es sich zum einen um 17 β -Estradiol- und ER α -Zielgene und zum anderen um Dexamethason-regulierte Gene (Abb. 4.19). BC21 könnte demnach noch β -Catenin/TCF4-unabhängige Effekte auf die Genexpression haben.

5.2.5.1 Der Estrogenrezeptor kann partiell an der *PDK4*-Induktion nach Adhärenzverlust beteiligt sein

Die Transkriptomanalyse von SKOV-3 Zellen nach Adhärenzverlust lieferte zum einen Hinweise auf den Estrogenrezeptor (ER) als regulierenden Transkriptionsfaktor für die adhärenzabhängige *PDK4*-Expression (Abb. 4.19).

In ersten Untersuchungen stellte sich heraus, dass Estradiol grundsätzlich die *PDK4*-Transkription positiv beeinflussen kann (Abb. 4.20A). Dies deutet darauf hin, dass *PDK4* in SKOV-3 Zellen ein hormonabhängiges Zielgen des ER ist. In anderen Geweben ist zwar bereits sowohl eine induzierende als auch eine reduzierende Wirkung des ER bzw. von Estradiol auf die *PDK4*-Expression beschrieben (Campbell et al., 2003; Cheng et al., 2009; Gao et al., 2008), für das Ovar gab es allerdings bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Erkenntnisse bezüglich dieser Regulation.

Sollte der ER an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation beteiligt sein, ist in diesem Fall von einem hormonunabhängigen Mechanismus auszugehen. Eine Veränderung im Expressionslevel des Transkriptionsfaktors als hormonunabhängiger regulatorischer Mechanismus ist dabei denkbar. Interessanterweise war die *ER α* -Expression auf transkriptioneller Ebene in adhärenzenten Zellen deutlich reduziert (Abb. 4.20B). Dies korreliert mit der *PDK4*-Expression, die bei diesen Zellen ebenfalls stark reprimiert ist und lässt eine Partizipation des Rezeptors bei der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation vermuten. Zudem inhibierte Fulvestrant, eine Substanz, die die Degradation von *ER α* verursacht (Yeh et al., 2013), die transkriptionelle *PDK4*-Aktivierung in nicht-adhärenzenten Zellen (Abb. 4.20C). Diese Effekte sind zwar signifikant aber schwach und lassen darauf schließen, dass der ER durch einen hormonunabhängigen Mechanismus zumindest partiell an der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz und Adhärenzverlust beteiligt ist.

Eine ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors ist außerdem bereits beschrieben durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen (Maggi, 2011). Veränderungen in der Aktivität integrinabhängiger Signalwege durch Adhärenz und Adhärenzverlust könnten durch beteiligte Kinasen die Aktivität des Rezeptors beeinflussen. Dies kann ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein.

Deutlich wird aus den Ergebnissen vor allem, dass die Regulation vermutlich nicht von einem Signalweg vermittelt wird. Wahrscheinlicher ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Signalwege.

5.2.5.2 Einfluss des Glukokortikoidrezeptors auf die *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen

Als weiterer putativer Transkriptionsfaktor der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation wurde der Glukokortikoidrezeptor ermittelt.

Die glukokortikoidabhängige *PDK4*-Induktion ist bisher primär in der Leber bekannt, wo die Glukoseoxidation zu Gunsten der Gluconeogenese gehemmt wird, und im Herzen bei Ratten (Puthanveetil et al., 2010; Qi et al., 2004). Das synthetische Glukokortikoid Dexamethason induziert dabei die *PDK4*-Expression durch die Bindung des GR an „*glucocorticoid-response elements*“ (GREs) in Leberkarzinomzelllinien. FOXO-Faktoren haben dabei eine kooperative Wirkung auf die transkriptionelle *PDK4*-Aktivierung (Connaughton et al., 2010; Kwon et al., 2004). Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die *PDK4*-Expression auch im humanen Ovariakarzinom glukokortikoidabhängig reguliert werden kann. Bei SKOV-3 Zellen ließ sich eine moderate *PDK4*-Derepression bei adhärennten (Adhärenz 24 h) und eine mäßig gehemmte Repression bei adhärenierenden Zellen (Adhärenz 3 h) beobachten (Abb. 4.21A). In nicht-adhärennten Zellen (Adhärenz 0 h) hingegen war der aktivierende Effekt von Dexamethason auf die *PDK4*-Expression auffallend stärker (Abb. 4.21B). Dies lässt vermuten, dass nach Adhärenzverlust bestimmte Faktoren zur *PDK4*-Induktion rekrutiert werden, die in Kooperation mit dem Glukokortikoidrezeptor nach Dexamethason-Behandlung die *PDK4*-Expression weiter steigern können. Durch welche Faktoren diese kooperative Wirkung vermittelt werden kann ist aber indes völlig unklar, da FOXO-Transkriptionsfaktoren, für die eine solche Kooperation mit dem GR bekannt ist, nicht am *PDK4*-Promotor nachzuweisen waren (Abb. 4.15D).

Obwohl bei der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz und Adhärenzverlust von einem ligandenunabhängigen Mechanismus auszugehen ist, liefert die ligandenabhängige *PDK4*-Regulation wichtige Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen.

Eine ligandenunabhängige Aktivierung des GR nach Adhärenzverlust ist denkbar, da ein solcher Mechanismus bereits für verschiedene Stressfaktoren wie beispielsweise Hitzeschock oder mechanische Krafteinwirkung beschrieben ist (Ji et al., 2003; Vandevyver et al., 2012). Bei Scherkräften beeinflussen Kinasen durch Phosphorylierung des Rezeptors die GR-abhängige Transkription (Ji et al., 2003). Indem sich durch Adhärenz und Adhärenzverlust die Aktivität integrinabhängiger Signalwege ändert, ist eine solche Regulation ebenfalls vorstellbar und sollte zukünftig weiter untersucht werden.

5.2.5.3 PPAR β/δ ist nicht in die *PDK4*-Expressionsregulation in Abhängigkeit der Adhärenz involviert

Wie unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte, ist *PDK4* ein Zielgen der Klasse II des ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktors PPAR β/δ , da sich die Expression durch Agonisten-Behandlung aktivieren und durch inverse Agonisten reprimieren lässt. Zudem ist PPAR β/δ im Basalzustand in einem Komplex mit Ko-Repressoren an diese Zielgene gebunden, sodass die siRNA-vermittelte PPAR β/δ -Depletion zu einer Derepression der Gene führt (Adhikary et al., 2011). Auf Grundlage dieser komplexen Regulation kann eine Beteiligung des Kernrezeptors an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation in Betracht gezogen werden. Einer Hypothese nach, könnten veränderte Adhärenzbedingungen Enzyme wie Cyclooxygenasen in ihrer Expression und damit die Synthese endogener Liganden, wie Prostaglandine, beeinflussen (Gupta et al., 2000). In diesem Fall würde man davon ausgehen, dass die adhärenzabhängige *PDK4*-Regulation ligandenvermittelt über PPAR β/δ gesteuert wird.

Dafür dass es sich bei der *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust jedoch um einen PPAR β/δ -unabhängigen Mechanismus handelt, spricht zum einen das Ergebnis der PPAR β/δ -Depletionsexperimente. In den nicht-adhärenen PPAR β/δ -depletierten Zellen erfolgte sowohl die siRNA-vermittelte *PDK4*-Derepression als auch die transkriptionelle Aktivierung durch Adhärenzverlust (Abb. 4.22B). Zum anderen induzierte die Agonisten-Behandlung die *PDK4*-Expression zusätzlich zur Induktion durch Adhärenzverlust (Abb. 4.22C). In beiden Fällen ließ sich die *PDK4*-Transkription neben der Aktivierung durch Adhärenzverlust noch zusätzlich durch PPAR β/δ -abhängige Mechanismen steigern.

Zudem führte die Behandlung mit einem Antagonisten, der die Agonisten-abhängige Rekrutierung von Ko-Aktivatoren hemmt, zu keiner veränderten *PDK4*-Aktivierung in adhärenzlosen Zellen. Dies unterstreicht, dass diese Aktivierung nicht durch die Bindung von Agonisten an PPAR β/δ vermittelt werden kann (Abb. 4.22D)

Von klinischer Bedeutung könnten hingegen die Effekte des inversen Agonisten PT-S264 sein, dessen Bioverfügbarkeit bereits von unserer Arbeitsgruppe bestätigt wurde (Toth et al., 2016). Die Behandlung mit diesem synthetischen Liganden hält die *PDK4*-Expression auch in nicht-adhärenen Zellen auf Basalniveau reprimiert (Abb. 22E). Aus therapeutischer Sicht wäre es daher in Zukunft denkbar, die gesteigerte *PDK4*-Expression in metastasierenden Ovarialkarzinomzellen zu reprimieren und somit die Umsteuerung zum wahrscheinlich vorteilhaften glykolysezentrierten Metabolismus zu verhindern. In weiteren Experimenten sollte daher zukünftig die *PDK4*-Regulation durch PPAR β/δ -spezifische Liganden in primären Tumorzellen des Ovarialkarzinoms untersucht werden.

5.2.6 C/EBP β kann ein kooperierender Faktor bei der *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust sein

Aus der Literatur ist mit C/EBP β ein weiterer *PDK4*-regulierender Transkriptionsfaktor bekannt, der an der thyroidhormonabhängigen *Pdk4*-Induktion in der Leber von Ratten beteiligt ist. Die Ergebnisse der ChIP-Experimente aus SKOV-3 Zellen könnten dafür sprechen, dass C/EBP β in die transkriptionelle *PDK4*-Aktivierung nach Adhärenzverlust involviert ist, da sich der Transkriptionsfaktor unter dieser Bedingung am *PDK4-Upstream-Enhancer* nachweisen ließ (Abb. 4.23). Gegen C/EBP β als verantwortlichen Faktor für die *PDK4*-Aktivierung nach Adhärenzverlust spricht allerdings die siRNA-vermittelte C/EBP β -Depletion, die diese Aktivierung nicht inhibierte (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für diese Daten könnte sein, dass C/EBP β lediglich als kooperierender Faktor für einen anderen Signalweg und Transkriptionsfaktor, und nicht als notwendiger Vermittler der transkriptionellen *PDK4*-Aktivierung, nach Adhärenzverlust fungiert. So ist beispielsweise eine Kooperation zwischen C/EBP β und PPAR γ bei der Aktivierung des Genexpressionsprogramms zur Adipozyten-Differenzierung bekannt (Lefterova et al., 2008).

5.2.7 Störungen der Aktinpolymerisation des Zytoskeletts aktivieren die *PDK4*-Expression

Neben der Regulation von Signalwegen zur Zellproliferation und dem Überleben von Zellen sind Integrine durch Interaktionen mit Proteinen wie Talin, α -Actinin oder Vinculin auch an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Wiesner et al., 2005). Beim Adhären der Zellen fördern die ausgebildeten Fokalen Adhäsionen die Anordnung von Aktinfilamenten (F-Aktin), während der Verlust der Adhärenz die Depolymerisation des F-Aktins zur Folge haben kann (Rullo et al., 2012; Van de Water et al., 1994). Solche Veränderungen im Aktinzytoskelett können sich bekanntermaßen über verschiedene Signalproteine oder nukleäres Aktin auf die Genexpression auswirken (Olson and Nordheim, 2010). Anhand dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Umordnungen des Aktinzytoskeletts die *PDK4*-Expression beeinflussen. Die Störung der Aktinpolymerisation, ausgelöst durch Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D (CytoD) und Latrunculin A (LatA), aktivierte die *PDK4*-Transkription deutlich (Abb. 4.24). Da diese Auswirkungen sowohl in SKOV-3 als auch in MCF-10A Zellen (Daten nicht gezeigt) beobachtet wurden, scheint es sich nicht um zelltypspezifische Effekte zu handeln.

Adhärierende SKOV-3 Zellen wiesen, im Vergleich zu nicht-adhären und adhären Zellen, die stärkste Aktivierung der *PDK4*-Expression nach CytoD und LatA-Behandlung auf (Abb. 4.24C und D). Da es während dieses Adhärenzvorgangs durch eine integrinvermittelte Aktinpolymerisation zu einer Neuordnung des Aktinzytoskeletts kommt (Bailly, 2003; Brunton et al., 2004), können die Substanzen wahrscheinlich unter diesen Bedingungen ihre größte Wirkung entfalten. Dies unterstützt die Hypothese, dass Veränderungen im Aktinzytoskelett an der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation beteiligt sein können. Über welche Signalwege diese transkriptionelle Regulation erfolgen könnte, ist derzeit jedoch völlig unklar. Aus der Literatur ist zwar bekannt, dass die JNK und der Transkriptionsfaktor NF- κ B die Genexpression nach Umordnungen des Aktinzytoskeletts beeinflussen können (Coso et al., 1995; Cowell et al., 2009; Minden et al., 1995; Olson and Nordheim, 2010; Rosso et al., 2005), Hinweise auf eine adhärenzabhängige *PDK4*-Regulation durch diese Proteine gibt es in SKOV-3 Zellen jedoch nicht (Abb. 4.9). Vorrangig ist außerdem die Signalachse aus Rho-GTPasen, den Ko-Aktivatoren MRTF und dem Transkriptionsfaktor SRF für die aktinabhängige Zielgenaktivierung verantwortlich (Hill et al., 1995; Sotiropoulos et al., 1999). Allerdings ist *PDK4* weder als SRF-Zielgen bekannt, noch konnten *in silico* Analysen von ChIP-Sequenzierungen SRF-Bindestellen am humanen *PDK4*-Lokus oder an *Enhancer*-Bereichen identifizieren (Daten nicht gezeigt). Gegen eine Regulation der *PDK4*-Expression durch SRF sprechen auch die beobachteten Effekte nach CytoD- und LatA-Behandlung. Beide Substanzen aktivierten die *PDK4*-Expression sehr deutlich, obwohl LatA im Gegensatz zu CytoD die SRF-Aktivität inhibiert (Miralles et al., 2003; Vartiainen et al., 2007).

5.3 Modell zur komplexen Transkriptionsregulation von *PDK4* in SKOV-3 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl an Signalwegen und Transkriptionsfaktoren unter dem Blickwinkel der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation untersucht. Auf der Suche nach Faktoren, die die *PDK4*-Repression in adhären beziehungsweise die Induktion in nicht-adhären Zellen vermitteln können, entstand ein komplexes Bild der Transkriptionsregulation des *PDK4*-Gens in SKOV-3 Zellen über den Aspekt der adhärenzvermittelten Regulation hinaus (Abb. 5.2). Bisher waren Regulationsmechanismen für das *PDK4*-Gen vor allem in der Maus und bei Ratten bekannt (siehe Kapitel 2.2.4.1). Die vorliegende Arbeit fokussierte sich auf das humane System und lieferte damit viele wichtige Erkenntnisse in diesen Zellen, die über das bisher bekannte weit hinaus gehen.

Es zeigte sich, dass aus anderen Zelltypen bekannte Signalwege für die Regulation der *PDK4*-Expression in SKOV-3 Zellen nicht bestätigt werden konnten (MEK-ERK-Signalweg). Anderen bekannten Signalwegen wiederum konnte erstmals eine *PDK4*-regulierende Wirkung in SKOV-3 Zellen zugesprochen werden (z. B. GR, ER α). Und für wieder andere Signalwege wurde überhaupt erstmalig eine Regulation der *PDK4*-Expression beschrieben (AC-cAMP-PKA-Signalweg, GSK3- β -Catenin-Signalweg).

In Bezug auf die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation ist es jedoch aufgrund der derzeitigen Faktenlage schwierig, ein Modell für den Mechanismus dieser Regulation zu entwerfen. Die vorliegende Arbeit liefert dafür jedoch trotzdem wichtige und neue Erkenntnisse. Für einige Signalwege konnten keine Hinweise gefunden werden, bei anderen lässt die uneindeutige Faktenlage trotz einiger Anhaltspunkte keine definitive Beurteilung zu. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es wahrscheinlich keinen alleinigen notwendigen Faktor gibt, der diese Regulation vermittelt, sondern es sich um ein Zusammenspiel vieler Signalwege handelt, die auch untereinander interagieren könnten. Gerade die Ergebnisse bezüglich einer Beteiligung des Estrogenrezeptors sprechen dafür. Dies würde die Identifizierung der beteiligten Signalachsen deutlich erschweren, da ihre Blockade oder Aktivierung nur geringfügige Effekte zur Folge hätte und könnte einige kontroverse Ergebnisse dieser Arbeit erklären. Von dem Verlust der Adhärenz sind nicht nur integrinvermittelte Signalwege betroffen, auch Umstrukturierung im Zytoskelett sowie Veränderungen in Zell-Zell-Kontakten finden statt. Dass dies ebenfalls Auswirkungen auf die *PDK4*-Expression hat zeigt diese Arbeit deutlich und unterstützt damit die Hypothese einer multifaktoriellen Regulation. Auch in Bezug auf die nicht-tumorigene Brustepithelzelllinie MCF-10A liefert diese Arbeit neue Erkenntnisse. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass sowohl der MEK-ERK-Signalweg als auch der Transkriptionsfaktor ERR γ die *PDK4*-Expression über EZM-Kontakte regulieren können. Und wie diese Arbeit zeigt, könnten mit dem SRC-PI3K-AKT-Signalweg und Veränderungen des Aktinzytoskeletts weitere Signalwege daran beteiligt sein. Dies stützt ebenfalls die Annahme einer Kooperation mehrerer Signalwege bei der adhärenzvermittelten *PDK4*-Regulation, auch zelltyp-übergreifend.

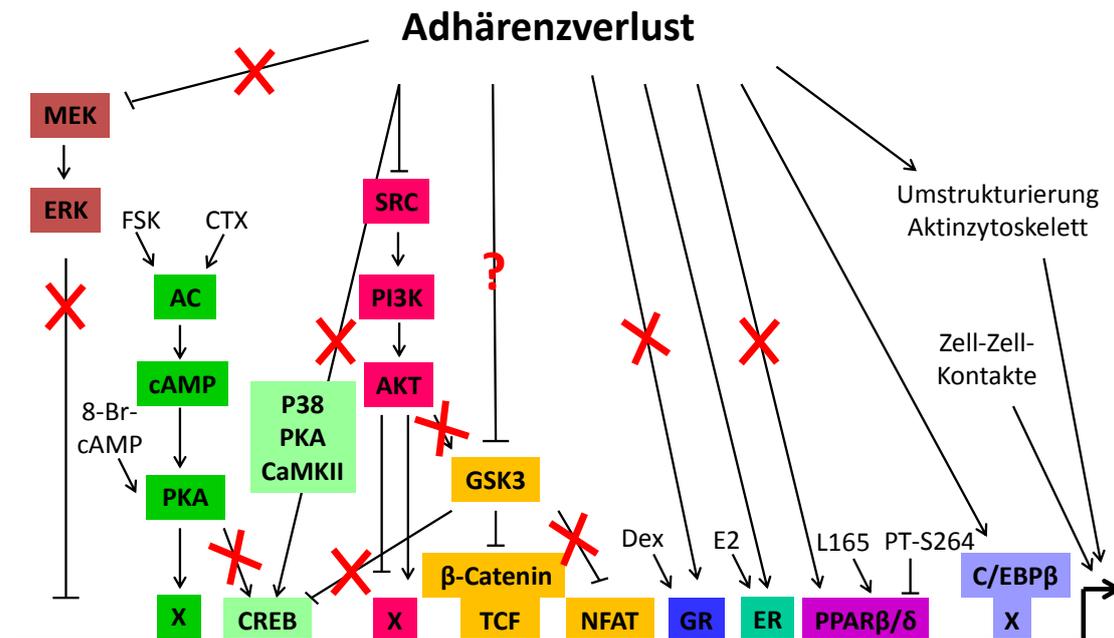


Abb. 5.2 Modell zur komplexen Transkriptionsregulation von *PDK4* in SKOV-3 Zellen.

Das Modell fasst die aus dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der transkriptionellen Genregulation von *PDK4* in SKOV-3 Zellen zusammen (Details siehe Text). Rote Kreuze kennzeichnen die Signalwege und Verbindungen, die weitgehend ausgeschlossen werden können an der *PDK4*-Regulation beteiligt zu sein. X steht für bisher noch nicht identifizierte Faktoren.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht-adhärenz SKOV-3 eine Induktion der *PDK4*-Expression aufweisen, die mit dem glykolytischen Metabolismus in diesen Zellen in Verbindung zu stehen scheint, da *PDK4* die Pyruvatdehydrogenase und damit die Energiegewinnung durch Glukoseoxidation und OXPHOS bekanntermaßen negativ reguliert. Um zu bestätigen, dass es sich bei *PDK4* um den verantwortlichen Faktor handelt, sollten jedoch noch weitere Untersuchungen dienen. Veränderungen im glykolysezentrierten Metabolismus nicht-adhärenz Zellen sollten bei siRNA-vermittelten *PDK4*-Depletionsexperimenten und anhand der Behandlung von Zellen mit Substanzen, die die *PDK4*-Expression modulieren, untersucht werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die deutliche Aktivierung der *PDK4*-Expression in Sphäroiden primärer Ovarialkarzinomzellen ebenfalls zur Umsteuerung auf einen glykolysezentrierten Metabolismus führt. Hieraus könnte sich die in dieser Arbeit mehrfach angesprochene therapeutische Relevanz der *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust ergeben, besonders da das Ovarialkarzinom durch die Ausbreitung

der Tumorzellen über den Aszites schnell in den Peritonealraum metastasiert. Diese therapeutische Option gilt es in Zukunft abzuklären. Um der Annahme nachzugehen, sollten auch Mausmodelle miteinbezogen werden. Mit dem PPAR β/δ -spezifischen inversen Agonisten PT-S264 und der Substanz BC21 konnten Modulatoren identifiziert werden, die eine *PDK4*-Induktion nach Adhärenzverlust bei SKOV-3 Zellen verhindern. Da es sich bei PT-S264 um eine Substanz handelt, deren Bioverfügbarkeit bereits bestätigt wurde, wäre sie im Mausmodell einsetzbar, um den Einfluss der *PDK4*-Induktion durch Adhärenzverlust auf die Metastasierung zu untersuchen.

Unter der Voraussetzung, dass die adhärenzvermittelte *PDK4*-Regulation von klinischer Relevanz ist, ist es von besonderer Bedeutung sie mechanistisch aufzuklären. Obwohl die vorliegende Arbeit eine komplexe Regulation des *PDK4*-Gens in der Modellzelllinie SKOV-3 Zellen aufzeigt, sind die Erkenntnisse bezüglich der *PDK4*-Regulation durch Adhärenz noch unzureichend und erfordern weitere Untersuchungen. In Bezug auf neue Therapieansätze sollte der Fokus dabei auf primären Ovarialkarzinomzellen liegen. Wie bereits geschildert, könnte sich die Identifizierung beteiligter Signalwege aufgrund der multifaktoriellen Hypothese als äußerst schwierig erweisen. Denkbar wäre ein umfassender Ansatz mit dem Proteom adhärenter und nicht-adhärenter Zellen, bei dem Proteinphosphorylierungen in der quantitativen Massenspektrometrie vergleichend analysiert werden und Aufschluss über die Aktivität diverser Signalwege geben können. Damit könnte ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der Metastasierung des Ovarialkarzinoms geleistet und neue pharmakologische Angriffziele erschlossen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, **16**, 3797-3804.
- Adhikary, T., Kaddatz, K., Finkernagel, F., Schonbauer, A., Meissner, W., Scharfe, M., Jarek, M., Blocker, H., Muller-Brusselbach, S. and Muller, R. (2011) Genomewide analyses define different modes of transcriptional regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta). *PLoS One*, **6**, e16344.
- Alberini, C.M. (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev*, **89**, 121-145.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. and Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, **7**, 261-269.
- Altomare, D.A., Wang, H.Q., Skele, K.L., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A.J., Godwin, A.K. and Testa, J.R. (2004) AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth. *Oncogene*, **23**, 5853-5857.
- Anastassiadis, T., Deacon, S.W., Devarajan, K., Ma, H. and Peterson, J.R. (2011) Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, **29**, 1039-1045.
- Anderson, A.S., Roberts, P.C., Frisard, M.I., Hulver, M.W. and Schmelz, E.M. (2014) Ovarian tumor-initiating cells display a flexible metabolism. *Exp Cell Res*, **328**, 44-57.
- Anderson, A.S., Roberts, P.C., Frisard, M.I., McMillan, R.P., Brown, T.J., Lawless, M.H., Hulver, M.W. and Schmelz, E.M. (2013) Metabolic changes during ovarian cancer progression as targets for sphingosine treatment. *Exp Cell Res*, **319**, 1431-1442.
- Araki, M. and Motojima, K. (2006) Identification of ERRalpha as a specific partner of PGC-1alpha for the activation of PDK4 gene expression in muscle. *Febs J*, **273**, 1669-1680.
- Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y. and Slamon, D.J. (2003) Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res*, **63**, 196-206.
- Arend, R.C., Londono-Joshi, A.I., Straughn, J.M., Jr. and Buchsbaum, D.J. (2013) The Wnt/beta-catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecol Oncol*, **131**, 772-779.
- Attia, R.R., Connnaughton, S., Boone, L.R., Wang, F., Elam, M.B., Ness, G.C., Cook, G.A. and Park, E.A. (2010) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) by thyroid hormone: role of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC-1 alpha). *J Biol Chem*, **285**, 2375-2385.
- Attia, R.R., Sharma, P., Janssen, R.C., Friedman, J.E., Deng, X., Lee, J.S., Elam, M.B., Cook, G.A. and Park, E.A. (2011) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) by CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta). *J Biol Chem*, **286**, 23799-23807.
- Attwell, S., Roskelley, C. and Dedhar, S. (2000) The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene*, **19**, 3811-3815.
- Bailly, M. (2003) Connecting cell adhesion to the actin polymerization machinery: vinculin as the missing link? *Trends Cell Biol*, **13**, 163-165.
- Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B. and Kurrey, N.K. (2005) Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, **65**, 3025-3029.

- Baron, R. and Kneissel, M. (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*, **19**, 179-192.
- Barthel, A., Schmoll, D. and Unterman, T.G. (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, **16**, 183-189.
- Beaufort, C.M., Helmijr, J.C., Piskorz, A.M., Hoogstraat, M., Ruigrok-Ritstier, K., Besselink, N., Murtaza, M., van, I.W.F., Heine, A.A., Smid, M., Koudijs, M.J., Brenton, J.D., Berns, E.M. and Helleman, J. (2014) Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One*, **9**, e103988.
- Beeson, C.C., Beeson, G.C., Buff, H., Eldridge, J., Zhang, A., Seth, A., Demcheva, M., Vournakis, J.N. and Muise-Helmericks, R.C. (2012) Integrin-dependent Akt1 activation regulates PGC-1 expression and fatty acid oxidation. *J Vasc Res*, **49**, 89-100.
- Behal, R.H., Buxton, D.B., Robertson, J.G. and Olson, M.S. (1993) Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annu Rev Nutr*, **13**, 497-520.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E. and Vousden, K.H. (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, **126**, 107-120.
- Berger, J., Leibowitz, M.D., Doebber, T.W., Elbrecht, A., Zhang, B., Zhou, G., Biswas, C., Cullinan, C.A., Hayes, N.S., Li, Y., Tanen, M., Ventre, J., Wu, M.S., Berger, G.D., Mosley, R., Marquis, R., Santini, C., Sahoo, S.P., Tolman, R.L., Smith, R.G. and Moller, D.E. (1999) Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem*, **274**, 6718-6725.
- Bissell, M.J. and Radisky, D. (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, **1**, 46-54.
- Bowker-Kinley, M.M., Davis, W.I., Wu, P., Harris, R.A. and Popov, K.M. (1998) Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J*, **329 (Pt 1)**, 191-196.
- Brunton, V.G., MacPherson, I.R. and Frame, M.C. (2004) Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta*, **1692**, 121-144.
- Byun, J.K., Choi, Y.K., Kang, Y.N., Jang, B.K., Kang, K.J., Jeon, Y.H., Lee, H.W., Jeon, J.H., Koo, S.H., Jeong, W.I., Harris, R.A., Lee, I.K. and Park, K.G. (2015) Retinoic acid-related orphan receptor alpha reprograms glucose metabolism in glutamine-deficient hepatoma cells. *Hepatology*, **61**, 953-964.
- Cadoudal, T., Distel, E., Durant, S., Fouque, F., Blouin, J.M., Collinet, M., Bortoli, S., Forest, C. and Benelli, C. (2008) Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes*, **57**, 2272-2279.
- Cairns, R.A., Harris, I.S. and Mak, T.W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, **11**, 85-95.
- Campbell, S.E., Mehan, K.A., Tunstall, R.J., Febbraio, M.A. and Cameron-Smith, D. (2003) 17beta-estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and lipid oxidative genes in skeletal muscle. *J Mol Endocrinol*, **31**, 37-45.
- Cannistra, S.A. (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med*, **351**, 2519-2529.
- Carduner, L., Picot, C.R., Leroy-Dudal, J., Blay, L., Kellouche, S. and Carreiras, F. (2014) Cell cycle arrest or survival signaling through alphav integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Exp Cell Res*, **320**, 329-342.
- Casey, R.C., Bursleson, K.M., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema, T.R., Jr., Ruff, L.E. and Skubitz, A.P. (2001) Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am J Pathol*, **159**, 2071-2080.

- Cheng, H., Isoda, F. and Mobbs, C.V. (2009) Estradiol impairs hypothalamic molecular responses to hypoglycemia. *Brain Res*, **1280**, 77-83.
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L. and Cantley, L.C. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, **452**, 230-233.
- Colombo, N., Peiretti, M., Parma, G., Lapresa, M., Mancari, R., Carinelli, S., Sessa, C. and Castiglione, M. (2010) Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, **21 Suppl 5**, v23-30.
- Condello, S., Morgan, C.A., Nagdas, S., Cao, L., Turek, J., Hurley, T.D. and Matei, D. (2014) beta-Catenin-regulated ALDH1A1 is a target in ovarian cancer spheroids. *Oncogene*, **34**, 2297-2308.
- Connaughton, S., Chowdhury, F., Attia, R.R., Song, S., Zhang, Y., Elam, M.B., Cook, G.A. and Park, E.A. (2010) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) gene expression by glucocorticoids and insulin. *Mol Cell Endocrinol*, **315**, 159-167.
- Connelly, J.T., Gautrot, J.E., Trappmann, B., Tan, D.W., Donati, G., Huck, W.T. and Watt, F.M. (2010) Actin and serum response factor transduce physical cues from the microenvironment to regulate epidermal stem cell fate decisions. *Nat Cell Biol*, **12**, 711-718.
- Constantin-Teodosiu, D., Constantin, D., Stephens, F., Laithwaite, D. and Greenhaff, P.L. (2012) The role of FOXO and PPAR transcription factors in diet-mediated inhibition of PDC activation and carbohydrate oxidation during exercise in humans and the role of pharmacological activation of PDC in overriding these changes. *Diabetes*, **61**, 1017-1024.
- Cooper, J.A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*, **105**, 1473-1478.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. and Gutkind, J.S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, **81**, 1137-1146.
- Cowell, C.F., Yan, I.K., Eiseler, T., Leightner, A.C., Doppler, H. and Storz, P. (2009) Loss of cell-cell contacts induces NF-kappaB via RhoA-mediated activation of protein kinase D1. *J Cell Biochem*, **106**, 714-728.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.
- Danen, E.H., Sonneveld, P., Sonnenberg, A. and Yamada, K.M. (2000) Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *J Cell Biol*, **151**, 1413-1422.
- Danen, E.H. and Yamada, K.M. (2001) Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol*, **189**, 1-13.
- Daniels, D.L. and Weis, W.I. (2005) Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 364-371.
- de Lange, P., Moreno, M., Silvestri, E., Lombardi, A., Goglia, F. and Lanni, A. (2007) Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *Faseb J*, **21**, 3431-3441.
- Degenhardt, T., Saramaki, A., Malinen, M., Rieck, M., Vaisanen, S., Huotari, A., Herzig, K.H., Muller, R. and Carlberg, C. (2007) Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Mol Biol*, **372**, 341-355.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. and Dedhar, S. (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase

- kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11211-11216.
- Desgrosellier, J.S. and Cheresch, D.A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, **10**, 9-22.
- Diviani, D., Soderling, J. and Scott, J.D. (2001) AKAP-Lbc anchors protein kinase A and nucleates Galpha 12-selective Rho-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem*, **276**, 44247-44257.
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C. and Schultz, N. (2013) Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun*, **4**, 2126.
- Du, K. and Montminy, M. (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, **273**, 32377-32379.
- Dunbar, E.M., Coats, B.S., Shroads, A.L., Langae, T., Lew, A., Forder, J.R., Shuster, J.J., Wagner, D.A. and Stacpoole, P.W. (2014) Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest New Drugs*, **32**, 452-464.
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M. and Thompson, C.B. (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 3892-3899.
- Fan, Y., Dickman, K.G. and Zong, W.X. (2010) Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition. *J Biol Chem*, **285**, 7324-7333.
- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D. and Hemmings, B.A. (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **279**, 41189-41196.
- Foster, D.W. (2012) Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J Clin Invest*, **122**, 1958-1959.
- Frisch, S.M. and Ruoslahti, E. (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 701-706.
- Fujiwara, S., Kawano, Y., Yuki, H., Okuno, Y., Nosaka, K., Mitsuya, H. and Hata, H. (2013) PDK1 inhibition is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Cancer*, **108**, 170-178.
- Furuyama, T., Kitayama, K., Yamashita, H. and Mori, N. (2003) Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem J*, **375**, 365-371.
- Gao, H., Falt, S., Sandelin, A., Gustafsson, J.A. and Dahlman-Wright, K. (2008) Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. *Mol Endocrinol*, **22**, 10-22.
- Gatenby, R.A. and Gillies, R.J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, **4**, 891-899.
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032.
- Goc, A., Al-Husein, B., Katsanevas, K., Steinbach, A., Lou, U., Sabbineni, H., DeRemer, D.L. and Somanath, P.R. (2014) Targeting Src-mediated Tyr216 phosphorylation and activation of GSK-3 in prostate cancer cells inhibit prostate cancer progression in vitro and in vivo. *Oncotarget*, **5**, 775-787.
- Grassian, A.R., Metallo, C.M., Coloff, J.L., Stephanopoulos, G. and Brugge, J.S. (2011) Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes Dev*, **25**, 1716-1733.
- Grimes, D.R., Kelly, C., Bloch, K. and Partridge, M. (2014) A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *J R Soc Interface*, **11**, 20131124.
- Gudi, R., Bowker-Kinley, M.M., Kedishvili, N.Y., Zhao, Y. and Popov, K.M. (1995) Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *J Biol Chem*, **270**, 28989-28994.
- Guo, W. and Giancotti, F.G. (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 816-826.

- Gupta, R.A., Tan, J., Krause, W.F., Geraci, M.W., Willson, T.M., Dey, S.K. and DuBois, R.N. (2000) Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13275-13280.
- Gyorffy, B., Lanczky, A. and Szallasi, Z. (2012) Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocr Relat Cancer*, **19**, 197-208.
- Harris, R.A., Huang, B. and Wu, P. (2001) Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Adv Enzyme Regul*, **41**, 269-288.
- Hemmings, B.A. and Restuccia, D.F. (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a011189.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y. and Mills, G.B. (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 988-1004.
- Hill, C.S., Wynne, J. and Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, **81**, 1159-1170.
- Holness, M.J., Bulmer, K., Smith, N.D. and Sugden, M.C. (2003) Investigation of potential mechanisms regulating protein expression of hepatic pyruvate dehydrogenase kinase isoforms 2 and 4 by fatty acids and thyroid hormone. *Biochem J*, **369**, 687-695.
- Holness, M.J., Kraus, A., Harris, R.A. and Sugden, M.C. (2000) Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes*, **49**, 775-781.
- Holness, M.J. and Sugden, M.C. (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1143-1151.
- Hsieh, M.C., Das, D., Sambandam, N., Zhang, M.Q. and Nahle, Z. (2008) Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. *J Biol Chem*, **283**, 27410-27417.
- Huang, B., Gudi, R., Wu, P., Harris, R.A., Hamilton, J. and Popov, K.M. (1998) Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J Biol Chem*, **273**, 17680-17688.
- Huang, B., Wu, P., Popov, K.M. and Harris, R.A. (2003) Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes*, **52**, 1371-1376.
- Huang, D., Khoe, M., Befekadu, M., Chung, S., Takata, Y., Ilic, D. and Bryer-Ash, M. (2007) Focal adhesion kinase mediates cell survival via NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, C1339-1352.
- Huddleston, J.E. (2011) Metabolic regulation by ERK. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 546.
- Hur, E.M. and Zhou, F.Q. (2010) GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*, **11**, 539-551.
- Hur, H., Xuan, Y., Kim, Y.B., Lee, G., Shim, W., Yun, J., Ham, I.H. and Han, S.U. (2013) Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. *Int J Oncol*, **42**, 44-54.
- Huveneers, S. and Danen, E.H. (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, **122**, 1059-1069.
- Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687.
- Igishi, T., Fukuhara, S., Patel, V., Katz, B.Z., Yamada, K.M. and Gutkind, J.S. (1999) Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen-activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c-Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Biol Chem*, **274**, 30738-30746.
- Ince, T.A., Sousa, A.D., Jones, M.A., Harrell, J.C., Agoston, E.S., Krohn, M., Selfors, L.M., Liu, W., Chen, K., Yong, M., Buchwald, P., Wang, B., Hale, K.S., Cohick, E., Sergent, P., Witt, A., Kozhekbaeva, Z., Gao, S., Agoston, A.T., Merritt, M.A., Foster, R., Rueda, B.R., Crum, C.P., Brugge, J.S. and Mills, G.B. (2015)

- Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nat Commun*, **6**, 7419.
- Jeong, J.Y., Jeong, N.H., Park, K.G. and Lee, I.K. (2012) Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab J*, **36**, 328-335.
- Jeong, N.H. (2015) Pyruvate Dehydrogenase Kinases: Therapeutic Targets for Diabetes and Cancers. *Diabetes Metab J*, **39**, 188-197.
- Jeong, N.H. and Harris, R.A. (2010) Role of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in regulation of blood glucose levels. *Korean Diabetes J*, **34**, 274-283.
- Jeong, N.H., Wu, P., Joshi, M.A., Jaskiewicz, J., Bock, C.B., Depaoli-Roach, A.A. and Harris, R.A. (2006) Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homeostasis during starvation. *Biochem J*, **397**, 417-425.
- Jha, M.K. and Suk, K. (2013) Pyruvate dehydrogenase kinase as a potential therapeutic target for malignant gliomas. *Brain Tumor Res Treat*, **1**, 57-63.
- Ji, J.Y., Jing, H. and Diamond, S.L. (2003) Shear stress causes nuclear localization of endothelial glucocorticoid receptor and expression from the GRE promoter. *Circ Res*, **92**, 279-285.
- Kadmiel, M. and Cidlowski, J.A. (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*, **34**, 518-530.
- Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, **119**, 1420-1428.
- Kamarajugadda, S., Stemboroski, L., Cai, Q., Simpson, N.E., Nayak, S., Tan, M. and Lu, J. (2012) Glucose oxidation modulates anoikis and tumor metastasis. *Mol Cell Biol*, **32**, 1893-1907.
- Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V.A., Mackay, G., van der Burg, S.H., Verdegaal, E.M., Cascante, M., Shlomi, T., Gottlieb, E. and Peeper, D.S. (2013) A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*, **498**, 109-112.
- Kaur, S., Kenny, H.A., Jagadeeswaran, S., Zillhardt, M.R., Montag, A.G., Kistner, E., Yamada, S.D., Mitra, A.K. and Lengyel, E. (2009) β 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *Am J Pathol*, **175**, 2184-2196.
- Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N. and Hay, N. (1997) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev*, **11**, 701-713.
- Kim, J.W., Gao, P., Liu, Y.C., Semenza, G.L. and Dang, C.V. (2007) Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol*, **27**, 7381-7393.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L. and Dang, C.V. (2006a) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, **3**, 177-185.
- Kim, K.S., Sengupta, S., Berk, M., Kwak, Y.G., Escobar, P.F., Belinson, J., Mok, S.C. and Xu, Y. (2006b) Hypoxia enhances lysophosphatidic acid responsiveness in ovarian cancer cells and lysophosphatidic acid induces ovarian tumor metastasis in vivo. *Cancer Res*, **66**, 7983-7990.
- Kim, Y.D., Kim, Y.H., Tadi, S., Yu, J.H., Yim, Y.H., Jeong, N.H., Shong, M., Hennighausen, L., Harris, R.A., Lee, I.K., Lee, C.H. and Choi, H.S. (2012) Metformin inhibits growth hormone-mediated hepatic PDK4 gene expression through induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Diabetes*, **61**, 2484-2494.
- Kim, Y.I., Lee, F.N., Choi, W.S., Lee, S. and Youn, J.H. (2006c) Insulin regulation of skeletal muscle PDK4 mRNA expression is impaired in acute insulin-resistant states. *Diabetes*, **55**, 2311-2317.
- Kim, Y.N., Koo, K.H., Sung, J.Y., Yun, U.J. and Kim, H. (2013) Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol*, **2012**, 306879.

- Koci, L., Hyzd'alova, M., Vaculova, A., Hofmanova, J. and Kozubik, A. (2011) Detachment-mediated resistance to TRAIL-induced apoptosis is associated with stimulation of the PI3K/Akt pathway in fetal and adenocarcinoma epithelial colon cells. *Cytokine*, **55**, 34-39.
- Kornhauser, J.M., Cowan, C.W., Shaywitz, A.J., Dolmetsch, R.E., Griffith, E.C., Hu, L.S., Haddad, C., Xia, Z. and Greenberg, M.E. (2002) CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*, **34**, 221-233.
- Kramer, A., Green, J., Pollard, J., Jr. and Tugendreich, S. (2014) Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, **30**, 523-530.
- Kramer, D.K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P.M. and Krook, A. (2007) Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem*, **282**, 19313-19320.
- Kulkarni, S.S., Salehzadeh, F., Fritz, T., Zierath, J.R., Krook, A. and Osler, M.E. (2012) Mitochondrial regulators of fatty acid metabolism reflect metabolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, **61**, 175-185.
- Kurman, R.J. and Shih, I. (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, **34**, 433-443.
- Kwon, H.S., Huang, B., Unterman, T.G. and Harris, R.A. (2004) Protein kinase B-alpha inhibits human pyruvate dehydrogenase kinase-4 gene induction by dexamethasone through inactivation of FOXO transcription factors. *Diabetes*, **53**, 899-910.
- Lee, J.H., Kim, E.J., Kim, D.K., Lee, J.M., Park, S.B., Lee, I.K., Harris, R.A., Lee, M.O. and Choi, H.S. (2012) Hypoxia induces PDK4 gene expression through induction of the orphan nuclear receptor ERRgamma. *PLoS One*, **7**, e46324.
- Lee, J.W. and Juliano, R. (2004) Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells*, **17**, 188-202.
- Lefterova, M.I., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C.J., Jr., Liu, X.S. and Lazar, M.A. (2008) PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev*, **22**, 2941-2952.
- Lei, J. and Ingbar, D.H. (2011) Src kinase integrates PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 pathways in T3-induced Na-K-ATPase activity in adult rat alveolar cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **301**, L765-771.
- Lengyel, E. (2010) Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*, **177**, 1053-1064.
- Leoni A., K.-S., Marina Kreutz, and Ruth Knuechel. (1998) Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol*.
- Leoni A. Kunz-Schughart, M.K., and Ruth Knuechel. (1998) Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol*.
- Levine, A.J. and Puzio-Kuter, A.M. (2010) The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, **330**, 1340-1344.
- Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W.K., Zhang, M.Q. and Ren, B. (2003) A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8164-8169.
- Lieber, S., Scheer, F., Meissner, W., Naruhn, S., Adhikary, T., Muller-Brusselbach, S., Diederich, W.E. and Muller, R. (2012) (Z)-2-(2-bromophenyl)-3-[[4-(1-methylpiperazine)amino]phenyl]acrylonitrile (DG172): an orally bioavailable PPARbeta/delta-selective ligand with inverse agonistic properties. *J Med Chem*, **55**, 2858-2868.
- Liu, Z., Chen, X., Wang, Y., Peng, H., Wang, Y., Jing, Y. and Zhang, H. (2014) PDK4 protein promotes tumorigenesis through activation of cAMP-response element-binding protein (CREB)-Ras homolog enriched in brain (RHEB)-mTORC1 signaling cascade. *J Biol Chem*, **289**, 29739-29749.

- Lu, C.W., Lin, S.C., Chen, K.F., Lai, Y.Y. and Tsai, S.J. (2008) Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem*, **283**, 28106-28114.
- Maggi, A. (2011) Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim Biophys Acta*, **1812**, 1054-1060.
- Mayers, R.M., Butlin, R.J., Kilgour, E., Leighton, B., Martin, D., Myatt, J., Orme, J.P. and Holloway, B.R. (2003) AZD7545, a novel inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDHK2), activates pyruvate dehydrogenase in vivo and improves blood glucose control in obese (fa/fa) Zucker rats. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1165-1167.
- Mayr, B. and Montminy, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 599-609.
- Medina, M. and Wandosell, F. (2011) Deconstructing GSK-3: The Fine Regulation of Its Activity. *Int J Alzheimers Dis*, **2011**, 479249.
- Meng, E., Long, B., Sullivan, P., McClellan, S., Finan, M.A., Reed, E., Shevde, L. and Rocconi, R.P. (2012) CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. *Clin Exp Metastasis*, **29**, 939-948.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. and Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-1157.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I. and Treisman, R. (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, **113**, 329-342.
- Miyata, K.S., McCaw, S.E., Marcus, S.L., Rachubinski, R.A. and Capone, J.P. (1994) The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene*, **148**, 327-330.
- Moser, T.L., Pizzo, S.V., Bafetti, L.M., Fishman, D.A. and Stack, M.S. (1996) Evidence for preferential adhesion of ovarian epithelial carcinoma cells to type I collagen mediated by the alpha2beta1 integrin. *Int J Cancer*, **67**, 695-701.
- Muller, M.R. and Rao, A. (2010) NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol*, **10**, 645-656.
- Naruhn, S., Meissner, W., Adhikary, T., Kaddatz, K., Klein, T., Watzler, B., Muller-Brusselbach, S. and Muller, R. (2010) 15-hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist. *Mol Pharmacol*, **77**, 171-184.
- Naruhn, S., Toth, P.M., Adhikary, T., Kaddatz, K., Pape, V., Dorr, S., Klebe, G., Muller-Brusselbach, S., Diederich, W.E. and Muller, R. (2011) High-affinity peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-specific ligands with pure antagonistic or inverse agonistic properties. *Mol Pharmacol*, **80**, 828-838.
- Nelson, C.M. and Chen, C.S. (2002) Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Lett*, **514**, 238-242.
- Nelson, P.J. and Daniel, T.O. (2002) Emerging targets: molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control. *Kidney Int*, **61**, S99-105.
- Nikolova, D.N., Doganov, N., Dimitrov, R., Angelov, K., Low, S.K., Dimova, I., Toncheva, D., Nakamura, Y. and Zembutsu, H. (2009) Genome-wide gene expression profiles of ovarian carcinoma: Identification of molecular targets for the treatment of ovarian carcinoma. *Mol Med Rep*, **2**, 365-384.
- Oh, K.J., Park, J., Kim, S.S., Oh, H., Choi, C.S. and Koo, S.H. (2012) TCF7L2 modulates glucose homeostasis by regulating CREB- and FoxO1-dependent transcriptional pathway in the liver. *PLoS Genet*, **8**, e1002986.
- Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Birge, R.B. and Giancotti, F.G. (1999) Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol*, **145**, 1461-1469.
- Olson, E.N. and Nordheim, A. (2010) Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 353-365.

- Paoli, P., Giannoni, E. and Chiarugi, P. (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*, **1833**, 3481-3498.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L. and Denko, N.C. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, **3**, 187-197.
- Pate, K.T., Stringari, C., Sprowl-Tanio, S., Wang, K., TeSlaa, T., Hoverter, N.P., McQuade, M.M., Garner, C., Digman, M.A., Teitell, M.A., Edwards, R.A., Gratton, E. and Waterman, M.L. (2014) Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *Embo J*, **33**, 1454-1473.
- Pausawasdi, N., Ramamoorthy, S., Crofford, L.J., Askari, F.K. and Todisco, A. (2002) Regulation and function of COX-2 gene expression in isolated gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282**, G1069-1078.
- Penuel, E. and Martin, G.S. (1999) Transformation by v-Src: Ras-MAPK and PI3K-mTOR mediate parallel pathways. *Mol Biol Cell*, **10**, 1693-1703.
- Peters, J.M., Shah, Y.M. and Gonzalez, F.J. (2012) The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*, **12**, 181-195.
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G. and Gustafsson, J.A. (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*, **11**, 1486-1496.
- Piao, L., Sidhu, V.K., Fang, Y.H., Ryan, J.J., Parikh, K.S., Hong, Z., Toth, P.T., Morrow, E., Kutty, S., Lopaschuk, G.D. and Archer, S.L. (2013) FOXO1-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) decreases glucose oxidation and impairs right ventricular function in pulmonary hypertension: therapeutic benefits of dichloroacetate. *J Mol Med (Berl)*, **91**, 333-346.
- Pilegaard, H. and Neufer, P.D. (2004) Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proc Nutr Soc*, **63**, 221-226.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, **18**, 306-360.
- Prigione, A., Rohwer, N., Hoffmann, S., Mlody, B., Drews, K., Bukowiecki, R., Blumlein, K., Wanker, E.E., Ralser, M., Cramer, T. and Adjaye, J. (2014) HIF1alpha modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells*, **32**, 364-376.
- Puthanveetil, P., Wan, A. and Rodrigues, B. (2012) FoxO1 is crucial for sustaining cardiomyocyte metabolism and cell survival. *Cardiovasc Res*, **97**, 393-403.
- Puthanveetil, P., Wang, Y., Wang, F., Kim, M.S., Abrahani, A. and Rodrigues, B. (2010) The increase in cardiac pyruvate dehydrogenase kinase-4 after short-term dexamethasone is controlled by an Akt-p38-forkhead box other factor-1 signaling axis. *Endocrinology*, **151**, 2306-2318.
- Pytela, R., Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E. (1985) Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell*, **40**, 191-198.
- Qi, D., Pulnilkunnil, T., An, D., Ghosh, S., Abrahani, A., Pospisilik, J.A., Brownsey, R., Wambolt, R., Allard, M. and Rodrigues, B. (2004) Single-dose dexamethasone induces whole-body insulin resistance and alters both cardiac fatty acid and carbohydrate metabolism. *Diabetes*, **53**, 1790-1797.
- Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M. and Thompson, C.B. (2003) Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol*, **23**, 7315-7328.
- Ravindran, S., Radke, G.A., Guest, J.R. and Roche, T.E. (1996) Lipoyl domain-based mechanism for the integrated feedback control of the pyruvate dehydrogenase complex by enhancement of pyruvate dehydrogenase kinase activity. *J Biol Chem*, **271**, 653-662.

- Ricci, F., Bernasconi, S., Perego, P., Ganzinelli, M., Russo, G., Bono, F., Mangioni, C., Fruscio, R., Signorelli, M., Broggin, M. and Damia, G. (2012) Ovarian carcinoma tumor-initiating cells have a mesenchymal phenotype. *Cell Cycle*, **11**, 1966-1976.
- Ricote, M. and Glass, C.K. (2007) PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 926-935.
- Rinnankoski-Tuikka, R., Silvennoinen, M., Torvinen, S., Hulmi, J.J., Lehti, M., Kivela, R., Reunanen, H. and Kainulainen, H. (2012) Effects of high-fat diet and physical activity on pyruvate dehydrogenase kinase-4 in mouse skeletal muscle. *Nutr Metab (Lond)*, **9**, 53.
- Roche, T.E. and Hiromasa, Y. (2007) Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 830-849.
- Rosso, S.B., Sussman, D., Wynshaw-Boris, A. and Salinas, P.C. (2005) Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci*, **8**, 34-42.
- Rowles, J., Scherer, S.W., Xi, T., Majer, M., Nickle, D.C., Rommens, J.M., Popov, K.M., Harris, R.A., Riebow, N.L., Xia, J., Tsui, L.C., Bogardus, C. and Prochazka, M. (1996) Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem*, **271**, 22376-22382.
- Rullo, J., Becker, H., Hyduk, S.J., Wong, J.C., Digby, G., Arora, P.D., Cano, A.P., Hartwig, J., McCulloch, C.A. and Cybulsky, M.I. (2012) Actin polymerization stabilizes alpha4beta1 integrin anchors that mediate monocyte adhesion. *J Cell Biol*, **197**, 115-129.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **307**, 1098-1101.
- Sawada, K., Ohyagi-Hara, C., Kimura, T. and Morishige, K. (2011) Integrin inhibitors as a therapeutic agent for ovarian cancer. *J Oncol*, **2012**, 915140.
- Sayas, C.L., Moreno-Flores, M.T., Avila, J. and Wandosell, F. (1999) The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J Biol Chem*, **274**, 37046-37052.
- Schaller, M.D. (2001) Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, **1540**, 1-21.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B. and Parsons, J.T. (1992) pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5192-5196.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T. and van der Geer, P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**, 786-791.
- Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R. and Sieg, D.J. (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*, **71**, 435-478.
- Schlaepfer, D.D. and Hunter, T. (1998) Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol*, **8**, 151-157.
- Schumann, T., Adhikary, T., Wortmann, A., Finkernagel, F., Lieber, S., Schnitzer, E., Legrand, N., Schober, Y., Nockher, W.A., Toth, P.M., Diederich, W.E., Nist, A., Stiewe, T., Wagner, U., Reinartz, S., Muller-Brusselbach, S. and Muller, R. (2015) Dereglulation of PPARbeta/delta target genes in tumor-associated macrophages by fatty acid ligands in the ovarian cancer microenvironment. *Oncotarget*, **6**, 13416-13433.
- Shackelford, D.B. and Shaw, R.J. (2009) The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, **9**, 563-575.
- Shaw, N., Elholm, M. and Noy, N. (2003) Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*, **278**, 41589-41592.

- Shi, Y., Hon, M. and Evans, R.M. (2002) The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2613-2618.
- Shin, D.J., Joshi, P., Hong, S.H., Mosure, K., Shin, D.G. and Osborne, T.F. (2012) Genome-wide analysis of FoxO1 binding in hepatic chromatin: potential involvement of FoxO1 in linking retinoid signaling to hepatic gluconeogenesis. *Nucleic Acids Res*, **40**, 11499-11509.
- Slack-Davis, J.K., Atkins, K.A., Harrer, C., Hershey, E.D. and Conaway, M. (2009) Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer Res*, **69**, 1469-1476.
- Soga, T. (2013) Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci*, **104**, 275-281.
- Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J. and Treisman, R. (1999) Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*, **98**, 159-169.
- Spector, I., Shochet, N.R., Kashman, Y. and Groweiss, A. (1983) Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science*, **219**, 493-495.
- St-Germain, M.E., Gagnon, V., Parent, S. and Asselin, E. (2004) Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer*, **3**, 7.
- Strobel, T. and Cannistra, S.A. (1999) Beta1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Gynecol Oncol*, **73**, 362-367.
- Strumilo, S. (2005) Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim Pol*, **52**, 759-764.
- Sugden, M.C. and Holness, M.J. (2006) Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem*, **112**, 139-149.
- Sun, M., Yang, L., Feldman, R.I., Sun, X.M., Bhalla, K.N., Jove, R., Nicosia, S.V. and Cheng, J.Q. (2003) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *J Biol Chem*, **278**, 42992-43000.
- Sun, P., Enslin, H., Myung, P.S. and Maurer, R.A. (1994) Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*, **8**, 2527-2539.
- Sun, Y., Daemen, A., Hatzivassiliou, G., Arnott, D., Wilson, C., Zhuang, G., Gao, M., Liu, P., Boudreau, A., Johnson, L. and Settleman, J. (2014) Metabolic and transcriptional profiling reveals pyruvate dehydrogenase kinase 4 as a mediator of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumor cells. *Cancer Metab*, **2**, 20.
- Sutendra, G. and Michelakis, E.D. (2013) Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol*, **3**, 38.
- Sznajdman, M.L., Haffner, C.D., Maloney, P.R., Fivush, A., Chao, E., Goreham, D., Sierra, M.L., LeGrumelec, C., Xu, H.E., Montana, V.G., Lambert, M.H., Willson, T.M., Oliver, W.R., Jr. and Sternbach, D.D. (2003) Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett*, **13**, 1517-1521.
- Tanji, C., Yamamoto, H., Yorioka, N., Kohno, N., Kikuchi, K. and Kikuchi, A. (2002) A-kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) and mediates protein kinase A-dependent inhibition of GSK-3beta. *J Biol Chem*, **277**, 36955-36961.
- Thamilselvan, V., Craig, D.H. and Basson, M.D. (2007) FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway. *Faseb J*, **21**, 1730-1741.

- Tian, W., Han, X., Yan, M., Xu, Y., Duggineni, S., Lin, N., Luo, G., Li, Y.M., Han, X., Huang, Z. and An, J. (2011) Structure-based discovery of a novel inhibitor targeting the beta-catenin/Tcf4 interaction. *Biochemistry*, **51**, 724-731.
- Toth, P.M., Lieber, S., Scheer, F.M., Schumann, T., Schober, Y., Nockher, W.A., Adhikary, T., Muller-Brusselbach, S., Muller, R. and Diederich, W.E. (2016) Design and Synthesis of Highly Active Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) beta/delta Inverse Agonists with Prolonged Cellular Activity. *ChemMedChem*, **11**, 488-496.
- Van de Water, B., Jaspers, J.J., Maasdam, D.H., Mulder, G.J. and Nagelkerke, J.F. (1994) In vivo and in vitro detachment of proximal tubular cells and F-actin damage: consequences for renal function. *Am J Physiol*, **267**, F888-899.
- van den Berg, D.L., Zhang, W., Yates, A., Engelen, E., Takacs, K., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I. and Poot, R.A. (2008) Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*, **28**, 5986-5995.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. and Thompson, C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **324**, 1029-1033.
- Vandevyver, S., Dejager, L. and Libert, C. (2012) On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic*, **13**, 364-374.
- Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B. and Treisman, R. (2007) Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science*, **316**, 1749-1752.
- Wagner, K.D. and Wagner, N. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol Ther*, **125**, 423-435.
- Wakeling, A.E., Dukes, M. and Bowler, J. (1991) A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*, **51**, 3867-3873.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, 309-314.
- Warburg, P.K., Negelein F. (1924) Uber den stoffwechsel der carcinomzelle. *Biochem Z*, **152**, 319-344.
- Wauson, E.M., Guerra, M.L., Barylko, B., Albanesi, J.P. and Cobb, M.H. (2013) Off-target effects of MEK inhibitors. *Biochemistry*, **52**, 5164-5166.
- Wende, A.R., Huss, J.M., Schaeffer, P.J., Giguere, V. and Kelly, D.P. (2005) PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol*, **25**, 10684-10694.
- Wiesner, S., Legate, K.R. and Fassler, R. (2005) Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1081-1099.
- Wigfield, S.M., Winter, S.C., Giatromanolaki, A., Taylor, J., Koukourakis, M.L. and Harris, A.L. (2008) PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. *Br J Cancer*, **98**, 1975-1984.
- Wisdom, R., Johnson, R.S. and Moore, C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo J*, **18**, 188-197.
- Wong, W. and Scott, J.D. (2004) AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 959-970.
- Wu, P., Blair, P.V., Sato, J., Jaskiewicz, J., Popov, K.M. and Harris, R.A. (2000) Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys*, **381**, 1-7.
- Wu, P., Inskeep, K., Bowker-Kinley, M.M., Popov, K.M. and Harris, R.A. (1999) Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes*, **48**, 1593-1599.
- Wu, P., Sato, J., Zhao, Y., Jaskiewicz, J., Popov, K.M. and Harris, R.A. (1998) Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J*, **329 (Pt 1)**, 197-201.

- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., Kliewer, S.A. and Milburn, M.V. (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*, **3**, 397-403.
- Xu, S., Yang, Y., Dong, L., Qiu, W., Yang, L., Wang, X. and Liu, L. (2014) Construction and characteristics of an E-cadherin-related three-dimensional suspension growth model of ovarian cancer. *Sci Rep*, **4**, 5646.
- Yeh, W.L., Shioda, K., Coser, K.R., Rivizzigno, D., McSweeney, K.R. and Shioda, T. (2013) Fulvestrant-induced cell death and proteasomal degradation of estrogen receptor alpha protein in MCF-7 cells require the CSK c-Src tyrosine kinase. *PLoS One*, **8**, e60889.
- Yu, S. and Reddy, J.K. (2007) Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 936-951.
- Zhang, S., Hulver, M.W., McMillan, R.P., Cline, M.A. and Gilbert, E.R. (2014) The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab (Lond)*, **11**, 10.
- Zhang W, Z.S., Hu X, Tam KY. (2015) Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? . *Int J Biol Sci*, **11(12)**, 1390-1400.
- Zhang, Z.S., Hu X, Tam KY. (2015) Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? . *Int J Biol Sci*, **11(12)**, 1390-1400.
- Zhao, G., Jeoung, N.H., Burgess, S.C., Rosaaen-Stowe, K.A., Inagaki, T., Latif, S., Shelton, J.M., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Harris, R.A., Richardson, J.A. and Kliewer, S.A. (2008) Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**, H936-943.

7 Lebenslauf

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Bastians, Bauer, Bremmer, Daut, del Rey, Decher, Eilers, Elsässer, Fritz, Garn, Garten, Grzeschik, Haselik, Hassel, Huber, Jacob, Koch, Koolmann, Krebber, Löffler, Lill, Lohoff, Luers, Oeffner, Petz, Portenier, Meißner, Moll, Müller, Müller-Brüsselbach, Röhm, Schäfer, Stiewe, Suske, Weihe, Westermann

9 Publikationen

Schumann T *, Adhikary T *, Wortmann A *, Finkernagel F, Lieber S, Schnitzer E, Legrand N, Schober Y, Nockher WA, Toth PM, Diederich WE, Nist A, Stiewe T, Wagner U, Reinartz S, Müller-Brüsselbach S, Müller R. **Deregulation of PPAR β/δ target genes in tumor-associated macrophages by fatty acid ligands in the ovarian cancer microenvironment.** Oncotarget. 2015 May 30;6(15):13416-33. Epub 2015 Apr 15

Stockert J *, Wolf A *, Kaddatz K, Schnitzer E, Finkernagel F, Meissner W, Müller-Brüsselbach S, Kracht M, Müller R. **Regulation of TAK1/TAB1-mediated IL-1 β signaling by cytoplasmic PPAR β/δ .** PLoS One. 2013 Apr 30;8(4):e63011. Epub 2013 Apr 30

* Ko-Erstautorenschaft

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf Müller und PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die konstruktiven Anregungen und Diskussionen sowie für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und hilfreichen Tipps. Bei Dr. Halama aus dem NCT in Heidelberg bedanke ich mich für die Durchführung des „Bio-Plex Signaling Assays. Der *Genomics Unit* des ZTI Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Thorsten Stiewe gilt mein Dank bezüglich der RNA-Sequenzierungen und Dr. Silke Reinartz danke ich für die Bereitsstellung der Daten aus den Primärzellen sowie Florian Finkernagel für die bioinformatischen Auswertungen.

Außerdem bedanke ich mich bei Julia Obert, Dr. Verena Rohhalter und vor allem PD Dr. Wolfgang Meißner für das ausführliche und schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonders dankbar bin ich sagen zu können, dass ich an der Arbeit unter derzeitigen und ehemaligen Kollegen auch Freunde gefunden habe, die mich stets aufgemuntert und mir auch mal den Kopf zurechtgerückt haben, wenn es nötig war.

Vor allem dir, Julia, gilt mein Dank für eine stets gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, aber auch für unzählige, unvergesslich lustige Momente, die die letzten Jahre zu einer besonderen Zeit gemacht haben.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen „Speyerer Mädels“ Henriette, Katharina und Sophia für ihr stetiges Interesse an dieser Arbeit, ihr stets offenes Ohr, die kraftspendenden Worte in den letzten Jahren und einfach dafür, dass sie immer an meiner Seite sind.

Meinen Eltern danke ich für die jahrelange Unterstützung und Hilfe in allen Belangen.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Transkriptionsregulation der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 (PDK4), einem zentralen Schalter des Glukosestoffwechsels, durch Zelladhäsion und onkogene Signalwege beim humanen Ovarialkarzinom“ im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) unter Leitung von Prof. Rolf Müller ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den ,

Evelyn Schnitzer