

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Fakultät für Medizin
Direktor: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Regulation der transkriptionellen Koaktivatoren
Megakaryoblastic Leukemia 1 und 2 (MKL1 und -2) und ihre
Bedeutung in der Tumorigenese**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach
Pharmakologie und Toxikologie

vorgelegt

von

Dr. rer. nat. Susanne Mühlich

München 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Der Transkriptionsfaktor Serum Response Faktor (SRF)
- 1.2 Die transkriptionellen Koaktivatoren Megakaryoblastic Leukemia 1 und -2 (MKL1/2)
- 1.3 Der Tumorsuppressor Deleted in Liver Cancer 1 (DLC1)
- 1.4 Zielsetzung

2. Ergebnisse und Diskussion eigener Arbeiten

- 2.1 Identifikation des Aktin-Bindeproteins Filamin A als neuen MKL1-Interaktionspartner
- 2.2 MKL1 und -2 als neue pharmakologische Angriffspunkte in der Therapie des hepatozellulären Karzinoms (HCC)
- 2.3 Charakterisierung von Myoferlin als neues MKL/SRF-Zielgen und Modulator von Wachstum und Seneszenz im HCC

3. Zusammenfassung und Ausblick

4. Literaturverzeichnis

5. Danksagung

6. Curriculum vitae

7. Verzeichnis eigener Publikationen

1. Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor Serum Response Faktor (SRF)

Zahlreiche fundamentale biologische Prozesse wie Zellwachstum, Zellmigration, Differenzierung und Organisation des Zytoskeletts unterliegen der Kontrolle des ubiquitären Transkriptionsfaktors SRF (Serum Response Faktor). SRF aktiviert die Transkription von Genen, die aufgrund ihrer Induktion innerhalb von Minuten nach Stimulation mit Serum- oder Wachstumsfaktoren auch „*Immediate Early Genes*“ (IEGs) genannt werden (Winkles et al., 1998). SRF ist Mitglied der Familie der MADS-Box Familie von Transkriptionsfaktoren (MCM1, AG, DEFA, SRF) mit dem gemeinsamen Merkmal einer konservierten Sequenz von 56 AS. Der C-Terminus der MADS-Box ist für die Dimerisierung zweier SRF-Monomere und der N-Terminus für die DNA-Bindungsspezifität von SRF an das sogenannte „Serum Response Element“ (SRE) verantwortlich (Shore and Sharrocks, 1995). Das SRE enthält die Konsensus-Sequenz CC(A/T)₆GG, die auch als CArG-Box bezeichnet wird (Shore and Sharrocks, 1995). Die terminalen Guaninreste der CArG-Box sind für die Bindung von SRF essentiell (Treisman, 1986). Am besten werden Substitutionen der ersten oder letzten Position des Adenin-/Thymidin-reichen Mittelstücks gegen Cytosin oder Guanin toleriert (Leung and Miyamoto, 1989). Es gibt ungefähr 160 verschiedene SRF-Zielgene, die größtenteils an Zellwachstum, Migration, Adhäsion, Myogenese und Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (Miano et al., 2007; Pipes et al., 2006). Da Zellmigration und-adhäsion essentiell für die Gastrulation sind, ist es nicht verwunderlich, dass die homozygote *Srf*-null Mutation in Mäusen zur Letalität bei der Gastrulation führt (Arsenian et al., 1998). Gewebsspezifische Deletionen von SRF zeigten jedoch die fundamentalen biologischen Funktionen von SRF-Zielgenen für das kardiovaskuläre System, die Muskel- und Leberentwicklung und das zentrale Nervensystem (Alberti et al., 2005; Charvet et al., 2006; Knoll and Nordheim, 2009; Latasa et al., 2007; Li et al., 2005; Miano et al., 2004; Niu et al., 2005; Parlakian et al., 2005). Das prototypische SRF-Zielgen ist *c-fos*, welches Osteosarkome in Mäusen hervorrufen kann (Curran et al., 1984). Multiple Sequenzelemente im *c-fos* Promotor wurden kartiert, von denen das Serum Response Element (SRE) die wichtigste Rolle für die Transformation spielt. Ein Mechanismus für die Aktivierung des *c-fos* SRE durch Serum und dessen Komponente Lysophosphatidsäure (LPA) wird durch eine purinreiche Sequenz in

5`Orientierung der SRF-Bindungsregion vermittelt (Abb. 1), an die *Ternary Complex Factor* (TCF) bindet (Shaw and Saxton, 2003). TCF wird von den drei Genen Elk-1, SAP1 und SAP2/Net1 kodiert und wird über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) kontrolliert (Shaw and Saxton, 2003). Dies erfolgt durch Aktivierung des kleinen G-Proteins *Rat Sarcoma* (RAS) und Membranbindung der *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (RAF) Kinase. RAF aktiviert die *Mitogen-activated Protein Kinase 1 und 2* (MEK 1/2), welche die *Extracellular-signal Regulated Kinase 1 und 2* (ERK 1/2) phosphoryliert. ERK1/2 transloziert daraufhin in den Zellkern und aktiviert das SRE.

Der zweite Signalweg zur Aktivierung des SRE ist unabhängig von TCFs und wird durch die kleine GTPase RhoA und die transkriptionellen SRF-Koaktivatoren *Megakaryoblastic Leukemia 1 und -2* (MKL1 und -2) induziert (Hill et al., 1995, Miralles et al., 2003).

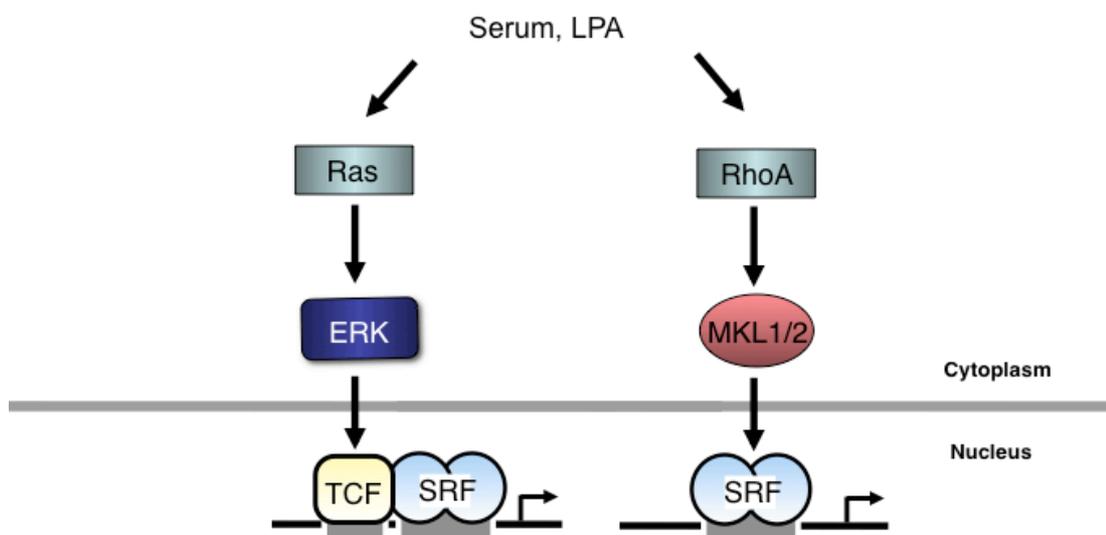


Abb. 1: Schematische Darstellung der zwei Signalwege zur Induktion des SRE durch Serum und Lysophosphatidsäure (LPA). Serum und LPA aktivieren die Ras- und RhoA-Signalwege.

1.2 Die transkriptionellen Koaktivatoren Megakaryoblastic Leukemia 1 und -2 (MKL1/2)

MKL1 wurde erstmals im Fusionsprotein RBM15 (RNA-binding motif protein 15)-MKL1 beschrieben, welches durch die Translokation der Chromosomen 1 und 22 im Rahmen der akuten megakaryoblastischen Leukämie (AML) gebildet wird (Ma et al., 2001). MKL1 teilt Homologie mit Myokardin, einem herzspezifischen SRF-Koaktivator (Wang et al., 2001). Deshalb werden die beiden ubiquitär vorkommenden Myokardinanaloga MKL1 und MKL2 auch als *Myocardin-related*

transcription factors A and B (MRTF-A/B) bezeichnet. Die diversen funktionellen Domänen von MKL1, MKL2 und Myokardin sind evolutionär konserviert und in Abb. 2 dargestellt. Am N-Terminus befindet sich die RPEL-Domäne, die in der Lage ist, monomeres G-Aktin zu binden, und am C-Terminus die als Transkriptionsaktivierungs-Domäne fungierende Region (Miralles et al., 2003). Die Assoziation mit SRF wird durch die *Basic*-Region und eine benachbarte Glutamin-reiche Region vermittelt (Miralles et al., 2003). Die aus 35 Aminosäuren bestehende SAP-Domäne vermittelt Promotorspezifität und ist an diversen chromosomalen DNA Metabolismen beteiligt (Olson and Nordheim, 2010). Die hochkonservierte *leucine zipper*-Domäne dient der Homo- und Heterodimerisierung der Myokardin-verwandten Transkriptionsfaktoren (Miralles et al., 2003). Wir konnten zeigen, dass MKL1 an Aminosäuren 449, 450 und 454 durch die *Extracellular-signal regulated kinase 1/2* (Erk1/2) phosphoryliert wird und dies den nukleären Export und damit die Inaktivierung von MKL1 vorantreibt (Muehlich et al., 2008). Zudem konnten wir im Rahmen dieses Habilitationsprojekts eine neue Interaktionsdomäne an den Aminosäuren 301-310 von MKL1 identifizieren. Hier findet die Interaktion zwischen MKL1 und dem aktin-bindenden Protein Filamin A statt, die sich als essentiell für die transkriptionelle Aktivität von MKL1 und die Expression von MKL/SRF-Zielgenen erwies (Kircher et al., 2015).

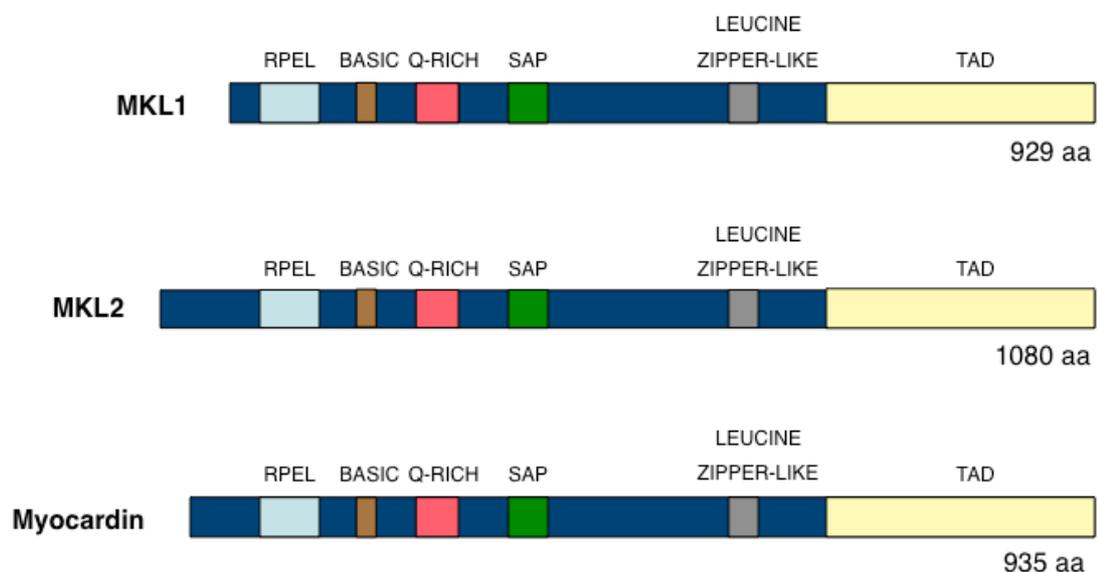


Abb. 2: Domänenstruktur der Myokardin-Proteinfamilie. MKL1/2 und Myokardin teilen Homologie in vielen funktionellen Domänen: RPEL, konservierte N-terminale Domäne; B, basische Domäne; Q, glutamin-reiche Domäne; SAP, SAF-A/B-Acinus-PIAS Domäne; LZ, *leucine zipper*-ähnliche Domäne und TAD, Transaktivierungsdomäne.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand führt die Dissoziation des MKL1-G-Aktin-Komplexes durch vermehrte Polymerisation zu F-Aktin infolge Serumstimulation zur Aktivierung von MKL1 und -2 (Miralles et al., 2003 und Abb. 3). Die Freisetzung von G-Aktin demaskiert eine nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS) in der RPEL-Domäne, die für den Importin-medierten nukleären Import der MKLs benötigt wird (Pawlowski et al., 2010). Nach Translokation in den Kern assoziiert MKL1 mit SRF und aktiviert dort MKL/SRF-Zielgene, die an der Zellmotilität, –kontraktilität oder muskel-spezifischen Funktionen beteiligt sind (Olson and Nordheim, 2010). Jüngste Befunde zeigen interessanterweise, dass neben der zytoplasmatischen auch eine nukleäre Aktinpolymerisation zur MKL1-Aktivierung benötigt wird. Diese nukleäre Aktinpolymerisation wird durch das Formin mDia bewerkstelligt (Baarlink et al., 2013). Auch die ektope Expression von Aktin-Mutanten im Kern steigerte die SRF-Aktivität (Kokai et al., 2014; Stern et al., 2009). Ebenso konnte kürzlich gezeigt werden, dass das nukleäre Protein MICAL-2 nukleäres G-Aktin redoxabhängig vermindert und dadurch die MKL1/SRF-Aktivität steigert (Lundquist et al., 2014). Nukleäres G-Aktin ist auch für den Export von MKL1 aus dem Kern verantwortlich. In Fibroblasten ist der nukleäre Export von MKL1 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die subzelluläre Lokalisation von MKL1 (Vartiainen et al., 2007).

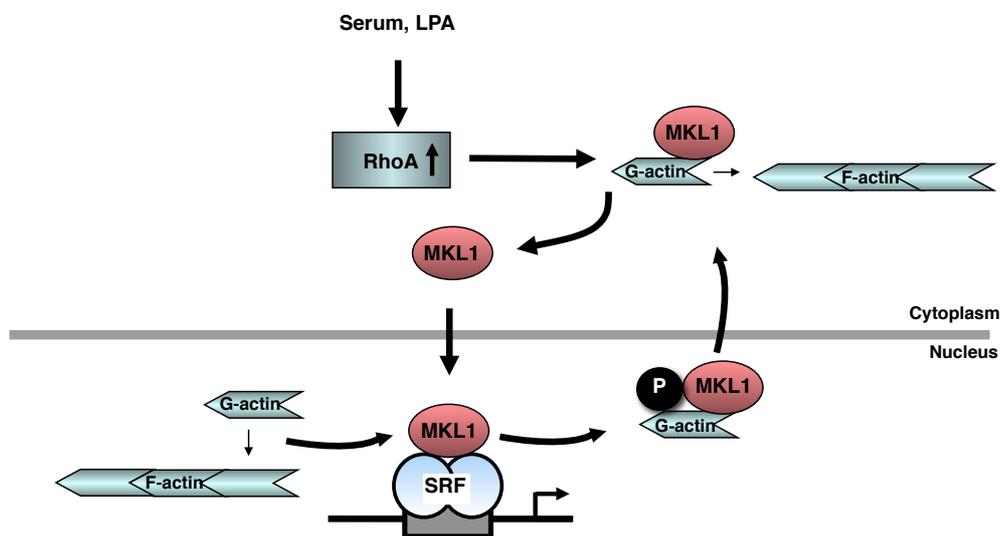


Abb. 3: Modell für die MKL1-Regulation in Fibroblasten: Die Aktivierung von RhoA nach Serum-Induktion stimuliert durch die Bildung von F-Aktin-Stressfasern und einer Abnahme von monomerem G-Aktin die Translokation von MKL1 in den Zellkern, wo es mit SRF assoziiert und SRF-Zielgene aktiviert. Neben der zytoplasmatischen spielt auch die nukleäre Aktinpolymerisation eine wichtige Rolle bei der SRF-Aktivierung. Der nukleäre Export von MKL1 wird durch gesteigerte G-Aktin-Bindung und Phosphorylierung bewerkstelligt. Modifiziert nach: Muehlich et al. (2008).

In anderen Zelltypen jedoch, wie in quergestreiften Muskelzellen und Neuronen, findet sich jedoch eine konstitutiv nukleäre Lokalisation von MKL1 (Kalita et al., 2006; Stern et al., 2009). Wir konnten zeigen, dass Tumorzellen, denen der Tumorsuppressor Deleted in Liver Cancer 1 (DLC1) fehlt, eine konstitutiv nukleäre Lokalisation von MKL1 und -2 aufweisen (Muehlich et al., 2012).

1.3 Der Tumorsuppressor Deleted in Liver Cancer 1 (DLC1)

DLC1 ist ein Rho-GTPase-aktivierendes Protein (Rho-GAP), welches die Hydrolyse von Rho-GTP in Rho-GDP und dadurch die Inaktivierung von Rho vorantreibt (Jaffe and Hall, 2005 und Abb. 4). Eine Deletion des Tumorsuppressors DLC1 liegt in ca. 50% der Leber-, Mamma- und Lungentumore und in ca. 70% der Kolonkarzinome vor (Xue et al., 2008). Neben der Deletion des Genlokus von DLC1, welcher auf Chromosom 8p22 angesiedelt ist, kommen für die Inaktivierung von DLC1 epigenetische Mechanismen wie Methylierung und Histon-Deacetylierung in Betracht (Wong et al., 2003; Yuan et al., 2003). Das DLC1-Protein besitzt vier funktionelle Domänen: ein N-terminales steriles alpha-Motiv (SAM), eine serinreiche (SR) Region, eine Rho-GAP-Domäne und eine C-terminale START-Domäne. Über die SAM-Domäne kann DLC1 Homo- oder Hetero-Oligomere mit anderen Proteinen, die SAM-Domänen aufweisen, bilden (Qiao and Bowie, 2005). Die relativ unkonservierte SR-Region enthält einen Tyrosin-Rest an Position 442, der mit der Src-Homologie 2 (SH2) – Domäne von Tensin interagiert (Qian et al., 2007) und dadurch die Lokalisation von DLC1 an Fokaladhäsionen ermöglicht.

Die Rho-GAP-Domäne katalysiert die Konversion der aktiven, GTP-gebundenen Rho-Proteine in ihre inaktive, GDP-gebundene Form. Ein konservierter "Arginin-Finger" an Position 677 ist essentiell für die Katalysation der GTP-Hydrolyse (Durkin et al., 2007). DLC1 und die beiden weiteren Mitglieder der DLC-Proteinfamilie DLC2 and DLC3 besitzen eine starke Rho-GAP-Aktivität gegenüber RhoA und zu einem geringeren Ausmaß gegenüber der RhoGTPase Cdc42, während fast kein Effekt auf die GTPase-Aktivität von Rac1 vorliegt (Ching et al., 2003; Durkin et al., 2007; Qian et al., 2007; Wong et al., 2003). Die C-terminale START-Domäne interagiert mit Phospholipase C- δ 1 (PLC- δ 1) und aktiviert dessen Fähigkeit, das Membranlipid Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-triphosphat (IP3) zu hydrolysieren (Liao et al., 2008). Dies aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und steigert die Calciumionen-Konzentration, was zu Alterationen im Aktin-Zytoskelett führt (Liao et al., 2008). Veränderungen im Aktin-

Zytoskelett sind auch eminent in Fibroblasten, die aus DLC1-Knockout-Embryos isoliert wurden. Die homozygote DLC1-null Mutation in Mäusen resultiert in embryonaler Letalität an Tag 10.5 und beweist damit die essentielle Rolle von DLC1 für die Embryonalentwicklung (Durkin et al., 2005).

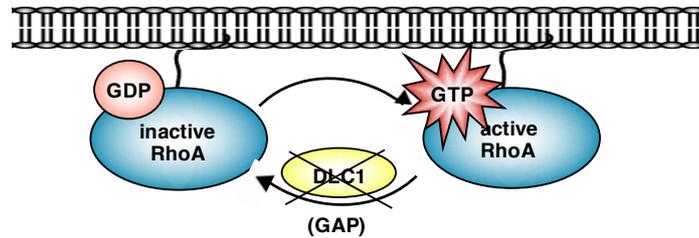


Abb. 4: Deletion des Rho-GTPase-aktivierenden (GAP) Proteins DLC1 führt zur dauerhaften Aktivierung von RhoA.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare und pathophysiologische Charakterisierung der transkriptionellen Koaktivatoren *Megakaryoblastic Leukemia 1 und 2* (MKL1 und -2), insbesondere in der Hepatokanzerogenese.

Zunächst sollte ein neuer Interaktionspartner von MKL1 charakterisiert werden. Neben der Kartierung der Bindestelle zwischen MKL1 und Filamin A, einem Aktin-Bindeprotein, sollte die physiologische Bedeutung der MKL1-Filamin A-Interaktion für die Expression von MKL/SRF-Zielgenen ermittelt werden.

Der Schwerpunkt des zweiten Teils der Arbeit war es, die pathophysiologischen Funktionen von MKL1 und -2 für die Tumorigenese, insbesondere die Hepatokanzerogenese, bedingt durch Verlust des Tumorsuppressors *Deleted in Liver Cancer 1* (DLC1) zu untersuchen. Ein Verlust von DLC1 liegt in ca. 50% der Leber-, Mamma- und Lungentumore und 70% der Kolonkarzinome vor. Basierend auf unserem Befund, dass die Abwesenheit von DLC1 zur konstitutiven Aktivierung von MKL1 und -2 führt, sollten MKL1 und -2 im Sinne einer personalisierten Medizin als pharmakologische Zielstrukturen validiert werden.

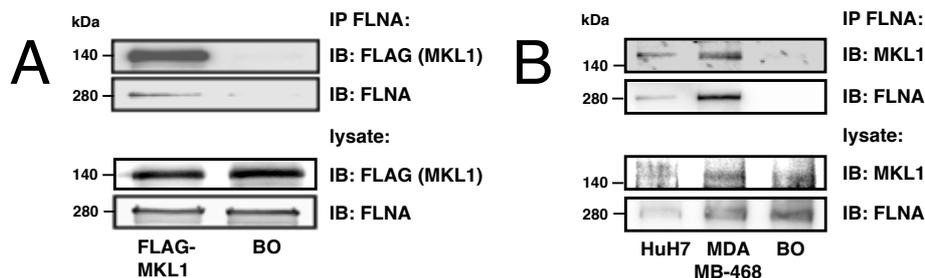
Ziel des dritten Teils der Arbeit war es, nach der Etablierung von MKL1 und -2 als neuen pharmakologische Zielstrukturen im HCC, neue HCC-relevante MKL-Zielgene zu identifizieren. Diese sollten dann auf Ihre Fähigkeit hin überprüft werden, den Effekt von MKL1 und -2 auf die Seneszenzantwort und das HCC-Wachstum zu vermitteln.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Identifikation des Aktin-Bindeproteins Filamin A als neuen MKL1-Interaktionspartner

(Kircher et al., 2015, Muehlich et al., 2008, 2016, Hayashi et al., 2015)

Wir konnten durch massenspektrometrische Analyse einen neuen Interaktionspartner von MKL1 namens Filamin A identifizieren (Kircher et al., 2015). Filamin A ist ein aktin-bindendes Protein, das die Zellform und –motilität determiniert, indem es Aktin-Filamente verknüpft. Die direkte Interaktion von ektopem wie auch endogenem Filamin A und MKL1 wurde durch reziproke Immunpräzipitationsexperimente nachgewiesen (Abb. 5A, B). In unseren funktionellen Studien erhielten wir vielfältige Beweise dafür, dass Filamin A die MKL1/SRF-Aktivität stimuliert: erstens förderte die LPA-induzierte RhoA-Aktivierung in primären humanen Fibroblasten die Interaktion von MKL1 und Filamin A und induzierte SRF-Zielgene (Abb. 5C). Zweitens führte die Depletion von FLNA mittels RNA-Interferenz zu einer starken Reduktion von MKL/SRF-Zielgenen (Abb. 5D). Und drittens erwies sich die Filamin A-induzierte Zielgenexpression als MKL-abhängig und die MKL-induzierte Zielgenexpression als Filamin A-abhängig (Abb. 5E,F). Somit stellt die Bindung an Filamin A einen neuen Mechanismus für die MKL1-Regulation zusätzlich zu der Bindung an G-Aktin dar. Die Regulation von MKL1 durch freies monomeres G-Aktin wurde in der Einleitung (1.2) eingehend beschrieben.



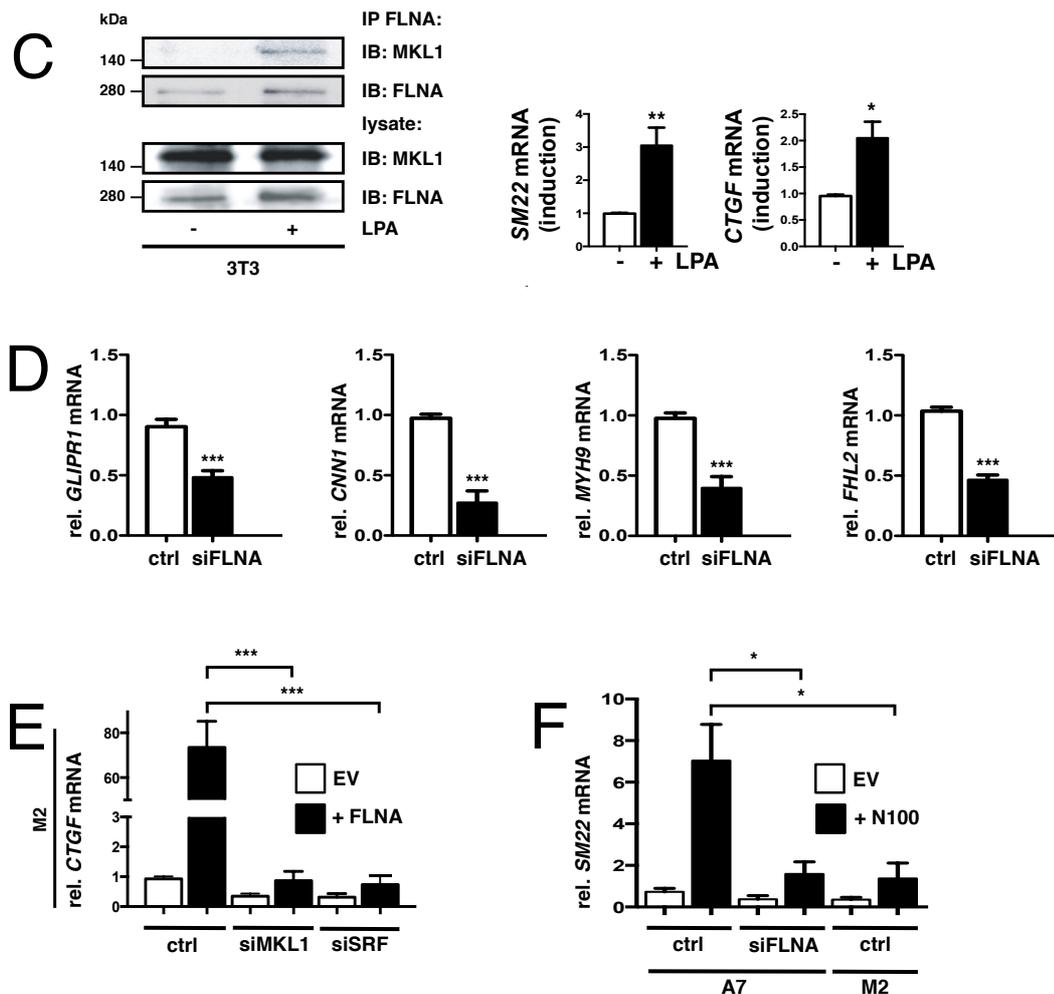


Abb. 5. Identifikation von Filamin A als MKL1 Interaktionspartner, der für die transkriptionelle Aktivität von MKL1 benötigt wird. (A) Interaktion zwischen ektopisch exprimiertem FLAG-MKL1 und Filamin A (FLNA) in A7-Melanomzellen. BO, Sepharose Beads-only Kontrolle ohne Antikörper. (B) Interaktion von endogenem MKL1 und FLNA in HuH7-hepatozellulären Karzinomzellen und MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen. (C) Interaktion von endogenem MKL1 und FLNA nach Behandlung von 3T3-Fibroblasten mit 10 μ M Lysophosphatidsäure (LPA) und Induktion MKL/SRF-abhängiger Zielgene wie SM22 und *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF, rechts). (D) Quantitative RT-PCR-Analyse in A7-Melanomzellen transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder FLNA-siRNA (siFLNA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt ($***P < 0,001$). (E) CTGF mRNA-Expression in FLNA-defizienten M2-Melanomzellen, ermittelt durch qRT-PCR-Analyse, nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (ctrl), MKL1 siRNA (siMKL1) und SRF siRNA (siSRF) und Rekonstitution mit FLNA. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt ($***P < 0,001$). (F) SM22 mRNA-Expression in FLNA-exprimierenden A7 und FLNA-defizienten M2-Melanomzellen, ermittelt durch qRT-PCR-Analyse, nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder FLNA siRNA (siFLNA) und Rekonstitution mit konstitutiv aktivem (N100-) MKL1. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt ($*P < 0,05$). Entnommen aus: Kircher et al. *Sci Signal.* (2015).

Beide Mechanismen haben ein gemeinsames Charakteristikum: ihre Abhängigkeit von der Phosphorylierung von MKL1. Wir konnten eine konservierte Phosphorylierungsstelle an Serin 449, Threonin 450 und Serin 454 identifizieren, der eine entscheidende Rolle für den nukleären Export von MKL1 zukommt. So befindet sich MKL1, welches durch Konversion dieser kritischen Aminosäuren zu Alanin nicht phosphoryliert werden kann, konstitutiv im Kern (Muehlich et al., 2008).

Zur Klärung des Effekts der Phosphorylierung auf die subzelluläre Lokalisation wurden Punktmutationen der Aminosäuren 449, 450 und 454 zu Glutamat vorgenommen, die in einer gesteigerten Exportrate und zytoplasmatischen Lokalisation von MKL1 resultierten. Die genannte Abfolge der Aminosäuren (S449/T450/S454) entspricht dem Konsensus-Motiv für die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) (Alvarez et al., 1991). In vitro Kinase-Experimente mit rekombinant aktiver Mitogen-aktivierter Protein Kinase 1 (MAPK1/ERK2) bestätigten deren Beteiligung an der Phosphorylierung von MKL1. Im Einklang damit hemmte der spezifische MAPK-Inhibitor UO126 die MKL1-Phosphorylierung und rief eine überwiegend nukleäre Lokalisation von MKL1 hervor, während eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs mit TPA (Tetradecanoylphorbol-Acetat) zur Phosphorylierung und zytoplasmatischen Lokalisation von MKL1 führte. Diese Daten unterstreichen, dass die Phosphorylierung von MKL1 den nukleären Export fördert. Auf molekularer Ebene konnten wir in diesem Zusammenhang ein nukleäres Exportsignal (NES) in MKL1 identifizieren und nachweisen, dass die ERK-vermittelte Phosphorylierung die Bindung von MKL1 an Exportin 1 (CRM1/XPO1) steigert (Hayashi et al., 2015; Muehlich et al., 2008). Exportin 1 mediert den NES-abhängigen nukleären Export von Proteinen, darunter interessanterweise auch G-Aktin selbst (Vartiainen et al., 2007). Die Phosphorylierung von MKL1 stellt unseren Studien zufolge eine Voraussetzung für die Bindung an G-Aktin dar, welche den nukleären Export von MKL1 fördert und die transkriptionelle Aktivierung von MKL1 supprimiert (Vartiainen et al., 2007). Im Gegensatz dazu hemmt die Bindung von Filamin A an MKL1 die MKL1-Phosphorylierung und hat dadurch einen positiven Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von MKL1 und SRF. Unsere Arbeiten beweisen, dass Filamin A für die nukleäre Aktinpolymerisation benötigt wird (Kircher et al., 2015 und Abb. 6).

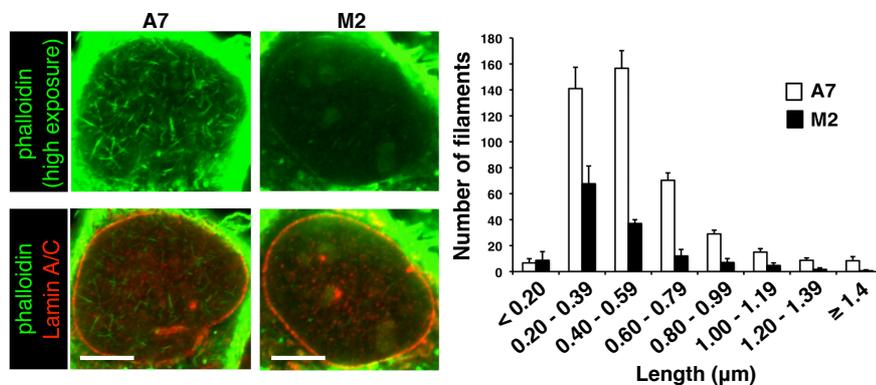


Abb. 6. Essentielle Rolle von Filamin A für die nukleäre Aktinpolymerisation. Immunfluoreszenzanalyse von Phalloidin und Lamin A/C in FLNA-exprimierenden A7-Melanomzellen und FLNA-defizienten M2-Melanomzellen (Maßstab: 10 μm) und quantitative Auswertung der Filamentlänge (rechts). Entnommen aus: Kircher et al. Sci Signal. (2015).

Obwohl die Präsenz und Funktion von nukleärem Aktin Gegenstand intensiver Debatte sind, mehren sich in jüngsten Studien die Beweise für eine wichtige Rolle von nukleärem Aktin in der Genexpression. So wurde nukleäres Aktin als Komponente aller dreier nukleärer RNA-Polymerasen und Chromatin-Remodelling-Komplexe beschrieben (Skarp and Vartiainen, 2010). Baarlink und Kollegen berichteten vor kurzem, dass die nukleäre Aktinpolymerisation hinreichend für die transkriptionelle Aktivierung von MKL1 und SRF sei (Baarlink et al., 2013). Daher war es unsere Hypothese, dass Filamin A als F-Aktin-Bindeprotein und neuartiger MKL1-Interaktionspartner das Signal für die nukleäre Aktinpolymerisation in SRF-Aktivierung umsetzen kann. Dazu wurde eine Aktin-Mutante (S14C-Aktin), deren Expression die Aktinpolymerisation begünstigt, sowie eine konstitutiv aktive Version des Formins mDia, welches eine nukleäre Aktinpolymerisation auslöst, in Filamin A-exprimierenden und -defizienten Zellen eingesetzt. Es zeigte sich, dass Filamin A für die SRF-Aktivierung auf die nukleäre Aktinpolymerisation hin benötigt wird (Abb. 7). Unsere Befunde stützen somit das vor kurzem aufgekommene Konzept von nukleärem Aktin, aktin-bindenden Proteinen und nukleärer Aktinpolymerisation in der Transkription.

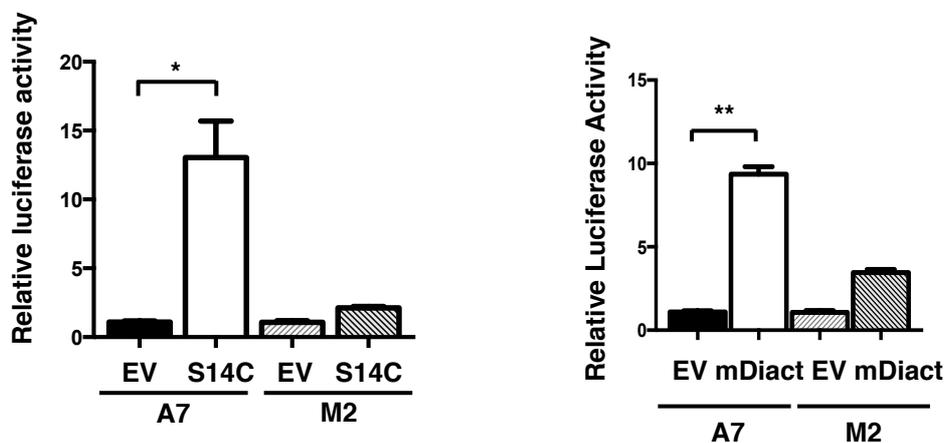


Abb. 7. Filamin A setzt das Signal für Aktinpolymerisation in SRF-Aktivierung um. Luziferaseassay auf 5xSRE Reportergenaktivität in FLNA-exprimierenden A7 oder FLNA-defizienten M2-Zellen nach ektopter Expression von S14C-Aktin oder einer konstitutiv aktiven Form von mDia (mDia, rechts). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). Entnommen aus: Kircher et al. Sci Signal. (2015).

Um die biologische Relevanz der Filamin A-MKL1-Interaktion zu evaluieren, wurden die motilen und invasiven Eigenschaften einer MKL1-Deletionsmutante untersucht, die nicht an Filamin A binden kann. Für die Untersuchung der Effekte auf die Zellmigration war es zunächst erforderlich, die Bindungsdomänen zwischen MKL1 und Filamin A zu kartieren. Durch *in vitro*-Mutagenese wurden verschiedene FLAG-getaggte MKL1-Deletionsvarianten (N300, C500, C630, Δ 301-380, Δ 381-506, Δ 301-342, Δ 321-342, Δ 301-310) generiert, in Filamin A-exprimierende Zellen transfiziert und Koimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Während Filamin A N300, C500 und C630-MKL1 und MKL1 Δ 381-506 mit vergleichbarer Effizienz koimmunopräzipitierte (Abb. 8), wurde MKL1 Δ 301-380, MKL1 Δ 301-342 und MKL1 Δ 301-310 nicht gebunden (Abb. 8E,G). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aminosäuren 301-310 in MKL1 eine kritische Rolle für die Interaktion mit Filamin A spielen. Die Filamin A-bindungsdefizienten MKL1-Mutanten wurden daraufhin Migrations- und Invasionsanalysen unterworfen. Im Vergleich zu wt-MKL1 wies die MKL1-Mutante, die durch Deletion der Aminosäuren 301-310 die Fähigkeit zur Bindung an FLNA verloren hat, stark reduzierte motile Merkmale auf (Abb. 8H). Zusammenfassend leiten sich aus unseren Daten zwei massgebliche Funktionen von Filamin A für die MKL-vermittelte Zellmigration ab:

- 1) Filamin A setzt die Informationen für die Aktin-Polymerisation in MKL/SRF-abhängige Genexpression um. Eine solche Kommunikation zwischen dem Zustand des Aktinzytoskeletts und dem Genom erlaubt der Zelle, die Expression von MKL/SRF-abhängigen zytoskeletalen Genen entsprechend anzupassen und ermöglicht so eine enge zeitliche Kopplung von Aktindynamik und Genexpression.
- 2) Filamin A fördert die Expression von MKL/SRF-Zielgenen. Diese kodieren für Proteine, die das Aktinzytoskelett modifizieren, damit die Zelle migrieren kann, und Aktin selbst, wie wir durch Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen nachweisen konnten (Muehlich et al., 2016). Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass die Gentranskription von Aktin selbst der essentielle regulatorische Schritt in der Kontrolle der Zellmigration ist (Salvany et al., 2014).

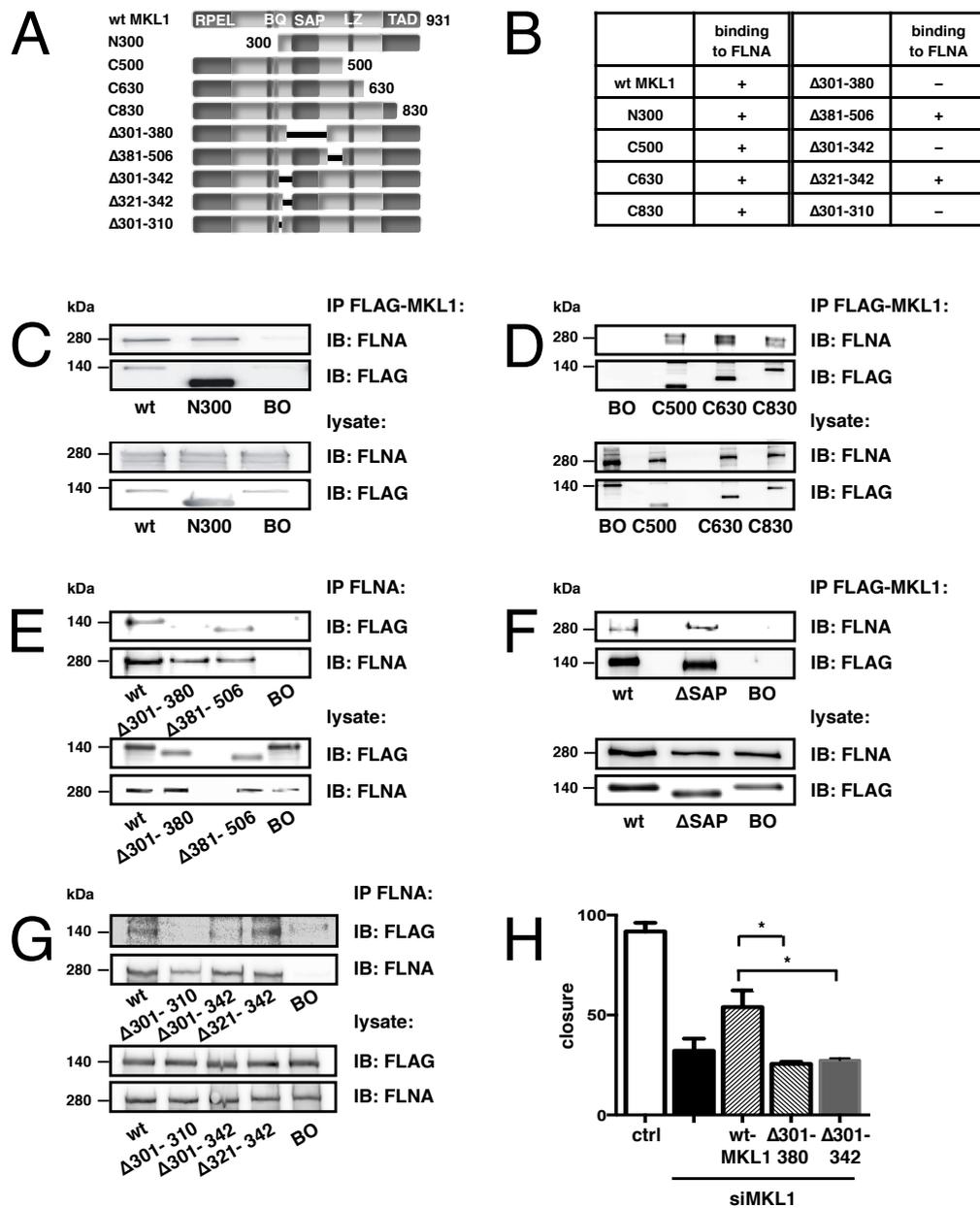


Abb. 8. Kartierung der Bindungsstelle für Filamin A im MKL1-Protein. (A) Schematische Abbildung der benutzten MKL1-Derivative. RPEL, konservierte N-terminale Domäne; B, basische Domäne; Q, glutamin-reiche Domäne; SAP, SAF-A/B-Acinus-PIAS Domäne; LZ, leucine zipper-ähnliche Domäne; TAD, Transaktivierungsdomäne. (B) Übersicht der MKL1-Derivative, die FLNA binden (+) oder nicht binden (-). (C-G) Immunopräzipitation und Western-Blot-Analyse in A7-Melanomzellen transfiziert mit FLAG-MKL1 oder FLAG-MKL1-Derivativen. BO, Sepharose Beads only Kontrolle. (H) Zellmigration in A7-Melanomzellen transfiziert mit Negativ-Kontroll siRNA, MKL1 siRNA und rekonstituiert mit FLAG-MKL1 oder den FLNA-nichtbindenden MKL1-Proteinvarianten. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (* $P < 0,05$). Entnommen aus: Kircher et al. Sci Signal. (2015).

Aberrante Zellmigration führt zu pathologischen Prozessen wie Tumorformation und Metastasierung. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob der Filamin A-MKL1-Komplex hier eine wichtige pathophysiologische Funktion spielt. Im Einklang mit dieser Hypothese ist Filamin A hochreguliert in hepatischen-, und Mamma-Karzinomen (Guedj et al., 2009; Tian et al., 2013), und MKL1 essentiell für die experimentelle Metastasierung (Medjkane et al., 2009) und die invasive Zellmigration (Somogyi and Rorth, 2004). Auch Befunde unserer eigenen Arbeitsgruppe, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, deuten auf eine wichtige Rolle von MKL1 in der Tumorigenese, insbesondere der Hepatokarzinogenese, hin.

2.2 MKL1 und -2 als neue pharmakologische Angriffspunkte in der Therapie des hepatozellulären Karzinoms

(Muehlich et al., 2012, 2013, Hampl, 2013;
Muehlich et al., 2007, Cicha, 2008, Giehl, 2015)

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt die zweithäufigste, krebserkrankungsbedingte Todesursache dar (Ferlay et al., 2015). Trotzdem sind die molekularen Mechanismen der Hepatokarzinogenese weitgehend unbekannt und bisher nur wenige molekulare Zielstrukturen zur therapeutischen Intervention identifiziert worden. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass ein Verlust des Tumorsuppressors Deleted in Liver Cancer 1 (DLC1) in ca. 50% der Leberkarzinome vorliegt. Die Identifizierung neuer, durch DLC1-Verlust initiiertes Signalwege könnte daher eine personalisierte Therapie des HCC zulassen.

Wir konnten erstmals nachweisen, dass der Verlust von DLC1 zur konstitutiv nukleären Lokalisation von MKL1 und -2 in HCC-Zellen, sowie HCC-Patientenproben führt (Abb. 9). Die Ursache für die nukleäre Lokalisation von MKL1 und -2 in DLC1-defizienten HCC-Zellen lag darin begründet, dass der RhoA/Aktin-Signalweg aktiviert und die Phosphorylierung von MKL1 unterbunden war, was in einer konstitutiven Aktivierung tumor-relevanter MKL1/2-Zielgene wie *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) und Integrin $\alpha 5$ und gesteigerter Zellproliferation resultierte (Abb. 10) (Cicha et al., 2008; Giehl et al., 2015; Muehlich et al., 2007; Muehlich et al., 2012).

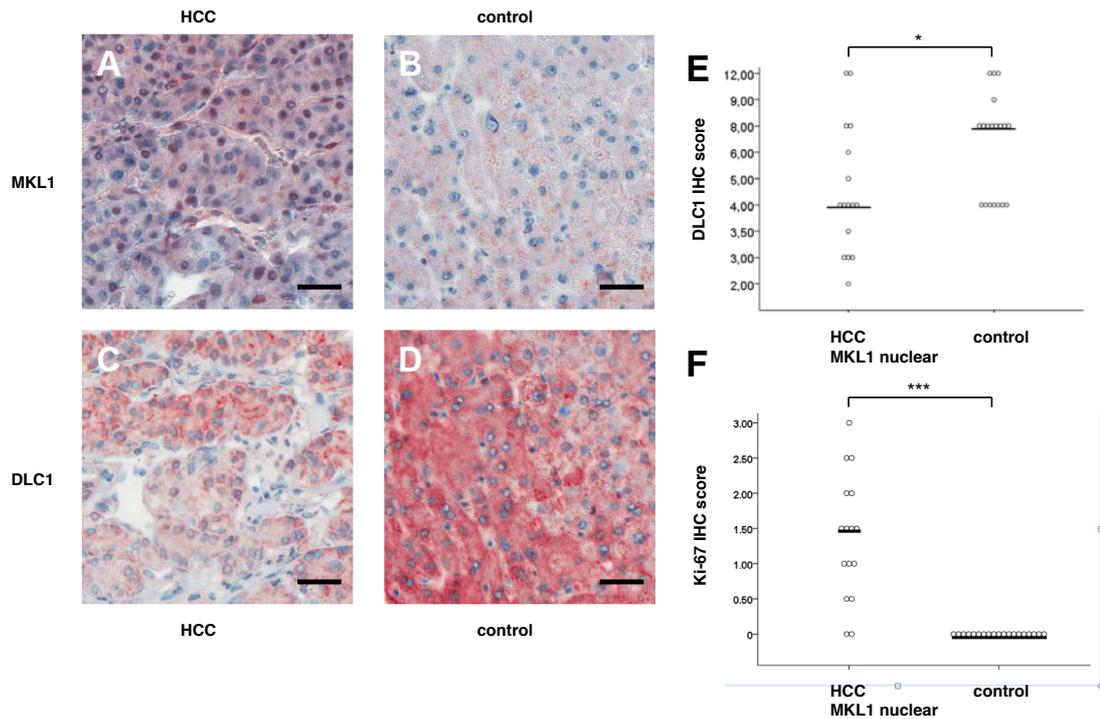


Abb. 9. Korrelation zwischen nukleärer Lokalisation von MKL1 und verminderter DLC1-Expression im HCC. (A) MKL1-Immunfärbung in HCC-Gewebe. (B) MKL1-Immunfärbung in normalem Lebergewebe. (C) DLC1-Immunfärbung im gleichen HCC-Specimen wie in (A). (D) DLC1-Immunfärbung im gleichen Kontroll-Lebergewebe wie in (B). (E) Streudiagramm für DLC1-Expression in HCCs mit nukleärer Akkumulation von MKL1, verglichen mit normalem Lebergewebe. Die horizontalen Linien zeigen den Median ($*P < 0,05$). (F) Streudiagramm für Ki-67-Expression in HCCs mit nukleärer Akkumulation von MKL1, verglichen mit normalem Lebergewebe. Die horizontalen Linien zeigen den Median ($***P < 0,001$). Entnommen aus: Muehlich et al. Oncogene (2012).

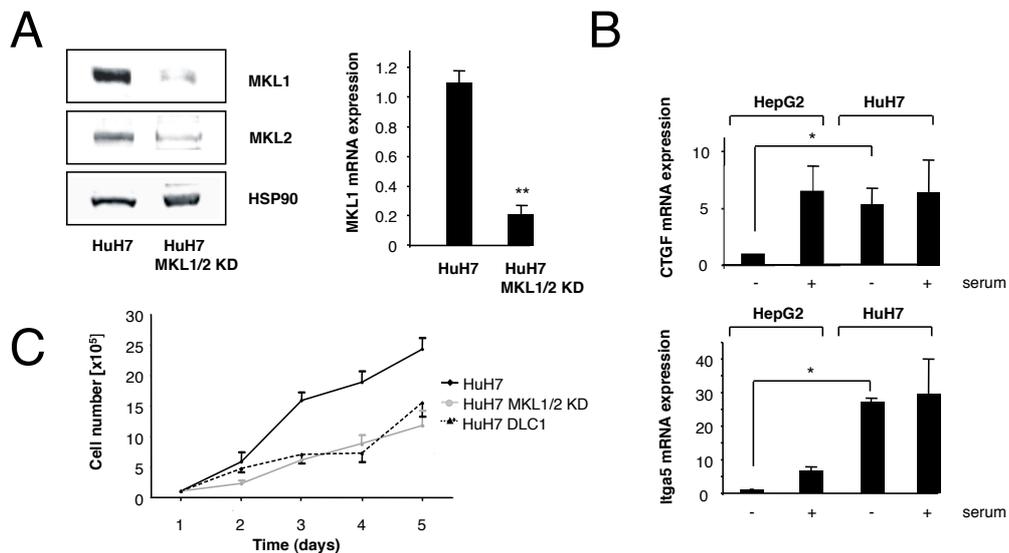


Abb. 10. Aktivierung von MKL/SRF-Zielgenen und gesteigerte Zellproliferation in DLC1-defizienten HCC-Zellen. (A) Knockdown-Effizienz von MKL1/2 in HuH7-MKL1/2 Knockdown (KD)-Zellen, ermittelt durch Immunoblotting und quantitative RT-PCR-Analyse. (B) Serum-deprivierte HepG2 und HuH7-Zellen wurden für 2 Stunden mit Serum behandelt. (C) HuH7-, HuH7-MKL1/2 KD- und mit DLC1 rekonstituierte HuH7-Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich gezählt. Entnommen aus Muehlich et al. Oncogene (2012).

Diese Befunde warfen die Fragestellung auf, ob die Depletion von MKL1 und -2 die Proliferation DLC1-defizienter HCC-Zellen supprimieren kann. Die Ausschaltung von MKL1 und -2 rief tatsächlich einen Wachstumsarrest in HuH7- und HuH6-Zellen hervor (Abb. 11), der mit charakteristischen Merkmalen onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) wie flacher Zellmorphologie, G1-Zellzyklusarrest, Aktivierung des Onkogens Ras und Anstieg spezifischer Tumorsuppressorproteine wie p16^{INK4a} und hypophosphoryliertem Retinoblastoma (Rb)-Protein, verbunden war (Abb. 12). Außerdem kam es zur Sekretion charakteristischer Proteine, was als Seneszenz-Assoziierter-Sekretorischer-Phänotyp (SASP) bezeichnet wird. Das gleiche Repertoire an OIS-Faktoren war nach DLC1-Rekonstitution nachweisbar, was die Vermutung nahelegt, dass DLC1 seine tumorsuppressiven Eigenschaften über eine Seneszenzinduktion ausübt. Da die Wiedereinführung von Tumorsuppressoren wie DLC1 jedoch therapeutisch nicht zugänglich ist, stellen MKL1 und -2 vielversprechende Angriffspunkte einer pharmakologischen Therapie dar.

Um die Wirksamkeit einer solchen Therapie zu evaluieren, verabreichten wir HCC-Xenograft-tragenden Nacktmäusen mit Polyethylenimin (PEI)-komplexierte MKL1/2-siRNAs. PEI-Nanopartikel stellen ein innovatives, effizientes Instrument zur systemischen Administration von siRNAs dar (Hobel and Aigner, 2010). In der Tat führte sowohl die Ausschaltung von MKL1 und -2, als auch von MKL1 alleine zur vollständigen Inhibition des Tumorwachstums (Abb. 12F). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Rückgang der HCC-Xenograft-Tumore mit onkogen-induzierter Seneszenz assoziiert war. Basierend auf diesen Befunden stellt die Seneszenzinduktion durch Antagonisierung von MKL1 und -2 einen vielversprechenden neuen therapeutischen Ansatz für die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms dar.

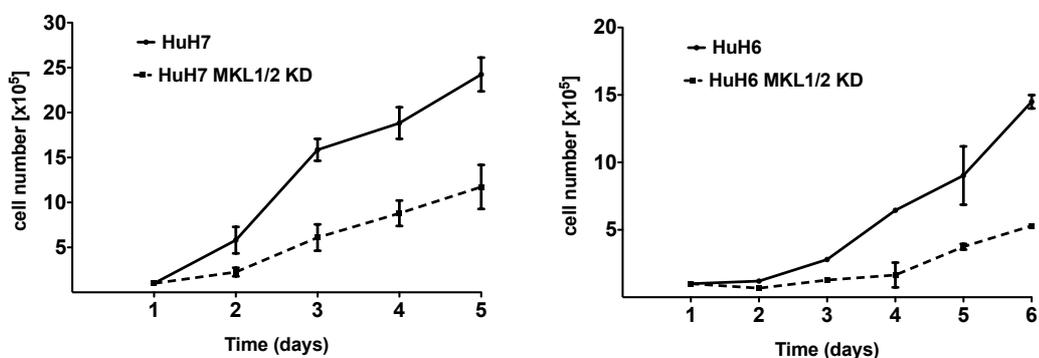


Abb. 11. Die Depletion von MKL1 und -2 ruft einen Proliferationsarrest hervor. Kontroll- und MKL1/2 shRNA-exprimierende hepatozelluläre Karzinomzellen (HuH7 und HuH6) wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen täglich gezählt.

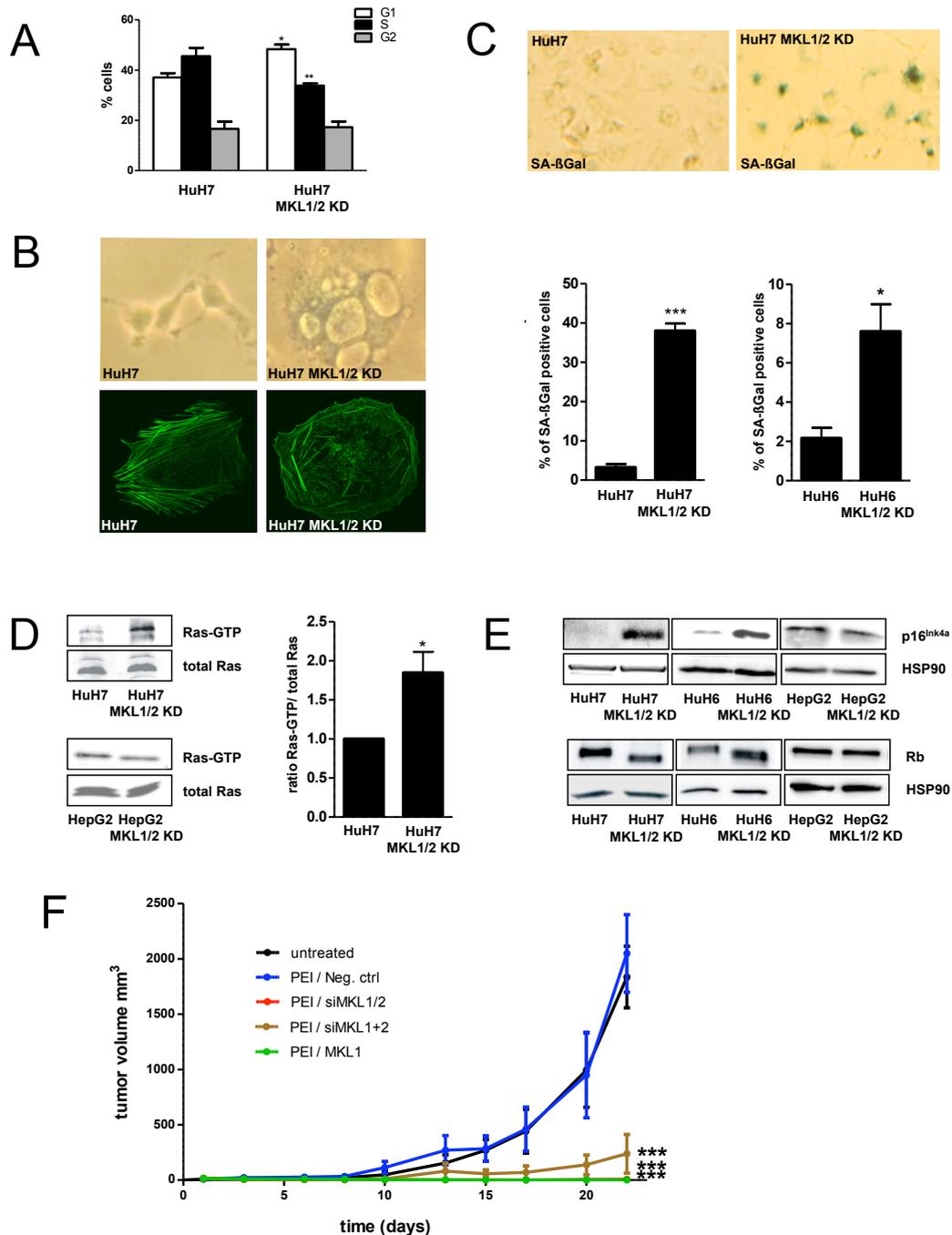


Abb. 12. Die Depletion von MKL1 und -2 führt zu onkogen-induzierter Seneszenz und zur Inhibition des HCC-Xenograft-Wachstums. (A) Zellzyklusprofil von HuH7-hepatozellulären Karzinomzellen, die mit Kontroll- bzw. MKL1/2 shRNA lentiviral transduziert wurden, ermittelt durch FACS-Analyse. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). (B) Zellmorphologie und Aktin-Zytoskelett von HuH7- und HuH7-MKL1/2 KD-Zellen, visualisiert mittels Immunfluoreszenz-Analyse unter Verwendung von Alexa Fluor 488-gekoppeltem Phalloidin. (C) Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung in HuH7- und HuH7-MKL1/2 KD-Zellen, quantifiziert und als Mittelwerte \pm SD dargestellt (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$). (D) HuH7- und HuH7-MKL1/2 KD-Zellen wurden mit einem Antikörper, der gegen aktives Ras gerichtet ist, immunpräzipitiert und mit einem anti-Ras Antikörper in der Immunoblotanalyse detektiert. Das relative Verhältnis von aktivem versus totalem Ras ist rechts graphisch dargestellt (* $P < 0,05$). (E) SDS-PAGE und Immunoblotanalyse von HuH7-, HuH6- und HepG2-Zellen mit anti- p16^{INK4a} und anti-Rb Antikörper. (F) Nach der Etablierung von s.c. HuH7-Xenografts wurden die athymischen Nacktmäuse 3 mal pro Woche durch systemische Injektion von 15 μ g PEI-komplexierten siRNAs behandelt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (*** $P < 0,001$). Entnommen aus: Hampl et al. *EMBO Mol Med.* (2013).

2.3 Charakterisierung von Myoferlin als neues MKL/SRF-Zielgen und Modulator von Wachstum und Seneszenz im HCC

(Hermanns et al., 2017, Muehlich et al., 2012, 13, Hampl et al., 2013)

Basierend auf unseren Vorarbeiten zur Bedeutung der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1 und -2 in der Hepatokarzinogenese gingen wir der Frage nach, über welche(s) Zielgen(e) die Depletion von MKL1 und -2 zur Seneszenzinduktion und Tumorregression führt. Mikroarray-Analysen in HuH7-hepatozellulären Karzinomzellen, in denen MKL1 und -2 mittels lentiviraler Transduktion ausgeschaltet wurden, ergaben eine MKL1/2-Abhängigkeit der Zielgene *Myoferlin*, *Microtubule-associated protein 1B* (MAP1B), *Transforming Growth Factor beta 1* (TGFB1), *Myosin heavy chain 9* (MYH9), *Calponin 1* (CNN1) and *Glioma pathogenesis-related protein 1* (GLIPR1). Mit Ausnahme von MYH9 war eine Beteiligung von MKL1 und -2 an der Regulation dieser Gene noch nicht bekannt (Medjkane et al., 2009). Von den neuidentifizierten MKL-Zielgenen war Myoferlin *in vivo* im HCC-Xenograft-Modell am stärksten herunterreguliert, und wies die höchste Ko-Expression mit MKL1 und -2 in HCC-Daten aus dem *Cancer Genome Atlas* auf. Der *Cancer Genome Atlas* ist ein umfassendes Verzeichnis der bei verschiedenen Krebsformen erfolgenden Veränderungen des menschlichen Genoms (Cerami et al., 2012). Myoferlin ist ein Mitglied der Proteinfamilie der Ferline, welche in eine Vielzahl von Membranprozessen wie Endozytose und vesikulärem Transport impliziert wurden, und spielt eine Schlüsselrolle im Mammakarzinom (Turtoi et al., 2013).

Wir konnten zeigen, dass Myoferlin stark im humanen HCC, sowie einem Maus-HCC-Modell überexprimiert wird (Abb. 13). In letzterem HCC-Modell führt die Expression von konstitutiv aktivem SRF (SRF-VP16) in Maus-Hepatozyten zu einer schnellen Hepatozyten-Expansion, der Bildung von prämaligen dysplastischen Knoten und schliesslich zur Progression zum lethalen HCC (Ohrnberger et al., 2015). Auf molekularer Ebene konnten wir eine Induktion von Myoferlin durch den G_{12/13}-Rho-Aktin-Signalweg und direkte Rekrutierung von MKL1 an eine CA₂G-Box an Position 304-363 des Myoferlin-Promoters nachweisen (Abb. 13C, D).

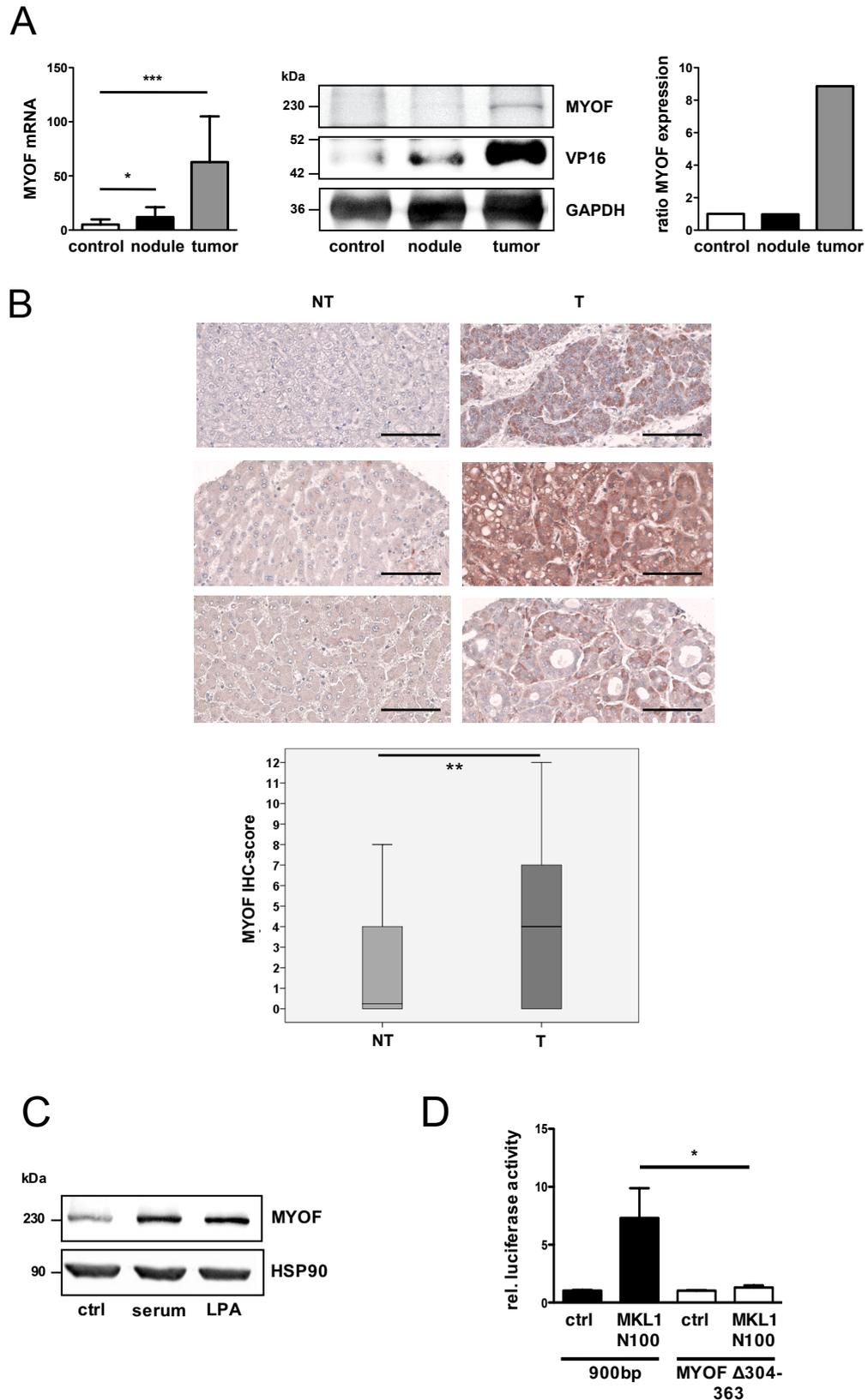


Abb. 13. Überexpression von Myoferlin in murinen und humanen HCCs. (A) Myoferlin mRNA- (links) und Protein-Expression in Kontroll-, premalignen Nodul- und Tumorgewebe von *SRF-VP16^{hHep}*-Mäusen, nachgewiesen durch qRT-PCR- und Western-Blot-Analyse. (B) Immunohistochemische Färbung von Myoferlin in repräsentativen Specimen von nicht-tumorösem- (NT) und HCC- (T; tumorös) Gewebe (Maßstab 100 μ M). Unten: Box-Diagramm des Medianwerts der Myoferlin-Färbung in 26 NT- und 138 T-Gewebsschnitten (** $P < 0,01$). (C) Induktion von Myoferlin nach Serum- und LPA-Stimulation,

ermittelt durch Immunoblotting. (D) Luziferaseassay auf Reporteragenaktivität des 900 bp Myoferlin-Promotors bzw. eines Myoferlin-Promotor-Deletionskonstruktes nach ektopter Expression einer konstitutiv aktiven Form von MKL1 (MKL1N100). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (* $P < 0,05$). Entnommen aus Hermanns et al., Oncogene (2017).

Im Umkehrschluß dazu verursachte die Myoferlin-Depletion einen Proliferationsarrest in HCC-Zellen (Abb. 14A). Wir konnten zeigen, dass die Wachstumshemmung nach Herunterregulation der Myoferlin-Expression durch eine Aktivierung des Ras-/MAPK-Signalweges und onkogen-induzierte Seneszenz verursacht wird (Abb. 14B). Um diese Ergebnisse weiter zu validieren, führten wir Rekonstitutionsexperimente durch. Die ektope Expression von Myoferlin war in der Lage, die Aktivierung von Ras im Zuge der MKL1/2-Depletion zu supprimieren (Abb. 14B). Der Effekt auf Ras wurde durch Myoferlin-vermittelte Modulation des aktiven EGF-Rezeptors ausgeübt. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass Myoferlin die Aktivität des EGF-Rezeptors (EGFR) in Mamma-Karzinomzellen kontrolliert, indem es dessen Degradation steuert (Turtoi et al., 2013). Im Einklang damit beobachteten wir eine EGFR-Aktivierung, nachgewiesen anhand einer Phosphorylierung des EGFR am Tyrosin 1173, nach Myoferlin- und MKL1/2-Depletion, die durch das Wiedereinbringen eines Myoferlin-Vektors rückgängig gemacht werden konnte.

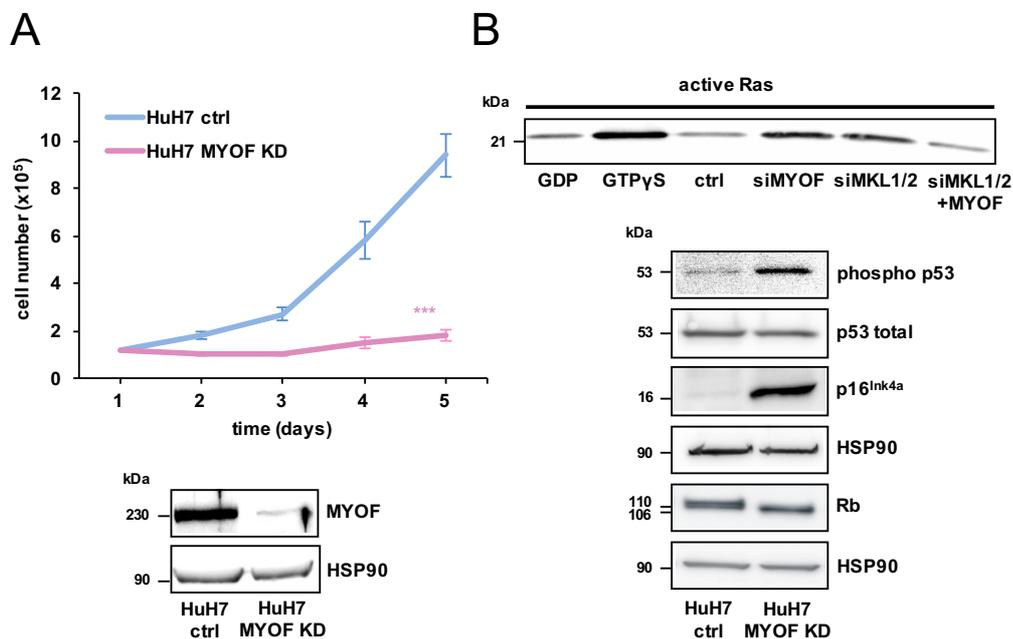


Abb. 14. Die Depletion von Myoferlin führt zum Proliferationsarrest und zur onkogen-induzierten Seneszenz (OIS). (A) Kontroll- und Myoferlin shRNA-exprimierende HuH7-Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich gezählt. Die Knockdown (KD)-Effizienz der Myoferlin-Expression ist unten mittels Immunoblotting dargestellt. (B) HuH7-, HuH7-Myoferlin KD- und HuH7-MKL1/2 KD-Zellen, die mit HA-Myoferlin rekonstituiert wurden, sowie eine Negativ- (GDP) und Positiv- (GTPγS) Kontrolle wurden mit einem Antikörper, der gegen aktives Ras gerichtet ist, immunpräzipitiert und einem Ras-Antikörper detektiert. Zusätzlich wurden HuH7- und HuH7-Myoferlin KD-Zellen Immunoblotanalysen mit OIS-spezifischen Antikörpern unterworfen (unten). Entnommen aus Hermanns et al., Oncogene (2017).

Diese in vitro Befunde stehen im Einklang mit Daten aus *ex vivo* Experimenten, nach denen aus SRF-VP16^{iHep}-Mäusen stammende Lebertumor (LT)-Zellen nach Myoferlin-Depletion eine Phosphorylierung des EGFR am Tyrosin 1173, eine Hochregulation von p16^{INK4a}, Hypophosphorylierung von Retinoblastoma (Rb)-Protein und gesteigerte TNFSF10-Expression aufwiesen (Abb. 15). Insgesamt zeigen diese Befunde, dass Myoferlin die Effekte von MKL1 und -2 auf die onkogen-induzierte Seneszenz vermitteln kann, indem es den Aktivierungszustand des EGFR und nachgeschalteter MAPK- und p16-/Rb-Signalwege moduliert.

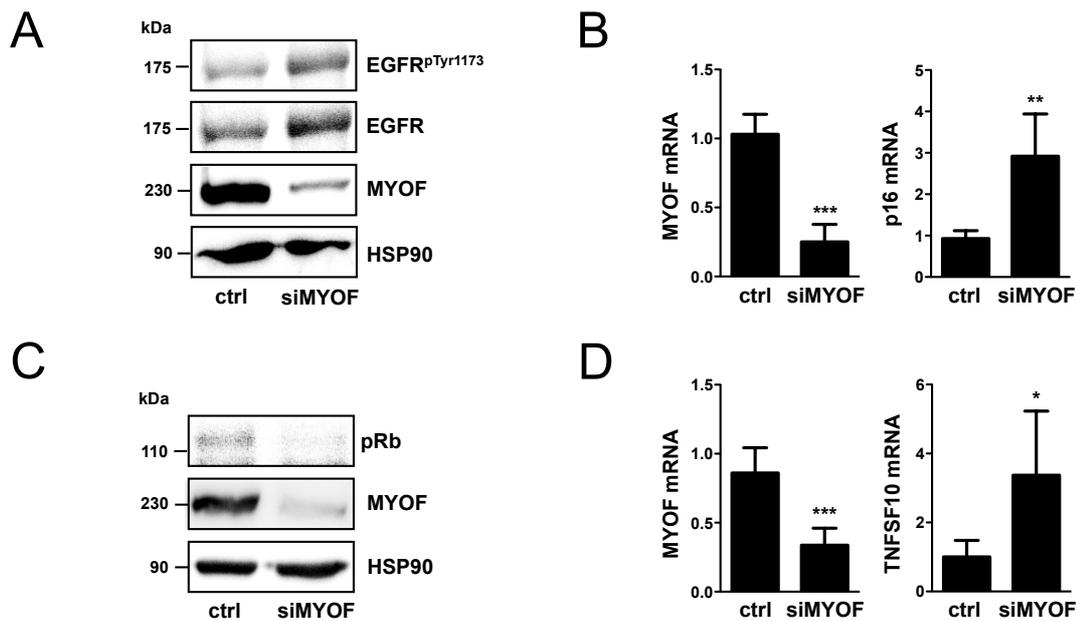


Abb. 15. Die Depletion von Myoferlin induziert onkogen-induzierte Seneszenz durch eine Phosphorylierung des EGFR am Tyrosin 1173 (A) Lysate von LT-Kontroll- und LT-Zellen mit Myoferlin siRNA aus SRF-VP16^{iHep}-Mäusen wurden einer Western-Blot-Analyse mit anti-EGFR^{pTyr1173}-, anti-EGFR-, anti-MYOF- und anti-HSP90-Antikörpern unterworfen. (B) Myoferlin- und p16-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR-Analyse ermittelt. (C) Immunoblotanalyse wie in (A) unter Verwendung von anti-pRb-, anti-MYOF- und anti-HSP90-Antikörpern. (D) Nachweis der Myoferlin- und TNFSF10 mRNA-Expression wie in (B). Die Daten (B und D) sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Entnommen aus Hermanns et al., Oncogene (2017).

3. Zusammenfassung und Ausblick

Eine Vielzahl biologischer Vorgänge wie Zellwachstum, Zellmigration, Differenzierung und Organisation des Zytoskeletts unterliegen der Kontrolle des ubiquitären Transkriptionsfaktors SRF (Serum Response Faktor). SRF aktiviert die Transkription von Genen, die aufgrund ihrer transkriptionellen Induktion innerhalb von Minuten nach Stimulation mit Serum- oder Wachstumsfaktoren auch „Immediate Early Genes“ (IEGs) genannt werden (Winkles, 1998). Es gibt zwei Signalwege zur Aktivierung von „Immediate Early Genes“. Der erste involviert die kleine GTPase Ras und der zweite die kleine GTPase RhoA (Hill et al., 1995; Johansen and Prywes, 1995). Beide Signalwege wurden bereits in die Tumorigenese impliziert. Gut charakterisiert ist die Veränderung von Ras-Signalwegen und der IEG-Expression in der Tumorigenese; ERK1/2-Inhibitoren befinden sich derzeit in der klinischen Testung (Kohno and Pouyssegur, 2006; Shaw and Saxton, 2003). Für eine Beteiligung von RhoA an der Tumorigenese fehlte jedoch ein direkter Beweis, obwohl eine RhoA-Überexpression in verschiedenen Tumoren nachgewiesen wurde (Gomez del Pulgar et al., 2005). Dieser Beweis wurde vor kurzem durch die Entdeckung des Tumorsuppressors „Deleted in Liver Cancer 1“ (DLC1) erbracht (Xue et al., 2008). DLC1 ist ein Rho-GTPase-aktivierendes Protein (Rho-GAP), welches die Hydrolyse von Rho-GTP in Rho-GDP und dadurch die Inaktivierung von Rho vorantreibt. Trotz des Vorkommens anderer Rho-GAPs wie p190Rho-GAP, DLC2, and DLC3 führt allein die Abwesenheit von DLC1 zur Aktivierung von RhoA. Heterozygote Deletion von DLC1 wurde bei 50% der Patienten mit Leber-, Brust-, Darm- und Lungenkrebs identifiziert (Xue et al., 2008). Die Aktivierung von RhoA wurde für die Tumorformation verantwortlich gemacht, der molekulare Mechanismus ist jedoch noch unbekannt (Xue et al., 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der SRF-Kofaktoren Megakaryoblastic Leukemia 1 und -2, die durch den RhoA-Signalweg aktiviert werden, für die Hepatokarzinogenese infolge DLC1-Verlusts zu erforschen. Insbesondere sollten neue Interaktionspartner von MKL1 identifiziert werden.

Wir konnten Filamin A als einen neuen Interaktionspartner von MKL1 identifizieren. Filamin A ist ein aktin-bindendes Protein, das die Zellform und –motilität determiniert, indem es Aktin-Filamente verknüpft. Wir konnten zeigen, dass die Bindung an Filamin A einen neuen Mechanismus für die MKL1-Regulation

zusätzlich zu der Bindung an G-Aktin darstellt. Während der MKL1-G-Aktin-Komplex repressiv wirkt (Miralles et al., 2003), erwies sich der neuentdeckte MKL1-Filamin A-Komplex als essentiell für die Aktivierung von MKL/SRF-Zielgenen und die Zellmigration (Abb. 16).

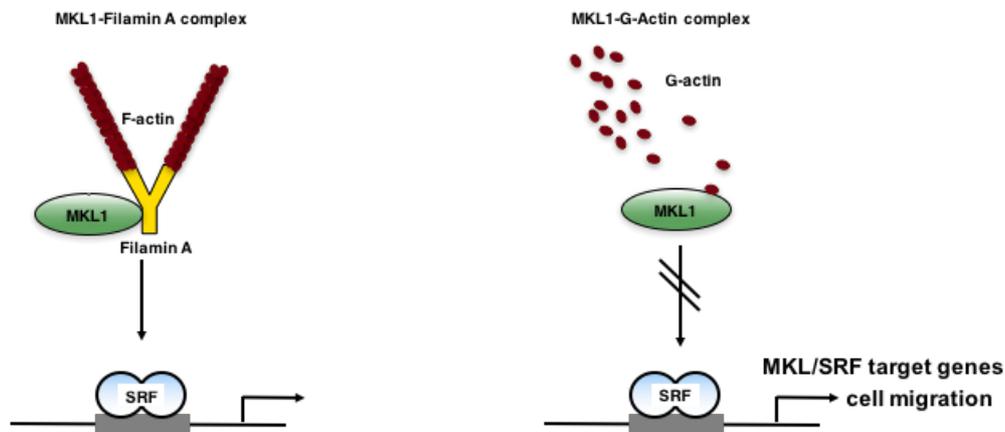


Abb. 16. Modell für den neuentdeckten MKL1-Filamin A-Komplex und den bekannten MKL1-G-Aktin-Komplex. MKL1 existiert in einem aktivierenden MKL1-Filamin A-Komplex oder einem reprimierenden MKL1-G-Aktin-Komplex, der die Expression von MKL/SRF-Zielgenen und in der Folge die Zellmigration unterdrückt. Entnommen aus: Kircher et al. *Sci Signal.* (2015).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob der Verlust von DLC1 sich auf die Expression MKL/SRF-abhängiger Zielgene auswirkt. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals zeigen, dass der Verlust von DLC1 zur konstitutiv nukleären Lokalisation von MKL1 und -2 in HCC-Zellen und HCC-Patientenproben führt. Dies resultiert in einer konstitutiven Aktivierung von MKL/SRF-Zielgenen und gesteigerter Zellproliferation und -migration. In einem therapeutischen HCC-Xenograft-Modell konnten wir darlegen, dass die Ausschaltung von MKL1 und -2 zur vollständigen Inhibition des HCC-Xenograft-Wachstums, bedingt durch onkogen-induzierte Seneszenz, führt. Basierend auf diesen Befunden postulieren wir, dass die Antagonisierung von MKL1 und -2 durch eine seneszenz-induzierende Strategie einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms darstellt.

Im dritten Teil der Arbeit wurde mittels einer Mikroarray-Analyse untersucht, welches Zielgen maßgeblich an der Seneszenzinduktion und Tumorregression nach Ausschaltung von MKL1 und -2 beteiligt ist. Wir konnten ein neuartiges MKL/SRF-Zielgen namens Myoferlin identifizieren. Myoferlin ist ein Mitglied der Proteinfamilie der Ferline, welche in eine Vielzahl von Membranprozessen wie Endozytose und

vesikulärem Transport impliziert wurden, an der Degradation von Wachstumsfaktor-Rezeptoren beteiligt sind und eine Schlüsselrolle im Mammakarzinom spielen (Turtoi et al., 2013). Wir konnten zeigen, dass Myoferlin in humanen und murinen HCCs und HCC-Patientenproben überexprimiert vorliegt. Myoferlin war zudem in der Lage, die Effekte von MKL1/2 auf die Seneszenzantwort zu vermitteln, indem es den Aktivitätszustand des EGFR moduliert (Abb. 17). In vivo konnten wir in einem HCC-Mausmodell, in dem die Expression von konstitutiv aktivem SRF-VP16 in Maus-Hepatozyten zur HCC-Progression führt, zeigen, dass die Ausschaltung von Myoferlin einen therapeutischen Ansatz durch Seneszenzinduktion darstellt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Informationen sind von besonderem Interesse, um MKL1 und -2 und Myoferlin als pharmakologische Zielstrukturen in DLC1-defizienten Tumoren zu etablieren.

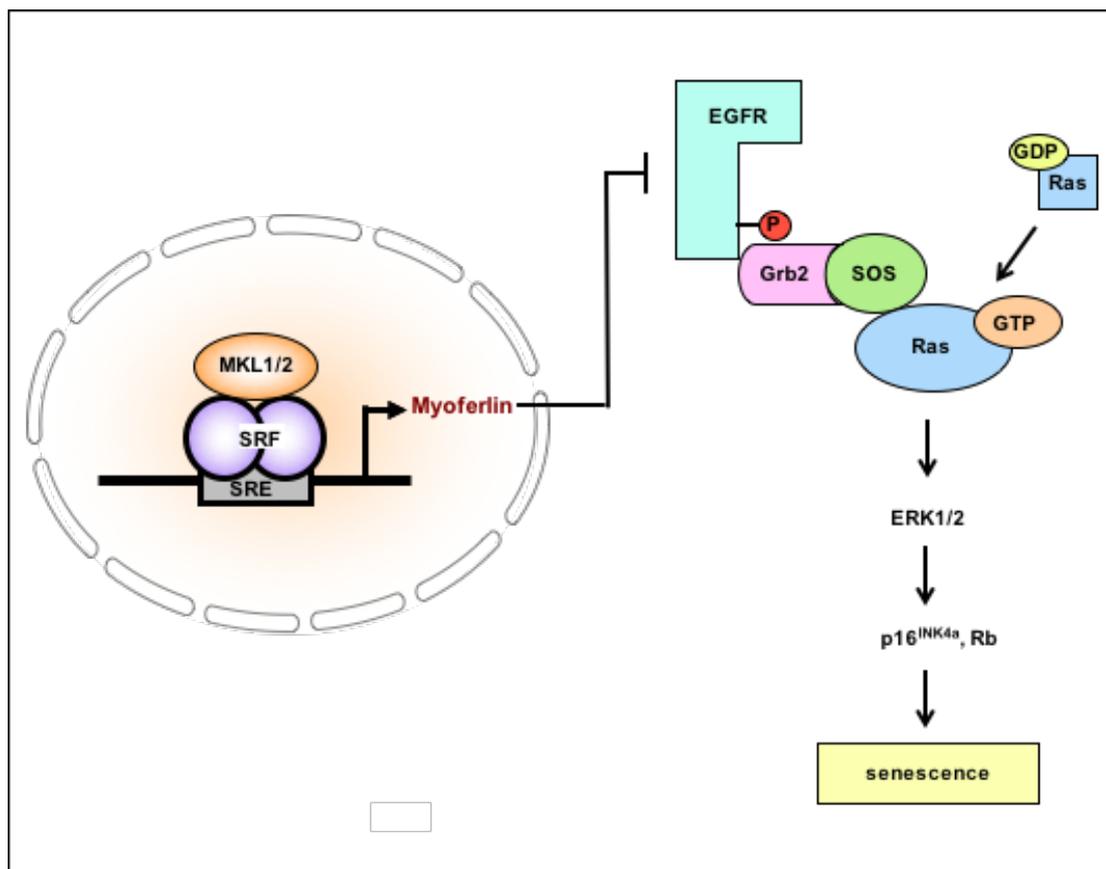


Abb. 17. Modell für die MKL1/2- und Myoferlin-assoziierte Seneszenzantwort. Depletion von MKL1/2 induziert zelluläre Seneszenz durch eine Aktivierung von Ras/MAPK- und p16^{INK4a}/pRb-Signalwegen. Die verringerte Expression des MKL1/2/SRF-Zielgens Myoferlin verursacht durch eine EGFR-Phosphorylierung am Tyrosin 1173 die Ras-Aktivierung. Entnommen aus: Hermanns et al. Oncogene (2017).

4. Literaturverzeichnis

Alberti, S., Krause, S.M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F.F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schutz, G., *et al.* (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6148-6153.

Alvarez, E., Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Latour, D.A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., and Davis, R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J Biol Chem* 266, 15277-15285.

Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschlager, M., Ruther, U., and Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J* 17, 6289-6299.

Baarlink, C., Wang, H., and Grosse, R. (2013). Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science* 340, 864-867.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., *et al.* (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2, 401-404.

Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., *et al.* (2006). New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol Cell Biol* 26, 6664-6674.

Ching, Y.P., Wong, C.M., Chan, S.F., Leung, T.H., Ng, D.C., Jin, D.Y., and Ng, I.O. (2003). Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 278, 10824-10830.

Cicha, I., Goppelt-Struebe, M., Muehlich, S., Yilmaz, A., Raaz, D., Daniel, W.G., and Garlich, C.D. (2008). Pharmacological inhibition of RhoA signaling prevents connective tissue growth factor induction in endothelial cells exposed to non-uniform shear stress. *Atherosclerosis* 196, 136-145.

Curran, T., Miller, A.D., Zokas, L., and Verma, I.M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* 36, 259-268.

Durkin, M.E., Avner, M.R., Huh, C.G., Yuan, B.Z., Thorgeirsson, S.S., and Popescu, N.C. (2005). DLC-1, a Rho GTPase-activating protein with tumor suppressor function, is essential for embryonic development. *FEBS Lett* 579, 1191-1196.

Durkin, M.E., Ullmannova, V., Guan, M., and Popescu, N.C. (2007). Deleted in liver cancer 3 (DLC-3), a novel Rho GTPase-activating protein, is downregulated in cancer and inhibits tumor cell growth. *Oncogene* 26, 4580-4589.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.

Giehl, K., Keller, C., Muehlich, S., and Goppelt-Struebe, M. (2015). Actin-mediated gene expression depends on RhoA and Rac1 signaling in proximal tubular epithelial cells. *PLoS One* 10, e0121589.

Gomez del Pulgar, T., Benitah, S.A., Valeron, P.F., Espina, C., and Lacal, J.C. (2005). Rho GTPase expression in tumorigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays* 27, 602-613.

Guedj, N., Zhan, Q., Perigny, M., Rautou, P.E., Degos, F., Belghiti, J., Farges, O., Bedossa, P., and Paradis, V. (2009). Comparative protein expression profiles of hilar and peripheral hepatic cholangiocarcinomas. *J Hepatol* 51, 93-101.

Hayashi, K., Murai, T., Oikawa, H., Masuda, T., Kimura, K., Muehlich, S., Prywes, R., and Morita, T. (2015). A novel inhibitory mechanism of MRTF-A/B on the ICAM-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep* 5, 10627.

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.

Hobel, S., and Aigner, A. (2010). Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo. *Methods Mol Biol* 623, 283-297.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

Johansen, F.E., and Prywes, R. (1995). Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1242, 1-10.

Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J.J., and Hetman, M. (2006). Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *J Neurosci* 26, 10020-10032.

Kircher, P., Hermanns, C., Nossek, M., Drexler, M.K., Grosse, R., Fischer, M., Sarikas, A., Penkava, J., Lewis, T., Prywes, R., *et al.* (2015). Filamin A interacts with the coactivator MKL1 to promote the activity of the transcription factor SRF and cell migration. *Sci Signal* 8, ra112.

Knoll, B., and Nordheim, A. (2009). Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci* 32, 432-442.

Kohno, M., and Pouyssegur, J. (2006). Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 38, 200-211.

Kokai, E., Beck, H., Weissbach, J., Arnold, F., Sinske, D., Sebert, U., Gaiselmann, G., Schmidt, V., Walther, P., Munch, J., *et al.* (2014). Analysis of nuclear actin by overexpression of wild-type and actin mutant proteins. *Histochem Cell Biol* 141, 123-135.

Latasa, M.U., Couton, D., Charvet, C., Lafanechere, A., Guidotti, J.E., Li, Z., Tuil, D., Daegelen, D., Mitchell, C., and Gilgenkrantz, H. (2007). Delayed liver regeneration in mice lacking liver serum response factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G996-G1001.

Leung, S., and Miyamoto, N.G. (1989). Point mutational analysis of the human c-fos serum response factor binding site. *Nucleic Acids Res* 17, 1177-1195.

Li, S., Czubyrt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1082-1087.

Liao, Y.C., Shih, Y.P., and Lo, S.H. (2008). Mutations in the focal adhesion targeting region of deleted in liver cancer-1 attenuate their expression and function. *Cancer Res* 68, 7718-7722.

Lundquist, M.R., Storaska, A.J., Liu, T.C., Larsen, S.D., Evans, T., Neubig, R.R., and Jaffrey, S.R. (2014). Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling. *Cell* 156, 563-576.

Ma, Z., Morris, S.W., Valentine, V., Li, M., Herbrick, J.A., Cui, X., Bouman, D., Li, Y., Mehta, P.K., Nizetic, D., *et al.* (2001). Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet* 28, 220-221.

Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E., and Treisman, R. (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat Cell Biol* 11, 257-268.

Miano, J.M., Long, X., and Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C70-81.

Miano, J.M., Ramanan, N., Georger, M.A., de Mesy Bentley, K.L., Emerson, R.L., Balza, R.O., Jr., Xiao, Q., Weiler, H., Ginty, D.D., and Misra, R.P. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17132-17137.

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.

Muehlich, S., Cicha, I., Garlichs, C.D., Krueger, B., Posern, G., and Goppelt-Struebe, M. (2007). Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1732-1738.

Muehlich, S., Hampl, V., Khalid, S., Singer, S., Frank, N., Breuhahn, K., Gudermann, T., and Prywes, R. (2012). The transcriptional coactivators megakaryoblastic leukemia 1/2 mediate the effects of loss of the tumor suppressor deleted in liver cancer 1. *Oncogene* 31, 3913-3923.

Muehlich, S., Hermanns, C., Meier, M.A., Kircher, P., and Gudermann, T. (2016). Unravelling a new mechanism linking actin polymerization and gene transcription. *Nucleus* 7, 121-125.

Muehlich, S., Schneider, N., Hinkmann, F., Garlichs, C.D., and Goppelt-Struebe, M. (2004). Induction of connective tissue growth factor (CTGF) in human endothelial cells by lysophosphatidic acid, sphingosine-1-phosphate, and platelets. *Atherosclerosis* 175, 261-268.

Muehlich, S., Wang, R., Lee, S.M., Lewis, T.C., Dai, C., and Prywes, R. (2008). Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol* 28, 6302-6313.

Niu, Z., Yu, W., Zhang, S.X., Barron, M., Belaguli, N.S., Schneider, M.D., Parmacek, M., Nordheim, A., and Schwartz, R.J. (2005). Conditional mutagenesis of the murine serum response factor gene blocks cardiogenesis and the transcription of downstream gene targets. *J Biol Chem* 280, 32531-32538.

Ohrnberger, S., Thavamani, A., Braeuning, A., Lipka, D.B., Kirilov, M., Geffers, R., Autenrieth, S.E., Romer, M., Zell, A., Bonin, M., *et al.* (2015). Dysregulated serum response factor triggers formation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 61, 979-989.

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.

Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkentin, J.D., Gary-Bobo, G., De Windt, L.J., Ludosky, M.A., Paulin, D., Daegelen, D., *et al.* (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation* 112, 2930-2939.

Pawlowski, R., Rajakyla, E.K., Vartiainen, M.K., and Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J* 29, 3448-3458.

Pipes, G.C., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 20, 1545-1556.

Qian, X., Li, G., Asmussen, H.K., Asnaghi, L., Vass, W.C., Braverman, R., Yamada, K.M., Popescu, N.C., Papageorge, A.G., and Lowy, D.R. (2007). Oncogenic inhibition by a deleted in liver cancer gene requires cooperation between tensin binding and Rho-specific GTPase-activating protein activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9012-9017.

Qiao, F., and Bowie, J.U. (2005). The many faces of SAM. *Sci STKE* 2005, re7.

Salvany, L., Muller, J., Guccione, E., and Rorth, P. (2014). The core and conserved role of MAL is homeostatic regulation of actin levels. *Genes Dev* 28, 1048-1053.

Shaw, P.E., and Saxton, J. (2003). Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1210-1226.

Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1995). The ETS-domain transcription factors Elk-1 and SAP-1 exhibit differential DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res* 23, 4698-4706.

Skarp, K.P., and Vartiainen, M.K. (2010). Actin on DNA-an ancient and dynamic relationship. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 487-495.

Somogyi, K., and Rorth, P. (2004). Evidence for tension-based regulation of *Drosophila* MAL and SRF during invasive cell migration. *Dev Cell* 7, 85-93.

Stern, S., Debre, E., Stritt, C., Berger, J., Posern, G., and Knoll, B. (2009). A nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-dependent gene transcription. *J Neurosci* 29, 4512-4518.

Tian, H.M., Liu, X.H., Han, W., Zhao, L.L., Yuan, B., and Yuan, C.J. (2013). Differential expression of filamin A and its clinical significance in breast cancer. *Oncol Lett* 6, 681-686.

Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46, 567-574.

Turtoi, A., Blomme, A., Bellahcene, A., Gilles, C., Hennequiere, V., Peixoto, P., Bianchi, E., Noel, A., De Pauw, E., Lifrange, E., *et al.* (2013). Myoferlin is a key regulator of EGFR activity in breast cancer. *Cancer Res* 73, 5438-5448.

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.

Wang, D., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg, P.A., and Olson, E.N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-862.

Winkles, J.A. (1998). Serum- and polypeptide growth factor-inducible gene expression in mouse fibroblasts. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58, 41-78.

Wong, C.M., Lee, J.M., Ching, Y.P., Jin, D.Y., and Ng, I.O. (2003). Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 63, 7646-7651.

Xue, W., Krasnitz, A., Lucito, R., Sordella, R., Vanaelst, L., Cordon-Cardo, C., Singer, S., Kuehnel, F., Wigler, M., Powers, S., *et al.* (2008). DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 22, 1439-1444.

Yuan, B.Z., Durkin, M.E., and Popescu, N.C. (2003). Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 140, 113-117.

5. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann danke ich sehr herzlich für die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Aufbau einer Nachwuchsgruppe am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Sein wissenschaftlicher Rat und seine Expertise waren mir eine große Hilfe und Quelle der Motivation und haben ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Margarete Goppelt-Strübe (Universität Erlangen-Nürnberg). Ihre Begeisterung für wissenschaftliche Fragen hat maßgeblich meine Entscheidung beeinflusst, eine akademische Laufbahn einzuschlagen. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Ron Prywes (Columbia University New York) für eine äußerst inspirierende, motivierende Postdoc-Zeit an der Columbia University New York.

Diese Arbeit wäre nicht ohne die tatkräftige Unterstützung meiner naturwissenschaftlichen Doktoranden Constanze Hermanns, Veronika Hampl und Philipp Kircher zustande gekommen. Ich danke Ihnen und meiner technischen Assistentin Clara-Mae Beer sehr herzlich für die engagierte Mitarbeit, und Melanie Meier und Sandra Voringner für die sehr gute Übernahme der Projekte. Mein Dank gilt auch den medizinischen Doktoranden Maximilian Nossek, Josef Penkava und Natalie Frank und den Masterstudenten Maria Katharina Drexler und Claudia Martin, die wichtige Impulse für die laufenden Projekte eingebracht haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Walther-Straub-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die gute Zusammenarbeit. Stellvertretend seien Dr. Andreas Breit, Dr. Susanna Zierler, Dr. Vladimir Chubanov und PD Dr. Harald Mückter genannt. Petra Eigner danke ich für die sehr gute tierpflegerische Arbeit. Für die administrative Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei Jutta Schreier, Monika Krämer und Josefine Lakatos bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitgliedern des Fachmentorsrats, Prof. Dr. Thomas Kirchner (Pathologisches Institut der LMU) und Prof. Dr. Frank Kolligs (HELIOS Klinikum Berlin-Buch) für die gute Betreuung während des Habilitationsverfahrens.

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Detlef und Edeltraud Mühlich. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

6. Curriculum vitae

Name	Dr.rer.nat. Susanne Mühlich
Personalien	Geburtsdatum: 06.02.1978 Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Berufserfahrung	<p>seit 2/2010 Gruppenleiterin am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann)</p> <p>3/2009-1/2010 Postdoktoranden-Ausbildung mit Prof. Reinhard Fässler am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried</p> <p>2/2006-2/2009 Postdoktoranden-Ausbildung mit Prof. Ron Prywes an der Columbia Universität New York, USA</p>
Ausbildung	<p>2002-05 Dissertation an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg unter Betreuung von Prof. Goppelt-Strübe</p> <p>2004 Gastwissenschaftler im Labor von Prof. Paul Gleeson an der Universität Melbourne, Australien</p> <p>2001-02 Pharmaziepraktikum bei Boehringer Ingelheim in der Abteilung Forschung und Entwicklung, Biberach</p> <p>1997-01 Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-Nürnberg</p>
Auszeichnungen	<p>2017 Ernannt zum "Full Faculty Member" der Fakultät "F1000" für Biologie</p> <p>2016 Wissenschaftspreis der Münchner Universitätsgesellschaft</p> <p>2008 Ernannt zum "Associate Faculty Member" der Fakultät "F1000"</p> <p>2006-08 Forschungsstipendium der DFG</p> <p>2004-05 Sprecher der Doktoranden des Graduiertenkollegs 750: "Vaskuläre Schäden an Herz und Niere" der DFG</p> <p>2002-05 Promotionsstipendium der DFG</p>

7. Verzeichnis eigener Publikationen

7.1 Originalarbeiten

1. Hermanns C, Hampf V, Holzer K, Aigner A, Penkava J, Frank N, Martin DE, Maier KC, Waldburger N, Roessler S, Margarete Goppelt-Struebe M, Akrap I, Thavamani A, Singer S, Nordheim A, Gudermann T, **Muehlich S**. The novel MKL target gene myoferlin modulates expansion and senescence of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* Jan 23. doi: 10.1038, 2017.
2. **Muehlich S**, Rehm M, Ebenau A, Goppelt-Struebe M. Synergistic induction of CTGF by cytochalasin D and TGF β -1 in primary human renal epithelial cells: Role of transcriptional regulators MKL1, YAP/TAZ and Smad2/3. *Cell Signal*. Oct 7; 29:31-40, 2016.
3. Kircher P, Hermanns C, Nossek M, Drexler KM, Chinchilla P, Grosse R, Fischer M, Sarikas A, Penkava J, Lewis T, Prywes R, Gudermann T, **Muehlich S**. Filamin A interacts with the coactivator MKL1 to promote the activity of the transcription factor SRF and cell migration. *Sci Signal* Nov 10;8:ra112. doi: 10.1126/scisignal.aad2959, 2015.
4. Hayashi K, Murai T, Oikawa H, Masuda T, Kimura K, **Muehlich S**, Prywes R and Morita T. A novel inhibitory mechanism of MRTF-A/B on the ICAM-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep* May 29;5:10627, 2015.
5. Giehl K, Keller C, **Muehlich S**, Goppelt-Struebe M. Actin-mediated gene expression depends on RhoA and Rac1 signaling in proximal tubular epithelial cells. *Plos One* Mar 27;10(3):e0121589, 2015.
6. Breit A, Besik V, Solinski HJ, **Muehlich S**, Glas E, Yarwood S, Gudermann T. Epidermal growth factor induced serine 727 phosphorylation of hypothalamic STAT-3 enhances thyroliberin and SOCS-3 expression independently from tyrosine 705 phosphorylation. *Mol Endocrinol*. Mar 29(3):445-59, 2015.
7. Kraenbring J, Penza TM, Gutmann J, **Muehlich S**, Zolk O, Wojnowsky L, Maas R, Engelhardt S, Sarikas A. Accuracy and completeness of drug information in Wikipedia: a comparison with standard textbooks of pharmacology. *Plos One* Sep 24;9(9):e106930, 2014.
8. Hartmann T, Xu X, Kronast M, **Muehlich S**, Meyer K, Zimmermann W, Hurwitz J, Pan ZQ, Engelhardt S, Sarikas A. Inhibition of Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 7 by simian virus 40 large T antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* Mar 4;111(9):3371-6, 2014.
9. Scheufele F, Wolf B, Kruse M, Hartmann T, Lempert J, **Muehlich S**, Pfeiffer AF, Field LJ, Charron MJ, Pan ZQ, Engelhardt S, Sarikas A. Evidence for a regulatory

role of Cullin-RING E3 ubiquitinligase 7 in insulin signaling. *Cell Signal.* Feb;26(2):233-9, 2014.

10. Hampl V, Martin C, Aigner A, Hoebel S, Singer S, Frank N, Sarikas A, Ebert O, Prywes R, Gudermann T, **Muehlich S**. Depletion of the transcriptional coactivators Megakaryoblastic Leukemia 1 and 2 abolishes hepatocellular carcinoma xenograft growth by inducing oncogene-induced senescence. *EMBO Molecular Medicine* Sep 5(9):1367-82, 2013.

11. **Muehlich S**, Hampl V, Khalid S, Singer S, Frank N, Breuhahn K, Gudermann T and Prywes R. The transcriptional coactivators megakaryoblastic leukemia 1/2 mediate the effects of loss of the tumor suppressor deleted in liver cancer 1. *Oncogene* Aug 30;31(35):3913-23, 2012.

12. **Muehlich S**, Wang R, Lee SM, Lewis TC, Dai C, Prywes R. Serum-induced phosphorylation of the SRF coactivator MKL1 by the ERK1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol.* Oct; 28 (20):6302-13, 2008.

13. Cicha I, Goppelt-Struebe M, **Muehlich S**, Yilmaz A, Raaz D, Daniel WG, Garlichs CD. Pharmacological inhibition of RhoA signaling prevents connective tissue growth factor induction in endothelial cells exposed to non-uniform shear stress. *Atherosclerosis* 196(1):136-45, 2008.

14. **Muehlich S**, Cicha I, Garlichs CD, Krueger B, Posern G, Goppelt-Struebe M. Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor (CTGF). *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(5):C1732-8, 2007.

15. **Muehlich S**, Schneider N, Hinkmann F, Garlichs CD, Goppelt-Strübe M. Induction of connective tissue growth factor (CTGF) in human endothelial cells by lysophosphatidic acid, sphingosine-1-phosphate, and platelets. *Atherosclerosis* 175:261-268, 2004.

7.2 Übersichtsarbeiten

1. **Muehlich S**, Hermanns C, Meier MA, Kircher P, Gudermann T. Unravelling a new mechanism linking actin polymerization and gene transcription. *Nucleus* 7 (2): 121-5, 2016

2. **Muehlich S**, Gudermann T. Pro-senescence therapy for hepatocellular carcinoma. *Aging* Sep; 5(9): 639-40, 2013.