

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

**Charakterisierung von
Myoferlin
als neues MKL/SRF-abhängiges Zielgen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef C. Penkava
aus Bonn

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Mitberichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Philipp Korber PD Dr. med. Klaus Metzeler
Mitbetreuung	
durch die promovierte Betreuerin:	Prof. Dr. rer. nat. Susanne Mühlich
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	07.11.2019

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung von Myoferlin als neues MKL/SRF-abhängiges Zielgen“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 07. November 2019

Josef Penkava

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	9
1.1 Der Transkriptionsfaktor <i>Serum response factor</i> (SRF).....	9
1.1.1 Struktur und Funktion von SRF	9
1.1.2 Signalwege zur Aktivierung von SRF	11
1.1.2.1 Regulation der SRF-Aktivität durch <i>Ternary complex factors</i>	11
1.1.2.2 Regulation der SRF-Aktivität durch RhoA.....	12
1.1.3 Pathophysiologische Bedeutung von SRF	13
1.2 Die transkriptionellen Coaktivatoren MKL1 und MKL2.....	17
1.2.1 Myocardin	17
1.2.2 <i>Myocardin related transcription factors</i> : MKL1 und MKL2	18
1.2.2.1 Struktur von MKL1 und MKL2	18
1.2.2.2 Regulationsmechanismus zur Aktivierung von MKL1 und MKL2.....	19
1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung von MKL1 und MKL2.....	22
1.3 Filamin A als neuer Interaktionspartner von MKL1	23
1.3.1 Struktur der Filamine	23
1.3.2 Funktion der Filamine	25
1.3.3 Pathophysiologische Bedeutung von Filamin A.....	27
1.4 Der Tumorsuppressor <i>Deleted in Liver Cancer</i> (DLC1)	28
1.5 Myoferlin.....	31
1.6 Seneszenz.....	36
1.6.1 Replikative Seneszenz	37
1.6.2 Prämaturre Seneszenz	37
1.6.3 Gemeinsamkeiten und Charakteristika seneszenten Zellen	39
1.6.4 Biologische Bedeutung der Seneszenz <i>in vivo</i> und Implikationen für die Tumorgenese.....	41
1.6.5 MKL1/2-mediierter Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz	42
2 Zielsetzung der Arbeit	44
3 Material	45

3.1 Zellkultur.....	45
3.1.1 Zelllinien.....	45
3.1.2 Zellkulturmedien	46
3.1.3 Zellkulturmediumzusätze	46
3.2 Antikörper	47
3.2.1 Primäre Antikörper.....	47
3.2.2 Sekundäre Antikörper	48
3.3 Nukleinsäuren	49
3.3.1 Plasmide	49
3.3.2 siRNA.....	50
3.3.3 qRT-PCR-Primer	50
3.4 Antibiotika	51
3.5 Enzyme	52
3.6 Inhibitoren und Stimulantien.....	52
3.7 Bakterien und zugehörige Medien.....	53
3.8 Reaktions-Mischungen.....	53
3.9 Puffer und Lösungen	54
3.9.1 cDNA-Synthese und qRT-PCR.....	54
3.9.2 Transfektionsreagenzien	54
3.9.3 Proteinisolation und -aufreinigung	55
3.9.4 Immunpräzipitation	56
3.9.5 SDS-PAGE	57
3.9.6 Immunoblot	58
3.9.7 Wasch- und Verdünnungslösungen.....	59
3.9.8 Detektionslösungen	60
3.10 Gele.....	61
3.11 Chemikalien.....	62
3.12 Verbrauchsgegenstände	65
3.13 Technische Gerätschaften	66
3.14 Software und Datenbanken.....	68
4 Methoden	69
4.1 Zellkultur.....	69
4.1.1 Einfrieren von Zellen.....	69

4.1.2 Auftauen von Zellen.....	69
4.1.3 Kultivieren von Zellen	70
4.1.4 Hungern von Zellen	70
4.1.5 Serumstimulation	71
4.1.6 Behandlung mit chemischen Agenzien.....	71
4.1.7 Aussaat von Zellen	71
4.1.8 Proliferationsassay	72
4.1.9 Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase-Assay	72
4.2 Transfektionen.....	73
4.2.1 Transfektion mit Lipofectamine [®] RNAiMAX [™]	73
4.2.2 Transfektion mit Lipofectamine [®] 2000	74
4.2.3 Transfektion mit Calciumphosphat	75
4.3 Nukleinsäuren-Biochemie	75
4.3.1 RNA-Isolation.....	75
4.3.2 cDNA-Synthese	76
4.3.3 <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (qRT-PCR).....	77
4.3.4 Generierung von MKL1-Deletionskonstrukten.....	78
4.3.5 Transformation der MKL1-Deletionskonstrukte in kompetente Bakterien ..	79
4.3.6 Plasmid-Präparation	80
4.3.7 Luciferase Reporter-Assay	80
4.4 Protein-Biochemie	81
4.4.1 Proteinextraktion.....	81
4.4.2 Proteinaufreinigung und Proteinquantifizierung mittels Bradford-Assay....	81
4.4.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)....	82
4.4.4 Western-Blot	82
4.4.5 Detektion.....	83
4.4.6 Immunpräzipitation	84
4.5 Statistische Analysen	85
5 Ergebnisse.....	86
5.1 Charakterisierung von Myoferlin als MKL1/2- und SRF-abhängiges Zielgen... 86	
5.1.1 Induktion der Myoferlin-Expression nach Stimulation in Huh7-Zellen	86
5.1.2 Induktion der Myoferlin-Expression nach Stimulation in MDA-MB-468- Zellen	87

5.1.3 Induktion des Myoferlin-Promotors im Luciferase-Assay.....	88
5.1.4 Filamin A-Abhängigkeit der Myoferlin-Expression	89
5.1.4.1 Generierung eines MKL1-Deletionskonstrukts ohne FLNA- Bindefähigkeit.....	90
5.1.4.2 Einfluss eines FLNA-nicht-bindenden Deletionskonstrukts auf die Myoferlin-Expression.....	91
5.2 Biologische Effekte von Myoferlin und seiner Coaktivatoren MKL1/2	92
5.2.1 Proliferationshemmung nach MKL1/2-Depletion	92
5.2.2 Proliferationshemmung nach Myoferlin-Depletion	93
5.2.3 Einfluss der Myoferlin-Depletion auf den EGFR-Signalweg	94
5.2.3.1 Aktivierung von EGFR nach Myoferlin-Depletion.....	94
5.2.3.2 Aktivierung von ERK nach Myoferlin-Depletion	95
5.2.4 Seneszenz	96
5.2.4.1 Seneszenz nach MKL1/2-Knockdown	96
5.2.4.2 Seneszenz nach Myoferlin-Knockdown	98
6 Diskussion.....	99
6.1 Induktion der Myoferlin-Expression nach Stimulation mit SRF- und Aktin- interagierenden Substanzen	99
6.2 Genaktivierung am Myoferlin-Promotor durch SRF	101
6.3 Effekt von Filamin A auf die Myoferlin-Expression	102
6.4 Hemmung der Tumorzellproliferation nach MKL1/2-Depletion	103
6.5 Hemmung der Tumorzellproliferation nach Myoferlin-Depletion	105
6.6 Aktivierung des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion	106
6.7 Aktivierung von ERK1/2 nach Myoferlin-Depletion.....	109
6.8 Seneszenten Phänotyp nach MKL1/2-Depletion	111
6.9 Seneszenten Phänotyp nach Myoferlin-Depletion	112
6.10 Pharmakologisches Targeting von Myoferlin - eine Zukunftsperspektive	115
7 Zusammenfassung	118
8 Literaturverzeichnis.....	119
9 Abkürzungsverzeichnis.....	135
10 Abbildungsverzeichnis.....	140
11 Tabellenverzeichnis.....	141

12 Veröffentlichungen 143
13 Danksagung 144

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor *Serum response factor* (SRF)

1.1.1 Struktur und Funktion von SRF

Fundamentale biologische Prozesse unterliegen der Kontrolle von *Serum response factor* (SRF). Dieser ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor bindet an die DNA und reguliert Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen sowie die Organisation des Zytoskeletts und die Myogenese (1. Pipes, Creemers et al. 2006). Im Rahmen der Transkription, einem exakt kontrollierten Programm zur Proteinbiosynthese der Zelle, können Transkriptionsfaktoren als Vermittler zwischen extra- und intrazellulären Signalen angesehen werden, welche diese Signale in Veränderungen der Genexpression umsetzen. SRF wird als Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert und besteht als Protein aus 508 Aminosäuren (AS) mit einem molekularen Gesamtgewicht von 67 kDa. Eine Domäne von SRF, welche bei vielen verschiedenen Spezies gemeinsam und hoch konserviert vorhanden ist, wird als MADS-Box bezeichnet (2. Chai, Tarnawski 2002). Man ordnet daher SRF als Mitglied der MADS-Box-Domänen-enthaltenden Familie von Transkriptionsfaktoren ein; dieses Akronym steht für **M**cm1 und Arg80 in Hefen, **A**gamous und **D**eficiens in Pflanzen und **S**RF in Tieren (3. Miano, Long et al. 2007). Über die MADS-Box-Domäne bindet der Transkriptionsfaktor SRF an die DNA im Bereich des Promotors seiner jeweiligen Zielgene. Diese Bindung erfolgt in der Konformation eines Homodimers an eine spezifische Konsensussequenz, die als CArG-Box bezeichnet wird und als Kernmotiv die palindromische Basenabfolge CC(A/T)₆GG enthält (4. Minty, Kedes 1986, 5. Treisman 1986). Zielgene des *Serum response factor*, von denen nach heutigem Wissensstand über 200 bekannt sind, werden in verschiedenen Zellarten für entsprechend unterschiedliche biologische Funktionen und Prozesse exprimiert. Anteile von ihnen werden auch als *Immediate early genes* (IEG) bezeichnet, denn die transkriptionelle Induktion dieser Gene kann schon nach wenigen Minuten festgestellt werden (6. Miano 2015). Die Stimulation der IEG ist mittels Serum oder Wachstumsfaktoren möglich (7. Winkles 1998, 8.

Norman, Runswick et al. 1988). Da die Bindungsstärke eines Transkriptionsfaktors allein nur relativ schwach ist, erreicht SRF durch die Interaktion mit Cofaktoren, welche selbst nicht direkt an die DNA binden, sondern mit dem bereits gebundenen Transkriptionsfaktor assoziieren, eine verbesserte Bindungsfähigkeit an die DNA und dadurch zusätzlich eine höhere Zellspezifität (*1. Pipes, Creemers 2006, 9. Messenguy, Dubois 2003, 10. Spiegelman, Heinrich 2004*). Als Prototyp der Zielgene von SRF wurde durch Treisman und Kollegen das Onkogen c-Fos beschrieben, welches an Zellwachstum beteiligt ist und nur durch eine einzelne CArG-Box reguliert wird, die auch als *Serum response element* (SRE) bezeichnet wird (*5. Treisman 1986*). Ein SRE ist definiert als eine CArG-Box mit einer ETS-Bindungsseite, an welche TCF-Transkriptionsfaktoren (*Ternary complex factors*) assoziieren können (für nähere Erklärungen s.u.). SRF kann auch an eine CArG-Box ohne ETS binden. Aus Genomuntersuchungen ist bekannt, dass CArG-Boxen im Promotor der SRF-Zielgene überwiegend dupliziert vorliegen und auf diese Weise die Bindungsvoraussetzungen eines SRF und somit auch die Expression der entsprechenden Zielgene verstärken (*1. Pipes, Creemers 2006, 11. Sun, Chen et al. 2006*).



Abbildung 1: Schematische Darstellung von SRF mit MADS-Box.

1.1.2 Signalwege zur Aktivierung von SRF

1.1.2.1 Regulation der SRF-Aktivität durch *Ternary complex factors*

Mechanistisch gesehen kann SRF über zwei unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Zum einen geschieht dies über die Gruppe der *Ternary complex factors* (TCF). Diese transkriptionellen Koaktivatoren sind Proteine, denen eine ETS-Domäne gemeinsam ist und die ihrerseits nach extrazellulärer Stimulation mit Serum, Lysophosphatidsäure (LPA) oder Wachstumsfaktoren über G-Proteine vermittelt *via* Phosphorylierung durch MAP-Kinasen aktiviert werden, daraufhin mit ihrer ETS-Domäne die DNA spezifisch an einer Sequenz im Bereich des Promotors binden, welche als Kern die Sequenz GGA(A/T) beinhaltet und als EBS (*Ets binding sequence*) bezeichnet wird. Diese Sequenz ist in direkter Nachbarschaft einer CArG-Box lokalisiert und spielt für die Assoziation zu SRF eine wichtige Rolle. Hierbei entsteht ein ternärer Komplex, der sich aus den Komponenten TCF, SRF und der gebundenen DNA zusammensetzt. Zu den TCF gehören beispielsweise Elk-1, SAP-1 (SRF accessory Protein) und Net (Erp/Sap-2/Elk-3). Homolog zu Elk-1 (*ETS-like transcription factor 1*) ist p62, welches als erstes zusammen mit SRF am SRE von c-Fos identifiziert werden konnte (12. Poseern, Treisman 2006).

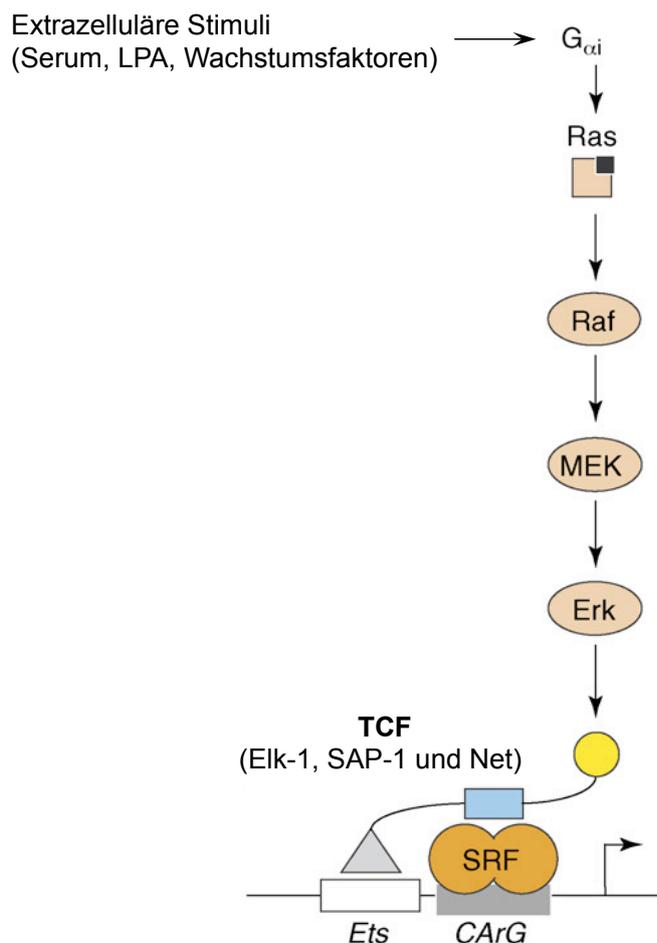


Abbildung 2: Bindung von TCF an SRF. Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade führt zur Phosphorylierung von TCF. Diese binden proximal der CARG-Box mittels ihrer ETS-Domäne, was zur Aktivierung der IEG-Transkription durch SRF führt; modifiziert nach Posern und Treisman, 2006.

1.1.2.2 Regulation der SRF-Aktivität durch RhoA

Der zweite Signalweg zur Aktivierung von SRF - ebenfalls durch Serumstimulation initiiert - führt dagegen initial zur Induktion von RhoA und hiervon ausgehend zu entscheidenden Veränderungen im Aktinzytoskelett. Dieser TCF-unabhängige Mechanismus wurde erstmals nachgewiesen, indem durch eine Mutation der TCF-Bindungsstelle im c-Fos-Promotor die Inaktivierung des TCF-vermittelten Signalweges sichergestellt werden konnte (13. Hill, Treisman 1995, 14. Johansen, Prywes 1994). Der Befund führte zur Konklusion, dass es mindestens zwei verschiedene und voneinander unabhängige Signalwege geben muss, welche zur Aktivierung von SRF beitragen. Bei Hemmung von RhoA wird entsprechend dieser Weg der SRF-Aktivierung blockiert und damit konsistent führt eine Überexpression

von aktivem RhoA zu einer signifikanten transkriptionellen SRF-Antwort. SRF wird somit in seiner transkriptionellen Aktivität durch diesen zusätzlichen Signaltransduktionsweg reguliert; hierbei sind sog. kleine G-Proteine aus der Rho-Familie der GTPasen involviert (siehe Abbildung 5). Durch die Rolle von RhoA ist die mechanistische Verbindung zum Aktinmetabolismus als Signalgeber für die SRF-Aktivität in den Vordergrund getreten.

1.1.3 Pathophysiologische Bedeutung von SRF

Aus *in vitro*-Experimenten in Zellkultur ist bekannt, dass dominant-negative SRF-Mutanten oder auch die Behandlung von Zellen mit gegen SRF gerichteter siRNA zeigen konnten, welche bedeutende Rolle die Expression von SRF für das Zellwachstum und die Entwicklung der Skelettmuskulatur inne hat. Bei frühen, embryonalen Skelettmuskelvorläufern konnte ein perinataler Tod aufgrund von Muskelfaserverdünnung und einer damit assoziierten Orthopnoe nachgewiesen werden. Der Verlust von SRF in der Skelettmuskulatur von neugeborenen Mäusen führte zum Verlust der Muskelfaseranordnung und zu einem Abfall der Expression der für Kontraktion notwendigen Gene (15. Li, Czubryt et al. 2005). Deletion von SRF in adultem Skelettmuskel erzeugte muskuläre Hypo- bzw. Atrophie (15. Li, Czubryt 2005, 16. Miano 2010). Die humane Sarkopenie, die ebenfalls mit Skelettmuskelverlust einhergeht, ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters; experimentelle Befunde sprechen für einen altersabhängigen Abfall der SRF-Expression bei Menschen und Mäusen (17. Lahoute, Sotiropoulos et al. 2008). Darüber hinaus war auch ein Kofaktor von SRF, nämlich MKL1 (s. u.) in gealtertem Skelettmuskel reduziert. Daraus wird die Bedeutung eines physiologischen SRF-Spiegels für die Funktion des Skelettmuskels evident. Zudem konnte in Experimenten gezeigt werden, dass SRF-Depletion *in vivo* zum einen in koronaren glatten Muskelzellen in Hühnerembryonen, zum anderen in muriner Skelett- und Herzmuskulatur zu einer Differenzierungsstörung führt (18. Soulez, Rouviere et al. 1996, 19. Kaplan-Albuquerque, Van Putten et al. 2005). Homozygote SRF-null-Mutanten verursachten bei Mäusen Letalität im Stadium der Gastrulation, da hierbei

Gene beteiligt waren, die für Migration und Adhäsion benötigt werden. Dieser Befund korreliert mit Verlust der Expression von Stressfasern, wie zum Beispiel Vinculin, Talin und einigen Aktinisoformen, welche direkt durch SRF gesteuert werden (20. *Arsenian, Weinhold et al. 1998, 21. Schratt, Philippar et al. 2002*). Bei Mäusen mit herzmuskelspezifischer Inaktivierung von SRF zeigte sich schon früh eine Malformation der Ventrikel mit kardialer Dilatation und Tod des Embryos; die Kardiomyozyten enthielten eine fehlerhafte Sarkomerbildung, welche zu Herzversagen führte (16. *Miano 2010, 22. Parlakian, Tuil et al. 2004*). Hemmung von SRF in Endothelzellen führte im murinen Modell zu letalen Aneurysmaformationen und Hämorrhagien des Gehirns sowie der Extremitäten. Die nähere histologische und molekularbiologische Untersuchung der Endothelzellen ließ eine verminderte Expression von E-Cadherinen in Erscheinung treten (16. *Miano 2010, 23. Franco, Mericskay et al. 2008, 24. Holtz, Misra 2008*). Aber auch die physiologische Bedeutung von SRF für Haut-, Leber- und ZNS-Entwicklung konnte in gewebespezifischen Knockout-Studien verdeutlicht werden (25. *Verdoni, Ikeda et al. 2010, 26. Sun, Yan et al. 2009, 27. Alberti, Krause et al. 2005*). So führte die weitere organbezogene Untersuchung des Einflusses von SRF zu den folgenden Erkenntnissen: Hepatozytenspezifische Deletion von SRF bei Mäusen zeigte in Studien sowohl eine verminderte Regenerationskapazität der Lebern als auch einen letalen Phänotyp. Desweiteren war die Expression von Genen des Cytochrom-P450-Systems erniedrigt (16. *Miano 2010*). Ein SRF-Verlust scheint hingegen keinen Einfluss auf die endokrine Funktion der Lagerhans'schen Inseln des Pankreas zu haben. Das exokrine Pankreas von SRF-mutierten Mäusen zeigt eine Behinderung der Proliferation der azinären Zellen und eine inflammatorische Reaktion, mit erhöhten NF- κ B-Leveln und Fibrose. Serum-Lipase und Amylase waren erhöht; nach ca. 11 Monaten ist die Funktion des exokrinen Pankreas vollständig defizient und das Organ wird mit Fettgewebe ersetzt (16. *Miano 2010, 28. Miralles, Hebrard et al. 2006*). Verlust von SRF im Gastrointestinaltrakt modelliert die humane chronische intestinale Pseudoobstruktion, der eine eingeschränkte Peristaltik auf Grund von gestörter glattmuskulärer Kontraktilität zugrunde liegt; Gene für Kontraktilität waren in ihrer Expression vermindert und die Zytoarchitektur glatter Muskelzellen war mit einem erniedrigten Verhältnis von F-Aktin zu G-Aktin gestört. Die Mäuse starben an Kachexie und Dehydratation nach ca. 3 Wochen, ab dem Zeitpunkt der SRF-Depletion gerechnet (16. *Miano 2010*). In einem Mausmodell der Lungenfibrose, in

welchem aktivierte Myofibroblasten pathogenetisch involviert sind, stiegen die Level von SRF an und aktivierten Gene, die wahrscheinlich für den fibrotischen Phänotyp bedeutsam sind (16. Miano 2010, 29. Yang, Zhe et al. 2003). SRF-Deletion in Keratinozyten der Epidermis führte zu Letalität des Mausembryo *in utero* mit starker Blasenbildung, Ödem und Hämorrhagie der Haut (16. Miano 2010). Darüber hinaus konnte physiologisch ein hohes Niveau von SRF in humaner Haut nachgewiesen werden, dagegen lag in hyperproliferativer Epidermis, verletzter sowie psoriatischer Haut eine herunterregulierte SRF-Expression vor. Postnataler Verlust von SRF in murinen Keratinozyten führte im weiteren Verlauf zur Entwicklung psoriatoider Hautläsionen mit konkomitanter Inflammationsreaktion und Hyperproliferation, abnormer Differenzierung der Keratinozyten sowie einer Störung des Zytoskeletts. Weitergehende Untersuchungen enthüllten eine signifikant reduzierte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und Verlust des Zusammenhalts der Epithelschichtung. Diese und die zytoskelettalen Anomalien konnten als direkte Folge des SRF-Verlusts bestätigt werden. Die Inflammationsreaktion und als deren Konsequenz die Hyperproliferation waren hingegen wahrscheinlich indirekte Effekte. Diese *in vivo*-Befunde sprechen für eine bedeutende Rolle von SRF bei hyperproliferativen dermatologischen Erkrankungen, wie z. B. der Psoriasis (30. Koegel, von Tobel et al. 2009). Expression von SRF wurde auch in einer Vielzahl von ZNS-Neuronen beobachtet, etwa während der frühen postnatalen Entwicklung, v. a. im Gyrus dentatus des Hippocampus und im Cortex (16. Miano 2010, 31. Stringer, Belaguli et al. 2002). *In vitro* zeigten Neuronenvorläufer eine gestörte Migrationsfähigkeit und damit konsistent *in vivo* eine Akkumulation in der subventrikulären Zone mit einem hypoplastischen Hippocampus und einem pathologischen Essverhalten der Tiere, die postnatal innerhalb weniger Wochen verstarben (27. Alberti, Krause 2005). Darüber hinaus zeigten SRF-null-Neurone in Kultur eine Abnahme der Axonlänge bzw. des Neuritwachstums und der Aktindynamik (32. Knoll, Kretz et al. 2006). Microarray-Analysen SRF-deletierter Hippocampi brachten eine reduzierte Expression vieler Gene hervor, u. a. solcher, die mit Oligodendrozyten assoziiert und für die Myelinisierung essentiell sind. Interessanterweise ist SRF in Proben glatter Muskelzellen cerebraler Blutgefäße, die von Alzheimerpatienten entnommen wurden, erhöht. Dieser erhöhte SRF-Spiegel vermag die zerebrale Hypoperfusion, die Teil der Alzheimer-Pathogenese ist, zu beeinflussen, denn die Reduktion von SRF mittels shRNA konnte in Versuchstieren die kontraktile Aktivität und cerebrale

Hypoperfusion teilweise wieder normalisieren (33. *Chow, Bell et al. 2007*). Zudem scheint die Erhöhung von SRF die physiologische Entfernung von Amyloid- β -Peptiden zu behindern. Dies geschieht durch direkte Aktivierung des *Sterol regulatory element binding protein-2* (SREBP 2), welches das *Low density lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP), einen Schlüssel-Rezeptor zur Entfernung von Amyloid- β , herunterreguliert (34. *Bell, Deane et al. 2009*). Daher hat sich SRF zu einem potentiellen, experimentellen Angriffspunkt in der Therapie dieser neurodegenerativen Erkrankung entwickelt (16. *Miano 2010*). Experimente in murinen Hinterhorn ganglien haben gezeigt, dass es zu einer erhöhten embryonalen Letalität bei SRF-Mutanten kommt, aufgrund eines Gefäßbildungsdefekts. Die Nervenzellen hatten eine normale Lebensfähigkeit, jedoch eine Störung der axonalen Verzweigungen und gezielten Innervation von Strukturen (35. *Wickramasinghe, Alvania et al. 2008*). Die Rolle von SRF für die Regenerierung von Strukturen nach spinalem oder peripherenervalem Trauma muss weiter untersucht werden. Die cerebelläre Bedeutung von SRF ist nicht ausreichend bekannt (16. *Miano 2010*). Das erste Zielgen von SRF wurde, wie weiter oben bereits erwähnt, mit c-Fos, einem bedeutenden Gen für Zellproliferation, beschrieben. Dies deutet auf die Funktion bei Wachstumsprozessen, im speziellen Fall einer unregulierten Hyperproliferation auf den Zusammenhang mit der Tumorentstehung, hin. Untersuchungen konnten eine Assoziation zwischen verschiedenen Krebsarten und erhöhten SRF-Spiegeln enthüllen (36. *Qiao, Liu et al. 2016*, 37. *Ohrnberger, Thavamani et al. 2015*, 38. *Prencipe, Fabre et al. 2018*). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CARG-Boxen strahlenempfindlich sind und dadurch zusätzlich eine potentielle radioonkologisch-gentherapeutische Herangehensweise ermöglichen könnten. Vor Kurzem wurde belegt, dass die SRF-Überexpression in Magenkarzinomzellen die Metastasierung ermöglicht und auch eine Bedeutung in der Hepatokarzinogenese besitzt (36. *Qiao, Liu 2016*, 37. *Ohrnberger, Thavamani 2015*).

1.2 Die transkriptionellen Coaktivatoren MKL1 und MKL2

1.2.1 Myocardin

Wie schon eingangs beschrieben hängt die transkriptionelle Potenz aber auch die Spezifität eines Transkriptionsfaktors wesentlich von seiner Fähigkeit Cofaktoren respektive Coaktivatoren an sich zu binden ab. Zu SRF, welcher selbst relativ gewebeunspezifisch existent ist, gehörig konnte der transkriptionelle Cofaktor Myocardin identifiziert werden. Dieser wird zunächst im embryonalen Herzmuskelgewebe und im glatten Muskelgewebe sowie später postpartal im Myokard exprimiert (39. Wang, Chang et al. 2001, 40. Wang, Li et al. 2002, 41. Miralles, Posern et al. 2003). Myocardin gehört zur Gruppe der SAP-Domänenenthaltenden Familie von Proteinen. Die SAP-Domäne ist 35 AS lang, wobei das Akronym SAP für **SAF-A/SAF-B** (*Scaffold attachment factors*, welche *Scaffold attachment regions*, SAR, erkennen), **Acinus** (ein durch Caspase-3 aktiviertes Protein, welches zur Chromatinkondensation während der Apoptose benötigt wird) und **PIAS** (einen Inhibitor der STAT-3-vermittelten Genaktivierung) steht. Diese Proteine regulieren verschiedene Prozesse im Rahmen der Chromatinremodellierung und Transkription (42. Aravind, Koonin 2000). Myocardin ist in der Lage CArG-Box-Reportergene zu aktivieren und stabil SRF zu binden (39. Wang, Chang 2001). Als potenter Koaktivator agiert Myocardin mit SRF in einem ternären Komplex. Dies konnte durch Beobachtung der Expression von dominant-negativen Myocardin-Mutanten in *Xenopus laevis*-Embryos belegt werden, welche zwar mit SRF assoziieren aber die Transkription nicht aktivieren können (39. Wang, Chang 2001).

1.2.2 Myocardin related transcription factors: MKL1 und MKL2

1.2.2.1 Struktur von MKL1 und MKL2

Zusätzlich zu Myocardin konnten zwei weitere Analoga identifiziert werden, die als *Myocardin related transcription factors* (MRTF) bezeichnet bzw. als MRTF-A und MRTF-B abgekürzt werden. Synonym werden sie in der Literatur auch als MAL/MKL1/BSAC und MKL2/MAL16 genannt. In vorliegender Arbeit wird die Nomenklatur *Megakaryoblastic leukemia 1* (MKL1) und *Megakaryoblastic leukemia 2* (MKL2) verwendet. Im Gegensatz zu Myocardin sind MKL1 und MKL2 ubiquitär in einem großen Gewebespektrum vorhanden, wie zum Beispiel in embryonalem Gewebe inklusive embryonaler Stammzellen aber auch in verschiedenen adulten Gewebearten (40. Wang, Li 2002, 43. Du, Chen et al. 2004).

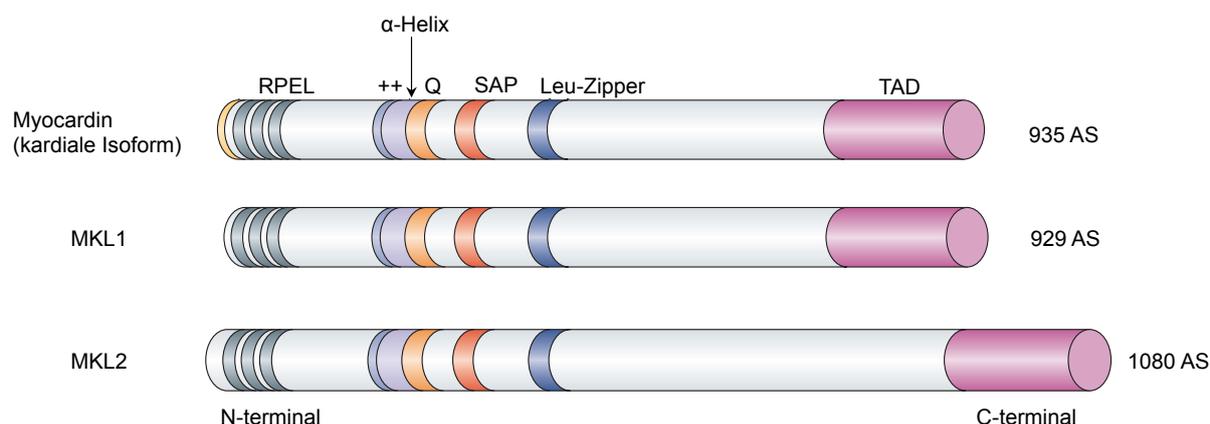


Abbildung 3: Struktur der transkriptionellen Coaktivatoren von SRF. Gezeigt werden schematisch die homologen Strukturen der transkriptionellen Cofaktoren von Myocardin, MKL1 und MKL2 mit ihren funktionellen Domänen und der Aminosäurezahl. MKL1 und MKL2 assoziieren mit SRF über eine basische Domäne (++) und eine anliegende Glu-reiche Domäne (Q); weitere Erklärungen siehe Text, Abbildung modifiziert nach Olson und Nordheim, 2010.

Die potenten transkriptionellen Coaktivatoren MKL1 und MKL2 assoziieren mit SRF über eine basische und eine Glutaminsäure-reiche Domäne. Zudem ist zwischen diesen zwei Domänen eine kurze alpha-helikale Region, welche ebenfalls SRF-Interaktion mediiert. Die N-terminal gelegenen drei RPEL-Motive mit den AS Arg-Pro-X-X-X-Glu-Leu interagieren mit monomeren G-Aktin und sequestrieren es auf diese Weise im Zytoplasma (41. Miralles, Posern 2003, 44. Posern, Miralles et al. 2004, 45. Cen, Selvaraj et al. 2004). Myocardin besitzt RPEL-Domänen, welche Aktin nicht

effizient binden können, was dazu führt, dass homodimeres Myocardin konstitutiv nukleär lokalisiert ist und durch Änderungen des Aktinmetabolismus nicht beeinflusst wird (46. *Descot, Rex-Haffner et al. 2008*). Dennoch ist es möglich, dass Myocardin durch Heterodimerisierung mit anderen MRTF der Regulation durch G-Aktin unterworfen wird (47. *Olson, Nordheim 2010*). Über die SAP-Domäne, wie schon weiter oben am Beispiel von Myocardin erläutert, kommt es zu DNA-Kontakt und Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. Die Leu-Zipper als Leucin-reiche Domänen binden Proteine mit einer ähnlichen Domäne und vermitteln auf diese Weise Homo- und Heterodimerisierung von Myocardin und MKL (39. *Wang, Chang 2001, 41. Miralles, Posern 2003, 48. Cen, Selvaraj et al. 2003*). Im C-terminalen Bereich befindet sich eine Domäne, die als *Transcription activation domain* (TAD) bezeichnet wird und die Aktivität von SRF stimuliert. Wie zudem aus Abbildung 3 ersichtlich wird, ist das Protein MKL2 mit 1080 AS geringfügig größer als MKL1 mit 929 AS. Die abgebildeten Domänen von Myocardin sind homolog zu denen der MKL und evolutionär konserviert (47. *Olson, Nordheim 2010*).

1.2.2.2 Regulationsmechanismus zur Aktivierung von MKL1 und MKL2

MKL1 und MKL2 sind die Schnittstelle im Signalweg zwischen dynamischem Aktinmetabolismus und transkriptioneller Aktivität. In serumgehungerten Zellen befinden sich jene in inaktivem Zustand und sind über ihre RPEL-Domäne an G-Aktin gebunden und auf diese Weise im Zytoplasma sequestriert. Im Experiment konnte beobachtet werden, dass Deletion der N-terminalen Sequenz inklusive der RPEL-Motive in größerem Umfang zur Bildung von MKL1-SRF-Komplexen führt (41. *Miralles, Posern 2003*). Daher kann die Verbindung von G-Aktin und MKL als inhibitorischer Komplex bezeichnet werden, welcher dafür sorgt, dass keine transkriptionell aktiven MKL-SRF-Komplexe nukleär gebildet werden können. Polymerisierung von globulären G-Aktin zu filamentären F-Aktin erfolgt über die Aktivierung von RhoA nach LPA- oder Serumstimulation; dies führt zum Entzug des G-Aktin-Pools und sekundär zur intrazellulären Translokation von MKL1 und MKL2 aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo die Transkription von Zielgenen aktiviert werden kann (41. *Miralles, Posern 2003*). Der Importweg von MKL1 und MKL2 ist

u. a. Importin-vermittelt über Importin α/β_1 (49. Pawlowski, Rajakyla et al. 2010). Die Aktivierung von Rho führt zur Aktinpolymerisierung über zwei verschiedene Effektor-Signalwege. Der Rho-Kinase (ROCK)-LIM-Kinase (LIMK)-Cofilin-Weg stabilisiert F-Aktin, während der mDia-Weg unter Beteiligung des Proteins Profilin dessen Synthese vorantreibt.

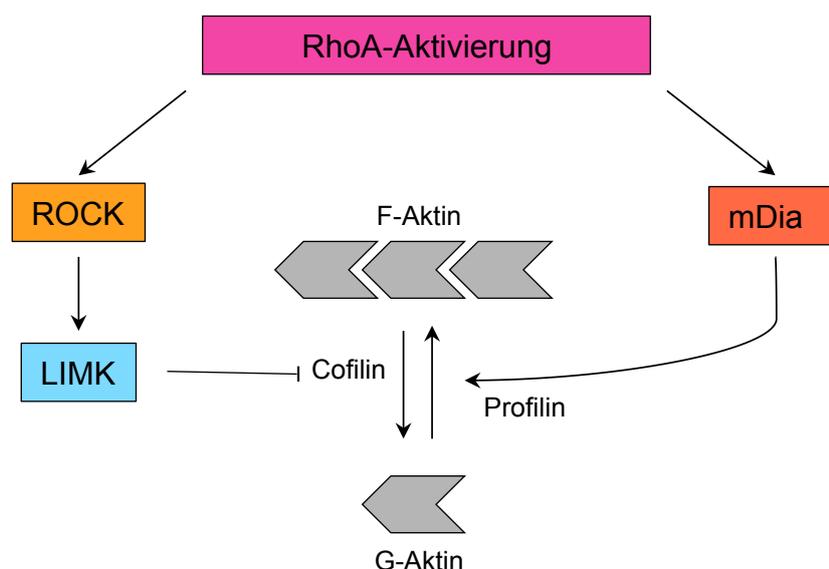


Abbildung 4: mDia und Rho-Kinase im Modell der SRF-Aktivierung. Der Rho-Signalweg treibt die F-Aktin Polymerisierung mittels ROCK-LIMK sowie mDia voran. Daraus resultierende G-Aktin-Depletion trägt zur Aktivierung von SRF bei; modifiziert nach Miralles et al., 2003.

MKL1 unterliegt in unstimulierten Zellen beständig einem Shuttle-Mechanismus und zirkuliert zwischen Zytoplasma und Zellkern. Dieser Shuttle-Mechanismus von MKL1 und MKL2 basiert zum einen auf dem gerade geschilderten Importweg, er benötigt aber gleichzeitig auch einen geregelten Export-Weg. Dieser Export wird u.a. effizient durch einen Exportin-vermittelten Crm1-abhängigen Transport sichergestellt (50. Kudo, Khochbin et al. 1997, 51. Hayashi, Morita 2013). Hierbei fördert die Komplexbildung zwischen nukleärem G-Aktin und MKL den Crm1-abhängigen nukleären Export der MKL zurück ins Zytoplasma (52. Vartiainen, Guettler et al. 2007). Die Rate des nukleären Exports ist abhängig von der MKL1-Bindung an Aktin und wird bei serumstimulierten Zellen durch die nukleäre Lokalisation von MKL1 reduziert bzw. verhindert (52. Vartiainen, Guettler 2007). Neben der Zustandsänderung von Aktin konnten Muehlich et al. 2008 zum ersten Mal zeigen, dass Serumstimulation auch einen indirekten Einfluss auf MKL1 hat. Diese kann über

die MAP-Kinasen ERK1/2 MKL1 am Serinrest 454 phosphorylieren und führt ebenfalls zur Bindung von G-Aktin mit nukleärem Export (53. Muehlich, Wang et al. 2008).

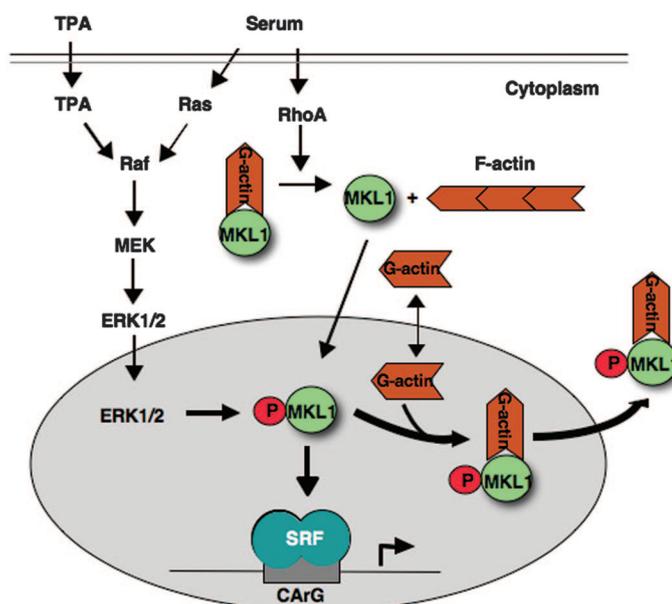


Abbildung 5: Aktivierung und Regulation von MKL1. Seruminduktion führt zur Aktivierung des RhoA- und Ras/MEK/ERK-Signalwegs. RhoA-Aktivierung stimuliert die nukleäre Lokalisation von MKL1 auf Grund von Stressfaserbildung und Abfall des G-Aktin-Niveaus. Der nukleäre Export wird u. a. durch ERK1/2-abhängige Phosphorylierung und zunehmende G-Aktin-Bindung von MKL1 stimuliert. Der Export von aktin gebundenen MKL1 reduziert die Menge von MKL1, die für SRF-Bindung und Aktivierung der Transkription zur Verfügung steht; nach Muehlich et al., 2008.

Serum- oder LPA-Stimulation fördern somit nicht nur die nukleäre Akkumulation von MKL. Die Phosphorylierung von MKL1, die gewissermaßen als „Aus-Schalter“ für den MKL/SRF-Signalweg fungiert, stellt eine Wechselwirkung mit der RhoA-vermittelten Aktivierung von MKL-abhängiger Transkription dar und zeigt, dass sie in diesem regulatorisch fein abgestimmten Prozess im Sinne einer negativen Regulation als Voraussetzung für die Bindung von G-Aktin, nukleären Export und letztlich die Beendigung der Transkription von induzierten Genen zu verstehen ist. Dafür, dass dieser Mechanismus nicht nur für MKL1 anwendbar ist, spricht die Tatsache, dass der Serinrest 454 auch in Myocardin und MKL2 konserviert ist (41. Miralles, Posern 2003, 53. Muehlich, Wang 2008). Formine, wie z.B. mDia als Effektor von RhoA, sind in der Lage serumabhängig und innerhalb kurzer Zeit die Aktinpolymerisierung im Zellkern voranzutreiben, um MKL1-SRF-Aktivität im Rahmen der Transkription zu unterstützen (54. Baarlink, Wang et al. 2013). Das Protein *Stem*

cells antigen 1 (SCA1) bindet mit MKL1 und SRF im Zellkern einen ternären Komplex und verhindert auf diese Weise die Transkriptionen von Genen, die beispielsweise für Zellproliferation von Bedeutung sind. Integrin-beta 1, ein für Invasion und Migration von Tumorzellen verantwortliches Gen wird durch SCA1 reguliert (55. Brandt, Baarlink et al. 2009). Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl weiterer Cofaktoren, die MKL-SRF-Aktivität regulieren oder zumindest Einfluss auf diese nehmen. In quergestreifter Skelettmuskulatur kommen zytoplasmatisch im Sarkomer STARS (*Striated muscle activator of Rho-dependent signalling*) vor, welche G-Aktin binden und indirekt zur nukleären Translokation von MKL1 führen. Es sind weitere Proteine beschrieben worden, die regulatorisch wirken und dabei entweder mit MRTF bzw. Myocardin oder SRF interagieren. Die verschiedenen Kombinationen unterschiedlicher Interaktionsvarianten von SRF und MKL1/2 mit anderen Interaktionspartnern erhöhen die regulatorische Potenz des Signalnetzwerks von SRF und deuten gleichzeitig auf die Komplexität des MKL-SRF-Systems hin.

1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung von MKL1 und MKL2

Knockout-Untersuchungen an Myocardin und MRTF bei Mäusen zeigten die *in vivo*-Bedeutung dieser SRF-Coaktivatoren in verschiedenen Gewebearten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. Die untersuchten Myocardin-Mutanten führten überwiegend zu Anomalien des Zytoskeletts sowie der Motilität und der Kontraktilität der Zelle. Mäuse mit einer Mutation von MKL1 sind zwar lebensfähig aber die Weibchen präsentieren aufgrund eingeschränkter Funktion der myoepithelialen Zellen der Brustdrüsen eine gestörte Aufzucht des Nachwuchses. Die Deletion von MKL2 führt hingegen zu Letalität bereits im embryonalen Stadium aufgrund von kardiovaskulären Defekten (47. Olson, Nordheim 2010). Die Überexpression von MKL1 und MKL2 führte in Fibroblasten zur Aktivierung von Genen, die typisch für glatte Muskelzellen sind (40. Wang, Li 2002, 43. Du, Chen 2004, 56. Selvaraj, Prywes 2003). Ma et al. und Mercher et al. konnten im Jahre 2001 unabhängig voneinander zeigen, dass bei der akuten megakaryoblastischen Leukämie im Kindesalter eine spezielle genetische Translokation vorliegt (57. Ma,

Morris et al. 2001, 58. Mercher, Coniat et al. 2001). MKL1 ist hierbei als t(1;22) zusammen mit dem *RNA-binding motif protein 15* (RBM 15)-Gen (synonym auch als OTT bezeichnet) fusioniert. Das entsprechende Proteinprodukt besitzt onkogene Eigenschaften und wurde namensgebend für MKL1 und MKL2. Mühlich und Hampl haben die biologische Bedeutung der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1 und MKL2 besonders für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) in ihren Studien hervorgehoben. In HCC-Zellen waren eine nukleäre Lokalisation von MKL1/2 und tumorspezifische Charakteristika nachzuweisen. Eine MKL1/2-Depletion *in vitro* zeigte u. a. eine Hemmung des Wachstums der hepatozellulären Karzinomzelllinie Huh7 und konsistent damit war in murinen *in vivo*-Experimenten mit HCC-Xenografts an athymischen Nacktmäusen eine signifikante Tumorreduktion durch therapeutische Injektion Polyethylenimin (PEI)-komplexierter MKL1/2-siRNA sichtbar (*59. Muehlich, Hampl et al. 2012, 60. Hampl, Martin et al. 2013*). Hemmung von MKL in einem experimentellen Metastasierungsmodell zeigte eine fehlerhafte Kolonisierung der Lunge aus der Blutbahn heraus (*61. Medjkane, Perez-Sanchez et al. 2009*). In fibrotischen Prozessen, bei denen es zu einem bindegewebigen Umbau des Ursprungsgewebes kommt, spielt der MKL/SRF-Signalweg ebenfalls eine Rolle; dies ist etwa für die Augenfibrose belegt. Zielgene von MRTF in NIH-3T3 Fibroblasten sind u. a. die Matrixmetalloproteinasen MMP-2, MMP-9 und MMP-14, welche die Fibrosebildung unterstützen. In klinischen Experimenten konnte hierbei der Nutzen von Matrixmetalloproteinasehemmern als antifibrotischen Medikamenten gezeigt werden (*62. Yu-Wai-Man, Treisman et al. 2014*). Therapeutisch denkbar sind spezifische Eingriffe im MKL/SRF-Signalweg (siehe Kap. 6.10).

1.3 Filamin A als neuer Interaktionspartner von MKL1

1.3.1 Struktur der Filamine

Filamine sind große, aktinbindende Proteine, die dreidimensionale Aktinfilamentnetzwerke stabilisieren und mit zellulären Membranen verbinden können. Hierbei nehmen sie eine Integrationsfunktion zwischen Zellarchitektur und Signalgebung für die Zellbewegung wahr. Filamin A ist Teil der Proteinfamilie der

Filamine. Zu dieser Proteinfamilie zählen drei homologe Proteine, die Produkte unterschiedlicher Gene und ihrer zugehörigen mRNA-Splice-Varianten darstellen: Filamin A, Filamin B und Filamin C; abgekürzt FLNA, FLNB und FLNC (63. Zhou, Hartwig et al. 2010). Filamin A ist diejenige Isoform, welche im adulten Organismus ubiquitär und am häufigsten exprimiert wird (64. Nakamura, Stossel et al. 2011, 65. Ruskamo, Ylanne 2009). Das Filamin A-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert; das Proteinprodukt formiert sich als Homodimer aus zwei Untereinheiten von jeweils etwa 280 kDa Molekulargewicht, mit einer aktinbindenden Domäne am N-Terminus (66. Gorlin, Yamin et al. 1990). Auch Heterodimere von FLNA und FLNB sind beschrieben, etwa während der humanen Corticogenese (67. Sheen, Feng et al. 2002). Die Struktur des homodimeren Proteins ähnelt dem Buchstaben „V“ (68. van der Flier, Sonnenberg 2001). Der Ort der Dimerisierung befindet sich am C-terminalen Ende (63. Zhou, Hartwig 2010). Die C-terminale Domäne verankert zudem F-Aktin an der Zellmembran über Transmembran-Rezeptoren. Zwischen N- und C-terminalem Ende besteht das Protein aus insgesamt 24 Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Segmenten. Zusätzlich vermitteln *Hinge*-Domänen Flexibilität und trennen die 24 Ig-ähnlichen Segmente zwischen Segment 15 und 16 - an dieser Stelle als H1-Domäne bezeichnet - in zwei Abschnitte, Rod1- und Rod2-Domäne, siehe auch Abbildung 6 (69. Gardel, Nakamura et al. 2006). Innerhalb der Rod-Domänen werden die Ig-Segmente 1-15 als Rod1-Domäne und die Ig-Segmente 16-23 als Rod2-Domäne bezeichnet. Eine weitere *Hinge*-Domäne, H2 befindet sich zwischen Ig-Segment 23 und 24, am Übergang zur carboxyterminalen Dimerisierungsdomäne. *Hinge*-Regionen sind zudem *cleavage sites* für die Ca^{2+} -abhängige Protease Calpain; dies wird u. a. als Regulationsmechanismus des Filamins angesehen (63. Zhou, Hartwig 2010). Abgesehen von Aktin binden die meisten Interaktionspartner an der Rod2-Domäne, an der die räumliche Freiheit zu F-Aktin dies ermöglicht. Die Bindung von F-Aktin zwischen den Ig-Domänen 9 und 15 schafft Widerstandsfähigkeit des Filamin A-Aktin-Netzwerks gegenüber Scherkräften (68. van der Flier, Sonnenberg 2001, 70. Stossel, Condeelis et al. 2001). Weitere Regulationsmechanismen, denen Filamin A und seine Interaktionspartner unterliegen, sind neben mechanisch induzierten Konformationsänderungen und Proteolyse, Phosphorylierung, kompetitive Beeinflussung zwischen Bindungspartnern und Multimerisation der Partner (64. Nakamura, Stossel 2011)

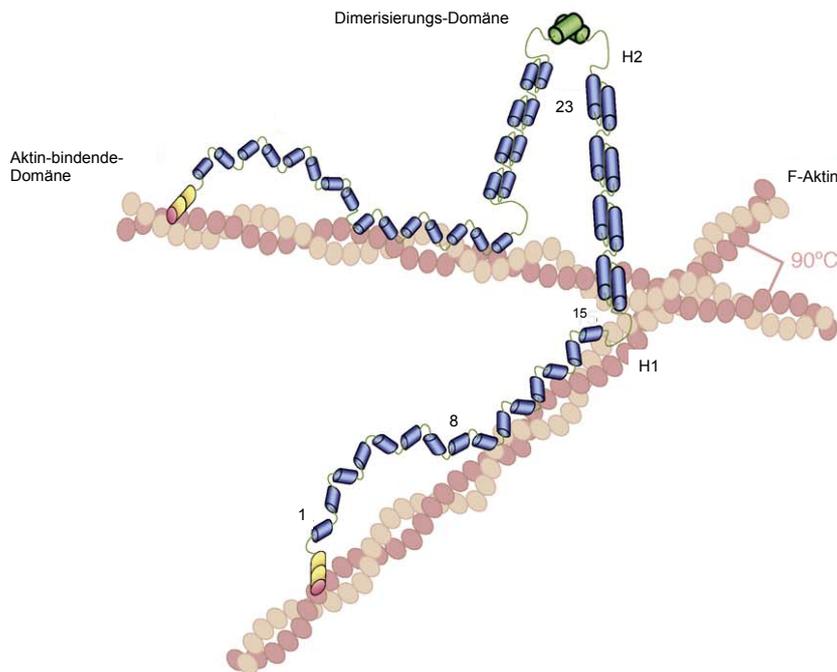


Abbildung 6: Domänen von Filamin A. Modell für die Organisation der Domänen im Filamin A-Protein sowie Interaktion zwischen Filamin A und F-Aktin. Durch die dimere Struktur des Proteins entstehen orthogonale Verbindungen zwischen den Aktinfilamenten; modifiziert nach Zhou et al., 2010.

1.3.2 Funktion der Filamine

Filamine fungieren als Aktin-bindende Proteine. Aktin-bindende Proteine werden für essentielle statische und dynamische zelluläre Eigenschaften benötigt. Diese umfassen die Anheftung von Aktinfilamenten an Zellmembranen, die Regulierung der Polymerisierung von Aktinfilamenten sowie die Organisation, d. h. Bindung bzw. Querverbindung der Aktinpolymere in dreidimensionale Gerüste. Die dynamische Anpassung von F-Aktin ermöglicht zelluläre Translokation und Motilität, die Änderung der Zellform und eine Resistenz gegenüber potentiell schädlichen mechanischen Stressfaktoren (71. Lynch, Sheetz 2011). Die Aktin-bindenden Filamine integrieren zudem die Funktionen des Zytoskeletts mit zellulärer Signalgebung und sie sind darüber hinaus auch für die fetale Entwicklung von elementarer Bedeutung (70. Stossel, Condeelis 2001). FLNA ist das am höchsten potente aktinqueretzende

Protein, welches man in Gelierungsversuchen mittels Zuführen von FLNA zu aktinenthaltenden Zellextrakten nachweisen konnte. FLNA erhöhte die Viskosität des Gels durch Quervernetzung von Aktinfilamenten zu orthogonalen Aktinnetzwerken (72. Hartwig, Tyler et al. 1980, 73. Hartwig, Shevlin 1986, 74. Nakamura, Osborn et al. 2007). Neben der Funktion Aktin zu binden und querzuvernetzen, bindet Filamin A als Interaktionspartner mehrere dutzend verschiedener anderer Proteine für Zelladhäsion, Migration sowie Rezeptoren, Kanäle, Enzyme und Signalgebungsproteine, wie z.B. *GTPase related proteins* und Transkriptionsfaktoren (63. Zhou, Hartwig 2010, 70. Stossel, Condeelis 2001). FLNA reguliert die Verteilung bzw. Ausbreitung von Zellen mittels Ausbildung von Protrusionen an der Zellmembran über die intrazelluläre Bindung an β 1-Integrin, was in Gingiva-Fibroblasten und Nierenzellen nachgewiesen werden konnte (63. Zhou, Hartwig 2010). Die Reduktion der Expression eines der beiden Interaktionspartner beeinflusst die Expression des anderen. Jedoch unterliegt die Migration der Zellen während der Interaktion von FLNA mit Integrinen einem Gleichgewichtszustand: bei einer zu starken Bindung von Integrin-Filamin wird die Migration eingeschränkt und steht unter zusätzlichem Einfluss der Proteine Talin und Migfilin, welche in einem kompetitiven Status um die Bindungsstellen dieser Interaktionspartner treten (63. Zhou, Hartwig 2010). Durch die Nähe zur Zellmembran während der Bindung von Filamin A zu Integrinen und anderen Transmembran-Proteinen kommt es zur Assoziation von signalgebenden kleinen GTPasen (siehe auch Kap. 1.4). Filamin A bildet einen Komplex mit Rho-Kinase (ROCK) mittels Kollokalisierung an den Protrusionen der Zellmembranen und wirkt somit als Gerüst an der Zellmembran für Transmembran-Proteine und dort aktive GTPase Faktoren. Desweiteren wurde auch eine Interaktion mit MAP-Kinasen beschrieben (75. Suetsugu, Takenawa 2007). Bezüglich der Interaktion mit genexpressionsregulierenden Proteinen haben Filamine sowohl proaktivierende, positive als auch reprimierende, negative Einflüsse auf die Transkription. Interaktion von FLNA mit dem Komplex PEBP2/CBF scheint repressiv zu wirken ebenso wie der Einfluss auf FOXC1 und den Androgen-Rezeptor, die Bindung von SMAD2 und SMAD5 wirkt hingegen positiv mit darauf folgender nukleärer Akkumulation und die Interaktion von Filamin A mit BRCA1 wird für effiziente DNA-Reparatur benötigt (63. Zhou, Hartwig 2010, 76. Berry, O'Neill et al. 2005, 77. Loy, Sim et al. 2003, 78. Sasaki, Masuda et al. 2001, 79. Kim, Park et al. 2007, 80. Yoshida, Ogata et al. 2005, 81. Velkova, Carvalho et al. 2010, 82. Yuan,

Shen 2001). Der transkriptionelle Koaktivator MKL1 treibt als Interaktionspartner von Filamin A u. a. die Expression MKL- und SRF-abhängiger Zielgene voran (83. Kircher, Hermanns et al. 2015).

1.3.3 Pathophysiologische Bedeutung von Filamin A

Zellen in Kultur, welche kein Filamin exprimieren, besitzen instabile Zelloberflächen, sind unfähig zur lokalen Bewegung und haben eine eingeschränkte Widerstandskraft gegenüber mechanischem Stress (74. Nakamura, Osborn 2007, 84. Flanagan, Chou et al. 2001, 85. Kainulainen, Pender et al. 2002). FLNA ist relevant für die Entwicklung bei Säugern (86. Feng, Chen et al. 2006, 87. Ferland, Gaitanis et al. 2006, 88. Hart, Morgan et al. 2006). Punktmutationen von Filamin A führen u. a. zu Entwicklungsstörungen der Knochen, Gliedmaßen und des Herzens beim Menschen (74. Nakamura, Osborn 2007, 89. Robertson 2005, 90. Kyndt, Gueffet et al. 2007). In der Embryogenese ist FLNA insbesondere an der Entwicklung der Gefäße beteiligt. Aber auch in der Tumorgenese steht die Regulation der Gefäßbildung und die Metastasierung unter Einfluss von FLNA (91. Shao, Zhang et al. 2016). Einige Tumorzellen exprimieren kein Filamin A (70. Stossel, Condeelis 2001). Die Filamin A-defiziente Melanomzelllinie M2 zeigt eine morphologisch blasenförmig veränderte Plasmamembran und eine geringere Zellmotilität. Die Transfektion dieser Zelllinie mit FilaminA-cDNA erhöhte die migratorische Kapazität proportional bis zu normalen Expressionsleveln eines Wildtyps (70. Stossel, Condeelis 2001, 92. Cunningham, Gorlin et al. 1992). Ursache für die morphologisch blasenförmigen Veränderungen ist eine instabile Oberfläche, welche zur Ausbildung multipler sphärischer Aneurysmen führt, die als *blebs* bezeichnet werden. Diesem *Blebbing*-Phänomen zugrunde liegend ist die Unfähigkeit des Zellkortex filamindefizienter Mutanten dem inneren hydrostatischen Druck standzuhalten; hierdurch kommt es aufgrund des instabilen Aktinzytoskeletts zu einem hydrostatisch bedingten Aufreißen der Zelle (92. Cunningham, Gorlin 1992, 93. Dai, Sheetz 1999). Desweiteren spielt Filamin A eine Rolle bei der Metastasierung, wie oben schon erwähnt, und Invasion. Während es in zytoplasmatischer Lokalisation eher prometastatisch und proinvasiv zu wirken

scheint, zeigt sich die Interaktion insbesondere von proteolytisch abgetrennten FLNA-Fragmenten an Transkriptionsfaktoren im Zellkern antiinvasiv (91. *Shao, Zhang 2016*). Darüber hinaus wurden Mutationen von FLNA in einem großen Spektrum kongenitaler Erkrankungen beim Menschen gefunden, beispielsweise beim Otopalatodigitalen Syndrom (OPD), bei der frontometaphysealen Dysplasie (FMD) und beim Melnick-Needles-Syndrom (MNS). Bei diesen Syndromen herrscht eine generalisierte Dysplasie vor, welche kraniofaziale Strukturen, *Digiti* und lange Knochen betrifft (94. *Robertson, Twigg et al. 2003*). Die X-chromosomale Myxoide Valvuläre Dystrophie (XMVD), welche das Herz befällt, wurde ebenfalls mit FLNA-Mutationen in Verbindung gebracht. Diese Erkrankung führt zu einer Valvulopathie mit Mitralklappen-Prolaps sowie mitraler und aortaler Regurgitation (90. *Kyndt, Gueffet 2007*). Aus neurophysiologischer Perspektive ist Filamin A für die radiäre neuronale Zellmigration während der Entwicklung des Gehirns zur Formation des Neocortex notwendig. Genmutationen, die zu einer vollständig fehlenden Expression von Filamin A führen (Nullmutationen) sind die Ursache der humanen periventrikulären Heterotopie, einer X-chromosomal vererbten Entwicklungsstörung (95. *Fox, Lamperti et al. 1998*). Betroffene Mädchen leiden an rezidivierenden epileptischen Anfällen, Knaben versterben bereits pränatal. Morphologisch akkumulieren Neurone periventrikulär der lateralen Ventrikel auf Grund einer gestörten Migration nach kortikal. Diese Akkumulationen stellen zudem die epileptogenen Foci dar (70. *Stossel, Condeelis 2001, 95. Fox, Lamperti 1998*). Durch die multiplen Funktionen von Filamin A, bedingt durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen in unterschiedlichen Zelltypen und Gewebearten sowie die sukzessiv bekannt werdende Involvierung dieses Proteins in unterschiedlichen Krankheitsentitäten, wird die weitreichende biologische Rolle dieses Proteins zunehmend evident.

1.4 Der Tumorsuppressor *Deleted in Liver Cancer (DLC1)*

Um aus molekularmedizinischer Perspektive im Hinblick auf die Tumorgenese die Bedeutung der Signalwege von SRF, MRTF und ihrer Zielgene weiter einzuordnen, muss für das mechanistische Verständnis der wechselseitigen Interaktionen ein

weiteres Protein, *Deleted in Liver Cancer 1* (DLC1), mit seinen zugehörigen Regulatoren erwähnt werden. DLC1 hat als Tumorsuppressor regulatorischen Einfluss auf die Mitglieder der Familie der kleinen G-Proteine. Diese sind in der Lage Guanosintriphosphat (GTP) zu binden und es mit ihrer enzymatischen GTPase-Funktion zu hydrolysieren. Man unterscheidet grundsätzlich einen GTP-gebundenen Zustand dieser G-Proteine von einem GDP-gebundenen, wobei ersterer die aktive Form und letzterer die inaktive Form des Proteins darstellt. Man kann dies mit einem Schalter, der an- bzw. ausgeschaltet ist, vergleichen. Durch diese Eigenschaft sind die regulatorischen GTPasen in der Lage *downstream*-liegende Signalwege zu steuern. GTPasen werden ihrerseits durch *Guanine nucleotide exchange factors* (GEF) positiv und durch *GTPase activating proteins* (GAP), welche die Hydrolyse von GTP-gebundenen G-Protein in GDP-gebundenes vorantreiben, negativ reguliert. Rho-GTPasen konstituieren neben Ras-GTPasen eine zweite Gruppe innerhalb der Superfamilie der regulatorischen GTPasen und bestehen aus Rho, Rac, Cdc42 sowie über 20 weiteren Gruppenangehörigen. Die Regulation ist komplex und besteht wie bei Ras aus GEF, GAP und zusätzlich Rho-GDI, sog. *GDP dissociation inhibitors*. Zu jenen Rho-GAP wird auch DLC1 gezählt; es trägt in seiner Funktion zur Inaktivierung des kleinen G-Proteins Rho bei und wirkt mechanistisch tumorsuppressiv. In vielen verschiedenen Tumorentitäten ist ein Tumorsuppressor deletiert, so auch DLC1, dessen Name seine pathogenetische Rolle für das Leberkarzinom betont. Durch den Wegfall von DLC1 entfällt auch die negative Regulation auf Rho, welches dadurch konstitutiv aktiviert wird und zu tumorigenen Eigenschaften wie Proliferation, Invasion und gesteigerter Zellmotilität führt (96. Sahai, Marshall 2002, 97. Kim, Vigil et al. 2009, 98. Ridley 2001).

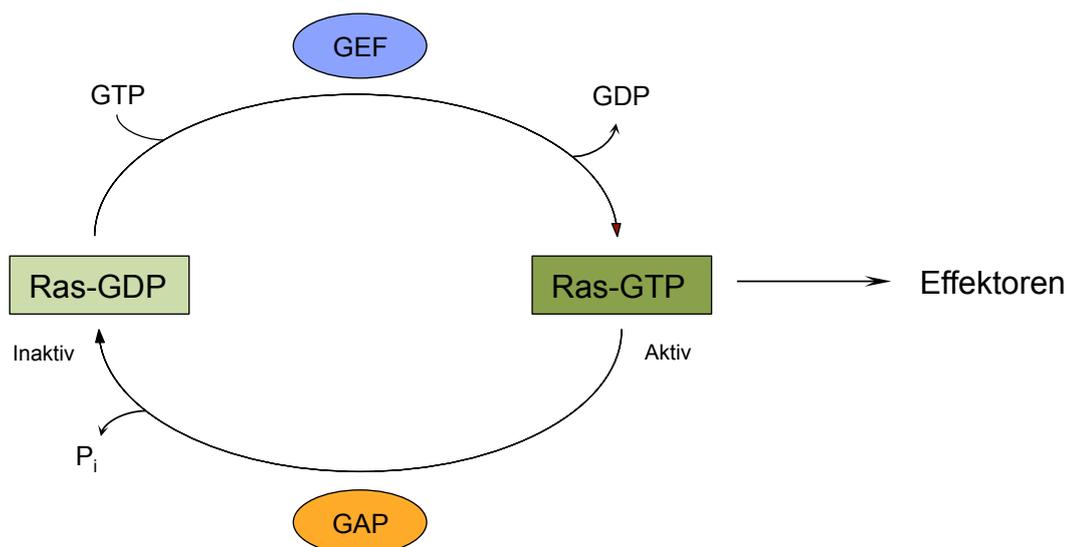


Abbildung 7: Der Ras-GTP/GDP-Zyklus. Ras-GTPasen sind molekulare Schalter. Der GDP/GTP-Zyklus wird durch GEF und GAP kontrolliert. Effektorproteine interagieren mit GTP-gebundenem Ras; modifiziert nach Lahoz et al., 2008.

DLC1 wird physiologisch ubiquitär in humanen Geweben exprimiert (99. Yuan, Miller et al. 1998, 100. Xue, Krasnitz et al. 2008, 101. Lahoz, Hall 2008). In Tumorgewebe ist die Expression dagegen vermindert, in 30 % aller HCC-Zelllinien ist keine DLC1-Expression vorhanden (99. Yuan, Miller 1998). Durkin et al. führten diesen Umstand auf eine Gen-Inaktivierung durch *Loss of Heterocycosity* (LOH), epigenetische Veränderungen wie z.B. Hypermethylierungen und Histon-Hypoacetylierungen zurück (102. Durkin, Ullmannova et al. 2007). In der Nähe des Genlocus von DLC1 befinden sich multiple LOH (99. Yuan, Miller 1998). LOH besitzen pathogenetische Bedeutung für die Krebsentstehung. Durch eine erste inaktivierende Mutation (1. Hit) liegt ein heterozygoter Zustand bezüglich der zwei interessierenden Allele vor. Durch ein zweites Ereignis (2. Hit) wie etwa chemische Noxen oder Strahlung kommt es zur Mutation des zweiten Allels und somit zur Inaktivierung eines Tumorsuppressors. Bei etwa 50 % aller Patienten mit Leber-, Lungen- und Brustkrebs, sowie bei 70 % der Darmkrebspatienten wurden heterozygote Deletionen von DLC1 gefunden, welches einer vergleichbaren Häufigkeit wie bei dem Tumorsuppressor p53 entspricht. Durch Arbeiten von Mühlich und Kollegen wurde die Bedeutung von DLC1 für die transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 und für die von diesen abhängigen biologische Prozesse entdeckt (59. Muehlich, Hampl 2012, 60. Hampl, Martin 2013). MKL1/2 konnten intranukleär aktiv in DLC1-defizienten Tumorzellen vorgefunden

werden. Bei Depletion dieses nukleär lokalisierten und konstitutiv aktiven MKL1/2 wurde eine Regression der Tumoreigenschaften beobachtet. In HepG2-Zellen, welche DLC1 exprimieren, konnte nach DLC1-Knockdown eine erhöhte Zellproliferation gesehen werden (59. Muehlich, Hampl 2012, 60. Hampl, Martin 2013).

1.5 Myoferlin

Noch vor der Erstbeschreibung Myoferlins wurde als erstes humanes Homolog zu fer-1, einem bei *Caenorhabditis elegans* vorkommenden Protein, welches zur Fusion membranöser Organellen mit der Plasmamembran benötigt wird, das Protein Dysferlin in einer Unterform der muskulären Dystrophie (*Limb-girdle muscular dystrophy 2B*) und der Mioshi Myopathie - zweier autosomal-rezessiven Muskelerkrankungen - als mutiertes Gen entdeckt. Die Rolle von Dysferlin liegt ebenfalls in Membranumbauprozessen und zeigt *in morbide* den pathogenetischen Ursprung im Sinne einer fehlerhaften Membranregeneration bei dieser Art der Muskeldegeneration. Durch die Entdeckung von Dysferlin wurde eine neue, aber evolutionär alte Proteinfamilie beschrieben (103. Lek, Lek et al. 2010). Zu dieser Familie der Ferline gehören entsprechend der Nomenklatur neben oben erwähntem Dysferlin (DYSF), das Otoferlin (OTOF), welches für die präsynaptische Transmission der synaptischen Vesikel mitverantwortlich und in mutierter Form mit der autosomal-rezessiv vererbten nonsyndromalen prälingualen Taubheit DFNB9 assoziiert ist, und das Myoferlin (MYOF), synonym auch als Fer-1-like 3 (FER1L3) bezeichnet (104. Yasunaga, Grati et al. 1999). In seiner Gesamtheit enthält das humane Genom sechs Fer-1-like Gene, neben den oben genannten noch die Ferline Fer1L4, Fer1L5 und Fer1L6, deren bisher nachgewiesene Proteinprodukte strukturelle Ähnlichkeiten besitzen (105. Posey, Demonbreun et al. 2011).

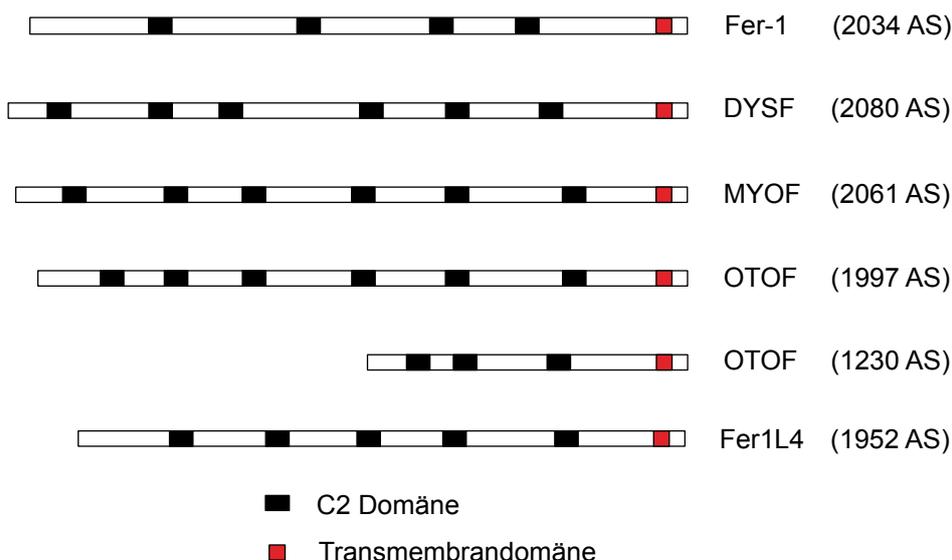


Abbildung 8: Domänen von Myoferlin und anderen Ferlinen. Die Ferlin-Proteinfamilie besitzt eine konservierte Proteinstruktur. Alle Ferlin-Proteine tragen eine variable Anzahl an C2-Domänen und eine Transmembrandomäne, welche C-terminal lokalisiert ist; modifiziert nach Bansal et al., 2004.

Das Myoferlin-Gen ist auf dem Chromosom 10 (10q23.33) lokalisiert und das gleichnamige Protein besitzt ein Molekulargewicht von 230 kDa. Im Bereich dieses Genlocus, benachbart zum Tumorsuppressor PTEN, konnten unterschiedliche Erkrankungen genetisch kartiert werden, wie zum Beispiel M. Cowden, das intestinale Polyposis Syndrom, die Makrocephalie, die progressive externe Ophthalmoplegie und die corneale Dystrophie (106. Britton, Freeman et al. 2000, 107. Nelen, Padberg et al. 1996, 108. Jacoby, Schlack et al. 1997, 109. Zigman, Lavine et al. 1997, 110. Suomalainen, Kaukonen et al. 1995). Strukturell wird Myoferlin als Typ II-Transmembranprotein angesehen und enthält mehrere - wie Dysferlin sechs - C2-Domänen, die wie der Großteil des Gesamtproteins zytoplasmatisch lokalisiert sind, sowie eine C-terminale Transmembrandomäne, mit welcher es in der Plasmamembran verankert ist. Die Nomenklatur der C2-Domänen erfolgt numerisch linear von N- nach C-terminal (105. Posey, Demonbreun 2011). Wie Dysferlin auch, enthält Myoferlin eine DYSF-Domäne, welche für die Bindung von Caveolin-3 verantwortlich gemacht wird (111. Patel, Harris et al. 2008, 112. Yan, Rachubinski et al. 2008). Daneben konnten 5 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsseiten, von denen 3 konserviert mit Dysferlin vorhanden sind, und 3 potentielle cAMP- und cGMP-abhängige Protein-Kinase-Phosphorylierungsseiten,

von denen 2 mit Dysferlin konserviert sind und eine strukturell-funktionelle Bedeutung für Signaltransduktionsprozesse besitzen, identifiziert werden. Zusätzlich enthält Myoferlin auch eine SH3-Domäne, die zur Interaktion mit weiteren Proteinen beitragen kann (113. Davis, Delmonte et al. 2000). Die Lysin- und Arginin-Reste in der Proteinstruktur von Myoferlin dienen als potentiell nukleäre Lokalisationssignale (106. Britton, Freeman 2000). Die C2-Domänen kommen in membranassoziierten Proteinen vor, welche an Signaltransduktions- und Membranfusionsprozessen sowie Vesikeltransport beteiligt sind und hierbei Protein-Lipid, Protein-Calcium bzw. Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Während Membranfusionsprozessen können C2-Domänen mit negativ geladenen Phospholipiden, wie z. B. Phosphatidylserin, das von der N-terminalen C2A-Domäne Dysferlins bzw. Myoferlins gebunden wird, und anderen Proteinen interagieren. Dies wird durch Ca^{2+} -abhängige Modifikation des elektrostatischen Oberflächenpotentials ermöglicht, indem Ca^{2+} an der C2-Domäne binden kann und damit als Brücke zwischen den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran und den korrespondierenden Aminosäureresten des Proteins dient (113. Davis, Delmonte 2000, 114. Bansal, Campbell 2004). Wie schon die Namensgebung von Myoferlin nahelegt, wurde seine Existenz zunächst mit Muskelgewebe in Verbindung gebracht. Die Bezeichnung Myoferlin geht auf Davis und Kollegen zurück, welche dessen Expression in Herz- sowie Skelettmuskulatur nachweisen konnten und vermuteten, dass es sich um einen potentiellen Mediator der Kardiomyopathie beziehungsweise der muskulären Dystrophie handelt. Myoferlin war intrazellulär wie das homologe Dysferlin mit der Plasmamembran assoziiert aber zusätzlich auch an der nukleären Membran zu beobachten, wobei die genaue Rolle dieses perinukleären Myoferlins noch nicht abschließend geklärt ist. Es wird angenommen, dass es sich möglicherweise auf dem Weg zur Plasmamembran oder zu intrazellulären Vesikeln befindet (105. Posey, Demonbreun 2011). Im murinen Muskeldystrophie-Modell an der mdx-Maus, welcher das Protein Dystrophin fehlt, konnte eine Hochregulation des Myoferlin an der Membran der Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden (113. Davis, Delmonte 2000). Myoferlin ist in Myoblasten hoch exprimiert, vor allem in den Formen der Zellen, die zu differenzieren begonnen haben sowie vor der Fusion zum Synzytium stehen; gleichzeitig führt das Nichtvorhandensein von Myoferlin zu einer eingeschränkten Fusion der Myoblasten (105. Posey, Demonbreun 2011). Die Myoblastenfusion trägt zum Muskelwachstum während Entwicklung und

Regenerationsvorgängen des muren Muskels bei, daher ist auch nach Verletzungen des Muskels die Myoferlin-Expression erhöht (115. *Demonbreun, Posey et al. 2010*). Myoferlin interagiert direkt mit dem Endozytose-Recyclingprotein EHD 2, einem Mitglied der EH-Domänen-enthaltenden (EHD) Proteinfamilie. EHD 2 bindet ein Asp-Pro-Phe-Motif (NPF) an der C2B-Domäne von Myoferlin. Auf ähnliche Weise kolokalisiert IGFR-1 mit Myoferlin in proliferierenden Myoblasten (115. *Demonbreun, Posey 2010*). Myoferlin interagiert daneben mit dem Protein AHNAK, sowie Dysferlin, über seine C2A-Domäne, wobei dieser Interaktionspartner sich primär perinukleär befindet, in die Plasmamembran translozieren kann und mit Annexin-2 und Aktin für die Stabilität während Membranreparaturprozessen sorgt (116. *Benaud, Gentil et al. 2004, 117. Huang, Laval et al. 2007*). Aus den bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass Ferline eine allgemeine Rolle in dynamischen Transportvorgängen intrazellulärer Vesikel besitzen und in verschiedenen Zelltypen für die Exozytose von intrakompartimentalen Komponenten und den Membranersatz von recycelten Singalrezeptoren zuständig sind (105. *Posey, Demonbreun 2011*). Über diese Tatsache und die Rolle von Myoferlin in Muskelgeweben hinausgehend wurde in Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander berichtet, dass Myoferlin-Expression in weiteren Geweben vorhanden ist. Myoferlin wird beispielsweise in infiltrierenden Immunzellen exprimiert (115. *Demonbreun, Posey 2010*). In Endothelzellen führt ein Myoferlin-Knockdown zu verminderter Clathrin- und Cavelolae-Endozytose und die Überexpression von Myoferlin erhöhte die Endozytoserate (118. *Bernatchez, Sharma et al. 2009*). Das Fehlen von Myoferlin führte dort zudem zum Verlust von Proliferation, Migration und NO-Freisetzung in Reaktion auf den Liganden und Wachstumsfaktor VEGF. Es konnten in diesen Untersuchungen im Endothel reduzierte Expressions- und Autophosphorylierungslevel von VEGFR-2 gezeigt werden. Mechanistisch haben Bernatchez und Kollegen Myoferlin in einem Komplex mit Dynamin-2 und VEGFR-2 nachgewiesen, welcher die VEGFR-Ubiquitinylierung und den proteasomalen Abbau verhindert (119. *Bernatchez, Acevedo et al. 2007*). Diese Arbeiten waren der erste Hinweis darauf, dass Ferline notwendig sind, um Signaltransduktionsprozesse im Rahmen der dynamischen Integrität der Plasmamembran aufrechtzuerhalten. Zudem konnte ebenfalls in Endothelzellen gezeigt werden, dass erniedrigte Level an Myoferlin zu einer Verminderung von TIE 2 (Angiopietin-1 Rezeptor), einer Rezeptortyrosinkinase, führen (120. *Yu, Sharma et al. 2011*). Darüber hinaus führt

Myoferlin-Defizienz zu fehlerhaftem *Insulin-like growth factor* (IGF1)-Transport, sowie einer damit einhergehenden herabgesetzten Signalgebung (115. *Demonbreun, Posey 2010*). Weitere humane Gewebe, in denen nach Davis und Kollegen Myoferlin exprimiert wird, sind u. a. Lunge, Leber, Plazenta, Niere und Pankreas (113. *Davis, Delmonte 2000*). Eisenberg und Kollegen konnten mit ihren Untersuchungen als erste die Bedeutung von Myoferlin für die Onkogenese und im Speziellen für die Invasionsfähigkeit in einem Mammakarzinom-Modell hervorheben (121. *Eisenberg, Kim et al. 2011*). Es konnte gezeigt werden, dass MYOF in Brustkrebszelllinien exprimiert wird und in Brustkrebsbiopsien *in vivo* hochreguliert ist (122. *Amatschek, Koenig et al. 2004*, 123. *Adam, Boyd et al. 2003*). Weitere Daten sprechen dafür, dass MYOF in verschiedenen weiteren Krebsarten wie z. B. dem kolorektalen, ovariellen, Zervix-, Endometrium-, Schilddrüsen-, Pankreas-, Magen- und Leberkarzinom überexprimiert ist. Myoferlin-Knockdown reduzierte die Invasion von MDA-MB-231 Brustkrebszellen signifikant. In mathematisch modellierten Untersuchungen konnten u. a. Matrixmetalloproteinasen als Schlüsselmediatoren der invasiven Eigenschaften identifiziert werden (121. *Eisenberg, Kim 2011*). Leung und Kollegen konnten beobachten, dass sowohl humane als auch murine Brustkrebsgewebe *in vivo* Myoferlin stark exprimieren (124. *Leung, Yu et al. 2013*). *Loss-of-function*-Untersuchungen zeigten, dass Myoferlin-Knockdown die Tumorzellproliferation *in vitro* einschränkt und diese maßgeblich von Myoferlin-abhängigen Membranreparaturmechanismen abhängig ist. Volakis und Kollegen konnten ebenfalls belegen, dass Myoferlin zum einen in Brustkrebszellen überexprimiert wird und zum anderen, dass Depletion von MYOF zu mesenchymal-epithelialer Transition (MET) statt epithelial-mesenchymaler-Transition (EMT) führt, mit einhergehender reduzierter Invasionsfähigkeit durch die extrazelluläre Matrix, konsistent mit Eisenberg et al. (125. *Volakis, Li et al. 2014*). MYOF-Knockdown erniedrigte die Zellmigrationsgeschwindigkeit signifikant in MDA-MB-231-Zellen und die Zellen zeigten eine gerichtete gemeinsame Migration, wohingegen Kontrollzellen zu Einzelzellmigration fähig waren. *In vivo* waren Tumoren mit MYOF-Knockdown kleiner und lokal nicht invasiv. Blackstone und Kollegen konnten vor Kurzem darlegen, dass Myoferlin-Depletion in invasiven Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 die Zell-Matrix-Adhäsion verstärkt, und dabei zu Tyrosinphosphorylierung der *Focal adhesion kinase* (FAK) an der Position Y397 und von Paxillin an der Position Y118 führt, welche für fokale Kontakte in Zellverbänden bedeutend sind; ohne fokale

Adhäsionen der Zellen wird invasives Potential, welches für den Beginn der Tumorentstehung notwendig ist, ermöglicht. Gleichmaßen könnte man auch formulieren, dass Myoferlin die Motilität und den invasiven Phänotyp in Brustkrebszellen vermittelt (126. Blackstone, Li et al. 2015). Die Gruppe um Turtoi et al. konnte zeigen, dass Myoferlin eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Degradation des EGF-Rezeptors (EGFR) nach seiner Aktivierung und Internalisierung in Brustkrebszellen besitzt. Die Depletion von Myoferlin blockierte die EGF-induzierte Zellmigration und EMT. Beide Effekte wurden als eine Folge gestörter Degradation des phosphorylierten EGF-Rezeptors durch dysfunktionale Plasmamembran-Caveolae und Änderung der Caveolin-Homo-Oligomerisierung induziert. Parallel dazu reduzierte die Myoferlin-Depletion *in vivo* die Tumorentwicklung in einem Xenograftmodell von humanem Brustkrebs (127. Turtoi, Blomme et al. 2013).

1.6 Seneszenz

Das Wort „Seneszenz“ hat seinen Ursprung im Lateinischen und wird abgeleitet vom Verb *senescere*, dessen zwei Komponenten *senex* - „der Greis“ und *nasci* - „entstehen“ bedeuten. Man kann es also mit „alt-werden“ oder „altern“ übersetzen. Auch der biologische Prozess der Seneszenz steht mit Altern in einem Zusammenhang. Aber dies ist nur ein Aspekt der zellulären Seneszenz, denn diese hängt nicht nur mit der Alterung zusammen, sondern hat auch Bedeutung für die Tumorentstehung. Im evolutionären Kontext und dem Verständnis um die Theorie der antagonistischen Pleiotropie näher betrachtet, bedingt die Seneszenz in jungen Organismen den Schutz vor Tumorentstehung durch Verhinderung der Proliferation und geht in alten Organismen mit dem Alterungsprozess durch die abnehmende Regenerationsfähigkeit der Zellen einher. Hierdurch besteht evolutionär gesehen durch die Verhinderung von malignen Tumoren insbesondere bei jungen Organismen ein entscheidender Selektionsvorteil.

1.6.1 Replikative Seneszenz

Man kann nach heutigem Wissensstand grundsätzlich zwei Formen der Seneszenz voneinander unterscheiden, zum einen die sog. replikative Seneszenz, die durch das Altern selbst verursacht wird und zum anderen die sog. prämaturne Form der Seneszenz. Erstere geht auf die Forschungen von Leonard Hayflick in Philadelphia zurück, welcher beobachtete, dass es bei humanen Fibroblasten in Kultur nach zunächst ausgeprägter Zellteilung zunehmend zu einem Abfall der Proliferationsrate mit einem Arrest kommt, und dieses Phänomen als *Cellular senescence* bezeichnete (128. Hayflick, Moorhead 1961, 129. Hayflick 1965). Später wurde seine Beobachtung des irreversiblen Wachstumsarrests trotz ausreichenden Raums für Wachstum, trotz Nährstoffen und Wachstumsfaktoren im Kulturmedium als Folge der Telomerverkürzung in somatischen Zellen erkannt (130. Harley, Futcher et al. 1990). Hierbei kommt es zu einer Verkürzung der terminalen, nicht kodierenden repetitiven Sequenzen (5'-TTAGGG-3') der linearen Chromosomen, die Telomere genannt werden. Dies erfolgt nach jeder Replikation, da die DNA-Polymerase die Enden nicht vollständig zu replizieren vermag und somatische Zellen keine oder nur geringe Telomeraseaktivität besitzen, welche hingegen in Zellen der Keimbahn und vielen Tumorzellen zu einer Verlängerung der Basensequenz mittels der *Telomerase reverse transcriptase* (TERT)-Funktion dieses Enzyms führt und auf diese Weise das End-Replikationsproblem löst (131. Campisi, d'Adda di Fagagna 2007). Letztlich verursacht die Telomerverkürzung einen Mechanismus, der *DNA-damage response* (DDR) genannt wird, welcher Schäden an der DNA, wie z.B. Doppelstrangbrüche, erkennt und daraufhin zu einem Zellzyklus-Arrest führt respektive zur Reparatur des Schadens, sofern dies möglich ist.

1.6.2 Prämaturne Seneszenz

Die prämaturne Form der Seneszenz kann im Gegensatz zur telomergetriggerten Form durch sehr heterogene Stimuli ausgelöst werden. Dies sind beispielsweise

akuter zellulärer Stress durch DNA-interagierende Noxen, reaktive Sauerstoffspezies, metabolischer Stress durch Mangel an Wachstumsfaktoren und interessanterweise auch die Überaktivität von Onkogenen (132. *Collado, Serrano 2010*). Letzteres scheint zunächst etwas kontraintuitiv, denn allgemein wird die Aktivität eines Onkogens für Tumorentstehung bzw. deren Beförderung verantwortlich gemacht und nicht für einen Zustand der Zelle, in welchem ein gegenteiliger Prozess, nämlich ein Wachstumsarrest, abläuft. Tatsächlich aber reagieren Zellen, wie z. B. Fibroblasten auf viele Onkogene mit Seneszenzentwicklung (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007*). In der Literatur wurde als erstes von einer spanischen Gruppe um Serrano und Kollegen beschrieben, dass die Überexpression aktiver Onkogene, wie z. B. Ras das Phänomen der Seneszenz auslösen kann, welches dann entsprechend als Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) bezeichnet wird. Serrano konnte in Fibroblasten mit Überexpression eines H-Ras GV12-kodierenden Plasmids einen Wachstumsarrest mit Induktion von Tumorsuppressorproteinen wie p53, p21 sowie p16 beobachten (133. *Serrano, Lin et al. 1997*). Die erwähnten Auslöser der prämaturnen Seneszenz sind genauso heterogen wie die kausalen Mechanismen, die hinter diesen Auslösern stehen. Jeglicher Schaden, der im Genom entsteht, wie z. B. Doppelstrangbrüche, kann zur Seneszenz führen, die durch den Signalweg p53-p21 und zusätzlich auch über p16 vermittelt wird (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007*). Die p53-abhängige DDR mit Seneszenz kann darüberhinaus auch nach Stimulation mit dem antiproliferativen Zytokin β -Interferon, welches bei längerer Anwendung Sauerstoffradikale entstehen lässt, ausgelöst werden (134. *Moiseeva, Mallette et al. 2006*). Oxidativer Stress kann in einigen Zellen p16 induzieren (135. *Parrinello, Samper et al. 2003*). Und auch viele Chemotherapeutika sind als DNA-interagierende Substanzen dazu in der Lage, Schäden in der DNA zu erzeugen, was als Nebenwirkung in normalen mitotischen Zellen zur Seneszenz führt, was aber auch in einigen Tumorzellen - nämlich solchen mit Wildtyp p53 - *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden konnte (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007*, 136. *Roninson 2003*). Somit kommt der Seneszenz wahrscheinlich zusätzlich eine entscheidende Funktion als Wirkprinzip von Tumortherapien hinzu. Ein weiterer Mechanismus ist die Veränderung des Chromatins, die durch verschiedene Histonmodifikationen zustande kommt und als seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci (SAHF) erkennbar wird (137. *Narita, Narita et al. 2006*).

1.6.3 Gemeinsamkeiten und Charakteristika seneszenten Zellen

Wesentliche Gemeinsamkeiten seneszenten Zellen sind ein Wachstumsarrest, Apoptoseresistenz und eine veränderte Genexpression (131. Campisi, d'Adda di Fagagna 2007). Man sieht die Seneszenz als einen evolutionären Schutzmechanismus an (s. o.), der den Zellpool mit den vorhandenen, teilbaren mitotischen Zellen vor Neoplasien schützt. Seneszenz ist aber kein programmierter Zelltod wie die Apoptose, bei dem die Zelle aus dem Zellverbund entfernt und gegebenenfalls nach der Teilung einer benachbarten Zelle ersetzt wird, sondern sie stellt lediglich ein Ausscheiden aus dem aktiven Zellzyklus dar, was zu einem Arrest in der G1-Phase führt, wobei die betroffenen Zellen ihre Lebensfähigkeit mit ihrer metabolischen Aktivität beibehalten (138. Sherwood, Rush et al. 1988). Ein vergleichbarer Arrest in der G0-Phase des Zellzyklus, der als Quieszenz bezeichnet wird, ist bekannt. Sich in Quieszenz befindende Zellen sind in der Lage auf mitogene Stimuli zu reagieren und in den Zellzyklus wieder einzutreten. Im Gegensatz hierzu haben post-mitotische Zellen, wie zum Beispiel differenzierte Muskel- oder Nervenzellen, die Fähigkeit sich zu teilen verloren und können somit wie seneszente Zellen nicht mehr in den Zellzyklus eintreten. Wann und aus welchem Grund ein zu diesen unterschiedlichen Zuständen spezifisch führender Weg eingeschlagen wird ist noch nicht abschließend geklärt und unterliegt gegenwärtig der Forschung.

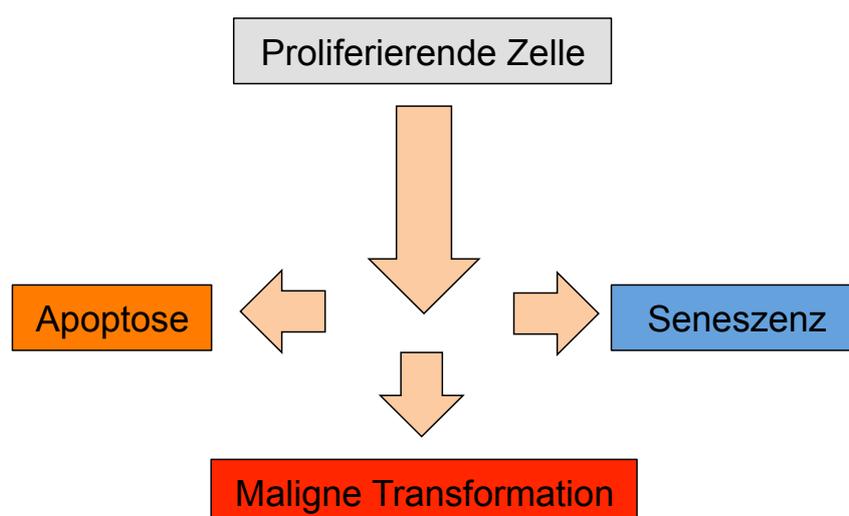


Abbildung 9: Entwicklungswege einer Zelle. Verschiedene Entwicklungswege einer Zelle führen zu unterschiedlichen Zellzuständen wie Apoptose, Seneszenz oder maligne Transformation.

Ob Apoptose oder Seneszenz abläuft, scheint jedoch vom Zelltyp und der Intensität des Stressors abzuhängen. Darüber hinaus ändert sich - wie schon weiter oben erwähnt - das Muster der Genexpression im Rahmen der Seneszenz, beispielsweise werden cyclinabhängige Kinase-Inhibitoren (CDKI) wie p21 oder p16, welche als Tumorsuppressoren dem Signalweg der transkriptionellen Regulatoren p53 und pRb unterliegen, vermehrt exprimiert. Der „Wächter des Genoms“ p53 induziert als Transkriptionsfaktor das Protein p21 und führt dann zu Seneszenz oder Apoptose. Oben geschilderte Mechanismen bedingen, dass das Retinoblastomprotein (Rb) in hypophosphorylierter Form vorliegt und den Transkriptionsfaktor E2F blockiert, was den Fortgang des Zellzyklus und die Zellproliferation verhindert. Analog zu diesem Mechanismus können seneszente Zellen auch Gene hemmen, die für Proteine kodieren, die ihrerseits die Progression des Zellzyklus vorantreiben würden, wie z. B. C-Fos, Cyclin A, Cyclin B. Desweiteren werden einige Gene für sezernierte Proteine trotz Wachstumsarrest exprimiert, was u. a. für die oben beschriebene metabolische Aktivität verantwortlich ist; es handelt sich z. B. um Proteine, die die ECM remodellieren oder lokale Entzündungsreaktionen verursachen (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007, 139. Mason, Jackson et al. 2004*). Um seneszente Zellen zu identifizieren sind verschiedene Marker gebräuchlich. Die niedrige Replikationsrate kann durch Inkorporation von 5-Bromodesoxyuridine oder 3H-Thymidin sowie durch Immunfluoreszenz von PCNA oder Ki-67 nachgewiesen werden. Der Phänotyp der seneszenten Zelle zeigt in der Lichtmikroskopie eine charakteristische Morphologie mit vergrößertem und abgeflachtem Perikaryon und histochemisch blauer Anfärbung eines vakuolenreichen Zytoplasmas bei Zugabe des Substrats X-Gal und gleichzeitig vorhandener Expression des spezifischen seneszenzassoziierten Enzyms β -Galactosidase. Diese ist höchstwahrscheinlich Korrelat der lysosomalen β -Galactosidase und entspricht der erhöhten lysosomalen Biogenese, die in seneszenten Zellen vorhanden ist (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007, 140. Lee, Han et al. 2006*). Dieser Nachweis der Seneszenz, der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* etabliert ist, wurde auch in vorliegender Arbeit angewendet (141. *Dimri, Lee et al. 1995, 142. Shelton, Chang et al. 1999*) Neben dem Nachweis von p16 gelten auch die Proteine DEC1, p15 und DCR2 als potentiell neue, vielversprechende Seneszenzmarker (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007*). Darüber hinaus kommt es zur Änderung des Sekretoms von Zellen während der Seneszenz-Induktion, was als *Senescence-messaging secretome* (SMS) bezeichnet

wird. Hierbei werden verschiedene inflammatorische Zytokine, Chemokine, matrix-remodellierende Faktoren und Wachstumsfaktoren hochreguliert (143. *Kuilman, Peeper 2009*).

1.6.4 Biologische Bedeutung der Seneszenz *in vivo* und Implikationen für die Tumorgenese

Als biologisches Phänomen hat die Seneszenz durch den mit ihr einhergehenden Wachstumsarrest von Zellen Bedeutung für verschiedene Prozesse wie Alterung und Tumorwachstum aber auch Wundheilung mit der replikativen Erneuerung von Zellverbänden. Seneszente Zellen finden sich beim Menschen in unterschiedlichen erneuerbaren Geweben, wie zum Beispiel Gefäßen, vielen Epithelien und im Stroma aber auch in den Zellen des hämatopoetischen Systems (144. *Kirkwood, Austad 2000*). Je älter ein Organismus wird, desto mehr seneszente Zellen häufen sich an (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007*). Auch in degenerativ veränderten Geweben bei chronischen Erkrankungen wie der Osteoarthritis oder Atherosklerose findet man seneszente Zellen vor. Neuere Befunde belegen die Expression von p16 und das Auftreten von Seneszenz in muriner Neurogenese und pankreatischer Funktion (145. *Du, Vidal et al. 1996*). Zusätzlich kann die weiter oben erwähnte, veränderte Genexpression mit erhöhter Expression von extrazelluläre Matrix-zersetzenden Enzymen zu einem Effekt im Rahmen der Alterungsprozesse beitragen (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007*). Die tumorsuppressive Rolle wird dadurch deutlich, dass gutartige, wie z. B. die benigne Prostatahyperplasie, oder auch präneoplastische Läsionen, hingegen nicht maligne Tumore, mit Seneszenz in Verbindung gebracht werden konnten. Auch der benigne Spitz-Nävus in humaner Haut zeigt Seneszenz (146. *Roh, Eliades et al. 2015*). Beim pilozytischen Astrozytom, einem niedriggradigen Gliom und dem häufigsten Gehirntumor bei Kindern, konnte ein seneszenten Phänotyp mittels β -Galactosidase-Färbung und erhöhte p16-Level in der Immunfluoreszenz-Färbung nachgewiesen werden (147. *Jacob, Quang-Khuong et al. 2011*). Im Rahmen der Tumorgenese müssen zur Malignität transformierende Zellen ihren Genotyp dergestalt ändern, dass sie die

Seneszenz überwinden können. Da die regulatorische Endstrecke aus den Signalpfaden p53-p21 und p16-pRb besteht, ist eine Taktik dieser Regulatoren durch Mutation der Seneszenzantwort zu entgehen. Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom, einer Erkrankung des p53-Regulationssystems, überwinden die Seneszenz und entwickeln Tumore (131. *Campisi, d'Adda di Fagagna 2007*). Die Ausschaltung der Seneszenz ist zwar ein notwendiger aber nicht alleine ausreichender Faktor, um Zellen maligne zu transformieren. Zur Komplexität der Wechselwirkungen der Seneszenz und Tumorentstehung trägt auch die Mikroumwelt bei, die durch die Sekretion wachstumsabhängiger und angiogener Faktoren in die Umgebung der seneszenten Zellen tumorfördernd sein kann.

1.6.5 MKL1/2-mediierter Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz

Nach MKL1/2-Knockdown-vermitteltem Wachstumsarrest hepatozellulärer Karzinomzellen konnten Hampl et al. die Onkogen-induzierte Seneszenz als den zugrunde liegenden Mechanismus aufzeigen (60. *Hampl, Martin 2013*). Wie in der Grafik, Abbildung 10 verdeutlicht wird, führt mechanistisch in hepatozellulären Huh7-Karzinomzellen *upstream* der Verlust des Tumorsuppressors DLC1 zur Aktivierung von RhoA mit nukleärer Translokation sowie Aktivierung der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 und potentiell Tumorwachstum. Bei Depletion von MKL1/2 wurde über bisher unbekannte Zielgene vermittelt, das Protein Ras in aktiver Form vorgefunden, seinerseits mit *downstream* Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/ERK2 (pT202, pY204). Im Rahmen des weiter oben erwähnten Signalwegs der Onkogen-induzierten Seneszenz wurde nach MKL1/2-Depletion der Tumorsuppressor p16 induziert und konkomitant Rb in seiner Rolle als Hemmfaktor weiterer E2F-vermittelter Transkription rekrutiert, welches den Stillstand in der G1-Phase ermöglicht und den Fortgang des Zellzyklus mit dem notwendigen G1-S-Phasen-Übergang verhindert (148. *Chicas, Wang et al. 2010*). Der Phänotyp dieser Zellen zeigte wie erwartet eine verbreiterte, abgeflachte und vakuolenreiche Zellmorphologie sowie Positivität in der seneszenzassoziierten β -Galactosidasefärbung.

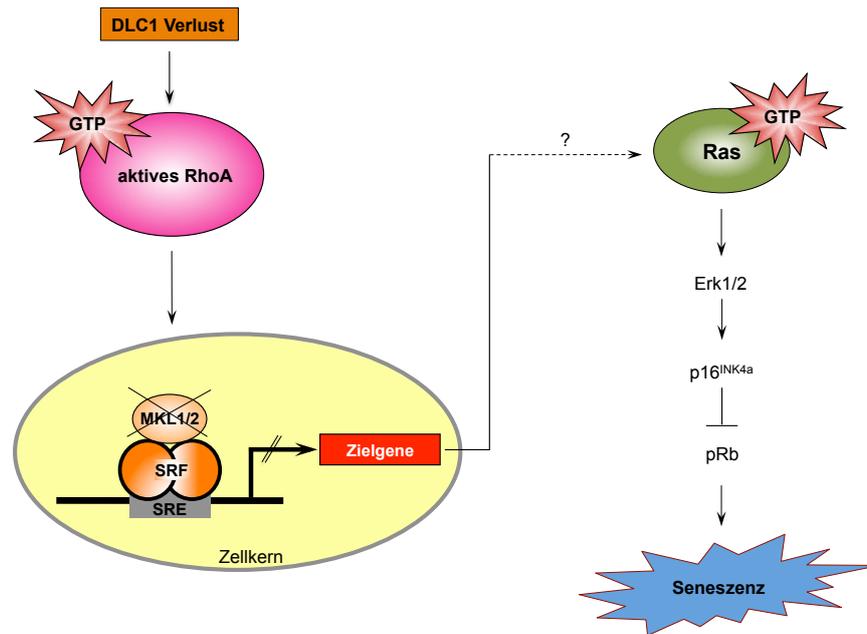


Abbildung 10: Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz. RhoA-Aktivierung und nukleäre Translokation von MKL1/2- nach DLC1-Verlust. Depletion von MKL1/2 induziert Seneszenz über die Aktivierung der Ras/MAPK und p16^{INK4a}/pRb-Kaskade. Es war bisher unklar über welche Zielgene MKL1/2-Depletion die Ras-Aktivierung verursacht; modifiziert nach Hampl et al., 2013.

2 Zielsetzung der Arbeit

Aus unseren Vorarbeiten ist bekannt, dass eine MKL1/2-Depletion im hepatozellulären Karzinom (HCC) zu Wachstumsarrest und zur Seneszenz führt. Als zugrunde liegender Signalweg konnte hierbei die Onkogen-induzierte Seneszenz nachgewiesen werden (60. *Hampfl, Martin 2013*). Um den molekularen Mechanismus der Mediation der Seneszenzinduktion nach MKL1/2-Depletion zu untersuchen, hat unsere Gruppe zunächst eine Microarray-Analyse in MKL1/2-depletierten HCC-Zellen durchgeführt und konnte dabei Myoferlin als neuartiges MKL1/2-abhängiges Zielgen identifizieren. Myoferlin wurde vor Kurzem mit dem EGF-Rezeptor in Zusammenhang gebracht, der bei Abwesenheit von Myoferlin in aktiviertem, phosphorylierten Zustand vorliegt und zusätzlich die Tumorentwicklung von Mammakarzinom-Zellen einschränkt (127. *Turtoi, Blomme 2013*). Deshalb wurden als Modellsysteme Mammakarzinom- und HCC-Zellen verwendet. Das Ziel dieses Projektes war es folgende Aspekte zu untersuchen:

1. Die Charakterisierung von Myoferlin als MKL1/2- und SRF-abhängiges Zielgen
2. Der Einfluss von Myoferlin und MKL1/2 auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen
3. Der Einfluss von Myoferlin und MKL1/2 auf die Seneszenzentstehung
4. Die Abhängigkeit der Myoferlin-Expression von der MKL1/Filamin A-Interaktion

Insbesondere die Fragestellung zu Punkt 4. ergab sich aus unseren Arbeiten zur Interaktion von Filamin A mit MKL1 (83. *Kircher, Hermanns 2015*). Filamin A konnte als neuer Interaktionspartner des transkriptionellen Koaktivators MKL1 beschrieben werden, der auch die Expression der MKL1-abhängigen Zielgene beeinflusst.

3 Material

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien mit zugehörigen Zellkulturmedien

Bezeichnung	Herkunft/Zelltyp	Kulturmedium	Hersteller
A7	Humane Melanomzelllinie mit stabiler FLNA-Expression	MEM	Prof. Thomas P. Stossel, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
HEK-293T	humane embryonale Nierenzelle	DMEM	Dr. Anna-Lena Forst, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland
HuH7	humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie	DMEM	Prof. Stephan Singer, Universität Greifswald, Deutschland
MDA-MB-468	humane Mammakarzinom-Zelllinie	DMEM	Prof. Ramon Parsons, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

3.1.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MEM (Minimum Essential Medium)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.1.3 Zellkulturmediumzusätze

Tabelle 3: Zusätze der Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco [®] Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM	Gibco [®] Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Zu DMEM- und MEM-Medium wurden jeweils 10 % FBS zugegeben.

3.2 Antikörper

Alle Antikörper wurden in TBS-T verdünnt.

3.2.1 Primäre Antikörper

Die primären Antikörper (AK) wurden zur Konservierung mit einer Spatelspitze BSA und einer 2 %-igen Natriumazidlösung (Endkonzentration 0,02 %) versetzt.

Tabelle 4: Primäre Antikörper für Immunoblot

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
anti-EGFR (tEGFR)	Maus monoklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
anti-ERK (C-14) (tERK)	Kaninchen polyklonal	1:10000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Filamin A	Mensch	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
anti-Flag [®] M2	Maus monoklonal	1:500	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
anti-HSP90	Maus monoklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-MKL1	Kaninchen polyklonal	1:500	Muehlich et al., 2008
anti-Myoferlin (D11)	Maus monoklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
anti-p44/42 MAPK (pERK) (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
anti-pEGFR (Tyr1173)	Kaninchen monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

3.2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für Immunoblot

Antikörper	Zielstruktur	Verdünnung	Herstellung
anti-Mouse IgG, HRP-linked	Maus	1:10 000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
anti-Rabbit IgG, HRP-linked	Kaninchen	1:10 000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 Plasmide

Tabelle 6: Plasmide mit zugehörigen Vektoren

Plasmid-DNA	Vektor	Hersteller
MYOF 1543 bp	pGL2	Prof. Elizabeth M. McNally, Northwestern University, Chicago, IL, USA
P3 x FLAG-MKL1 Mutante Δ 301-310	P3 x Flag-CMV TM -7.1	Josef Penkava, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland (83. Kircher, Hermanns 2015)
P3 x FLAG-MKL1 Mutante Δ 301-342	P3 x Flag-CMV TM -7.1	Josef Penkava, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland (83. Kircher, Hermanns 2015)
P3 x FLAG-MKL1 Mutante Δ 310-342	P3 x Flag-CMV TM -7.1	Josef Penkava, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland (83. Kircher, Hermanns 2015)
P3 x FLAG-MKL1 wt	P3 x Flag-CMV TM -7.1	Prof. Ron Prywes, Columbia University, New York , NY, USA
pcDNA 3.1 empty vector	pcDNA 3.1	Prof. Konstanze F. Winklhofer, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland
Renilla Luciferase SV40	pSV	Prof. Ron Prywes, Columbia University, New York , NY, USA
SRF-VP16	pMLV	Prof. Margarete Goppelt-Strübe, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen, Deutschland

3.3.2 siRNA

Die folgenden siRNA-Oligonukleotide wurden durch die Firma Sigma-Aldrich jeweils nach Bedarf synthetisiert. Lyophilisierte siRNA-Oligonukleotide wurden in Wasser zu einer Konzentration von 50µM gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: siRNA-Oligonukleotide mit Sequenz

siRNA	Sequenz (sense und antisense)	Hersteller
MKL1/2	5'-AUG GAG CUG GUG GAG AAG A A [dt][dt]-3' 5'-UUCUUCUCCACCAGCUCCAU [dt][dt]-3'	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MYOF	5'-CCC UGU CUG GAA UGA GA [dt][dt]-3' 5'-UCU CAU UCC AGA CAG GG [dt][dt]-3'	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
scrambled (scr) als negativ- Kontrolle	5'-CGU ACG CGG AAU ACU UCG A [dt] [dt]-3' 5'-UCG AAG UAU UCC GCG UAC G [dt][dt]-3'	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.3.3 qRT-PCR-Primer

Zielgenspezifische Primer wurden mit der Software Universal Probe Library von Roche konstruiert. Hiernach synthetisierte Primer wurden von der Metabion AG bezogen. Die quantitative *real-time* PCR-Primer wurden zu einer Konzentration von 100 µM verdünnt und bei -20 °C gelagert.

(Anmerkung: F= *forward*; R= *reverse*)

Tabelle 8: Humane Primer für qRT-PCR mit zugehöriger Sequenz

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
18s rRNA F	5'-TCG AGG CCC TGT AAT TGG AAT-3'	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
18s rRNA R	5'-CCC TCC AAT GGA TCC TCG TTA-3'	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MYOF F	5'-CCA TTA CTG GCT TCT AAG CTG AC-3'	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland
MYOF R	5'-TTC CCC TGA GGA AGC ATA AA-3'	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland
Random Hexamers	5'-NNN NNN-Wobbles-3'	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland

3.4 Antibiotika

Tabelle 9: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Gibco® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Zu MEM- und DMEM-Medium wurden jeweils 5% Penicillin/Streptomycin zugegeben.

3.5 Enzyme

Tabelle 10: Enzyme

Enzym	Hersteller
SuperScript® II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.6 Inhibitoren und Stimulantien

Tabelle 11: Inhibitoren und Stimulantien

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Cytochalasin D	2 μ M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FBS	20 %	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Jasplakinolid	0,5 μ M	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Lysophosphatidsäure (LPA)	10 μ M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.7 Bakterien und zugehörige Medien

Tabelle 12: Bakterien

Bakterienstamm	Hersteller
NEB [®] 5-alpha kompetente <i>E. coli</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

Tabelle 13: Agar und Medium zur Bakterienkultivierung

LB Agar	
1 %	NaCl
1 %	Bactotrypton
1,5 %	Baktoaagar
0,5 %	Hefeextrakt
ad 1000 ml H ₂ O, Anpassung an pH 7,5	
LB Flüssigmedium	
1 %	NaCl
0,5 %	Hefeextrakt
1 %	Baktotrypton
ad 1000 ml H ₂ O, Anpassung an pH 7,5 mit 10 M NaOH, autoklavieren	

3.8 Reaktions-Mischungen

Tabelle 14: Reaktions-Mischungen

Bezeichnung	Hersteller
Senescence β -Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Bezeichnung	Hersteller
Dual Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
GenElute [™] HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Q5 [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Bio Labs, Ipswich, MA, USA

3.9 Puffer und Lösungen

3.9.1 cDNA-Synthese und qRT-PCR

Tabelle 15: Reagenzien für cDNA-Synthese und qRT-PCR

Bezeichnung	Hersteller
5 x First-Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP (10 mm)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LightCycler [®] 480 SYBR Green Master I	Roche, Karlsruhe, Deutschland

3.9.2 Transfektionsreagenzien

Tabelle 16: Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
GenJet [™] DNA In Vitro Transfection	SignaGen Laboratories, Rockville, USA

Reagent	
Lipofectamine [®] 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine [®] RNAiMAX [™]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2 M Calciumphosphat	Selbstgemischt, siehe Tabelle 17

Tabelle 17: Calciumphosphat-Transfektionsreagenzien

CaCl ₂ -Lösung (2,5 M)	
87,6 g	CaCl ₂ x 6 H ₂ O
ad 200 ml <i>Aqua destillata</i> (<i>Aq. dest.</i>) , steril filtriert	
2 x HBS	
8,0 g	NaCl
0,2 g	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
6,5 g	HEPES
ad 500 ml <i>Aq. dest.</i> , Anpassung an pH 7,0	

3.9.3 Proteinisolation und -aufreinigung

Tabelle 18: Kralewski-Lysis-Puffer

Kralewski-Lysis-Puffer	
5 ml	1 M HEPES (pH 7,4)
3 ml	5 M NaCl

Kralewski-Lysis-Puffer	
1 ml	100 % Triton x-100
0,2 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 100 ml H ₂ O	
Unmittelbar vor Zellernte frische Zugabe zu 1 ml:	
2 µl	0,25 M PMSF
4 µl	0,25 M DTT
10 µl	10x Protease Inhibitor (PI)
0,25 M PMSF	
435,5 mg	PMSF
10 ml	Isopropanol

3.9.4 Immunpräzipitation

Tabelle 19: IP-Puffer

1 %-Triton IP-Lysis-Puffer	
50 mM	Tris
150 mM	NaCl
1 %	Triton x-100
10 %	Glycerol

1 %-Triton IP-Lysis-Puffer

Lagerung bei 4 °C, vor Benutzung Zugabe von PMSF 0,2 % und Proteaseinhibitor
1 %

IP-Waschpuffer

1 mM	EDTA
150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl
1 %	Triton X-100

3.9.5 SDS-PAGE

Tabelle 20: SDS-PAGE-Puffer

4 x Laemmli-Puffer

1 M	TRIS/HCl (pH 8,8)
0,01 %	Bromphenolblau
20 %	(w/v) SDS
2 %	(v/v) Glycerol
0,5 M	EDTA
5 %	(v/v) β -Mercaptoethanol

10 x Gellaufpuffer (pH 8,3)

0,25 M	TRIS
2 M	Glycin

4 x Laemmli-Puffer	
1 %	SDS
ad 5 000 ml H ₂ O	H ₂ O

3.9.6 Immunoblot

Tabelle 21: Immunoblot-Puffer

10 x Blotting Puffer	
15,13 g	TRIS
71,6 g	Glycin
5,0 g	SDS
ad 500 ml	<i>Aqua bidestillata (Aqua bidest.)</i>
Transfer-Puffer	
7,25 g	Tris
3,65 g	Glycin
0,47 g	SDS
200 ml	Methanol
ad 1 000 ml	<i>Aqua bidest.</i>
10 x TBS	
60,55 g	Tris
85,20 g	NaCl
ad 1 000 ml	<i>Aqua bidest., pH 7,6</i>

10 x TBS-T	
100 ml	10 x TBS
1 ml	Tween 20
ad 1 000 ml	<i>Aqua bidest.</i>

3.9.7 Wasch- und Verdünnungslösungen

Tabelle 22: PBS für Wasch- und Verdünnungsvorgänge

10 x PBS (pH 7,4)	
140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
1,8 mM	KH ₂ PO ₄

Tabelle 23: DEPC-H₂O für RNA-Resuspension

DEPC H ₂ O	
0,5 g	DEPC
500 ml	H ₂ O
1 h, 37 °C, autoklavieren	

3.9.8 Detektionslösungen

ECL-Lösung zur Chemiluminiszenz

Folgende Lösungen wurden bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch aufgetaut. Beide Lösungen wurden in einem 1:1-Verhältnis gemischt, um sie als Detektionslösung benutzen zu können

Tabelle 24: Detektionslösungen für Immunoblot

S1	
80 ml	H ₂ O
10 ml	1 M TRIS / HCl pH 8,5
1 ml	250 mM 3-Aminophthalhydrazide
0,44 ml	90 mM p-Coumarinsäure
ad 100 ml	H ₂ O
S2	
80 ml	H ₂ O
10 ml	1 M TRIS / HCl pH 8,5
60 µl	30 % H ₂ O ₂
ad 100 ml	H ₂ O

3.10 Gele

Tabelle 25: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE

5 % Trenngel	
8,5 ml	H ₂ O
2,5 ml	30 % Acrylamid
3,75 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
0,15 ml	10 % SDS
0,20 ml	10 % APS
0,012 ml	TEMED
10 % Trenngel	
3,97 ml	H ₂ O
3,33 ml	30 % Acrylamid
2,5 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
0,1 ml	10 % SDS
0,1 ml	10 % APS
0,004 ml	TEMED
5% Sammelgel	
5,4 ml	H ₂ O
1,34 ml	30 % Acrylamid
2,0 ml	1,0 M Tris, pH 6,8
0,08 ml	10 % SDS

0,08 ml	10 % APS
0,008 ml	TEMED
1 TRIS (1,5 M; pH 6,8)	
121 g	TRIS
1 M HCl	pH-Anpassung auf pH 6,8
ad 1000 ml	H ₂ O
1 TRIS (1,5 M; pH 8,8)	
121 g	TRIS
1 M HCl	pH-Anpassung auf pH 8,8
ad 1000 ml	H ₂ O

3.11 Chemikalien

Tabelle 26: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Chloroform	VWR, Ismaning, Deutschland
Desoxynukleosid Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMF (N,N-Dimethylformamide)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Heirler, Radolfzell, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Natriumtetraboratdecahydrate	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Protease Inhibitor, Cocktail Set III, Tierfrei	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Rec-Protein G-Sepharose [®] 4 B conjugat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] -Lumin 1, Roti [®] -Lumin 2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] -Quant	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spectra [™] Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Spectra [™] Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Super Signal West Femto Trialkit (Enhancerperoxid solution)	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Trinatriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol [®] LS Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.12 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 27: Verbrauchsgegenstände

Bezeichnung	Hersteller
24-well Transwell [®] Inserts 8 µm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glasperlen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Light Cycler [®] 480 Multiwell Plate 96	Roche, Penzberg, Deutschland
Light Cycler [®] 480 Versiegelungsfolie	Roche, Penzberg, Deutschland
PVDF-Membran	Millipore, Billerica, MA, USA
SDS-PAGE Ausrüstung	BIORAD, München, Bayern
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Wattestäbchen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
UV-transparente Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatman-Papier 0,8 mm	Optilab, München, Bayern
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.13 Technische Gerätschaften

Tabelle 28: Technische Gerätschaften

Bezeichnung	Hersteller
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blotting Apparatur Mini Protean [®] Tetra Cell	BioRad, München, Bayern
Chemiluminiszenz Detektor Chemi-Smart [™] 5100	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Eismaschine	Wessamat, Kaiserslautern, Deutschland
FlexCycler ²	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Gelelektrophorese-Apparatur	BioRad, München, Bayern
Inkubator MaxQ 6000	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Kryogefäße CryoPure 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Light Cycler [®] 480	Roche, Penzberg, Deutschland
Lumat ³ LB 9508 Single Tube Luminometer	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer REO basic C	IKA, Staufen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Netzgerät PeqPOWER 300	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter Lab850	SCHOTT-Instruments, Mainz, Deutschland
Pipette	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage VIC-612	Acculab Europe, Goettingen, Deutschland
Rotationsinkubator	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Shaker Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Schüttler Vortex-Genie™	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Scientific, Freiburg, Deutschland

3.14 Software und Datenbanken

Forschungspublikationen wurden über die Online-Datenbank NCBI PubMed bezogen.

Tabelle 29: Software-Programme

Bezeichnung	Hersteller
ChemiCapt Software	PEQLAB Biotechnology, Erlangen, Deutschland
EndNote X7	Thomson Reuters, New York City, New York, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
LightCycler [®] 480 Software	Roche, Penzberg, Deutschland
Microsoft Office 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
NEBaseChanger [™]	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
ImageJ 1.43	Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Einfrieren von Zellen

Vor dem Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -200 °C wurde das vorhandene Medium in der 10 cm-Kulturschale abgesaugt. Daraufhin erfolgte die Spülung mit PBS. Die adhären Zellen wurden mittels 2 ml Trypsin für 5 min im 37 °C temperierten Brutschrank abgelöst. Nach Resuspension der Zellen mit 8 ml Kulturmedium erfolgte die Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen mit nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm bei Raumtemperatur (RT). Nachdem der Überstand des Zentrifugats abgesaugt worden war, konnte das Zellpellet mit 900 μl von eiskaltem FBS resuspendiert werden. Im Anschluss an die Zugabe von 100 μl DMSO zur Verlängerung der Haltbarkeit wurde diese Zellsuspension in Cryovials bei -200 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.1.2 Auftauen von Zellen

Zellen, welche zur längerfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -200 °C gelagert wurden, mussten für die weitere Versuchsdurchführung initial aufgetaut werden. Dabei wurden zunächst 5 ml aufgewärmten Mediums auf 37 °C in 15 ml-Falconröhrchen vorgelegt. Das aus dem Stickstofftank entnommene Cryovial wurde anschließend schnell im 37 °C temperierten Wasserbad unter manuellem Schwenken erwärmt. Nach erfolgter Überführung der Zellsuspension in das Falconröhrchen mit dem für die Zelllinie entsprechenden Medium wurde dieses bei Raumtemperatur und 1000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugats wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Zellpellet konnte daraufhin mit 1 ml Medium neu aufgenommen und resuspendiert werden. Diese Zellsuspension wurde in eine Zellkulturschale mit 37 °C vorgewärmten Medium

gegeben und gleichmäßig durch lineare und zirkuläre Bewegung der Kulturschale verteilt.

4.1.3 Kultivieren von Zellen

Jegliche Arbeiten in der Zellkultur wurden in einem Laboratorium der biologischen Sicherheitsstufe S1 unter Abzug und sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kulturbedingungen waren bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt gegeben. Alle Zelllinien erhielten in ihrem zugehörigen Medium eine Zugabe von 10 % (v/v) fetales bovines Serum (FBS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin in 10 cm-Kulturschalen. Vor jeder Manipulation wurden benötigte Lösungen, wie z. B. PBS, Trypsin-EDTA und Medium auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Nachdem bei den adhärenen Zellen in Kultur eine Konfluenz von annähernd 80 - 100 % festgestellt werden konnte, erfolgte die Passagierung dieser Zellen, um die weitere Kultivierung zu ermöglichen. Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturschale mit den adhärenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, welches nach dem Waschvorgang ebenfalls abgesaugt wurde. Daraufhin wurden 2 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C im Brutschrank für 5 min inkubiert. Dies führte zur Lösung der davor adhärenen Zellen vom Boden der Zellkulturschale. Es erfolgte die Zugabe von 8 ml des für die jeweiligen Zellen benötigten Kulturmediums. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden die Zellen singularisiert. Danach konnte ein vorher definiertes Volumen dieser Zellsuspension in eine neue Zellkulturschale mit entsprechend vorgelegtem Medium zugegeben werden und auf diese Weise ein bestimmtes Teilungsverhältnis (von 1:2 bis 1:20) geschaffen werden.

4.1.4 Hungern von Zellen

Das Hungern von Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mittels PBS; daraufhin wurden die Zellen in einem Kulturmedium mit zugesetztem fetalen bovines Serum (FBS) von 0,2 % für 16 h ohne Antibiotikum inkubiert.

4.1.5 Serumstimulation

Um eine Stimulation von Zellen mit 20 %-igen Serum durchzuführen, wurden diese zunächst für eine Dauer von 16 h mit dem entsprechenden Medium, welches 0,2 % FBS und kein Antibiotikum enthielt, bei 37 °C gehungert. Daraufhin erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS und die Serumstimulation mittels Zugabe von 20 %-igem FBS für die Dauer von 2 h.

4.1.6 Behandlung mit chemischen Agenzien

Lysophosphatidsäure (LPA), Jasplakinolid und Cytochalasin D wurden auf die benötigte Konzentration im Medium verdünnt und auf die ausgesäten Zellen für die entsprechende Zeit (Wirkdauer) appliziert.

4.1.7 Aussaat von Zellen

Für die Versuche wurde jeweils eine definierte Zellzahl benötigt, die notwendigerweise vor Versuchsdurchführung quantifiziert werden musste. Die Quantifizierung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer, in welche ein Volumen von etwa 25 µl der vorher mit Trypsin-EDTA behandelten Zellsuspension in den Raum zwischen Deckglas und Zählkammer hineinpipettiert wurde. Unter einem Durchlichtmikroskop konnten die einzelnen Zellen in den Quadranten der Zählkammer gezählt werden; dies wurde jeweils viermal in den vier Quadranten der Zählkammer durchgeführt und hieraus der Mittelwert bestimmt. Nach folgender Formel wurde danach das benötigte Volumen der Zellsuspension bestimmt:

$$\text{Benötigtes Volumen} = \frac{\text{Anzahl der auszusäenden Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 10\,000}$$

Dieses errechnete, benötigte Volumen der Zellsuspension wurde in eine 6 cm-Kulturplatte, in welcher das entsprechende Kulturmedium eingesetzt wurde, zu dem Gesamtvolumen von 4 ml gefüllt.

Zelllinie	Beispielhaft ausgesäte Zellzahl in 6 cm-Platte
Huh7	400 000
MDA MB468	800 000

4.1.8 Proliferationsassay

Zur Durchführung eines Proliferationsassays wurden $1,2 \times 10^5$ Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bei Standardkulturbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellzahl wurde nach 24 h-Intervallen für die Dauer von vier bis sechs Tagen gezählt.

4.1.9 Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase-Assay

Zelluläre Seneszenz wurde entsprechend den Herstelleranweisungen mit Hilfe des Senescence β -Galactosidase Staining Kit nachgewiesen. Die zu untersuchenden Zellen wurden 5 Tage lang unter Standardbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. In 0,5 % Glutaraldehyd fixierte Zellen wurden mit einer β -Galactosidase Lösung, die 1 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactopyranosid enthielt, angefärbt und bei 37 °C und 0 % CO₂ über Nacht inkubiert. Die Anzahl blau gefärbter Zellen und die Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld wurden gezählt und daraufhin die Prozentzahl der β -Gal-positiven Zellen berechnet. Die Auswertung erfolgte in drei verschiedenen Gesichtsfeldern, woraus der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt wurde.

4.2 Transfektionen

4.2.1 Transfektion mit Lipofectamine® RNAiMAX™

Als Transfektion wird das Einbringen von fremder DNA oder RNA in Zellen bezeichnet. Die Inaktivierung von Genen mittels siRNA im Sinne eines Knockdown führt zu einer vorübergehenden und spezifischen Reduktion der Genexpression. Für transienten siRNA-vermittelten Knockdown auf Basis dieser RNA-Interferenz wurden die Zellen mit Lipofectamine® RNAiMAX™ durch reverse Transfektion nach Herstellerangaben transfiziert. In eine mit dem Boden der Pipettenspitzenaufbewahrungsbox unterlegte und somit angewinkelt positionierte 6 cm-Kulturschale wurden zunächst 1 ml Opti-MEM®, 4 µl siRNA (50 nM) und 10 µl Lipofectamine® RNAiMAX™ vorgelegt. Diese Lösung wurde vorsichtig zehnmal nacheinander auf- und abpipettiert, um die Bildung von Liposomenkomplexen zu ermöglichen und anschließend bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und für 4 min im Inkubator der Zellkultur mit Trypsin-EDTA behandelt, vereinzelt und anschließend bei Raumtemperatur und 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Ein Aliquot wurde vorher für die Zellzählung entnommen. Der Überstand des Zentrifugats wurde abgesaugt und das zentrifugierte Zellpellet in 10 ml Opti-MEM® resuspendiert. Parallel hierzu erfolgte die Zellzählung aus dem vorher entnommenen Aliquot und es wurde dadurch die Gesamtzellzahl der vorliegenden Suspension, welche nun in 10 ml Opti-MEM suspendiert war, bestimmt. Für die definierte Zahl der auszusäenden Zellen wurde jeweils als Reserve ein "+1-Ansatz" gewählt, z. B. bei 6 benötigten Kulturplatten, ein siebenfacher Ansatz. Die Verdünnung erfolgte dergestalt, dass in 3 ml Zugabevolumen die gewünschte Zahl an zu transfizierenden Zellen enthalten war. Diese 3 ml Suspension wurde nach 20 min zum Lipofectamine® siRNA-RNAiMAX™-Cocktail gegeben. Somit lag final ein Gesamtvolumen von 4 ml in der Kulturschale vor. Über Nacht wurde diese Zellsuspension bei o. g. Kulturbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 4 ml entsprechendem Kulturmedium statt Opti-MEM® versetzt und weiter bei gleichen Bedingungen kultiviert. Für qRT-PCR und Western-Blot wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion, für Seneszenz-Nachweis

5 Tage nach Transfektion weiter aufgearbeitet. Die verwendeten siRNA sind in Tabelle 7 aufgeführt.

4.2.2 Transfektion mit Lipofectamine[®] 2000

Die mit Plasmid-DNA zu transfizierenden Zellen wurden tags zuvor in 6 cm-Platten mit Kulturmedium ohne Antibiotikum ausgesät. Die Zellzählung erfolgt dabei mittels einer Neubauer Zählkammer. Bei einer Konfluenz von ca. 65 % wurde die Transfektion der Zellen mit Lipofectamine[®] 2000 nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Transfektionsmix wurde in OptiMEM[®]-Medium vorbereitet und zu den Zellen hinzugegeben. Nach 6 h wurde das Medium mit entsprechend frischem Medium ersetzt und die Zellen wurden weiter für mindestens 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Zellernte zur weiteren Analyse.

Tabelle 30: Lösungen zur Transfektion mittels Lipofectamine[®] 2000

Gefäß	DNA Plasmid [µg]	Lipofectamine [®] 2000 [µl]	OptiMEM [®] [µl]	Gesamtvolumen des Mediums nach Transfektion [ml]
6 well-Gefäß	4	5	250	2
6 cm-Gefäß	8	10	500	4

4.2.3 Transfektion mit Calciumphosphat

Es wurden 1×10^6 HEK-293T-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte 2 Stunden vor Transfektion ein Mediumwechsel mit 2 ml neuen Mediums, welches 10 % Serum aber kein antibiotisches Supplement enthielt.

Tabelle 31: Lösungen zur Transfektion mittels Calciumphosphat

Lösung A	Menge
Plasmid-DNA	2-4 μg
2 M CaCl_2	3,5 μl
H_2O	ad 62,5 μl
Lösung B	Menge
2x HBS-Puffer	62,5 μl

Der DNA- CaPO_4 -Cocktail wurde in den HBS-Puffer titriert hinzugegeben, während dieser gevortext wurde. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Lösung für 5 min bei Raumtemperatur und die tröpfchenweise Zugabe zu den Zellen. Nach 16 h wurde das Medium ersetzt mit 2 ml pro Well. Dieses enthielt 10 % Serum und Antibiotikum.

4.3 Nukleinsäuren-Biochemie

4.3.1 RNA-Isolation

Vor der RNA-Isolation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte zur Zellernte die Hinzugabe von 0,5 ml TRIzol[®]-Reagenz pro 6-Well-Platte. Die Zellen wurden heruntergekratzt, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform in das Reaktionsröhrchen hinzugefügt und es wurde für 15 s geschüttelt, gefolgt von einer

3-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Zur Phasenseparation wurde die Probe bei 13000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige, oben gelegene Phase, welche die RNA enthielt, wurde entfernt und in ein neues Röhrchen überführt. Für die Präzipitation der RNA wurden 0,25 ml Isopropanol zur wässrigen Phase hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Um RNA-Präzipitat zu gewinnen, wurde erneut bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das verbleibende RNA-Pellett wurde mit 1 ml 75 %-igem Ethanol gewaschen und danach bei 12000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die RNA luftgetrocknet. Anschließend konnte die RNA in nukleasefreiem Wasser resuspendiert und während der Inkubation bei 55 °C für 10 min vollständig aufgelöst werden. RNA-Konzentration und Reinheit wurden durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm respektive bei 280 nm gemessen.

4.3.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese, den Vorgang der Transkription von RNA in cDNA, wurde 1 µg Gesamt-RNA mit 1 µl *Random Hexamers* (50 µM) in einem Reaktionsvolumen von 5 µl *geprimed*. Diese Lösung wurde in einem Thermo-Cycler bei 70 °C für 5 min erhitzt, um das Template zu denaturieren, gefolgt von einer Inkubation bei 4 °C für die Dauer von 5 min. Zu dieser Mischung wurden 4 µl 5 x First Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl SuperScript® II Reverse Transcriptase und 7 µl H₂O hinzugefügt, zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 20 µl. Daraufhin erfolgte eine Inkubation im Thermo-Cycler bei 25 °C für 5 min und anschließend für 60 min bei 42 °C. Schließlich wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min inaktiviert und die Reaktion durch Lagerung des Reaktionsröhrchens auf Eis beendet. Die vorbereitete cDNA wurde direkt für die qRT-PCR benutzt oder alternativ bei -20 °C gelagert.

4.3.3 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Zur Amplifikation und Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde eine *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) durchgeführt. Jede qRT-PCR mit einem finalen Reaktionsvolumen von 20 µl enthielt jeweils 6 µl DNA (1:10 verdünnt mit H₂O; für 18 S rRNA verdünnt auf 1:100), 10 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix, 2 µl nukleasefreies Wasser und 1 µl Vorwärts- sowie 1 µl Rückwärts-Primer (10 µM). Die Primer waren spezifisch für das entsprechende Zielgen (siehe auch Tabelle 8). Die mRNA-Expression wurde auf das endogene *Housekeeping gene* 18S rRNA als Kontrolle normalisiert. Die qRT-PCR erfolgte mit dem LightCycler® 480 II-System unter den folgenden Reaktionsbedingungen:

Tabelle 32: Reaktionsschritte der qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Vorgang
1	42 °C	5 min	Vorinkubation
2	95 °C	10 s	Denaturierung
	55 °C	10 s	Amplifikation
	72 °C	10 s	Elongation
3	95 °C	30 s	Schmelzkurve
	60 °C	1 min	Schmelzkurve
	95 °C	10 s	Schmelzkurve
4	4 °C	30 s	Kühlen

Es liefen 50 Zyklen von Denaturierung, Amplifikation und Elongation ab. Analysen der Messungen wurden mit der LightCycler® 480 Software durchgeführt. Die statistische Berechnung sowie die graphischen Illustrationen wurden mit GraphPad Prism 6 angefertigt.

4.3.4 Generierung von MKL1-Deletionskonstrukten

Die MKL1 Δ 301-342-Deletionskonstrukte wurden mittels Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) generiert. Das Protokoll wurde entsprechend den Herstellerangaben angewendet. Für die Erzeugung der Deletionskonstrukte diente das P3 x Flag MKL1 wt Plasmid als *Template*. Prinzipiell enthielt der Reaktionsablauf drei Schritte: Als erstes erfolgte die exponentielle Amplifikation; nachdem passende Primer *designed* wurden, konnte eine PCR durchgeführt werden. Die Amplifikation wurde im FlexCycler² durchgeführt.

Tabelle 33: Reagenzien für Mutagenesis-PCR

Q5 [®] site-directed Mutagenesis Mix	
12,5 μ l	Q5 [®] Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix
1,25 μ l	Vorwärts-Primer (10 μ M)
1,25 μ l	Rückwärts-Primer (10 μ M)
1,00 μ l	Template DNA (20 ng/ μ l)
9,00 μ l	nukleasefreies Wasser

Tabelle 34: Reaktionsbedingungen der PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Vorgang
1	98 °C	30 s	Initiale Denaturierung
2	98 °C	10 s	Denaturierung
	58 °C	20 s	Amplifikation
	72 °C	3 min	Elongation
3	72 °C	2 min	Finale Extension
4	4 °C	unbegrenzt	Kühlen

Als zweites erfolgte die KLD-Behandlung, d.h. Kinase, Ligase und DpnI. Hierbei wurde das PCR-Produkt zirkularisiert und die ursprüngliche Template-DNA entfernt. Das PCR-Produkt wurde mit den in Tabelle 35 aufgeführten Reagenzien behandelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 35: Reagenzien für KLD-Verdau

KLD-Verdau	
1 µl	PCR-Produkt
5 µl	2x KLD Reaktionspuffer
1 µl	10x KLD Enzym Mix
3 µl	Nuclease-freies Wasser

Als dritter Schritt erfolgte die Transformation in chemisch-kompetente Bakterien. Es wurden 5 µl des KLD-Mix in NEB[®]5-alpha kompetente *E.coli*-Bakterien mittels Hitze-Schock-Methode transformiert. Bakterienkolonien wurden auf LB-Platten mit Ampicillin bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert.

Kontrollsequenzierungen wurden mit allen Konstrukten extern bei der Firma Eurofins GATC Biotech GmbH, Konstanz, Deutschland durchgeführt.

4.3.5 Transformation der MKL1-Deletionskonstrukte in kompetente Bakterien

Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock-Methode in Bakterien transformiert. Diese Bakterien-Aliquots von NEB[®]5-alpha kompetenten *E.coli*-Bakterien wurden bei einer Temperatur von -80 °C gelagert. Für jede Transformation wurde ein Aliquot mit 50 µl Bakteriensuspension für 15 min aufgetaut. Danach wurde 1 µl Plasmid-DNA hinzugefügt und auf Eis für 30 min inkubiert. Hierauf wurde diese Suspension durch einen Hitzeschock bei 42 °C exakt 90 s erhitzt und dann auf Eis für 2 min gelagert. 900 µl vorgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden hinzugefügt und die Suspension wurde bei 150 rpm bei 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Es erfolgte die Aussaat von 150 µl der Bakteriensuspension auf vorgewärmte Agar-Platten mit

entsprechendem Selektionsantibiotikum und die Inkubation über Nacht bei 37 °C. Vor weiterer Verwendung wurde die Agar-Platte mit Parafilm überzogen und bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt.

4.3.6 Plasmid-Präparation

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine einzelne Bakterienkolonie angepickt und mitsamt der Pipettenspitze in einen Erlenmeyer-Kolben in 50 ml LB-Medium, welches 50 µl Selektionsantibiotikum (50 mg/ml) enthielt, überführt und daraufhin für 16 Stunden über Nacht inkubiert sowie bei 300 rpm und 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterienzellen bei 3500 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand entzogen. Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben mittels GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit extrahiert. Schließlich wurde die DNA-Konzentration und Reinheit in einer photometrischen Messung bestimmt .

4.3.7 Luciferase Reporter-Assay

Aktivierung des SRF-VP16 Reporter Gens wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems entsprechend der Herstellerangaben gemessen. Zellen (HEK-293T) von ca. 60 % Konfluenz wurden in 6-Well-Platten mit dem Myoferlin-1543 bp-Promotorkonstrukt, einem Leervektor (pcDNA), dem SRF-VP16-Plasmid und dem *Renilla luciferase simian virus 40* (SV40)-Plasmid als interne Kontrolle transfiziert. Jede Transfektion enthielt 500 ng SRF-VP16 Reporter Plasmid, 1 µg Leervektor und 250 ng SV40-Plasmid als Referenz-Reporterplasmid, welche zur Normalisierung der Transfektion-Effizienz angewendet wurde. Nach einer Dauer von 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit 70 µl von 1 x *Passive lysis buffer* lysiert sowie bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert mit anschließender 15 minütiger Lagerung auf Eis. Photoemission und Firefly-Aktivität wurden durch die Menge der Umwandlung von Luciferin in

Oxyluciferin bestimmt. Ein Volumen von 5 μl des Überstandes wurde in ein Reaktionsgefäß übertragen, 20 μl LAR II und 20 μl Stop&Glo wurden zu der Probe hinzugegeben. Die Luciferase-Messungen konnten mit dem Lumat³ LB 9508 Single Tube Luminometer (Berthold) durchgeführt werden.

4.4 Protein-Biochemie

4.4.1 Proteinextraktion

Die Zellyse erfolgte auf Eis, um eine Proteindegradation zu verhindern. Zunächst wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt und die Kulturplatten zweimal nacheinander mit 2 ml eiskaltem PBS pro Well gewaschen. Ein bestimmtes Volumen (80-300 μl) - abhängig von Größe der Platte und Zelldichte - an Kralewski-Lysispuffer, supplementiert mit PMSF und DTT, wurde zu den noch adhärenen Zellen hinzugegeben und diese daraufhin mittels eines Zellschabers von der Platte gekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für 15 min auf Eis gelagert und anschließend für 15 min bei 12700 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand konnte mittels einer Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt werden. Diese Lysate wurden ab diesem Zeitpunkt entweder - sofern sie direkt weiter verarbeitet werden sollten - auf Eis gelagert oder bei -20 °C tiefgefroren.

4.4.2 Proteinaufreinigung und Proteinquantifizierung mittels Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde mittels photometrischer Messung bestimmt. Zunächst wurden je 2 μl des Lysats mit 1 ml Bradford-Reagenz (Roti[®]-Quant, welches 1:5 mit Wasser verdünnt und über Filterpapier filtriert war) versetzt und gevortext. Die Proben wurden etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei

dienten 2 µl Kralewski-Lysispuffer mit 1 ml Bradford-Reagenz als Leerwert. Anschließend erfolgte die Messung in Küvetten im BioPhotometer über die Absorption bei 595 nm. Die erhaltenen Messwerte wurden mittels Loading-Calculator-Software umgerechnet in die aufzutragenden Volumina für 10 µg Protein. Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Zellysate wurde Roti[®]-Quant Bradford-Reagenz entsprechend der Herstelleranweisung benutzt.

4.4.3 Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld. Proteine sind negativ geladen. Leichte Proteine wandern in einem Gel schneller als schwere Proteine in Richtung der Anode. Das Lysat wurde in 4:1-Verdünnung mit SDS-Lämmli-Protein-Probenpuffer (960 µl 4 x Probenpuffer, 40 µl β-Mercaptoethanol; z. B. 2,5 µl für 10 µl Lysat) versetzt. Daraufhin wurden die Proben für 10 min bei 95 °C denaturiert, anschließend kurz für 1 min bei 4 °C abzentrifugiert und dann auf Eis abgekühlt und gelagert. Die Proben wurden in die Taschen des Sammelgels mittels einer Pipette mit speziellen dünnen Pipettenspitzen gefüllt, wobei zusätzlich ein Längenstandard als Marker am Rand des Gels in eine Tasche miteingefüllt wurde. Auswahl der Trenngele erfolgte nach Größe des zu charakterisierenden Zielproteins, zur exakten Zusammensetzung der Gele siehe Tabelle 25. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte im Laufpuffer bei angelegter Gleichspannung von 100 V konstant bei 350 Watt für ca. 1:45 h, bis die Lauffront etwa kurz vor Ende des Trenngels angekommen war.

4.4.4 Western-Blot

Im Western-Blot-Verfahren können die ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine Membran übertragen werden und auf dieser mittels Antikörpern spezifisch detektiert und somit sichtbar gemacht werden. Zunächst wird eine PVDF-Membran mit 10 ml Methanol aktiviert und danach mit 40 ml Transfer-

Puffer für 5 min auf dem Rotator äquilibriert. Es erfolgte ein Sandwich-Aufbau für das Blotting: 1 Schwamm, 3 Filterpapiere, 1 PVDF-Membran, 1 Gel, 3 Filterpapiere, 1 Schwamm. Diese Bestandteile werden in der Blotting-Apparatur fixiert. Die PVDF-Membran ist der Anode näher, das Polyacrylamid-Gel der Kathode näher zugewandt. Das Blotting erfolgt in Transferpuffer bei 350 mA konstant für 75 min bei in Eis gekühlter Apparatur. Daraufhin wurde die PVDF-Membran für 1 h mit 5 %-iger Milchpulverlösung in TBS-T blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen in TBS-T für jeweils 5 min. Danach wurde der primäre Antikörper, der gegen das gesuchte Zielprotein auf der Membran gerichtet war, in entsprechender Verdünnung zugegeben und über Nacht bei 5 °C im Kühlraum auf dem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran dreimal je 15 min lang in TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörper, welcher gegen den primären gerichtet und gleichzeitig mit HRP, einer sog. *Horseradish-peroxidase* gekoppelt war. Der Sekundärantikörper wurde bei Raumtemperatur für 1 h auf dem Rotator inkubiert. Die Membran wurde nun dreimal nacheinander in TBS-T gewaschen und abschließend vor der Detektion in TBS gelagert.

4.4.5 Detektion

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte am Detektionsgerät ChemiSmart TM 5100. Die Luminiszenzlösungen S1 und S2 wurden in gleichem Verhältnis, jeweils 1,5 ml, zur Membran hinzugegeben, nachdem TBS entfernt worden war. Es folgte ein manuelles Schwenken und die Membran wurde dann mit einer der Signalstärke der Chemiluminiszenz entsprechenden Zeit im Detektionsgerät exponiert. Die Auswertung erfolgte mittels ChemiCapt Software.

4.4.6 Immunpräzipitation

Das Methodenprinzip der Immunpräzipitation (IP) basiert auf der *in vitro*-Bindung eines spezifischen Antikörpers an sein Antigen und Kopplung dieses Antikörpers an einen Trägerstoff, wie z.B. Protein G-Sepharose *Beads*. Das Antigen wird durch Zentrifugationsschritte und Waschvorgänge zusammen mit etwaigen anderen, gebundenen Interaktionspartnern gereinigt und aufkonzentriert. Anschließend können die Interaktionspartner mittels SDS-PAGE und Immunoblot nachgewiesen werden. Das Protokoll der Immunpräzipitation wurde in unserem Labor durch Dr. M. Nossek etabliert. Für die Immunpräzipitation wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion geerntet. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS. Die Lyse wurde durch Zugabe von 500 µl 1 %-Triton IP-Lysispuffer und Herunterkratzen von den Kulturschalen durch einen Zellschaber mit anschließender Inkubation auf Eis für 45 min sowie darauf folgender Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C erreicht. Ein Volumen von 20 µl der Lysate wurde separat für spätere Untersuchungen bei -20 °C tiefgefroren. Die verbleibenden 480 µl wurden mit Hilfe des jeweiligen Antikörpers für entsprechenden Plasmid-*Tag* über Nacht bei 5 °C auf dem Rotator der Immunpräzipitation unterzogen. Dieser sog. *Pull-Down* wurde durch Zugabe von 3 µl des spezifischen Antikörpers gegen beispielsweise HA-FLNA, FLAG-MKL1 oder endogenes MKL1 und FLNA erreicht. Als Kontrolle wurden in beiden Versuchsaufbauten jeweils 20 µl des Überstandes bei -20 °C eingefroren und 480 µl (IP-Kontrollprobe) ohne Hinzugabe des FLNA-Antikörpers bzw. FLAG-Antikörpers über Nacht bei 5 °C auf dem Rotator belassen. Im weiteren Verlauf wurde diese Kontrollprobe auf exakt die gleiche Weise behandelt wie die eigentliche IP-Probe. Am Folgetag wurden ca. 60 µl Protein G-Sepharose *Beads*-Lösung pro zu behandelnder IP-Probe aufgenommen und zentrifugiert (12700 rpm, 4 °C, 1 min), der Überstand wurde verworfen und die Protein G-Sepharose *Beads* mit IP-Lysispuffer äquilibriert. Dreimal wurde daraufhin der Überstand verworfen, die Protein G-Sepharose *Beads* mit IP-Lysispuffer inkubiert und zentrifugiert (12700 rpm, 4 °C, 30 s). Nach dem letzten Waschvorgang wurden lediglich 100 µl IP-Lysispuffer zu den äquilibrierten Protein G-Sepharose *Beads* gegeben und diese nach kurzem Vortexen in die IP-Proben überführt. Für die Kopplung der Protein G-Sepharose *Beads* an den Fc-Teil der FLNA-Antikörper wurde die IP-Probe für mindestens 4 h bei 5 °C auf dem

Rotator belassen. Danach wurde die IP-Probe zentrifugiert (12700 rpm, 4 °C, 1 min) und der Überstand verworfen. Es schlossen sich vier Waschvorgänge mit je 500 µl IP-Waschpuffer (150 mM) an. In jedem dieser Waschvorgänge wurde die IP-Probe 10 Minuten lang bei 5 °C auf dem Rotator belassen, im Anschluss zentrifugiert (12700 rpm, 4 °C, 30 s) und die Überstände verworfen. Hiernach wurde der gesamte Überstand über den Protein G-Sepharose *Beads* entfernt, die IP-Probe mit 15 µl SDS-Ladepuffer (4x) versetzt, bei 95 °C im Heizblock 3 min lang denaturiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Im kritischen letzten Schritt der Co-IP wurde die IP-Probe zentrifugiert (12700 rpm, 4 °C, 1 min), der Überstand ohne die Protein G-Sepharose *Beads* in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde die IP-Probe erneut für 3 Minuten bei 95 °C im Heizblock erhitzt und mit dem unbehandelten Lysat - wie unter 4.4.3 beschrieben – auf einem 10 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf PVDF-Membranen übertragen und mit dem entsprechenden Antikörper immungeblottet.

4.5 Statistische Analysen

Außer anders angegeben, sind die Daten als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) gezeigt. Die statistische Analyse in zwei Gruppen wurde mit Hilfe des unverbundenen Students' t-Test durchgeführt. Die entsprechenden P-Werte sind * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung von Myoferlin als MKL1/2- und SRF-abhängiges Zielgen

Myoferlin konnte als reguliertes Zielgen von MKL1/2 auf der Basis unseres Microarray identifiziert werden und darüber hinaus wurde dessen Bedeutung durch signifikante Herunterregulation nach siMKL1/2-Behandlung im HCC sowie in Xenografts und dadurch bedingte Tumorregression hervorgehoben (149. *Hermanns, Hampl et al. 2017*). Die tumorentwicklungsbeflussende Rolle dieses Proteins im Mammakarzinom wurde durch eine kürzlich erschienene Studie belegt (127. *Turtoi, Blomme 2013*). Aus diesen Gründen fokussierte sich diese Arbeit u. a. auf die Regulation von Myoferlin in Mammakarzinom-Zellen und seine Effekte auf Signalwege, die entscheidende tumorbiologische Prozesse betreffen.

5.1.1 Induktion der Myoferlin-Expression nach Stimulation in Huh7-Zellen

Als einer der ersten Schritte auf dem Weg zur näheren Charakterisierung von Myoferlin stellte sich uns die Frage, ob Myoferlin über den RhoA-Aktin-MKL-Signalweg reguliert wird und welchen Einfluss hierbei verschiedene etablierte Stimulantien des SRF/MKL-Signalwegs auf die Expression des Proteins haben. Dies waren neben Serum die Lysophosphatidsäure (LPA), ein mitogener Bestandteil von Serum, welche an heptahelikale Rezeptoren, die ihrerseits an heterotrimere G-Proteine der G12/13-Familie gekoppelt sind, bindet, Cytochalasin D sowie Jasplakinolid. G12/13-Proteine veranlassen einen RhoA-Guaninaustauschfaktor (RhoA-GEF), RhoA in die GTP-gebundene, aktive Form zu überführen (150. *Kozasa, Jiang et al. 1998*). Zum einen wurden als etabliertes Zellmodell Huh7-Tumorzellen verwendet. In Relation zu Serum- und LPA-Gabe, war die Myoferlin-Induktion nach Stimulation mit Jasplakinolid in Huh7-Zellen schwächer, jedoch stärker als nach

Cytochalasin-D-Stimulation. Zum anderen wurde die Stimulierbarkeit der Myoferlin-Expression zusätzlich in MDA-MB-468-Tumorzellen untersucht (s. u.).

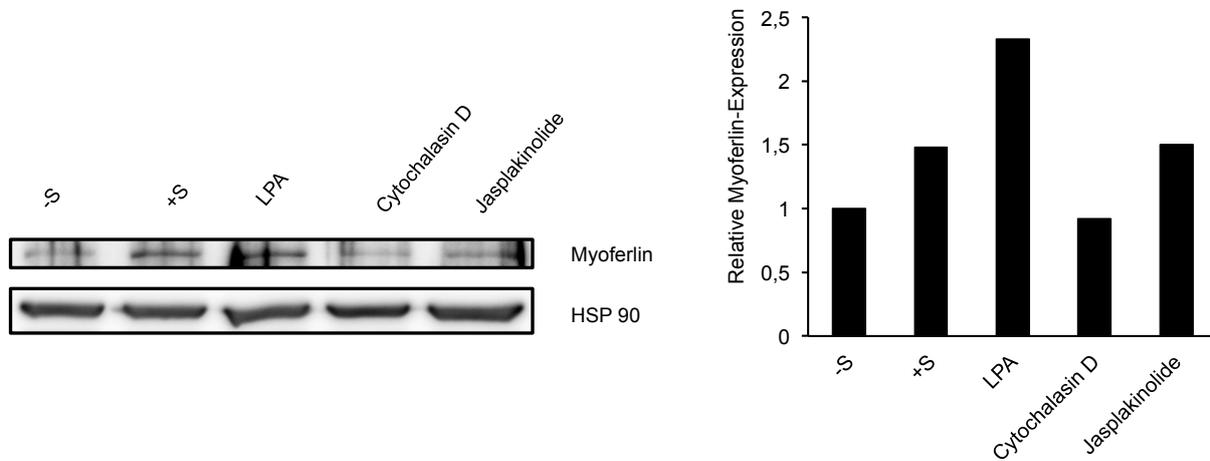


Abbildung 11: Stimulation der Expression von Myoferlin in Huh7-Zellen. Die für 16 h serumgehungenen Huh7-Zellen wurden mit 20 % Serum für 1 h stimuliert (+S), während die Kontrollgruppe unbehandelt blieb (-S). Die Gabe von 10 μ M LPA erfolgte für 2 h, von 2 μ M Cytochalasin D für 45 min und von 0,5 μ M Jasplakinolid für 2 h. Die Befundung der Myoferlin-Induktion wurde mittels Western-Blot durchgeführt. Die Expressionslevel des Proteins HSP90 zeigen jeweils gleiche Mengen an Proteinlysaten im Sinne einer Ladekontrolle an (n=1). Rechts: Quantifizierung der relativen Myoferlin-Expression bezogen auf HSP90 und normalisiert zur unbehandelten Kontrollgruppe.

5.1.2 Induktion der Myoferlin-Expression nach Stimulation in MDA-MB-468-Zellen

In MDA-MB-468-Mammakarzinom-Zellen als neuer Tumorentität wurde die Induktion von Myoferlin nach Stimulation analog wie in Huh7-Tumorzellen untersucht. Hierbei konnte ebenfalls beobachtet werden, dass alle benutzten Stimulantien die Myoferlin-Expression signifikant erhöhen. Durch die evidente Myoferlin-Induktion - wie im Blot Abbildung 12 sichtbar - schon nach alleiniger Serumgabe, ergab sich die weiterführende Frage nach der mechanistischen Verbindung der Serumgabe und der konsekutiven Expression von Myoferlin auf Proteinebene. Der bekannte Effekt von

SRF als zentralem Regulator auf transkriptioneller Ebene führte zum Postulat der SRF-Abhängigkeit von Myoferlin.

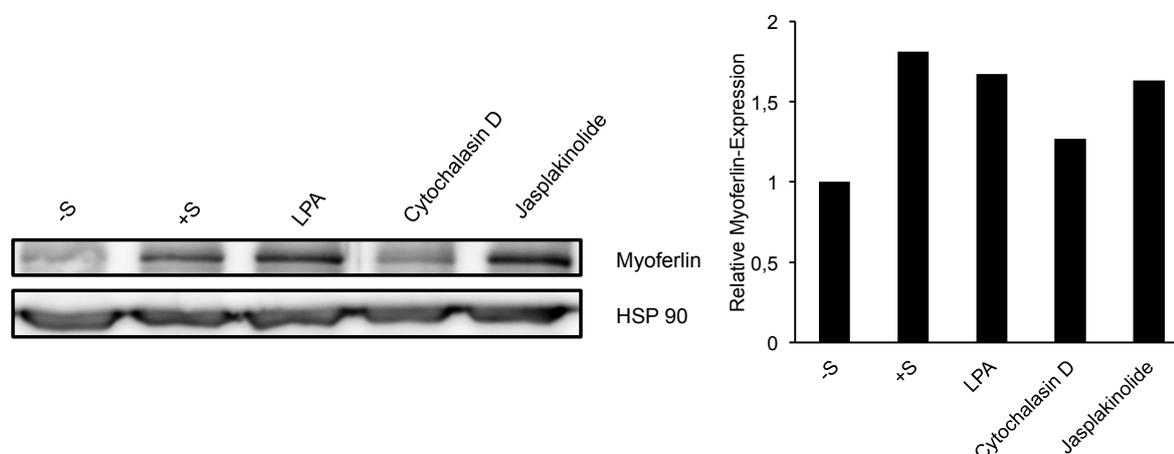


Abbildung 12: Stimulation der Expression von Myoferlin in MDA-MB-468 Zellen. Die für 16 h serumgehungenen MDA-MB-468-Zellen wurden mit 20 % Serum für 1 h stimuliert (+S), während die Kontrollgruppe unbehandelt blieb (-S). Die Gabe von 10 μ M LPA erfolgte für 2 h, von 2 μ M Cytochalsin D für 45 min und von 0,5 μ M Jasplakinolid für 2 h. Die Befundung der Myoferlin-Induktion wurde mittels Western-Blot durchgeführt. Die Expressionslevel des Proteins HSP90 zeigen jeweils gleiche Mengen an Proteinlysaten im Sinne einer Ladekontrolle an (n=1). Rechts: Quantifizierung der relativen Myoferlin-Expression bezogen auf HSP90 und normalisiert zur unbehandelten Kontrollgruppe.

5.1.3 Induktion des Myoferlin-Promotors im Luciferase-Assay

Um weitergehend die SRF-Abhängigkeit von Myoferlin auf Genebene zu untersuchen, wurde methodisch ein Versuchsdesign mit einem Luciferase-Assay gewählt, welcher die Genaktivität am Myoferlin-Promotor zu messen vermag. Auf diese Weise konnte durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante von SRF (SRF-VP16) der Einfluss auf die Aktivität eines 1543 bp langen Myoferlin-Promotorkonstrukts beurteilt und quantifiziert werden, ob SRF als transkriptioneller Regulator der Myoferlin-Expression agiert.

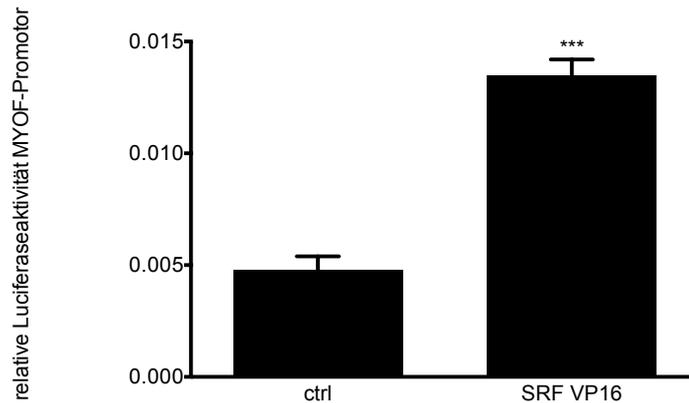


Abbildung 13: Relative Luciferaseaktivität am Myoferlin-Promotor. Die HEK-293T Zellen wurden jeweils mit einem 1543 bp Myoferlinpromotor transfiziert. Die Proben mit zusätzlicher Transfektion des konstitutiv aktiven SRF VP16 Plasmids zeigten eine signifikante Erhöhung mit dreifacher Induktion der Genaktivität am Myoferlin-Promotor. Gezeigt sind Mittelwerte, \pm SD (n=3); ***p < 0,001

Die Luciferaseaktivität am 1543 bp Myoferlinpromotor, welche eine signifikante dreifache Induktion der mit SRF transfizierten Probe zeigte, spricht für die direkte Abhängigkeit der Myoferlin-Expression von SRF mit Aktivität auf transkriptioneller Ebene. Dieser Befund untermauert die Hypothese der SRF-abhängigen Induktion von Myoferlin.

5.1.4 Filamin A-Abhängigkeit der Myoferlin-Expression

Nachdem wir kürzlich zeigen konnten, dass Filamin A mit MKL1 interagiert und auf diese Weise die transkriptionelle Aktivität von SRF reguliert, stellte sich uns zusätzlich die Frage nach dem Einfluss der Filamin-MKL1-Interaktion auf die Myoferlin-Expression (83. Kircher, Hermanns 2015).

5.1.4.1 Generierung eines MKL1-Deletionskonstrukts ohne FLNA-Bindfähigkeit

Zum ultimativen Beweis, dass die MKL1-FLNA-Interaktion für die Myoferlin-Expression benötigt wird, haben wir zunächst gentechnisch veränderte MKL1-Konstrukte mit einem FLAG-Tag durch *in vitro*-Mutagenese hergestellt und in A7-Melanomzellen exprimiert. Aus Vorbefunden konnte der Interaktionsbereich von MKL1 mit FLNA bereits eingeschränkt werden und es wurde postuliert, dass die AS $\Delta 301-342$ bedeutsam für die gegenseitige Wechselwirkung sein können. Dies konnte durch ein neuartiges Konstrukt von MKL1 $\Delta 301-342$, welches nicht fähig zur Bindung von FLNA war, bestätigt werden (83. Kircher, Hermanns 2015). In weiteren Versuchen konnte die Binderegion auf den AS-Bereich 301-310 eingengt werden.

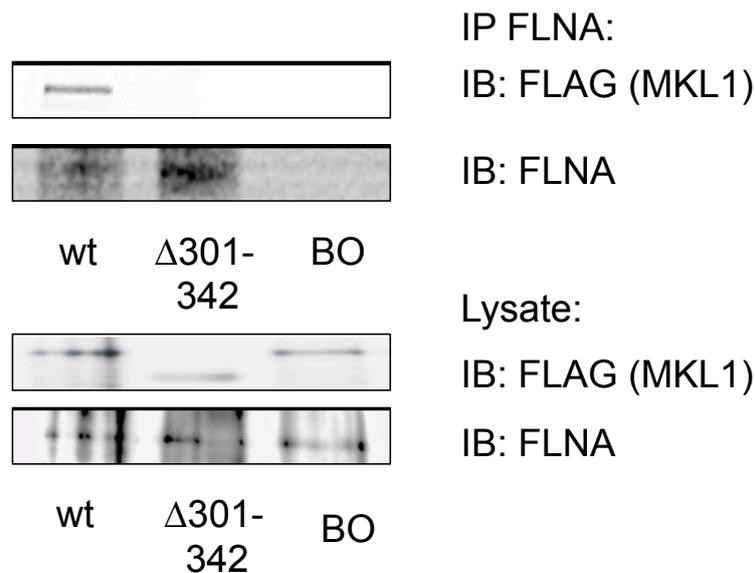


Abbildung 14: MKL1-Deletionskonstrukt ohne FLNA-Bindfähigkeit. A7-Tumorzellen wurden mit FLAG-Tag MKL1 bzw. mit der MKL1-Deletionsmutante transfiziert. Immunpräzipitate mit anti-FLNA-Antikörper wurden mit anti-FLNA oder anti-FLAG-Antikörpern auf einen Immunoblot aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle dienten A7-Zellen, die FLAG-Tag MKL1 exprimierten und mit Sepharose beads (BO) aber ohne Antikörper inkubiert wurden. Ein Teil der Zellysate (1/30) wurde auch direkt mit anti-FLNA und anti-FLAG-Antikörpern auf einen Immunoblot überführt. (Anmerkung: Versuchsdurchführung in Zusammenarbeit mit P. Kircher). Der Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

5.1.4.2 Einfluss eines FLNA-nicht-bindenden Deletionskonstrukts auf die Myoferlin-Expression

Durch die kürzlich erfolgte Charakterisierung von Filamin A als neuem Interaktionspartner von MKL1 konnte auch dessen Einfluss auf die Expression von bekannten MKL1-Zielgenen nachgewiesen werden (83. Kircher, Hermanns 2015). Entsprechend unseren Erwartungen zeigte die Transfektion einer MKL1-Deletionsmutante, welche Filamin A nicht binden kann, eine verringerte Expression der Myoferlin-mRNA.

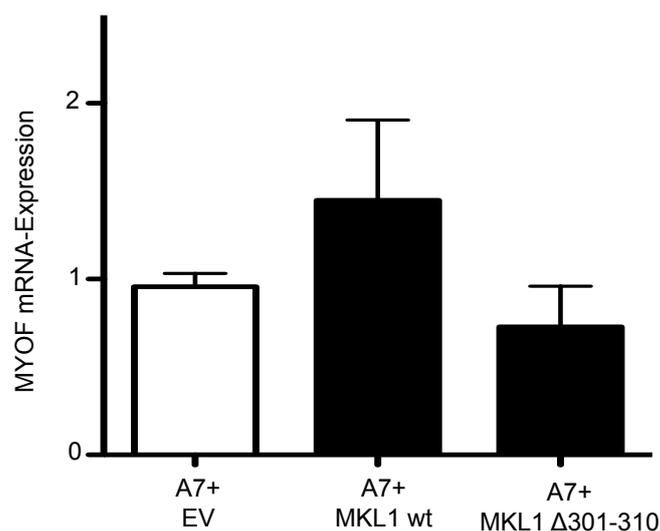


Abbildung 15: Einfluss des MKL1-Deletionskonstrukts Δ 301-310 auf die Myoferlin-Expression. Verringerung der Myoferlin-Expression nach Transfektion der MKL1-Mutante mit fehlender Filamin A-Bindfähigkeit. Die zelluläre Gesamt-RNA wurde aus A7-Zellen, die mit *Empty vector* (EV), MKL1 wt und MKL1 Δ 301-310 transfiziert wurden, isoliert. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR und MYOF-spezifischen Primern analysiert. Gezeigt ist die jeweils x-fache Änderung der MYOF-mRNA-Expression. Daten sind als Mittelwert, \pm SD (n=3); dargestellt. (Anmerkung: Versuchsdurchführung C. Hermanns)

5.2 Biologische Effekte von Myoferlin und seiner Coaktivatoren MKL1/2

5.2.1 Proliferationshemmung nach MKL1/2-Depletion

Als eines der wichtigsten Charakteristika von Tumorzellen gilt die gesteigerte Proliferationsrate. Im Proliferationsassay nach MKL1/2-Knockdown, welcher transient mittels siRNA-Transfektion der hepatozellulären Zelllinie Huh7 durchgeführt wurde, zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation der Tumorzellen.

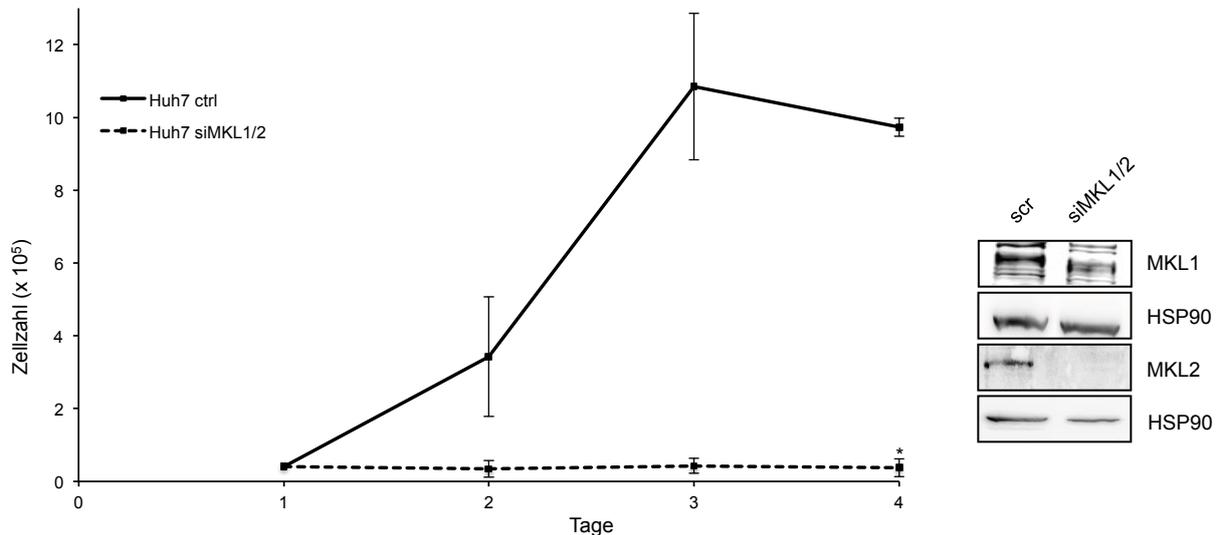


Abbildung 16: Hemmung der Proliferation nach MKL1/2-Depletion. Die Huh7-Zellen wurden kultiviert und anschließend mit siRNA gegen MKL1/2 behandelt bzw. siRNA scrambled als Kontrolle. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer an Tagen 1; 2; 3; 4; 5. Gezeigt sind Mittelwerte, \pm SD (n=3); *p < 0,05. (Anmerkung: Knockdown-Effizienz entnommen aus Hampl V. et al., 2013)

5.2.2 Proliferationshemmung nach Myoferlin-Depletion

Nachdem bereits die Depletion von MKL1/2 mittels siRNA die Proliferation der Tumorzellen gehemmt hat, sollte untersucht werden, ob dieser proliferationshemmende Effekt des MKL1/2-Knockdowns durch das MKL1/2-abhängige Zielgen Myoferlin vermittelt wird. In der Tat zeigte der shRNA-vermittelte Knockdown von Myoferlin im Proliferationsassay ebenfalls eine deutliche Wachstumshemmung der Zellen, was im Einklang mit der postulierten Hypothese steht.

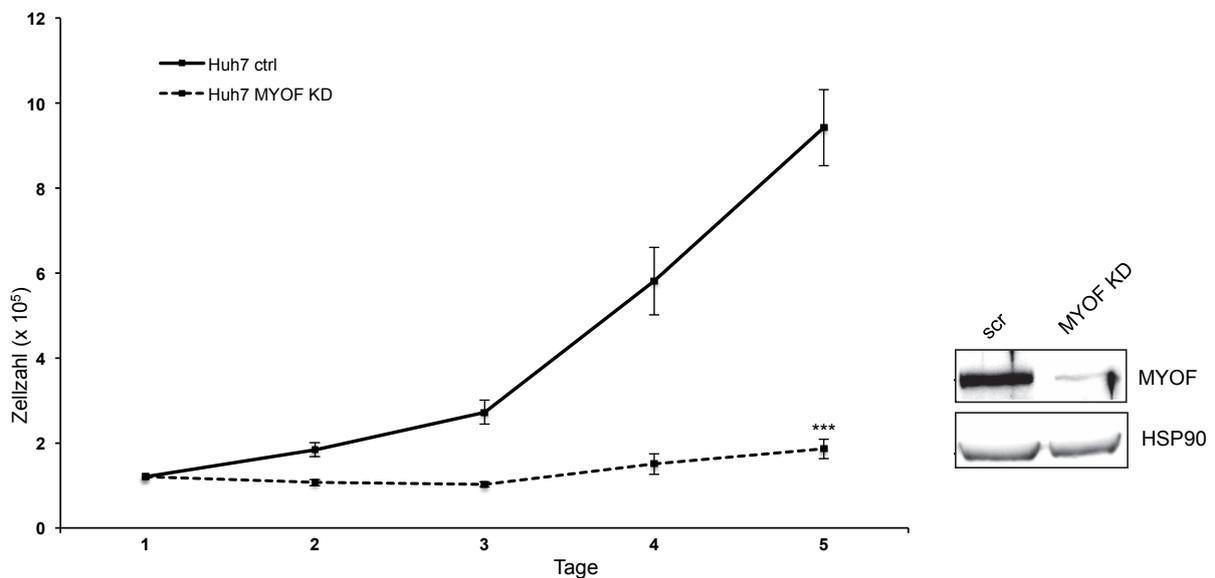


Abbildung 17: Hemmung der Proliferation nach Myoferlin-Depletion. Die Zellen wurden kultiviert und anschließend mit shRNA gegen MYOF bzw. Kontroll-shRNA behandelt. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer an Tagen 1; 2; 3; 4; 5. Gezeigt sind Mittelwerte, \pm SD (n=3); ***p < 0,001. (Anmerkung: Versuchsdurchführung C. Hermanns)

5.2.3 Einfluss der Myoferlin-Depletion auf den EGFR-Signalweg

In einer kürzlich erschienenen Publikation von Turtoi und Kollegen konnte gezeigt werden, dass Myoferlin die Degradation des EGF-Rezeptors (EGFR) beeinflusst, indem es die Phosphorylierung und Aktivierung des EGFR kontrolliert, und dessen Depletion Tumoreigenschaften, wie z. B. die Proliferation von MDA-MB-468-Zellen, wesentlich einschränkt (127. *Turtoi, Blomme 2013*). Wir haben deshalb untersucht, ob die in 5.2.2 beobachtete antiproliferative Wirkung der Myoferlin-Depletion ebenfalls mit einer Phosphorylierung des EGFR einhergeht.

5.2.3.1 Aktivierung von EGFR nach Myoferlin-Depletion

In der Tat zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung des EGFR am Tyrosinrest Y1173. Als Kontrolle diente der Expressionsstatus des totalen EGFR, welcher konstant blieb. Nachdem Myoferlin als MKL1/2-abhängiges Zielgen nach Depletion den weiter oben beschriebenen Proliferationsarrest zeigte, stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung des EGFR die Phosphorylierung des MAP-Kinasen-Signalwegs verursacht und in Folge onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) triggert, welche schon nach MKL1/2-Knockdown beobachtet worden war (60. *Hampf, Martin 2013*). Daher fokussierten sich die weiteren Untersuchungen auf essentielle Bestandteile des Signalwegs der OIS in Mammakarzinom-Zellen.

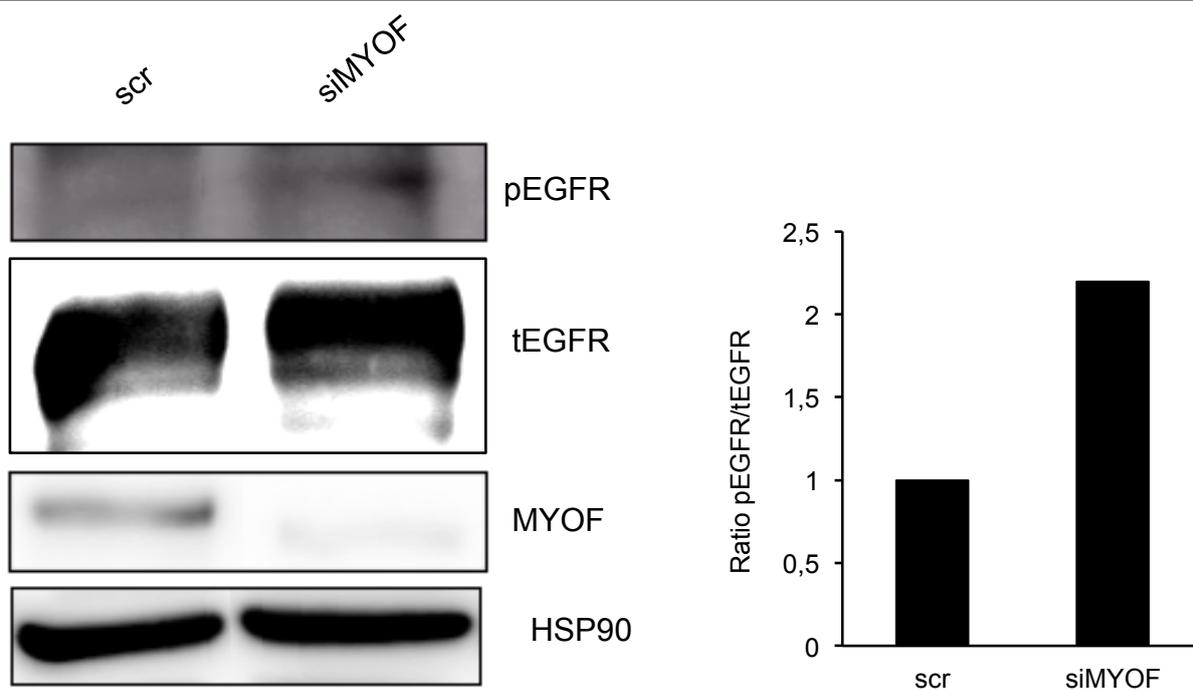


Abbildung 18: Phosphorylierung von EGFR nach Myoferlin-Knockdown. Die MDA-MB-468-Zellen wurden mit siRNA, welche gegen Myoferlin gerichtet war und scrambled-siRNA als Kontrolle (für 48h) transfiziert. Dadurch wurde ein transienter Knockdown erzielt. Nach Lyse der Zellen und Aufreinigung mit Krawski-Puffer wurden die Lysate auf ein 5%-iges Gel aufgetragen. Zur Detektion wurden als Primärantikörper anti-pEGFR (pTyr1173), anti-tEGFR, anti-MYOF herangezogen. Als Ladekontrolle zum Nachweis des Auftragens jeweils gleicher Lysatmengen dienten die Expressionslevel des Proteins HSP90 (n=1). Rechts: Quantifizierung der Ratio von pEGFR versus tEGFR, normalisiert zur Kontrolle scr.

5.2.3.2 Aktivierung von ERK nach Myoferlin-Depletion

Als weiteres *Read-Out downstream* des EGFR im Ras-Raf-MAP-ERK-Signalweg wurden die MAP-Kinasen, ERK1/2, ausgewählt und näher untersucht. Es stellte sich hierbei die Frage nach einer subsequenter Aktivierung von ERK1/2, da schon EGFR eine Überaktivierung nach Myoferlin-Knockdown zeigte. Im Western-Blot der in Abbildung 19 aufgetragenen Zelllysate konnte eine deutliche Zunahme der phosphorylierten Form von ERK 1/2 am Tyrosinrest T202/Y204 vorgefunden werden. Dieser Befund entspricht einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2.

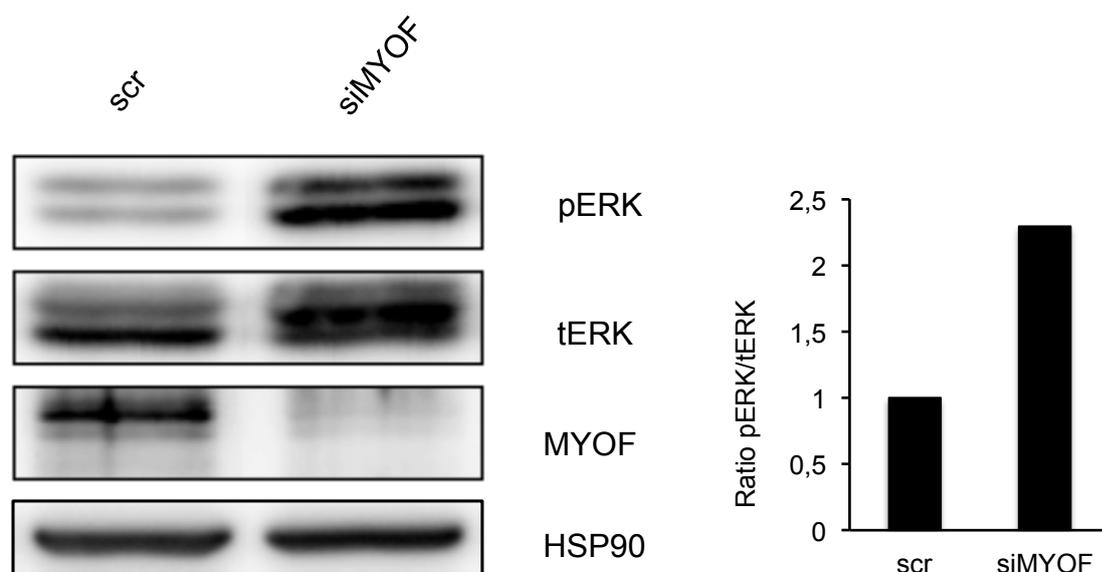


Abbildung 19: Phosphorylierung von ERK nach Myoferlin-Knockdown. Die MDA-MB-468-Zellen wurden mit siRNA, welche gegen Myoferlin gerichtet war und scrambled-siRNA als Kontrolle (für 48h) transfiziert. Dadurch wurde ein transienter Knockdown erzielt. Nach Lyse der Zellen und Aufreinigung durch Kralowski-Puffer wurden die Lysate auf ein 10%-iges Gel aufgetragen. Zur Detektion wurden als Primärantikörper anti-pERK-T202/Y204, anti-tERK, anti-MYOF herangezogen. Als Ladekontrolle zum Nachweis des Auftrags jeweils gleicher Lysatmengen dienen die Expressionslevel des Proteins HSP90 (n=1). Rechts: Quantifizierung der Ratio von pERK versus tERK, normalisiert zur Kontrolle scr.

5.2.4 Seneszenz

Um den Phänotyp der Seneszenz nachzuweisen und ob Aktivierung des MAP-Kinasen-Signalwegs in OIS resultiert, wurde die β -Galactosidasefärbung herangezogen, die als spezifischer Nachweis seneszenter Zellen gilt.

5.2.4.1 Seneszenz nach MKL1/2-Knockdown

Wie kürzlich von unserer Gruppe gezeigt werden konnte, führte eine MKL1/2-Depletion zu Proliferationshemmung und zu Onkogen-induzierter Seneszenz, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (60. Hampl, Martin 2013). Dieser Befund konnte in MDA-MB-468-Zellen, einer Mammakarzinom-Zelllinie, als neuer Tumorentität reproduziert werden, siehe Abbildung 20. Die MKL1/2-depletierten Tumorzellen zeigten den

typisch seneszenten Phänotyp mit abgeflachter Zellmorphologie und blauer Anfärbung.

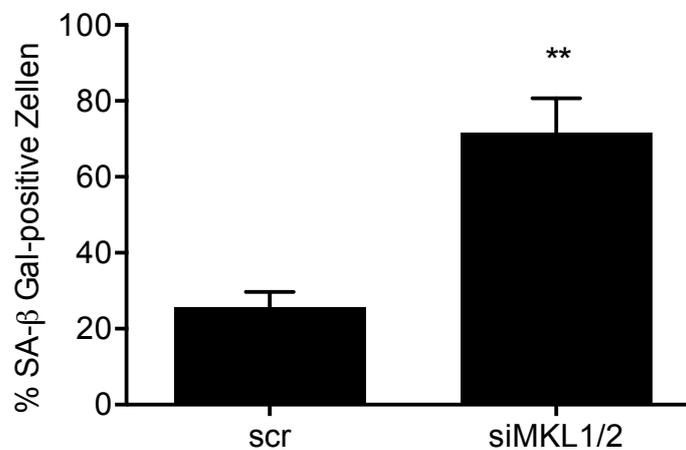


Abbildung 20: β-Galaktosidaseaktivität nach MKL1/2-Depletion. Die MDA-MB-468 Zellen wurden mit siRNA gegen MKL1/2 und scrambled als Kontrolle transfiziert und nach Herstellerangaben gefärbt, um seneszenzassoziierte β-Galactosidase Aktivität sichtbar zu machen. Die Zahl der SA-β-Gal positiven Zellen wurde gezählt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD (n=3); **p < 0,01.

5.2.4.2 Seneszenz nach Myoferlin-Knockdown

Daraus hervorgehend stellte sich die Frage, ob Myoferlin als MKL1/2-abhängiges Zielgen auch einen Einfluss auf Seneszenz besitzt, respektive, ob Myoferlin-Depletion zum seneszenten Phänotyp führen kann.

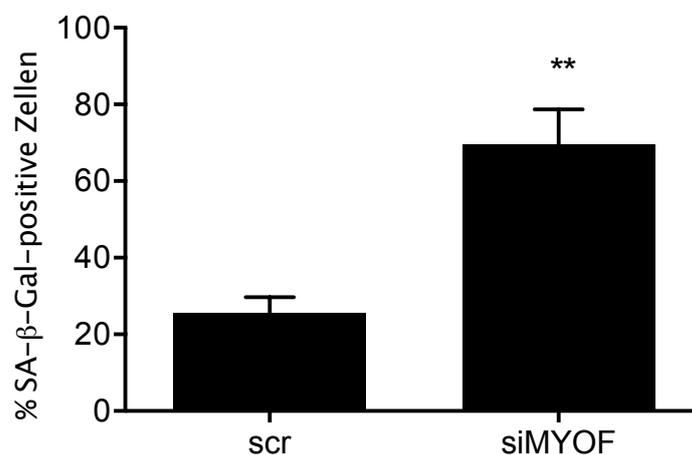


Abbildung 21: β-Galaktosidaseaktivität nach Myoferlin-Depletion. Die MDA-MB-468 Zellen wurden mit siRNA gegen MYOF und scrambled als Kontrolle transfiziert und nach Herstellerangaben gefärbt, um seneszenzassoziierte β-Galactosidase-Aktivität sichtbar zu machen. Die Zahl der SA-β-Gal positiven Zellen wurde gezählt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD (n=3); **p<0,01.

Nachdem die Bedeutung von Myoferlin als MKL1/2-abhängiges Zielgen und der Effekt der Myoferlindepletion auf Tumorzellproliferation und EGFR-MAPK-Signalweg auf den Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz hindeuteten, war es daher unsere weitere Intention zu untersuchen, ob Myoferlin-Depletion zu einem seneszenten Phänotyp führt. Diese Hypothese konnte mittels transientem siRNA-Knockdown durch den SA-β-Galactosidase-Assay bestätigt werden. Die myoferlindepletierten Zellen erschienen im Lichtmikroskop morphologisch abgeflacht, mit zellulären Ausläufern und typisch blauer Anfärbung. Die Quantifizierung legte dar, dass Herunterregulierung der Expression von Myoferlin die Zahl der SA-β-Gal positiven Zellen stark erhöhte. Somit konnte gezeigt werden, dass die Myoferlin-Depletion zur Seneszenzinduktion im Mammakarzinom-Modell führt.

6 Diskussion

6.1 Induktion der Myoferlin-Expression nach Stimulation mit SRF- und Aktin-interagierenden Substanzen

Krebs ist laut WHO neben kardiovaskulären Erkrankungen eine der zwei häufigsten Todesursachen der Menschen. Das hepatozelluläre Karzinom repräsentiert den zweithäufigsten Grund für krebsbedingte Todesursachen weltweit und das Mammakarzinom steht für die häufigste Todesursache bei Frauen (151. *Ferlay, Soerjomataram et al. 2015*, 152. *Jemal, Bray et al. 2011*). MKL1/2 und SRF spielen als transkriptionelle Regulationspartner eine wichtige Rolle in der Tumorgenese des hepatozellulären Karzinoms (153. *Bae, Noh et al. 2014*, 154. *Kwon, Kim et al. 2010*). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in Vorarbeiten zeigen, dass eine MKL1/2-Depletion das Wachstum des HCC sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmt (60. *Hampfl, Martin 2013*). Mäuse mit konstitutiv aktiver SRF-Expression in Hepatozyten zeigten die Entwicklung hyperproliferativer Noduli, welche zu hepatozellulären Karzinomen führen (37. *Ohrnberger, Thavamani 2015*). Daneben wurde eine erhöhte SRF-Expression in hochgradigem humanen hepatozellulären Karzinom berichtet (155. *Bai, Nasser et al. 2009*, 156. *Park, Kim et al. 2007*). Vorarbeiten in der AG Mühlich auf der Basis einer Microarray-Untersuchung zu MKL-Zielgenen mit potentielltem Einfluss auf das HCC-Wachstum in mittels shRNA stabil MKL1/2-depletierten Huh7-HCC-Zellen wurden durchgeführt, um weitere mechanistische Einsichten zu erhalten und die Gründe für den bekannten Wachstumsarrest nach SRF- bzw. MKL1/2-Knockdown besser zu verstehen. Neben den bekannten Zielgenen wurden neue identifiziert, deren Expression um mindestens den Faktor 2,5 im Vergleich zu Kontrollzellen lag. Unter diesen Zielgenen war auch Myoferlin. Die Daten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) zeigten, dass Myoferlin dasjenige Zielgen unter den übrigen mit der höchsten gemeinsamen Koexpression von MKL1 und MKL2 ist (157. *Gao, Aksoy et al. 2013*). Diese seit Kurzem bekannte und noch nicht weiter charakterisierte Rolle von Myoferlin führte zur Fokussierung auf dieses Protein. Weitere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen zudem die Relevanz von Myoferlin im Mammakarzinom (122. *Amatschek, Koenig 2004*, 123.

Adam, Boyd 2003). Die Gruppe von Turtoi et al. konnte aufzeigen, dass das Transmembranprotein die Tumorentwicklung im Mammakarzinom-Modell beeinflusst (*127. Turtoi, Blomme 2013*). Die Frage, die sich uns zunächst stellte, war, ob an der Regulation von Myoferlin der RhoA-Aktin-MKL-Signalweg beteiligt ist. Es ist bekannt, dass MKL-abhängige SRF-Zielgene bzw. deren Promotor auf Rho-Aktivatoren wie Serum und Lysophosphatidsäure (LPA), welche selbst ein Serumbestandteil ist, responsiv sind (*41. Miralles, Posern 2003, 52. Vartiainen, Guettler 2007*). Nach Stimulation mit diesen Agenzien wird MKL1/2 aus einem repressiven, cytoplasmatischen Komplex, in welchem es G-Aktin gebunden hat, entlassen und kann daraufhin nukleär translozieren und die SRF-abhängige Transkription vorantreiben. Bei Cytochalasin D als einer in vorliegender Arbeit verwendeten aktinbindenden Substanz handelt es sich um ein Alkaloid aus Pilzen, das die weitere Polymerisierung von F-Aktin hemmt, indem es an das Plus-Ende bindet. F-Aktin kann daraufhin kontinuierlich von seinem Minus-Ende depolymerisiert werden (*158. Wakatsuki, Schwab et al. 2001*). Zudem trennt Cytochalasin D den MKL1-G-Aktin-Komplex auf, was zur nukleären Translokation und Aktivierung von MKL1 führt (*41. Miralles, Posern 2003, 159. Muehlich, Rehm et al. 2017*). Muehlich et al. haben bereits gezeigt, dass Cytochalasin D stimulierend auf CTGF-Expression über verstärkt nukleäre Lokalisation von MKL1 wirkt (*159. Muehlich, Rehm 2017*). In vorliegender Induktions-Studie in Huh7- und MDA-MB-468-Zellen war nur eine relativ schwächere Zunahme der Myoferlin-Expression nach Cytochalasin D-Gabe zu erkennen. Auch Hermanns et al. haben keine potente SRF- oder MKL-Zielgen-Induktion nach Cytochalasin D-Behandlung in Huh7-Zellen beobachtet, denn diesen Zelllinien ist mit MDA-MB-468-Zellen gemeinsam, dass sie selbst in unstimuliertem Zustand bereits konstitutiv nukleäres MKL1 besitzen. Medjkane und Kollegen haben gezeigt, dass MKL1 in unstimulierten MDA-MB-231-Mammakarzinom-Zellen konstitutiv nukleär lokalisiert ist und eine Cytochalasin D-Stimulation von SRF-Reporter-Genen weniger wirksam ist als in B16F2-Melanom-Zellen, welche zytoplasmatisches MKL1 in unstimuliertem Zustand enthalten. (*61. Medjkane, Perez-Sanchez 2009*). Man kann aus diesen Ergebnissen schließen, dass Cytochalasin D spezifisch bezüglich der subzellulären MKL1-Lokalisation wirkt. Welchen Einfluss Filamin A, der neue Interaktionspartner von MKL1 auf diese komplexen Interaktionen zwischen RhoA- und aktinmetabolismusagierenden Substanzen hat, muss noch weiter untersucht werden. Jasplakinolid, das zweite direkt aktinbindende Agens,

welches in vorliegender Arbeit verwendet wurde, ist ein zyklisches Peptid, das aus dem marinen Schwamm *Jaspis johnstoni* und Phalloidin, dem Toxin des Knollenblätterpilzes, besteht und sich zwischen den Untereinheiten des filamentären F-Aktins einlagert, die filamentäre Struktur verstärkt und die Depolymerisierung verhindert (160. *Bubb, Senderowicz et al. 1994*). In Konsequenz wirkt es wie LPA bzw. Serum, nämlich aktinpolymerisierungsfördernd. Dessen Wirkung konnte, ähnlich wie an anderen *Immediate Early Genes*, beispielsweise CTGF, gezeigt werden (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Neben diesem Befund in Huh7 hepatozellulären Karzinomzellen konnte die Induktion von Myoferlin zum ersten Mal auch in einer weiteren, neuen Tumorentität, dem Mammakarzinom, im Zellmodell der MDA-MB-468-Zellen gezeigt werden. Dies untermauert die Bedeutung Myoferlins und seiner Aktivierbarkeit auf der RhoA-Aktin-MKL-Signalachse und spricht für einen Mechanismus, der nicht auf eine einzige Zell- bzw. Tumorgewebeart beschränkt ist. Diese Befunde sind konsistent mit bereits publizierten Daten, die die Gemeinsamkeiten der DLC1-defizienten Zelllinien Huh7 und MDA-MB-468 hervorheben, wonach MKL1 in einem aktivierten Zustand intranukleär SRF-Zielgene, und nun auch das neue Zielgen Myoferlin, regulieren kann (59. *Muehlich, Hampl 2012*).

6.2 Genaktivierung am Myoferlin-Promotor durch SRF

Zur weiteren Charakterisierung von Myoferlin und seiner Abhängigkeiten untersuchten wir auf Genebene den Einfluss von SRF auf Myoferlin. Durch Messung der Luciferase-Aktivität konnte zum ersten Mal der von uns postulierte Einfluss von SRF an einem 1543 bp langen Myoferlinpromotorkonstrukt gezeigt werden und nachgewiesen werden, dass die Expression von Myoferlin unter transkriptioneller Kontrolle von SRF steht. Myoferlin wird direkt durch SRF aktiviert. Hierbei wurde quantifiziert, wie stark sich die Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante von SRF (SRF-VP16) auf die Aktivität des Myoferlin-Promotors auswirkt. Das Ergebnis steht im Einklang mit Daten unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass zum einen SRF-Depletion zu stark reduzierter Myoferlin-Expression führt und dass zum anderen durch konstitutiv aktives SRF-VP16 an einem kürzeren, 200 bp langen Myoferlin-

Promotordeletionskonstrukt, welches die CArG-Box nicht enthält, eine signifikante Induktion nicht stattfinden kann (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Die biologische Bedeutung eines solchen konstitutiv aktiven SRF-VP16-Genotyps *in vivo* berichtete die Gruppe um Ohrnberger und Kollegen. In einem murinen Modell in Hepatozyten bildeten sich im Gewebeverband hyperproliferative Noduli, welche mit Progredienz zu hepatozellulären Karzinomen führten. Erhöhte Expression von IEG wurde bereits bei Entstehung der Noduliformation beobachtet. Dort konnte am Beispiel des HCC verdeutlicht werden, dass SRF-Überexpression und dessen Zielgene die Formation und Progression des Tumors fördert (37. *Ohrnberger, Thavamani 2015*).

6.3 Effekt von Filamin A auf die Myoferlin-Expression

Filamin A, als F-Aktin-bindendes Protein, konnte durch unsere Arbeiten als neues MKL1-regulierendes Protein eingeordnet werden (83. *Kircher, Hermanns 2015*). Filamin A verhindert die Phosphorylierung von MKL1 und hält es auf diese Weise zurück im Zellkern. Mechanistisch steht der MKL1-Filamin A-Komplex dem repressiven MKL1-G-Aktin-Komplex gegenüber. Mittels gezielter Deletionen konnten wir diejenige MKL1-Mutante identifizieren, welche nicht an Filamin A bindet und so die Bindestelle von MKL1 an Filamin A lokalisieren. Diese befindet sich zwischen den AS 301 bis 342 bzw. AS 301-310. In unseren Experimenten vermochten diese Deletionskonstrukte von MKL1 in der Immunpräzipitation nicht an FLNA zu binden. Die Interaktion zwischen Filamin A und MKL1 stellte sich darüber hinaus als bedeutsam für die Expression von MKL1-Zielgenen heraus. Aus Expressionsstudien unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass bei Filamin A-Absenz die Expression von MKL1-Zielgenen wie z. B. SRF, CTGF, SM22 und ITGA5 stark reduziert ist (83. *Kircher, Hermanns 2015*). Diese Befunde, welche wir in verschiedenen (Tumor-)zellarten wie Huh7, HepG2, MDA-MB-468 und NIH-3T3 erheben konnten, sprechen für die weitgehende Bedeutung dieses Interaktionspartners im Rahmen der transkriptionellen Regulation im MKL1-SRF-System. Die Interaktion zwischen MKL1 und Filamin A konnte bereits in Vorarbeiten unserer Gruppe dahingehend charakterisiert werden, dass eine MKL1-Mutante, MKL1 N100, welche monomeres

G-Aktin nicht zu binden vermag, in Zellen eingeführt wurde und bei Nichtvorhandensein von FLNA die Aktivität der Mutante eingeschränkt wurde. Um die Bedeutung der MKL1-FLNA-Interaktion für die MKL1-Zielgenexpression noch weiter zu untersuchen, haben wir überprüft, ob auch die Einführung von o. g. MKL1-Mutanten ($\Delta 301-342$), welche FLNA nicht binden, auch die Transkription von MKL1-Zielgenen behindert. Tatsächlich war die Expression von SM22- und CTGF-mRNA signifikant reduziert (83. Kircher, Hermanns 2015). Die Deletionsmutante MKL1 $\Delta 301-310$ zeigte eine Reduktion der Myoferlin-mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtyp-MKL1. Der Einfluss der Mutante MKL1 $\Delta 301-342$ auf die Myoferlin-Expression unterliegt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch der weiteren experimentellen Untersuchung. Methodisch ist grundsätzlich die Transfektionseffizienz durch Überexpression von Genen zu berücksichtigen, welche potentielle Befundvarianzen erklärt. Insgesamt konnten wir zeigen, dass die Interaktion zwischen FLNA und MKL1 für die transkriptionelle Aktivität von MKL1/SRF und die Expression einer Vielzahl von MKL1-Zielgenen inklusive Myoferlin benötigt wird. Die weitergehende Frage nach dem genauen signalgebenden Mechanismus von F-Aktin auf die transkriptionelle Aktivität von MKL1/SRF muss näher untersucht werden.

6.4 Hemmung der Tumorzellproliferation nach MKL1/2-Depletion

In vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits geklärt, dass in Huh7-Zellen durch den Verlust des Tumorsuppressors DLC1 der Transkriptionsfaktor MKL1 konstitutiv nukleär akkumuliert und die Proliferation der Zellen bei Erhöhung des Ki-67-Wertes zunimmt (59. Muehlich, Hampl 2012, 100. Xue, Krasnitz 2008). Ki-67 gilt als Korrelat der Zellproliferation und dient als Biomarker in der Diagnostik von Tumorerkrankungen. Die Nomenklatur des Proteins geht zurück auf den Antikörper, der aus dem 67. Klon im Versuchsansatz einer 96-well-Platte in der Stadt Kiel isoliert wurde (161. Scholzen, Gerdes 2000). Auf der Basis der bekannten Vorbefunde stellte sich uns die Frage, welche Rolle die MKL1/2-Expression auf die Proliferation von Karzinomzellen besitzt. Wir konnten

zeigen, dass ein durch siRNA-Behandlung vermittelter Knockdown von MKL1/2 die Proliferation von hepatozellulären Karzinomzellen signifikant reduziert. Medjkane et al. haben hervorgehoben, dass MKL1/2-Depletion die Zelladhäsion, Invasivität und Motilität - Voraussetzungen für die Metastasierung von Tumoren - einschränkt, jedoch nicht die Proliferation beeinflusst oder Apoptose induziert. Dies könnte daran liegen, dass Zelllinien verwendet wurden, bei welchen kein konstitutiv nukleäres MKL1/2 vorhanden ist (61. *Medjkane, Perez-Sanchez 2009*). So war es auch der Fall bei den in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Zellen mit vorhandener DLC1-Expression, wie z. B. HepG2-Zellen, in denen die MKL1/2-Depletion ebenfalls keinen antiproliferativen Effekt hatte (60. *HAMPL, Martin 2013*). Im Gegensatz hierzu steht die Arbeit von Descot et al. mit ihren Ergebnissen, die mit Überexpression von MKL1 in humanen Fibroblasten einen starken antiproliferativen Effekt erreichten (162. *Descot, Hoffmann et al. 2009*). Es wurde desweiteren über MKL1/2-Einfluss auf Migration dergestalt berichtet, dass MKL1/2-Knockdown in Fibroblasten promigratorisch wirkt (163. *Leitner, Shaposhnikov et al. 2011*). Synoptisch ist daher eine zelltypspezifische Regulation anzunehmen respektive stellt der antiproliferative Funktionsaspekt von MKL1/2 eine Summe mehrerer Faktoren dar. Wir konnten zeigen, dass die Depletion des übergeordneten transkriptionellen Regulators MKL1/2 zur Proliferationsinhibition in DLC1-defizienten Tumorzellen führt. Die antitumorale Wirkung eines therapeutischen MKL1/2-Knockdowns haben zum ersten Mal HAMPL und Kollegen *in vivo* mittels PEI-komplexierter siRNA-Behandlung dargestellt (60. *HAMPL, Martin 2013*).

6.5 Hemmung der Tumorzellproliferation nach Myoferlin-Depletion

Um Myoferlin als MKL1/2-abhängiges Zielgen funktionell näher zu charakterisieren, war ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit den Einfluss von Myoferlin auf die Tumorzellproliferation zu untersuchen. Noch vor allen anderen Tumorzelleigenschaften ist die Proliferation der Zellen als Grundvoraussetzung für das Ent- und Bestehen eines Tumors anzusehen (164. Hanahan, Weinberg 2011). Vor dem Hintergrund obiger Befunde der Proliferationshemmung nach MKL1/2-Depletion erschien es naheliegend auch die Auswirkungen einer Myoferlin-Depletion in einem Proliferationsassay darzustellen. Hierbei gelang unserer Gruppe der erste Nachweis davon, dass Myoferlin die Proliferation von Huh7-Tumorzellen beeinflusst. Die Proliferation dieser Tumorzellen war nach Myoferlin-Knockdown stark reduziert. Im näheren Zusammenhang mit kürzlich publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe untermauert dieser *in vitro*-Befund die *in vivo*-Bedeutung, welche Myoferlin-Expression in humanen HCC-Patientenproben besitzt. Die dort gezeigte, signifikant erhöhte Myoferlinimmunreaktivität akzentuiert deutlich die Rolle von Myoferlin in der Hepatokarzinogenese (149. Hermanns, Hampl 2017). Im selben Sinne wurde im Mammakarzinom bereits gezeigt, dass Depletion von Myoferlin die Invasivität der Zellen einschränkt (121. Eisenberg, Kim 2011). Li et al. sahen, dass shRNA-vermittelte Myoferlin-Depletion in Brustkrebszellen zu mesenchymal-epithelialer Transition (MET) mit Herunterregulation mesenchymaler zellulärer Marker wie z. B. Vimentin oder Fibronectin und Hochregulation epithelialer Marker, wie z. B. E-Cadherin führt und die Invasivität ebenfalls signifikant einschränkte; hierbei konnten sie die reduzierte Expression einer Vielzahl an Matrixmetallo-Proteinasen feststellen, welche im Rahmen der Invasion und Metastasierung zur Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix stromal sezerniert werden (165. Li, Ackerman et al. 2012). Leung und Kollegen haben darüber hinausgehend in einem murinen Lungenkrebsmodell gefunden, dass Myoferlin-Herunterregulation ebenfalls die Tumorzellproliferation reduziert (124. Leung, Yu 2013). Turtoi et al. beobachteten, dass Myoferlin-Depletion EGF-induzierte Zellmigration und epithelial-mesenchymale Transition (EMT) blockierte. In einem Xenograftmodell von humanem Brustkrebs führte Myoferlin-Depletion zu reduzierter Tumorentwicklung (127. Turtoi, Blomme 2013). Die antitumorigene Wirkung der Myoferlin-Depletion konnte durch

unsere weitergehenden Befunde untermauert werden, wonach Myoferlin-Knockdown in Huh7-Zellen in Soft Agar ein *anchorage-independent* Wachstum reduziert und auch die Invasion im Invasionsassay eingeschränkt war (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Zusammengefasst zeigt sich konsistent mit der Literatur der tumorwachstumshemmende Effekt der Myoferlin-Depletion in Tumorzellen.

6.6 Aktivierung des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion

Über die Beteiligung von Myoferlin an der Funktion und Stabilität der Rezeptor-Tyrosinkinasen wurde in der Literatur berichtet. Bernatchez und Kollegen konnten zeigen, dass Myoferlinentzug in vaskulären Endothelzellen zu Instabilität und schneller Degradation des *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR-2) führt (119. *Bernatchez, Acevedo 2007*). Zusätzlich brachten Untersuchungen in Endothelzellen hervor, dass die Expression eines weiteren Tyrosinkinase-Rezeptors, Tie-2, nach Myoferlin-Depletion attenuiert ist (120. *Yu, Sharma 2011*). Die Arbeitsgruppe um Demonbreun und Kollegen wies darauf hin, dass Myoferlin-Knockout in murinem Muskel in einer verminderten Antwort des *Insulin-Growth-Factor-1 Receptor* (IGFR) resultierte und zu Akkumulation der Rezeptoren in Vesikeln führte, welche vorbereitet zur Degradation, waren (115. *Demonbreun, Posey 2010*). Gemäß einer weiteren, vor kurzer Zeit veröffentlichten und für unsere Untersuchungen maßgeblichen Studie von Turtoi et al. wurde beschrieben, dass Myoferlin die Degradation des EGF-Rezeptors kontrolliert (127. *Turtoi, Blomme 2013*). Konsistent damit sind die vorliegenden Befunde nach Myoferlin-Knockdown in MDA-MB-468-Mammakarzinom-Zellen, welche eine Hyperphosphorylierung am EGF-Rezeptor, dort am Tyrosinrest Y1173 als Aktivitätsparameter, zeigen. Wir konnten dieses Phänomen der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion auch in hepatozellulären Karzinomzellen beobachten. Konsistent damit sahen wir erhöhte Phosphorylierung am Tyrosinrest Y1173 in MKL1/2-depletierten HCC-Zellen (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Zusammen mit Hermanns et al. hat unsere Arbeitsgruppe belegt, dass die EGFR-Phosphorylierung ein reversibler Prozess ist, denn diese konnte in Huh7-MKL1/2-Knockdown-Zellen durch Überexpression von Myoferlin umgekehrt werden. Dies spricht sehr für eine direkte

Interaktion zwischen Myoferlin und EGFR (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Interessanterweise konnte durch Hermanns et al. in der Immunfluoreszenz weitergehend funktionell mittels GFP-tagged EGFR nachgewiesen werden, dass Myoferlin-depletierte Tumorzellen ein fokales Anreicherungsmuster besitzen, im Gegensatz zu einer diffusen Anreicherung in Kontroll-Zellen, was für einen Degradations-Arrest des Rezeptors und eine damit verbundene membranäre Akkumulation spricht. Zusätzlich konnte auch MG132, ein Proteasom-Inhibitor, einen sehr ähnlichen Befund mit EGFR-Akkumulation zeigen. Diese beiden Befunde validieren die Ergebnisse von Turtoi und Kollegen im Mammakarzinom-Modell (127. *Turtoi, Blomme 2013*). Erhöhte EGFR-Phosphorylierung nach Herunterregulation der Myoferlin-Expression war auch *in vivo* bei hepatozellulären Karzinomen aus SRF-VP16^{iHep} Mäusen und HCC-Xenografts, die MKL1 und MKL2 siRNA erhielten, zu sehen. Gleichsinnig damit war die Phosphorylierung des EGFR im SRF-VP16-HCC-Mausmodell mit konstitutiv aktivem SRF, in dem Myoferlin entsprechend hochreguliert vorlag, erniedrigt (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Diese Daten demonstrieren die *in vivo*-Relevanz von Myoferlin. Zudem sprechen sie - da dieses Phänomen nicht auf eine einzige Tumorzellart beschränkt ist - für die wichtige Bedeutung von Myoferlin bei der Modulation des EGF-Rezeptors. Die Beteiligung von Myoferlin und EGFR an der Aktivierung von *downstream*-Signalwegen, wie z. B. der ERK1/2-Phosphorylierung (s. u.), wird durch die Tatsache, dass die Inhibition des *Guanin Nukleotid Exchange Factor Son of Sevenless* (SOS), der die stimulatorischen Signale des phosphorylierten EGFR auf die Ras/MEK/ERK-Signalkaskaden überträgt, die Myoferlin-Knockdown vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung und Seneszenz-Induktion verhindert, untermauert. (149. *Hermanns, Hampl 2017*).

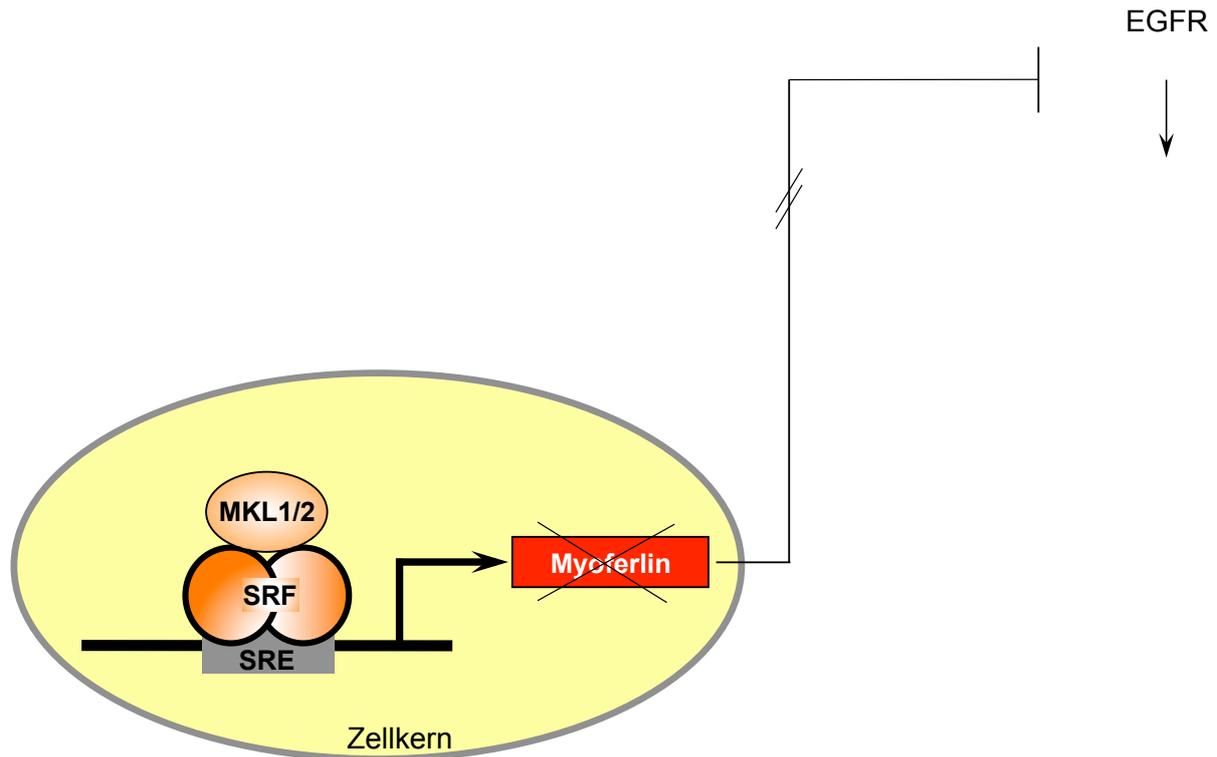


Abbildung 22: Modell der Onkogen-induzierten Seneszenz mit EGFR-Aktivierung. Vorgeschlagenes Modell für den initialen Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz nach Myoferlin-Depletion. Nukleär lokalisiertes MKL1/2 führt normalerweise zur Aktivierung seiner zugehörigen Zielgene. Bei Knockdown von Myoferlin kommt es zur Aktivierung des EGF-Rezeptors mit Phosphorylierung am Tyrosinrest Y1173.

Wenn man von der Degradation transmembranärer Rezeptoren - hier am Beispiel des EGF-Rezeptors - spricht, so erscheint es zunächst notwendig die zwei Wege der Endozytose, bei der Myoferlin eine Rolle spielt, zu erwähnen. Myoferlin ist als negativer Regulator des Rezeptors an dessen Abbau beteiligt. Nach Depletion von Myoferlin kann dieser Vorgang nicht korrekt ablaufen; der EGF-Rezeptor bleibt aktiviert und kann *downstream* weitere Komponenten des Signalwegs, wie beispielsweise ERK, etc. aktivieren. Man unterscheidet bei diesen endozytotischen Abbauvorgängen des EGFR grundsätzlich zum einen die *Clathrin mediated endocytosis* (CME), die bei niedrigen EGF-Leveln zur Endozytose des Rezeptors und konkomitantem Recycling ohne Ubiquitinylierung führt. Zum anderen, bei hohen EGF-Wachstumsfaktor-Leveln, wie sie auch in der Umwelt von Tumorzellverbänden vorkommen, wird der EGF-Rezeptor größtenteils ubiquitinyliert und dann im Rahmen

der clathrinunabhängigen Endozytose im Proteasom degradiert. Weiter oben erwähnte Befunde unserer Arbeitsgruppe und von Turtoi et al. zur Degradation des EGFR-Rezeptors zeigen die Bedeutung von Myoferlin für die Regulation der Endozytose und Internalisierung des EGFR und für die Proteasomaktivität auf. In diesem Zusammenhang ist es die Interaktion zwischen EGFR, Myoferlin und Caveolin, welche die Regulation dieses Prozesses steuert. Denn in den *Caveolae*, kleinen säckchenförmigen Einbuchtungen der Plasmamembran, sind EGFR und Caveolin in räumlicher Nähe zu Myoferlin lokalisiert; bei Abwesenheit von Myoferlin war die Kolokalisation mit Caveolin schwächer ausgeprägt, was die Endozytose des aktivierten EGFR beeinflusst (127. Turtoi, Blomme 2013). Die exakte mechanistische und funktionelle Interaktion bei der Endozytose zwischen EGFR sowie Myoferlin und Caveolin in den *Caveolae* mit evtl. weiteren funktionell bedeutenden Proteinen muss näher untersucht werden. Vor allem auch der Ablauf der Interaktion zwischen Myoferlin und EGFR ist im Detail noch nicht geklärt.

6.7 Aktivierung von ERK1/2 nach Myoferlin-Depletion

Nachdem sich gezeigt hat, dass Myoferlin die Aktivität des EGF-Rezeptors moduliert und wir aus unseren Vorarbeiten bereits wissen, dass MKL1/2-Depletion zu einem Proliferationsarrest mit einhergehender Onkogen-induzierter Seneszenz führt, war es unser Ziel den hierbei relevanten Signalweg auf Myoferlin-Abhängigkeit zu untersuchen. Als weiteres *Read-out* im Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz wurden daher die MAP-Kinasen ERK1/2 gewählt. Wie schon Daten unserer Gruppe im HCC nach MKL1/2-Depletion eine Aktivierung der MAP-Kinasen aufzeigen, konnte in vorliegender Arbeit dies auch nach Depletion von Myoferlin im Mammakarzinom-Modell gezeigt werden. Hampl und Kollegen konnten zusätzlich zeigen, dass nach MKL1/2-Knockdown und konsekutiver ERK1/2-Aktivierung (pT202/pY204) durch Behandlung mit dem MEK1-Inhibitor U0126 die Hyperphosphorylierung von ERK1/2 und antiproliferative MKL1/2-Knockdown-Effekte reversibel sind, wobei letzteres *prima vista* kontraintuitiv zur allgemeinen pro-proliferativen Annahme einer ERK1/2-Aktivierung ist, jedoch gleichzeitig die Bedeutung eines Proliferationsarrestes unterstreicht (60. Hampl, Martin 2013, 166.

Demidenko, Shtutman et al. 2009). Konsistent damit haben Hermanns et al. nachgewiesen, dass Myoferlin-depletierte und mit einem SOS-SH3-Domänen-Inhibitor behandelte Zellen einen Abfall der Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 präsentierten. SOS-SH3-Inhibition führt funktionell zu einer Verhinderung der Austausches von Ras-GDP zu Ras-GTP und somit zur Unterbindung des *downstream*-gebenden Signals (167. *Li, Batzer et al. 1993*, 168. *McKay, Morrison 2007*). *Upstream* von ERK1/2 aktiviert Ras die MAP-Kinasen-Kaskade. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass Ras nach Myoferlin-Knockdown in aktiviertem, GTP-gebundenem Zustand vorliegt und gleichsinnig nach Myoferlin-Rekonstitution in MKL1/2-depletierten Zellen Ras in einen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zurückfällt (149. *Hermanns, Hampl 2017*).

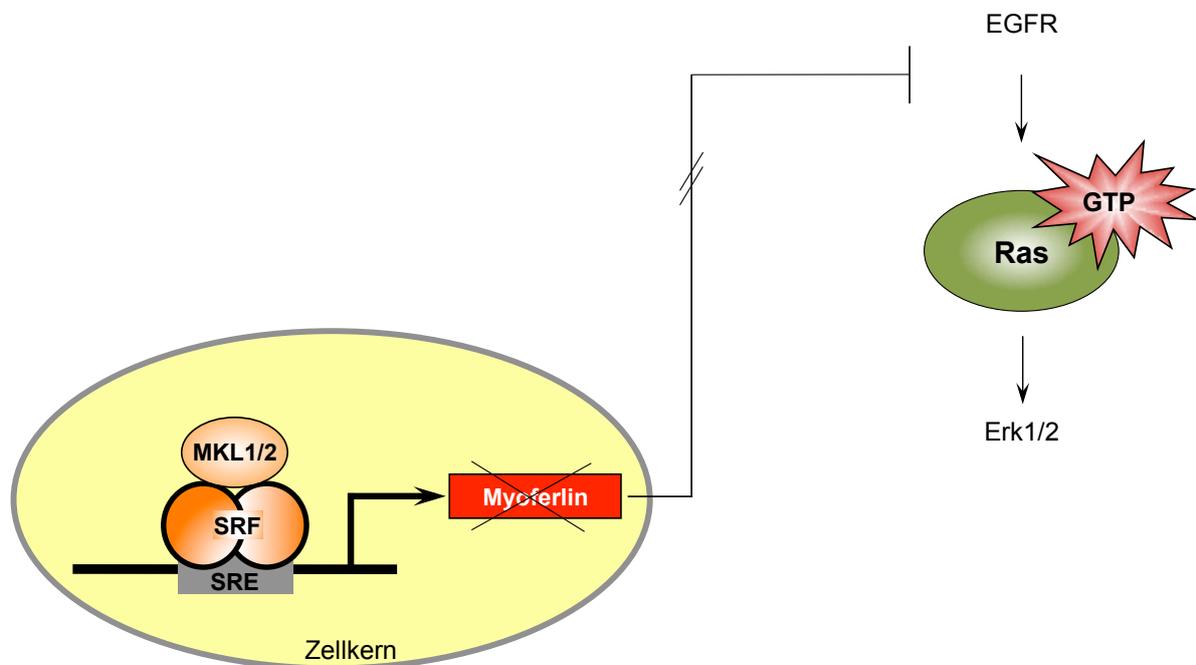


Abbildung 23: Modell der Onkogen-induzierten Seneszenz mit ERK1/2-Aktivierung. Vorgeschlagenes Modell für den initialen Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz nach Myoferlin-Depletion. Nukleär lokalisiertes MKL1/2 führt normalerweise zur Aktivierung seiner zugehörigen Zielgene. Bei Knockdown von Myoferlin kommt es zur Aktivierung des EGF-Rezeptors mit Phosphorylierung am Tyrosinrest Y1173 und konsekutiver Aktivierung des Onkogens Ras, welche die MAP-Kinasen ERK1/2 in einen phosphorylierten Zustand versetzt.

Somit ist mit der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 nach Myoferlin-Depletion unser kürzlich publizierter Befund im hepatozellulären Karzinom konsistent. Dort konnten, vereinbar mit dem Ras-Raf-MEK1-ERK1/2-Signalweg, welcher in der Lage ist Onkogen-induzierte Seneszenz auszulösen, eine erhöhte Aktivität der relevanten Signalkomponenten nach Myoferlin-Knockdown gefunden werden. Neben dem weiter unten beschriebenen Nachweis der Seneszenz mittels β -Galactosidase, existieren weitere Seneszenz-Marker, welche unsere Arbeitsgruppe nach Myoferlin-Depletion identifizieren konnte. Von den relevanten Tumorsuppressoren p53 und p16^{INK4a}, welche OIS induzieren, konnten wir nach Myoferlin-Depletion erhöhte Expressionslevel sowohl von p16^{INK4a} als auch von phosphoryliertem p53 identifizieren (133. *Serrano, Lin 1997, 149. Hermanns, Hampl 2017*). Diese Tumorsuppressoren führen zu einem Zellzyklus-Arrest, welcher der Seneszenz zu Grunde liegt (siehe auch Kap. 1.6.3). Im Einklang mit der Induktion des Tumorsuppressors p16^{INK4a} steht der Nachweis von hypophosphoryliertem Rb-Protein und G1-Arrest, welcher mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden konnte (149. *Hermanns, Hampl 2017*).

6.8 Seneszenten Phänotyp nach MKL1/2-Depletion

Die Regression von HCC-*Xenografts* in athymischen Nacktmäusen nach MKL1/2-Depletion in Voruntersuchungen unserer Gruppe, durchgeführt von Hampl et al. konnte auf die Aktivierung der onkogenen Achse Ras-Raf-MAPK zurückgeführt werden, was zur bereits beschriebenen Induktion onkogener Seneszenz führte. Ebenso wurde bei unseren *in vitro*-Befunden DLC1-defizienter Huh7- und Huh6-Karzinomzellen als zugrundeliegender Mechanismus des durch MKL1/2-Depletion vermittelten Wachstums- bzw. Proliferationsarrestes Onkogen-induzierte Seneszenz identifiziert, wobei Apoptose als möglicher weiterer kausaler Faktor im Sinne eines Tumorevasionsmechanismus ausgeschlossen werden konnte (60. *Hampl, Martin 2013*). Der Phänotyp zellulärer Seneszenz zeigt charakteristische Auffälligkeiten morphologischer und struktureller Art, wie beispielsweise eine vergrößerte und abgeflachte Zellform mit einem vakuloenreichen Zytoplasma. Zum Nachweis dieses

Phänotyps eignet sich besonders die β -Galactosidase Färbung als *valider*, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gut etablierter zellulärer Seneszenzmarker, der daher in vorliegender Arbeit angewendet wurde (169. *Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009*). Die Arbeiten von Li, Eisenberg und Hampl weiterführend konnte nun zum ersten Mal in einer neuen Tumorentität, dem Mammakarzinom, ein seneszenten Phänotyp nach MKL1/2-Knockdown nachgewiesen werden. Hieraus lässt sich folgern, dass dieses Phänomen, welches Aktivierung des MKL-Aktin-Signalweges bedingt und EGFR-MAPK-vermittelt ist, konsistent mit Hampl et al. und ihren Ergebnissen im hepatozellulären Karzinom ist (60. *Hampl, Martin 2013*). Die klinisch weiterführende Idee, die auf diesen Befunden aufbaut, ist es auf diese Weise herbeigeführte Onkogen-induzierte Seneszenz therapeutisch zu nutzen. Da Tumorsuppressoren wie DLC1 einer direkten, gezielten therapeutischen Intervention nicht zur Verfügung stehen stellt sich die Frage nach weiteren therapeutischen Zielstrukturen. Untersuchungen zur pharmakologischen Inhibition des RhoA-Effektorproteins ROCK mit dem *small molecule*-Inhibitor Y-27632 haben gezeigt, dass die Tumorentwicklung, u. a. im HCC, eingeschränkt wird (170. *Takamura, Sakamoto et al. 2001, 171. Imamura, Mukai et al. 2000, 172. Routhier, Astuccio et al. 2010*). Eine neuere Publikation hat jedoch Y-27632 mit Proliferationszunahme und Einschränkung von Seneszenz in Zusammenhang gebracht (173. *Lee, Park et al. 2015*). Der genaue Mechanismus muss hierbei noch näher untersucht werden. In Anbetracht unserer Forschungsergebnisse könnte die MKL1/2-Regulation bei bekannter *in vivo*-Effizienz von PEI-komplexierter siRNA aus murinen Untersuchungen eine neue therapeutische Perspektive eröffnen (174. *Muehlich, Gudermann 2013*).

6.9 Seneszenten Phänotyp nach Myoferlin-Depletion

Dennoch war es bisher unklar, auf welche Weise respektive durch welchen Mediator MKL1/2-Depletion zu oben beschriebener Onkogen-induzierter Seneszenz führen kann. Nachdem nun Myoferlin als MKL1/2-SRF-abhängiges Zielgen eingestuft werden konnte und dessen Depletion wichtige Tumorzelleigenschaften, wie die Proliferation einschränkt, hierbei den EGF-Rezeptor mit zugehörigen *downstream-*

Signalwegbestandteilen der Onkogen-induzierten Seneszenz aktiviert und der Knockdown seiner regulativen transkriptionellen Aktivatoren MKL1/2 zu einem seneszenten Phänotyp führt, stellte sich uns die Frage, ob die aus den Vorbefunden postulierte Beeinflussung der Seneszenz durch Myoferlin zutreffend ist.

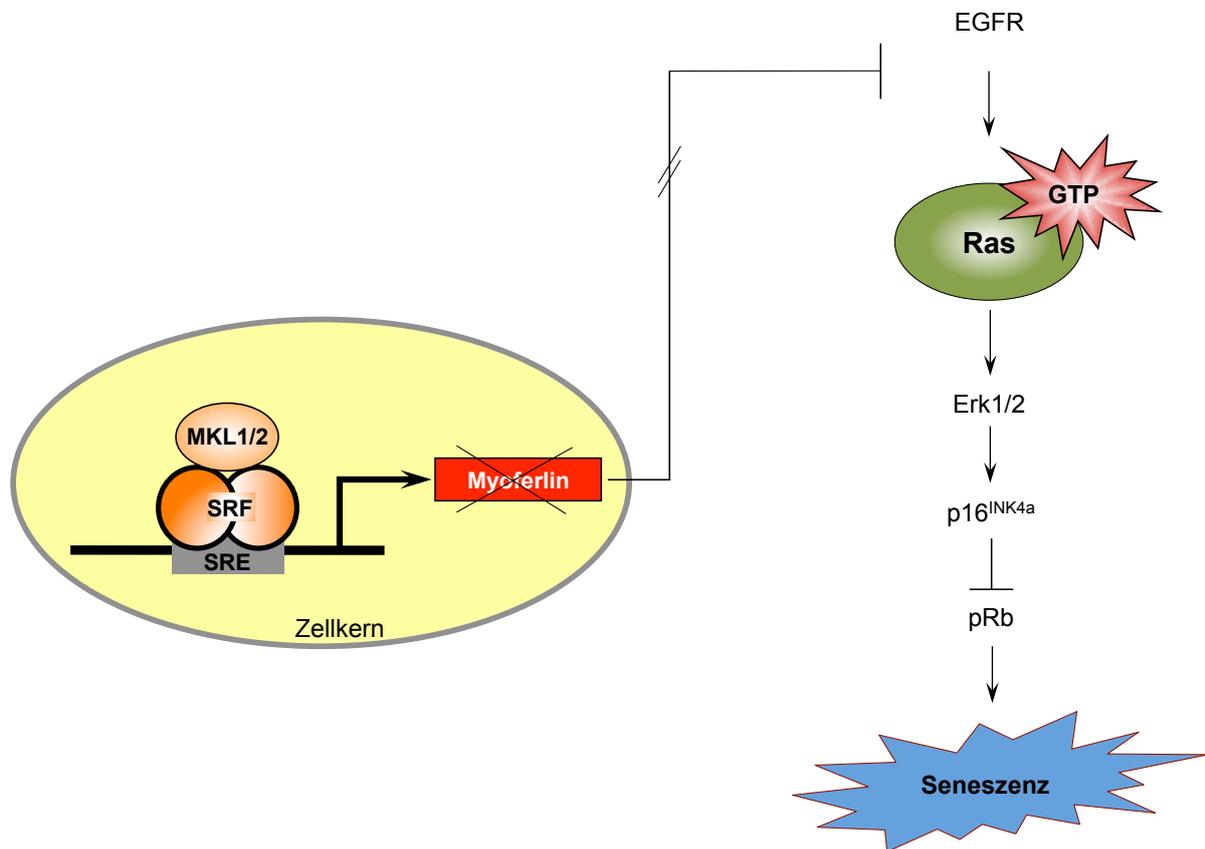


Abbildung 24: Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz nach Myoferlin-Depletion. Vorgeschlagenes Modell für den Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz nach Myoferlin-Depletion. Nukleär lokalisiertes MKL1/2 führt normalerweise zur Aktivierung seiner zugehörigen Zielgene. Bei Knockdown von Myoferlin kommt es zur Aktivierung des EGF-Rezeptors mit Phosphorylierung am Tyrosinrest Y1173 und konsekutiver Aktivierung des Onkogens Ras, welche die MAP-Kinasen ERK1/2 in einen phosphorylierten Zustand versetzt. Über Induktion von Tumorsuppressoren p16 und Rb kommt es dann zum Phänotyp der Onkogen-induzierten zellulären Seneszenz.

Existenz von Seneszenz im Mammakarzinom konnte bereits nachgewiesen werden; u. a. im HER2-positiven Mammakarzinom-Subtyp war ein hoher Anteil von Seneszenz evident (175. Cotarelo, Schad et al. 2016). Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten nun *de novo* in Mammakarzinom-Zellen Seneszenz nach Myoferlin-

Depletion zeigen. Der Befund vorliegender Arbeit steht in Konsistenz mit unseren kürzlich publizierten Daten aus dem Modell des hepatozellulären Karzinoms, durch welche Myoferlin als der Vermittler der bekannten MKL1/2-abhängigen Onkogen-induzierten Seneszenzantwort charakterisiert werden konnte (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Da die Zelllinien MDA-MB-468 und Huh7 sehr ähnliche molekularbiologische Eigenschaften bezüglich DLC1-Status und MKL1/2-Lokalisation besitzen sowie durch die gewählten *Read-Outs* des EGFR-MAPK-Signalwegs und den seneszenzassoziierten β -Galactosidase-Nachweis kann hieraus geschlossen werden, dass derselbe Seneszenzsignalweg analog abläuft. Wir konnten in unserer jüngsten Publikation zeigen, dass auch andere Seneszenzmarker nach Myoferlin-Depletion aktiviert wurden, wie z. B. CXCL10 und TNSF10 als Teil des *Senescence messaging secretome* (SMS), Phosphorylierung von p53 am Serinrest 15 als Indikator einer *DNA damage response* (DDR), Akkumulation von p16^{INK4a} und hypophosphoryliertes Rb-Protein (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Diese Befunde untermauern, dass Myoferlin-Depletion Onkogen-induzierte Seneszenz hervorruft. Apoptose nach Myoferlin-Knockdown konnte durch Messung der Caspase-8-Aktivität als Apoptosemarker ausgeschlossen werden (124. *Leung, Yu 2013*). Obwohl die Myoferlin-Knockdown-vermittelte Aktivierung des EGFR und der *downstream* davon abhängigen MEK/ERK-Signalkaskade eine plausible Erklärung für die MKL-assoziierte Seneszenzantwort liefert, können wir nicht vollständig ausschließen, dass noch weitere Gene an diesem Mechanismus beteiligt sind. Ein weiteres MKL1/2-Zielgen, Mig6, ist als negativer Regulator der EGFR/MAPK-Kaskade beschrieben worden (162. *Descot, Hoffmann 2009*, 176. *Reschke, Ferby et al. 2010*). In Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte auch keine erniedrigte Mig6-Expression in MKL1/2-siRNA-behandelten HCC-*Xenografts* beobachtet werden, was gegen die Rolle von Mig6 bei der MKL-assoziierten Seneszenz-Antwort spricht (149. *Hermanns, Hampl 2017*). Hierzu sind dennoch weitere Untersuchungen nötig, welche die MKL-induzierte Tumorgenese näher untersuchen und mögliche weitere beteiligte Gene, gegebenenfalls in anderen Tumorentitäten, studieren. Ein wichtiger Schritt auf dem Weg der Erforschung der MKL/Myoferlin-vermittelten Tumorgenese im Mammakarzinom ist die Beschreibung von Myoferlin als Seneszenz-Mediator, welches in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte.

6.10 Pharmakologisches Targeting von Myoferlin - eine Zukunftsperspektive

Die Rolle von Myoferlin in der Tumorgenese muss dringend noch weiter untersucht werden, denn Brust- und Leberkarzinome gehören weltweit zu den Tumoren mit der höchsten Mortalität (152. *Jemal, Bray 2011*). Unsere neuen Befunde kennzeichnen MKL1/2 und Myoferlin als mögliche neue pharmakologische Zielstrukturen für Tumorthérapien. Aus *in vitro*- und *in vivo*-Studien ist, wie wir gezeigt haben, bekannt, dass MKL1/2- und Myoferlin-Depletion sowohl im hepatozellulären als auch im Mammakarzinom Onkogen-induzierte Seneszenz hervorrufen (60. *Hampfl, Martin 2013*, 149. *Hermanns, Hampfl 2017*). Somit wäre ein möglicher therapeutischer Ansatz die Seneszenz zu nutzen und diese Proteine als Ziel einer Seneszenz-induzierenden Therapie zu verwenden. Unsere Gruppe hat bereits in Vorarbeiten die *in vivo*-Wirksamkeit einer PEI-komplexierten anti-MKL1/2-siRNA-Therapie gezeigt (60. *Hampfl, Martin 2013*, 177. *Hobel, Aigner 2013*). Aus anderen Studien sind *in vivo*-Ergebnisse von siRNA-Therapien als vielversprechend anzusehen, beispielsweise zur Therapie der Hämophilie mittels siRNA-vermittelter Antithrombin-Depletion (178. *Ragni 2015*). Eine Herausforderung wird das Design solcher Medikamente darstellen, welches ausreichende Stabilität des Pharmakons sowie eine gezielte und möglichst spezifische Applikation gewährleisten muss. Eine potentielle Gefahr stellen sicherlich die Nebenwirkungen einer siRNA-Therapie dar, besonders wenn Transkriptionsfaktoren das Ziel einer Therapie darstellen, von denen mehrere Zielgene mit entsprechenden zellulären Funktionen abhängig sind. Je ubiquitärer ein Target vorkommt, desto schwieriger, da nebenwirkungsreicher, ist die Entwicklung einer gezielten Therapie. Dagegen könnte eine Therapie mit Myoferlin als Zielstruktur eine spezifischere Wirkung erzielen. Mittels siRNA ist die Myoferlin-Depletion möglich und wäre bei pharmakodynamischer und pharmakokinetischer Eignung der therapeutischen Substanz einsetzbar. Darüberhinaus konnten Li et al. und Volakis et al. zeigen, dass Myoferlin-Depletion den malignen Prozess der EMT, welche die Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren darstellt, zur mesenchymal-epithelialen Transition (MET) bei Mammakarzinom-Zelllinien umkehren kann (125. *Volakis, Li 2014*, 165. *Li, Ackerman 2012*). Kürzlich konnte die Rolle von Myoferlin in dreifach-negativem Brustkrebs

(TNBC), einer prognostisch sehr ungünstigen Variante des Mammakarzinoms bezüglich metastasenfreiem und Gesamtüberleben, näher untersucht werden. Die Depletion von Myoferlin in dieser Tumorzelllinie führte zu Veränderungen im endosomalen System, u. a. beim Vesikeltransport, und im Zellmetabolismus. Zudem konnte *in vivo* nach Myoferlin-Depletion eine signifikant geringere Metastasierung in die Lunge nachgewiesen werden (179. *Blomme, Costanza et al. 2017*). Da es sich bei Myoferlin um ein Transmembranprotein handelt, erscheint auch die zielgerichtete Therapie mittels spezifischen monoklonalen Antikörpern, wie sie bereits etabliert ist und erfolgreich angewendet wird als mögliche Alternative. Die Substanzen (gegen die entsprechenden Zielstrukturen in Klammern) wie Gleevec[®] (abl-kinase), Herceptin[®] (her2neu), Panorex[®] (EpCAM) und IRESSA[®] (EGF-Rezeptor) sind hierfür beispielhaft anzuführen (123. *Adam, Boyd 2003*, 180. *Brenner, Adams 1999*, 181. *Abicht, Lochmuller 2000*, 182. *Ranson, Mansoor et al. 2002*). Durch entstehende Resistenzen steigt der Bedarf an neuen zielgerichteten Pharmaka (183. *Sullivan, Planchard 2016*, 184. *Martinelli, Morgillo et al. 2017*). Die fehlerhafte Aktivierung des EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs ist in einer Vielzahl maligner Tumoren zu finden, wird jedoch primär mit onkogenen Eigenschaften in Verbindung gebracht (185. *Roberts, Der 2007*). Dieser Signalweg unterliegt weiterhin intensiver Erforschung. Als pharmakologische Substanzen werden u. a. die *small molecules* Gefitinib und Erlotinib, beides Tyrosinkinase-Inhibitoren am EGF-Rezeptor, verwendet. Auch Antikörper, wie z. B. Cetuximab kommen zur Anwendung. Sorafenib, ein Multikinaseinhibitor, hat bisher im fortgeschrittenen HCC ein nur gering prognoseverbesserndes Benefit erbracht (186. *Kim, Kim et al. 2017*). Dies könnte gemäß unseren Befunden an der Blockierung der Onkogen-induzierten Seneszenz liegen. Da unsere Ergebnisse in Zelllinien, wie Huh7 und MDA-MB-468, welche den Tumorsuppressor DLC1 nicht enthalten, erbracht wurden, ist es denkbar, dass die biologische Heterogenität eines Tumors für ein nicht optimales therapeutisches Ansprechen verantwortlich ist. Deswegen ist die sog. personalisierte Medizin mit genetischen Profilen von Tumoren eine Voraussetzung für die zukünftige und gezielte tumorzellspezifische Therapie. Myoferlin als neues pharmakologisches Target einer Krebstherapie könnte zudem der Problematik entstehender Resistenzen bisheriger Therapien entgegenwirken. Ohrnberger et al. schlagen im hepatozellulären Karzinom eine simultane Inhibition von Ras/MAPK- und Rho/Aktin-Signalwegen vor, da überaktiviertes SRF von diesen beiden Signalwegen in einem

protumorigenen Sinne synergistisch gestützt wird (37. *Ohrnberger, Thavamani 2015*). Hierbei muss jedoch besonders der Ras/MAPK-Signalweg beachtet werden, denn bei therapeutischer Ausschaltung dessen wäre auch der Onkogen-induzierten Seneszenz, die durch Myoferlin-Depletion erreicht wurde, entgegengewirkt. Bezüglich Seneszenz und deren gezielt therapeutischer Nutzung sind bereits verschiedene potentielle Agenzien in Entwicklung und Testung. Vielversprechende Ergebnisse zeigten sich in der Stabilisierung des p53-Systems, z. B. mittels Nutlin-3-Analog (187. *Sonnemann, Palani et al. 2011*, 188. *Manfe, Biskup et al. 2012*). Andere Angriffspunkte liegen in der Modulation der Zell-Zyklus-Steuerung oder des Telomerase-Komplexes (189. *Nardella, Clohessy et al. 2011*). Eine kombinierte therapeutische Strategie könnte etwa Interventionen im Rho/Aktin-Signalweg, der tendentiell die SRF/MKL1/2-Interaktion adressiert mit proseneszentem Myoferlin-Knockdown verbinden. Letztlich sind diesbezüglich evidenzschaffende vorklinische und klinische Studien notwendig, um eine positive therapeutische Wirkung nachweisen zu können. Gleichzeitig muss die noch nicht abschließend geklärte Rolle des Immunsystems bei der Neutralisierung vorhandener seneszenten Zellen im Hinblick auf eine Seneszenz-induzierende antitumorale Therapie näher untersucht werden (189. *Nardella, Clohessy 2011*). Der Therapieeffekt gegenwärtig eingesetzter konventioneller Chemo- und auch Radiotherapien wird bereits zum Teil auf Erzeugung von Seneszenz zurückgeführt (132. *Collado, Serrano 2010*). Denn die Verwendung von einzelnen oder kombinierten zytotoxischen Therapeutika führt zu DNA-Schäden, welche die sich teilenden Tumorzellen zum Absterben bringen sollen. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch Seneszenz hervorgerufen wird (136. *Roninson 2003*, 190. *te Poele, Okorokov et al. 2002*). Zielgerichtete Seneszenz-induzierende Therapien könnten in näherer Zukunft als Ergänzung zur etablierten Chemo-, Radio- oder chirurgischen Therapie als adjuvante oder neoadjuvante Strategie eingesetzt werden.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden molekulare Mechanismen untersucht, durch welche das Protein Myoferlin Tumorwachstum und Seneszenz kontrolliert. Es konnte zum ersten Mal in Mammakarzinom-Zellen gezeigt werden, dass dieses SRF/MKL1/2-abhängige Zielgen als Vermittler der MKL-assoziierten Seneszenz-Antwort durch die Modulierung der Aktivität des EGF-Rezeptors und der untergeordneten MAPK-Kaskade fungiert. Konsistent mit den Befunden sind die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe über diesen neuartigen Mechanismus im hepatozellulären Karzinom. Die grundlegenden Erkenntnisse haben Implikationen für die klinische Anwendung durch zielgerichtete und personalisierte Therapien mit Angriffspunkten am EGF-Rezeptor- und MAP-Kinasen-Signalweg. Unsere Befunde zeigen, dass die Antagonisierung von Myoferlin eine neue therapeutische Strategie im Kampf gegen Leber- und Brustkrebs eröffnet, insbesondere durch die Initiierung von Seneszenz als bisher unzureichend genutzter therapeutischer Strategie.

8 Literaturverzeichnis

1. Pipes, G. C., Creemers, E. E., Olson, E. N., The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes & development* 20, 1545-1556 (2006); published online EpubJun 15 (10.1101/gad.1428006).
2. Chai, J., Tarnawski, A. S., Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 53, 147-157 (2002); published online EpubJun (
3. Miano, J. M., Long, X., Fujiwara, K., Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American journal of physiology. Cell physiology* 292, C70-81 (2007); published online EpubJan (10.1152/ajpcell.00386.2006).
4. Minty, A., Kedes, L., Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Molecular and cellular biology* 6, 2125-2136 (1986); published online EpubJun (
5. Treisman, R., Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46, 567-574 (1986); published online EpubAug 15 (
6. Miano, J. M., Myocardin in biology and disease. *Journal of biomedical research* 29, 3-19 (2015); published online EpubJan (10.7555/jbr.29.20140151).
7. Winkles, J. A., Serum- and polypeptide growth factor-inducible gene expression in mouse fibroblasts. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 58, 41-78 (1998).
8. Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., Treisman, R., Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55, 989-1003 (1988); published online EpubDec 23 (
9. Messenguy, F., Dubois, E., Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316, 1-21 (2003); published online EpubOct 16 (
10. Spiegelman, B. M., Heinrich, R., Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* 119, 157-167 (2004); published online EpubOct 15 (10.1016/j.cell.2004.09.037).
11. Sun, Q., Chen, G., Streb, J. W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C. J., Jr., Miano, J. M., Defining the mammalian CArGome. *Genome research* 16, 197-207 (2006); published online EpubFeb (10.1101/gr.4108706).
12. Posern, G., Treisman, R., Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in cell biology* 16, 588-596 (2006); published online EpubNov (10.1016/j.tcb.2006.09.008).
13. Hill, C. S., Treisman, R., Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *The EMBO journal* 14, 5037-5047 (1995); published online EpubOct 16 (

14. Johansen, F. E., Prywes, R., Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor. *Molecular and cellular biology* 14, 5920-5928 (1994); published online EpubSep (
15. Li, S., Czubyrt, M. P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., Nordheim, A., Olson, E. N., Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1082-1087 (2005); published online EpubJan 25 (10.1073/pnas.0409103102).
16. Miano, J. M., Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90, 1274-1284 (2010); published online EpubSep (10.1038/labinvest.2010.104).
17. Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., Daegelen, D., Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PloS one* 3, e3910 (2008)10.1371/journal.pone.0003910).
18. Soulez, M., Rouviere, C. G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A., Tuil, D., Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Molecular and cellular biology* 16, 6065-6074 (1996); published online EpubNov (
19. Kaplan-Albuquerque, N., Van Putten, V., Weiser-Evans, M. C., Nemenoff, R. A., Depletion of serum response factor by RNA interference mimics the mitogenic effects of platelet derived growth factor-BB in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 97, 427-433 (2005); published online EpubSep 02 (10.1161/01.RES.0000179776.40216.a9).
20. Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschlager, M., Ruther, U., Nordheim, A., Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *The EMBO journal* 17, 6289-6299 (1998); published online EpubNov 02 (10.1093/emboj/17.21.6289).
21. Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., Nordheim, A., Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* 156, 737-750 (2002); published online EpubFeb 18 (10.1083/jcb.200106008).
22. Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J. P., Paulin, D., Li, Z., Daegelen, D., Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Molecular and cellular biology* 24, 5281-5289 (2004); published online EpubJun (10.1128/mcb.24.12.5281-5289.2004).
23. Franco, C. A., Mericskay, M., Parlakian, A., Gary-Bobo, G., Gao-Li, J., Paulin, D., Gustafsson, E., Li, Z., Serum response factor is required for sprouting angiogenesis and vascular integrity. *Developmental cell* 15, 448-461 (2008); published online EpubSep (10.1016/j.devcel.2008.07.019).
24. Holtz, M. L., Misra, R. P., Endothelial-specific ablation of serum response factor causes hemorrhaging, yolk sac vascular failure, and embryonic lethality. *BMC developmental biology* 8, 65 (2008)10.1186/1471-213x-8-65).
25. Verdoni, A. M., Ikeda, S., Ikeda, A., Serum response factor is essential for the proper development of skin epithelium. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 21, 64-76 (2010); published online EpubFeb (10.1007/s00335-009-9245-y).

26. Sun, G., Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., Sarkis, D. A., Sommer, S. S., Rossi, J. J., SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA (New York, N.Y.)* 15, 1640-1651 (2009); published online EpubSep (10.1261/rna.1560209).
27. Alberti, S., Krause, S. M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F. F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schutz, G., Nordheim, A., Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6148-6153 (2005); published online EpubApr 26 (10.1073/pnas.0501191102).
28. Miralles, F., Hebrard, S., Lamotte, L., Durel, B., Gilgenkrantz, H., Li, Z., Daegelen, D., Tuil, D., Joshi, R. L., Conditional inactivation of the murine serum response factor in the pancreas leads to severe pancreatitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86, 1020-1036 (2006); published online EpubOct (10.1038/labinvest.3700457).
29. Yang, Y., Zhe, X., Phan, S. H., Ullenbruch, M., Schuger, L., Involvement of serum response factor isoforms in myofibroblast differentiation during bleomycin-induced lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 29, 583-590 (2003); published online EpubNov (10.1165/rcmb.2002-0315OC).
30. Koegel, H., von Tobel, L., Schafer, M., Alberti, S., Kremmer, E., Mauch, C., Hohl, D., Wang, X. J., Beer, H. D., Bloch, W., Nordheim, A., Werner, S., Loss of serum response factor in keratinocytes results in hyperproliferative skin disease in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 899-910 (2009); published online EpubApr (10.1172/jci37771).
31. Stringer, J. L., Belaguli, N. S., Iyer, D., Schwartz, R. J., Balasubramanyam, A., Developmental expression of serum response factor in the rat central nervous system. *Brain research. Developmental brain research* 138, 81-86 (2002); published online EpubSep 20 (
32. Knoll, B., Kretz, O., Fiedler, C., Alberti, S., Schutz, G., Frotscher, M., Nordheim, A., Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nature neuroscience* 9, 195-204 (2006); published online EpubFeb (10.1038/nn1627).
33. Chow, N., Bell, R. D., Deane, R., Streb, J. W., Chen, J., Brooks, A., Van Nostrand, W., Miano, J. M., Zlokovic, B. V., Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 823-828 (2007); published online EpubJan 16 (10.1073/pnas.0608251104).
34. Bell, R. D., Deane, R., Chow, N., Long, X., Sagare, A., Singh, I., Streb, J. W., Guo, H., Rubio, A., Van Nostrand, W., Miano, J. M., Zlokovic, B. V., SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nature cell biology* 11, 143-153 (2009); published online EpubFeb (10.1038/ncb1819).
35. Wickramasinghe, S. R., Alvania, R. S., Ramanan, N., Wood, J. N., Mandai, K., Ginty, D. D., Serum response factor mediates NGF-dependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons. *Neuron* 58, 532-545 (2008); published online EpubMay 22 (10.1016/j.neuron.2008.03.006).
36. Qiao, J., Liu, Z., Yang, C., Gu, L., Deng, D., SRF promotes gastric cancer metastasis through stromal fibroblasts in an SDF1-CXCR4-dependent

- manner. *Oncotarget*, (2016); published online EpubJun 14 (10.18632/oncotarget.10024).
37. Ohrnberger, S., Thavamani, A., Braeuning, A., Lipka, D. B., Kirilov, M., Geffers, R., Autenrieth, S. E., Romer, M., Zell, A., Bonin, M., Schwarz, M., Schutz, G., Schirmacher, P., Plass, C., Longerich, T., Nordheim, A., Dysregulated serum response factor triggers formation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61, 979-989 (2015); published online EpubMar (10.1002/hep.27539).
 38. Prencipe, M., Fabre, A., Murphy, T. B., Vargyas, E., O'Neill, A., Bjartell, A., Tasken, K. A., Grytli, H. H., Svindland, A., Berge, V., Eri, L. M., Gallagher, W., Watson, R. W., Role of serum response factor expression in prostate cancer biochemical recurrence. *The Prostate* 78, 724-730 (2018); published online EpubJul (10.1002/pros.23516).
 39. Wang, D., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., Krieg, P. A., Olson, E. N., Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-862 (2001); published online EpubJun 29 (
 40. Wang, D. Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schrott, G., Richardson, J. A., Nordheim, A., Olson, E. N., Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14855-14860 (2002); published online EpubNov 12 (10.1073/pnas.222561499).
 41. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., Treisman, R., Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342 (2003); published online EpubMay 2 (
 42. Aravind, L., Koonin, E. V., SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends in biochemical sciences* 25, 112-114 (2000); published online EpubMar (
 43. Du, K. L., Chen, M., Li, J., Lepore, J. J., Mericko, P., Parmacek, M. S., Megakaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 17578-17586 (2004); published online EpubApr 23 (10.1074/jbc.M400961200).
 44. Posern, G., Miralles, F., Guettler, S., Treisman, R., Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *The EMBO journal* 23, 3973-3983 (2004); published online EpubOct 13 (10.1038/sj.emboj.7600404).
 45. Cen, B., Selvaraj, A., Prywes, R., Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *Journal of cellular biochemistry* 93, 74-82 (2004); published online EpubSep 1 (10.1002/jcb.20199).
 46. Descot, A., Rex-Haffner, M., Courtois, G., Bluteau, D., Menssen, A., Mercher, T., Bernard, O. A., Treisman, R., Posern, G., OTT-MAL is a deregulated activator of serum response factor-dependent gene expression. *Molecular and cellular biology* 28, 6171-6181 (2008); published online EpubOct (10.1128/mcb.00303-08).
 47. Olson, E. N., Nordheim, A., Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 353-365 (2010); published online EpubMay (10.1038/nrm2890).

48. Cen, B., Selvaraj, A., Burgess, R. C., Hitzler, J. K., Ma, Z., Morris, S. W., Prywes, R., Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Molecular and cellular biology* 23, 6597-6608 (2003); published online EpubSep (
49. Pawlowski, R., Rajakyla, E. K., Vartiainen, M. K., Treisman, R., An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *The EMBO journal* 29, 3448-3458 (2010); published online EpubOct 20 (10.1038/emboj.2010.216).
50. Kudo, N., Khochbin, S., Nishi, K., Kitano, K., Yanagida, M., Yoshida, M., Horinouchi, S., Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *The Journal of biological chemistry* 272, 29742-29751 (1997); published online EpubNov 21 (
51. Hayashi, K., Morita, T., Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and myocardin-related transcription factor A. *The Journal of biological chemistry* 288, 5743-5755 (2013); published online EpubFeb 22 (10.1074/jbc.M112.408120).
52. Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B., Treisman, R., Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science (New York, N.Y.)* 316, 1749-1752 (2007); published online EpubJun 22 (10.1126/science.1141084).
53. Muehlich, S., Wang, R., Lee, S. M., Lewis, T. C., Dai, C., Prywes, R., Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Molecular and cellular biology* 28, 6302-6313 (2008); published online EpubOct (10.1128/mcb.00427-08).
54. Baarlink, C., Wang, H., Grosse, R., Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science (New York, N.Y.)* 340, 864-867 (2013); published online EpubMay 17 (10.1126/science.1235038).
55. Brandt, D. T., Baarlink, C., Kitzing, T. M., Kremmer, E., Ivaska, J., Nollau, P., Grosse, R., SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1-integrin. *Nature cell biology* 11, 557-568 (2009); published online EpubMay (10.1038/ncb1862).
56. Selvaraj, A., Prywes, R., Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional coactivator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry* 278, 41977-41987 (2003); published online EpubOct 24 (10.1074/jbc.M305679200).
57. Ma, Z., Morris, S. W., Valentine, V., Li, M., Herbrick, J. A., Cui, X., Bouman, D., Li, Y., Mehta, P. K., Nizetic, D., Kaneko, Y., Chan, G. C., Chan, L. C., Squire, J., Scherer, S. W., Hitzler, J. K., Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nature genetics* 28, 220-221 (2001); published online EpubJul (10.1038/90054).
58. Mercher, T., Coniat, M. B., Monni, R., Mauchauffe, M., Nguyen Khac, F., Gressin, L., Mugneret, F., Leblanc, T., Dastugue, N., Berger, R., Bernard, O. A., Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5776-5779 (2001); published online EpubMay 8 (10.1073/pnas.101001498).

59. Muehlich, S., Hampl, V., Khalid, S., Singer, S., Frank, N., Breuhahn, K., Gudermann, T., Prywes, R., 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 (2012); published online EpubAug 30 (10.1038/onc.2011.560).
60. 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 leukaemia 1 and 2 abolishes hepatocellular carcinoma xenograft growth by inducing oncogene-induced senescence. *EMBO molecular medicine* 5, 1367-1382 (2013); published online EpubSep (10.1002/emmm.201202406).
61. Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E., Treisman, R., Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nature cell biology* 11, 257-268 (2009); published online EpubMar (10.1038/ncb1833).
62. Yu-Wai-Man, C., Treisman, R., Bailly, M., Khaw, P. T., The role of the MRTF-A/SRF pathway in ocular fibrosis. *Investigative ophthalmology & visual science* 55, 4560-4567 (2014); published online EpubJul (10.1167/iovs.14-14692).
63. Zhou, A. X., Hartwig, J. H., Akyurek, L. M., Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in cell biology* 20, 113-123 (2010); published online EpubFeb (10.1016/j.tcb.2009.12.001).
64. Nakamura, F., Stossel, T. P., Hartwig, J. H., The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell adhesion & migration* 5, 160-169 (2011); published online EpubMar-Apr (
65. Ruskamo, S., Ylanne, J., Structure of the human filamin A actin-binding domain. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 65, 1217-1221 (2009); published online EpubNov (10.1107/s0907444909037330).
66. Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., Hartwig, J. H., Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *The Journal of cell biology* 111, 1089-1105 (1990); published online EpubSep (
67. Sheen, V. L., Feng, Y., Graham, D., Takafuta, T., Shapiro, S. S., Walsh, C. A., Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Human molecular genetics* 11, 2845-2854 (2002); published online EpubNov 01 (
68. van der Flier, A., Sonnenberg, A., Structural and functional aspects of filamins. *Biochimica et biophysica acta* 1538, 99-117 (2001); published online EpubApr 23 (
69. Gardel, M. L., Nakamura, F., Hartwig, J., Crocker, J. C., Stossel, T. P., Weitz, D. A., Stress-dependent elasticity of composite actin networks as a model for cell behavior. *Physical review letters* 96, 088102 (2006); published online EpubMar 03 (10.1103/PhysRevLett.96.088102).
70. Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M., Shapiro, S. S., Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 138-145 (2001); published online EpubFeb (10.1038/35052082).
71. Lynch, C. D., Sheetz, M. P., Cellular mechanotransduction: filamin A strains to regulate motility. *Current biology : CB* 21, R916-918 (2011); published online EpubNov 22 (10.1016/j.cub.2011.10.020).

72. Hartwig, J. H., Tyler, J., Stossel, T. P., Actin-binding protein promotes the bipolar and perpendicular branching of actin filaments. *The Journal of cell biology* 87, 841-848 (1980); published online EpubDec (
73. Hartwig, J. H., Shevlin, P., The architecture of actin filaments and the ultrastructural location of actin-binding protein in the periphery of lung macrophages. *The Journal of cell biology* 103, 1007-1020 (1986); published online EpubSep (
74. Nakamura, F., Osborn, T. M., Hartemink, C. A., Hartwig, J. H., Stossel, T. P., Structural basis of filamin A functions. *The Journal of cell biology* 179, 1011-1025 (2007); published online EpubDec 03 (10.1083/jcb.200707073).
75. Suetsugu, S., Takenawa, T., Stress-associated MAP kinase fills in the map of filamin-mediated neuronal migration. *Developmental cell* 12, 3-4 (2007); published online EpubJan (10.1016/j.devcel.2006.12.005).
76. Berry, F. B., O'Neill, M. A., Coca-Prados, M., Walter, M. A., FOXC1 transcriptional regulatory activity is impaired by PBX1 in a filamin A-mediated manner. *Molecular and cellular biology* 25, 1415-1424 (2005); published online EpubFeb (10.1128/mcb.25.4.1415-1424.2005).
77. Loy, C. J., Sim, K. S., Yong, E. L., Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4562-4567 (2003); published online EpubApr 15 (10.1073/pnas.0736237100).
78. Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., Watanabe, K., Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 17871-17877 (2001); published online EpubMay 25 (10.1074/jbc.M008422200).
79. Kim, E. J., Park, J. S., Um, S. J., Filamin A negatively regulates the transcriptional activity of p73alpha in the cytoplasm. *Biochemical and biophysical research communications* 362, 1101-1106 (2007); published online EpubNov 03 (10.1016/j.bbrc.2007.08.148).
80. Yoshida, N., Ogata, T., Tanabe, K., Li, S., Nakazato, M., Kohu, K., Takafuta, T., Shapiro, S., Ohta, Y., Satake, M., Watanabe, T., Filamin A-bound PEBP2beta/CBFbeta is retained in the cytoplasm and prevented from functioning as a partner of the Runx1 transcription factor. *Molecular and cellular biology* 25, 1003-1012 (2005); published online EpubFeb (10.1128/mcb.25.3.1003-1012.2005).
81. Velkova, A., Carvalho, M. A., Johnson, J. O., Tavtigian, S. V., Monteiro, A. N., Identification of Filamin A as a BRCA1-interacting protein required for efficient DNA repair. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9, 1421-1433 (2010); published online EpubApr 01 (10.4161/cc.9.7.11256).
82. Yuan, Y., Shen, Z., Interaction with BRCA2 suggests a role for filamin-1 (hsFLNa) in DNA damage response. *The Journal of biological chemistry* 276, 48318-48324 (2001); published online EpubDec 21 (10.1074/jbc.M102557200).
83. Kircher, P., Hermanns, C., Nossek, M., Drexler, M. K., 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. *Science signaling* 8, ra112 (2015); published online EpubNov 10 (10.1126/scisignal.aad2959).
84. Flanagan, L. A., Chou, J., Falet, H., Neujahr, R., Hartwig, J. H., Stossel, T. P., Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical

- actin filaments in human melanoma cells. *The Journal of cell biology* 155, 511-517 (2001); published online EpubNov 12 (10.1083/jcb.200105148).
85. Kainulainen, T., Pender, A., D'Addario, M., Feng, Y., Lekic, P., McCulloch, C. A., Cell death and mechanoprotection by filamin a in connective tissues after challenge by applied tensile forces. *The Journal of biological chemistry* 277, 21998-22009 (2002); published online EpubJun 14 (10.1074/jbc.M200715200).
86. Feng, Y., Chen, M. H., Moskowitz, I. P., Mendonza, A. M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D. J., Walsh, C. A., Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19836-19841 (2006); published online EpubDec 26 (10.1073/pnas.0609628104).
87. Ferland, R. J., Gaitanis, J. N., Apse, K., Tantravahi, U., Walsh, C. A., Sheen, V. L., Periventricular nodular heterotopia and Williams syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* 140, 1305-1311 (2006); published online EpubJun 15 (10.1002/ajmg.a.31259).
88. Hart, A. W., Morgan, J. E., Schneider, J., West, K., McKie, L., Bhattacharya, S., Jackson, I. J., Cross, S. H., Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin A. *Human molecular genetics* 15, 2457-2467 (2006); published online EpubAug 15 (10.1093/hmg/ddl168).
89. Robertson, S. P., Filamin A: phenotypic diversity. *Current opinion in genetics & development* 15, 301-307 (2005); published online EpubJun (10.1016/j.gde.2005.04.001).
90. Kyndt, F., Gueffet, J. P., Probst, V., Jaafar, P., Legendre, A., Le Bouffant, F., Toquet, C., Roy, E., McGregor, L., Lynch, S. A., Newbury-Ecob, R., Tran, V., Young, I., Trochu, J. N., Le Marec, H., Schott, J. J., Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 115, 40-49 (2007); published online EpubJan 02 (10.1161/circulationaha.106.622621).
91. Shao, Q. Q., Zhang, T. P., Zhao, W. J., Liu, Z. W., You, L., Zhou, L., Guo, J. C., Zhao, Y. P., Filamin A: Insights into its Exact Role in Cancers. *Pathology oncology research : POR* 22, 245-252 (2016); published online EpubApr (10.1007/s12253-015-9980-1).
92. Cunningham, C. C., Gorlin, J. B., Kwiatkowski, D. J., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Byers, H. R., Stossel, T. P., Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science (New York, N.Y.)* 255, 325-327 (1992); published online EpubJan 17 (
93. Dai, J., Sheetz, M. P., Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophysical journal* 77, 3363-3370 (1999); published online EpubDec (10.1016/s0006-3495(99)77168-7).
94. Robertson, S. P., Twigg, S. R., Sutherland-Smith, A. J., Biancalana, V., Gorlin, R. J., Horn, D., Kenwrick, S. J., Kim, C. A., Morava, E., Newbury-Ecob, R., Orstavik, K. H., Quarrell, O. W., Schwartz, C. E., Shears, D. J., Suri, M., Kendrick-Jones, J., Wilkie, A. O., Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature genetics* 33, 487-491 (2003); published online EpubApr (10.1038/ng1119).
95. Fox, J. W., Lamperti, E. D., Eksioğlu, Y. Z., Hong, S. E., Feng, Y., Graham, D. A., Scheffer, I. E., Dobyns, W. B., Hirsch, B. A., Radtke, R. A., Berkovic, S. F.,

- Huttenlocher, P. R., Walsh, C. A., Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21, 1315-1325 (1998); published online EpubDec (
96. Sahai, E., Marshall, C. J., RHO-GTPases and cancer. *Nature reviews. Cancer* 2, 133-142 (2002); published online EpubFeb (10.1038/nrc725).
97. Kim, T. Y., Vigil, D., Der, C. J., Juliano, R. L., Role of DLC-1, a tumor suppressor protein with RhoGAP activity, in regulation of the cytoskeleton and cell motility. *Cancer metastasis reviews* 28, 77-83 (2009); published online EpubJun (10.1007/s10555-008-9167-2).
98. Ridley, A. J., Rho GTPases and cell migration. *Journal of cell science* 114, 2713-2722 (2001); published online EpubAug (
99. Yuan, B. Z., Miller, M. J., Keck, C. L., Zimonjic, D. B., Thorgeirsson, S. S., Popescu, N. C., Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer research* 58, 2196-2199 (1998); published online EpubMay 15 (
100. Xue, W., Krasnitz, A., Lucito, R., Sordella, R., Vanaelst, L., Cordon-Cardo, C., Singer, S., Kuehnel, F., Wigler, M., Powers, S., Zender, L., Lowe, S. W., DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes & development* 22, 1439-1444 (2008); published online EpubJun 01 (10.1101/gad.1672608).
101. Lahoz, A., Hall, A., DLC1: a significant GAP in the cancer genome. *Genes & development* 22, 1724-1730 (2008); published online EpubJul 01 (10.1101/gad.1691408).
102. Durkin, M. E., Ullmannova, V., Guan, M., Popescu, N. C., 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 (2007); published online EpubJul 5 (10.1038/sj.onc.1210244).
103. Lek, A., Lek, M., North, K. N., Cooper, S. T., Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC evolutionary biology* 10, 231 (2010); published online EpubJul 29 (10.1186/1471-2148-10-231).
104. Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J., Petit, C., A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nature genetics* 21, 363-369 (1999); published online EpubApr (10.1038/7693).
105. Posey, A. D., Jr., Demonbreun, A., McNally, E. M., Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth. *Current topics in developmental biology* 96, 203-230 (2011)10.1016/b978-0-12-385940-2.00008-5).
106. Britton, S., Freeman, T., Vafiadaki, E., Keers, S., Harrison, R., Bushby, K., Bashir, R., The third human FER-1-like protein is highly similar to dysferlin. *Genomics* 68, 313-321 (2000); published online EpubSep 15 (10.1006/geno.2000.6290).
107. Nelen, M. R., Padberg, G. W., Peeters, E. A., Lin, A. Y., van den Helm, B., Frants, R. R., Coulon, V., Goldstein, A. M., van Reen, M. M., Easton, D. F., Eeles, R. A., Hodgsen, S., Mulvihill, J. J., Murday, V. A., Tucker, M. A., Mariman, E. C., Starink, T. M., Ponder, B. A., Ropers, H. H., Kremer, H., Longy, M., Eng, C., Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nature genetics* 13, 114-116 (1996); published online EpubMay (10.1038/ng0596-114).

108. Jacoby, R. F., Schlack, S., Sekhon, G., Laxova, R., Del(10)(q22.3q24.1) associated with juvenile polyposis. *American journal of medical genetics* 70, 361-364 (1997); published online EpubJun 27 (
109. Zigman, A. F., Lavine, J. E., Jones, M. C., Boland, C. R., Carethers, J. M., Localization of the Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome gene to chromosome 10q23. *Gastroenterology* 113, 1433-1437 (1997); published online EpubNov (
110. Suomalainen, A., Kaukonen, J., Amati, P., Timonen, R., Haltia, M., Weissenbach, J., Zeviani, M., Somer, H., Peltonen, L., An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA. *Nature genetics* 9, 146-151 (1995); published online EpubFeb (10.1038/ng0295-146).
111. Patel, P., Harris, R., Geddes, S. M., Strehle, E. M., Watson, J. D., Bashir, R., Bushby, K., Driscoll, P. C., Keep, N. H., Solution structure of the inner DysF domain of myoferlin and implications for limb girdle muscular dystrophy type 2b. *Journal of molecular biology* 379, 981-990 (2008); published online EpubJun 20 (10.1016/j.jmb.2008.04.046).
112. Yan, M., Rachubinski, D. A., Joshi, S., Rachubinski, R. A., Subramani, S., Dysferlin domain-containing proteins, Pex30p and Pex31p, localized to two compartments, control the number and size of oleate-induced peroxisomes in *Pichia pastoris*. *Molecular biology of the cell* 19, 885-898 (2008); published online EpubMar (10.1091/mbc.E07-10-1042).
113. Davis, D. B., Delmonte, A. J., Ly, C. T., McNally, E. M., Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 9, 217-226 (2000); published online EpubJan 22 (
114. Bansal, D., Campbell, K. P., Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in cell biology* 14, 206-213 (2004); published online EpubApr (10.1016/j.tcb.2004.03.001).
115. Demonbreun, A. R., Posey, A. D., Heretis, K., Swaggart, K. A., Earley, J. U., Pytel, P., McNally, E. M., Myoferlin is required for insulin-like growth factor response and muscle growth. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 1284-1295 (2010); published online EpubApr (10.1096/fj.09-136309).
116. Benaud, C., Gentil, B. J., Assard, N., Court, M., Garin, J., Delphin, C., Baudier, J., AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *The Journal of cell biology* 164, 133-144 (2004); published online EpubJan 05 (10.1083/jcb.200307098).
117. Huang, Y., Laval, S. H., van Remoortere, A., Baudier, J., Benaud, C., Anderson, L. V., Straub, V., Deelder, A., Frants, R. R., den Dunnen, J. T., Bushby, K., van der Maarel, S. M., AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 732-742 (2007); published online EpubMar (10.1096/fj.06-6628com).
118. Bernatchez, P. N., Sharma, A., Kodaman, P., Sessa, W. C., Myoferlin is critical for endocytosis in endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 297, C484-492 (2009); published online EpubSep (10.1152/ajpcell.00498.2008).
119. Bernatchez, P. N., Acevedo, L., Fernandez-Hernando, C., Murata, T., Chalouni, C., Kim, J., Erdjument-Bromage, H., Shah, V., Gratton, J. P., McNally, E. M., Tempst, P., Sessa, W. C., Myoferlin regulates vascular

- endothelial growth factor receptor-2 stability and function. *The Journal of biological chemistry* 282, 30745-30753 (2007); published online EpubOct 19 (10.1074/jbc.M704798200).
120. Yu, C., Sharma, A., Trane, A., Utokaparch, S., Leung, C., Bernatchez, P., Myoferlin gene silencing decreases Tie-2 expression in vitro and angiogenesis in vivo. *Vascular pharmacology* 55, 26-33 (2011); published online EpubJul-Sep (10.1016/j.vph.2011.04.001).
121. Eisenberg, M. C., Kim, Y., Li, R., Ackerman, W. E., Kniss, D. A., Friedman, A., Mechanistic modeling of the effects of myoferlin on tumor cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 20078-20083 (2011); published online EpubDec 13 (10.1073/pnas.1116327108).
122. Amatschek, S., Koenig, U., Auer, H., Steinlein, P., Pacher, M., Gruenfelder, A., Dekan, G., Vogl, S., Kubista, E., Heider, K. H., Stratowa, C., Schreiber, M., Sommergruber, W., Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer research* 64, 844-856 (2004); published online EpubFeb 01 (
123. Adam, P. J., Boyd, R., Tyson, K. L., Fletcher, G. C., Stamps, A., Hudson, L., Poyser, H. R., Redpath, N., Griffiths, M., Steers, G., Harris, A. L., Patel, S., Berry, J., Loader, J. A., Townsend, R. R., Daviet, L., Legrain, P., Parekh, R., Terrett, J. A., Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. *The Journal of biological chemistry* 278, 6482-6489 (2003); published online EpubFeb 21 (10.1074/jbc.M210184200).
124. Leung, C., Yu, C., Lin, M. I., Tognon, C., Bernatchez, P., Expression of myoferlin in human and murine carcinoma tumors: role in membrane repair, cell proliferation, and tumorigenesis. *The American journal of pathology* 182, 1900-1909 (2013); published online EpubMay (10.1016/j.ajpath.2013.01.041).
125. Volakis, L. I., Li, R., Ackerman, W. E. t., Mihai, C., Bechel, M., Summerfield, T. L., Ahn, C. S., Powell, H. M., Zielinski, R., Rosol, T. J., Ghadiali, S. N., Kniss, D. A., Loss of myoferlin redirects breast cancer cell motility towards collective migration. *PloS one* 9, e86110 (2014)10.1371/journal.pone.0086110).
126. Blackstone, B. N., Li, R., Ackerman, W. E. t., Ghadiali, S. N., Myoferlin depletion elevates focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation and enhances cell-matrix adhesion in breast cancer cells. 308, C642-649 (2015); published online EpubApr 15 (10.1152/ajpcell.00276.2014).
127. Turtoi, A., Blomme, A., Bellahcene, A., Gilles, C., Hennequiere, V., Peixoto, P., Bianchi, E., Noel, A., De Pauw, E., Lifrange, E., Delvenne, P., Castronovo, V., Myoferlin is a key regulator of EGFR activity in breast cancer. *Cancer research* 73, 5438-5448 (2013); published online EpubSep 1 (10.1158/0008-5472.can-13-1142).
128. Hayflick, L., Moorhead, P. S., The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 585-621 (1961); published online EpubDec (
129. Hayflick, L., THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental cell research* 37, 614-636 (1965); published online EpubMar (
130. Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W., Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460 (1990); published online EpubMay 31 (10.1038/345458a0).

131. Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F., Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 729-740 (2007); published online EpubSep (10.1038/nrm2233).
132. Collado, M., Serrano, M., Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature reviews. Cancer* 10, 51-57 (2010); published online EpubJan (10.1038/nrc2772).
133. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., Lowe, S. W., Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602 (1997); published online EpubMar 07 (
134. Moiseeva, O., Mallette, F. A., Mukhopadhyay, U. K., Moores, A., Ferbeyre, G., DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Molecular biology of the cell* 17, 1583-1592 (2006); published online EpubApr (10.1091/mbc.E05-09-0858).
135. Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., Campisi, J., Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature cell biology* 5, 741-747 (2003); published online EpubAug (10.1038/ncb1024).
136. Roninson, I. B., Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer research* 63, 2705-2715 (2003); published online EpubJun 01 (
137. Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S. A., Myers, M. P., Lowe, S. W., A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503-514 (2006); published online EpubAug 11 (10.1016/j.cell.2006.05.052).
138. Sherwood, S. W., Rush, D., Ellsworth, J. L., Schimke, R. T., Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 9086-9090 (1988); published online EpubDec (
139. Mason, D. X., Jackson, T. J., Lin, A. W., Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene* 23, 9238-9246 (2004); published online EpubDec 09 (10.1038/sj.onc.1208172).
140. Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., Hwang, E. S., Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell* 5, 187-195 (2006); published online EpubApr (10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x).
141. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9363-9367 (1995); published online EpubSep 26 (
142. Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D., Funk, W. D., Microarray analysis of replicative senescence. *Current biology : CB* 9, 939-945 (1999); published online EpubSep 09 (
143. Kuilman, T., Peeper, D. S., Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews. Cancer* 9, 81-94 (2009); published online EpubFeb (10.1038/nrc2560).
144. Kirkwood, T. B., Austad, S. N., Why do we age? *Nature* 408, 233-238 (2000); published online EpubNov 09 (10.1038/35041682).
145. Du, W., Vidal, M., Xie, J. E., Dyson, N., RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in Drosophila. *Genes & development* 10, 1206-1218 (1996); published online EpubMay 15 (

146. Roh, M. R., Eliades, P., Gupta, S., Tsao, H., Genetics of melanocytic nevi. *Pigment cell & melanoma research* 28, 661-672 (2015); published online EpubNov (10.1111/pcmr.12412).
147. Jacob, K., Quang-Khuong, D. A., Jones, D. T., Witt, H., Lambert, S., Albrecht, S., Witt, O., Vezina, C., Shirinian, M., Faury, D., Garami, M., Hauser, P., Klekner, A., Bogнар, L., Farmer, J. P., Montes, J. L., Atkinson, J., Hawkins, C., Korshunov, A., Collins, V. P., Pfister, S. M., Tabori, U., Jabado, N., Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 4650-4660 (2011); published online EpubJul 15 (10.1158/1078-0432.ccr-11-0127).
148. Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M., Lowe, S. W., Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer cell* 17, 376-387 (2010); published online EpubApr 13 (10.1016/j.ccr.2010.01.023).
149. Hermanns, C., Hampl, V., Holzer, K., Aigner, A., Penkava, J., Frank, N., Martin, D. E., Maier, K. C., Waldburger, N., Roessler, S., The novel MKL target gene myoferlin modulates expansion and senescence of hepatocellular carcinoma. (2017); published online EpubJan 23 (10.1038/onc.2016.496).
150. Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G., Sternweis, P. C., p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science (New York, N.Y.)* 280, 2109-2111 (1998); published online EpubJun 26 (
151. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 136, E359-386 (2015); published online EpubMar 01 (10.1002/ijc.29210).
152. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61, 69-90 (2011); published online EpubMar-Apr (10.3322/caac.20107).
153. Bae, J. S., Noh, S. J., Kim, K. M., Jang, K. Y., Chung, M. J., Kim, D. G., Moon, W. S., Serum response factor induces epithelial to mesenchymal transition with resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* 44, 129-136 (2014); published online EpubJan (10.3892/ijo.2013.2154).
154. Kwon, C. Y., Kim, K. R., Choi, H. N., Chung, M. J., Noh, S. J., Kim, D. G., Kang, M. J., Lee, D. G., Moon, W. S., The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for disease progression. *International journal of oncology* 37, 837-844 (2010); published online EpubOct (
155. Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B., Hsu, S. H., Datta, J., Kutay, H., Yadav, A., Nuovo, G., Kumar, P., Ghoshal, K., MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *The Journal of biological chemistry* 284, 32015-32027 (2009); published online EpubNov 13 (10.1074/jbc.M109.016774).
156. Park, M. Y., Kim, K. R., Park, H. S., Park, B. H., Choi, H. N., Jang, K. Y., Chung, M. J., Kang, M. J., Lee, D. G., Moon, W. S., Expression of the serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for epithelial-mesenchymal transition. *International journal of oncology* 31, 1309-1315 (2007); published online EpubDec (

157. Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., Schultz, N., Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 6, pl1 (2013); published online EpubApr 02 (10.1126/scisignal.2004088).
158. Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C., Elson, E. L., Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of cell science* 114, 1025-1036 (2001); published online EpubMar (
159. Muehlich, S., Rehm, M., Ebenau, A., Goppelt-Struebe, M., Synergistic induction of CTGF by cytochalasin D and TGFbeta-1 in primary human renal epithelial cells: Role of transcriptional regulators MKL1, YAP/TAZ and Smad2/3. *Cellular signalling* 29, 31-40 (2017); published online EpubJan (10.1016/j.cellsig.2016.10.002).
160. Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L., Korn, E. D., Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *The Journal of biological chemistry* 269, 14869-14871 (1994); published online EpubMay 27 (
161. Scholzen, T., Gerdes, J., The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 182, 311-322 (2000); published online EpubMar (10.1002/(sici)1097-4652(200003)182:3<311::aid-jcp1>3.0.co;2-9).
162. Descot, A., Hoffmann, R., Shaposhnikov, D., Reschke, M., Ullrich, A., Posern, G., Negative regulation of the EGFR-MAPK cascade by actin-MAL-mediated Mig6/Errfi-1 induction. *Molecular cell* 35, 291-304 (2009); published online EpubAug 14 (10.1016/j.molcel.2009.07.015).
163. Leitner, L., Shaposhnikov, D., Mengel, A., Descot, A., Julien, S., Hoffmann, R., Posern, G., MAL/MRTF-A controls migration of non-invasive cells by upregulation of cytoskeleton-associated proteins. *Journal of cell science* 124, 4318-4331 (2011); published online EpubDec 15 (10.1242/jcs.092791).
164. Hanahan, D., Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011); published online EpubMar 4 (10.1016/j.cell.2011.02.013).
165. Li, R., Ackerman, W. E. t., Mihai, C., Volakis, L. I., Ghadiali, S., Kniss, D. A., Myoferlin depletion in breast cancer cells promotes mesenchymal to epithelial shape change and stalls invasion. *PloS one* 7, e39766 (2012)10.1371/journal.pone.0039766).
166. Demidenko, Z. N., Shtutman, M., Blagosklonny, M. V., Pharmacologic inhibition of MEK and PI-3K converges on the mTOR/S6 pathway to decelerate cellular senescence. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8, 1896-1900 (2009); published online EpubJun 15 (10.4161/cc.8.12.8809).
167. Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., Schlessinger, J., Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363, 85-88 (1993); published online EpubMay 6 (10.1038/363085a0).
168. McKay, M. M., Morrison, D. K., Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113-3121 (2007); published online EpubMay 14 (10.1038/sj.onc.1210394).
169. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., Toussaint, O., Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols* 4, 1798-1806 (2009)10.1038/nprot.2009.191).

170. Takamura, M., Sakamoto, M., Genda, T., Ichida, T., Asakura, H., Hirohashi, S., Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33, 577-581 (2001); published online EpubMar (10.1053/jhep.2001.22652).
171. Imamura, F., Mukai, M., Ayaki, M., Akedo, H., Y-27632, an inhibitor of rho-associated protein kinase, suppresses tumor cell invasion via regulation of focal adhesion and focal adhesion kinase. *Japanese journal of cancer research : Gann* 91, 811-816 (2000); published online EpubAug (
172. Routhier, A., Astuccio, M., Lahey, D., Monfredo, N., Johnson, A., Callahan, W., Partington, A., Fellows, K., Ouellette, L., Zhidro, S., Goodrow, C., Smith, A., Sullivan, K., Simone, P., Le, L., Vezuli, B., Zohni, M., West, E., Gleason, D., Bryan, B., Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. *Oncology reports* 23, 861-867 (2010); published online EpubMar (
173. Lee, J., Park, S., Roh, S., Y-27632, a ROCK inhibitor, delays senescence of putative murine salivary gland stem cells in culture. *Archives of oral biology* 60, 875-882 (2015); published online EpubJun (10.1016/j.archoralbio.2015.03.003).
174. Muehlich, S., Gudermann, T., Pro-senescence therapy for hepatocellular carcinoma. *Aging* 5, 639-640 (2013); published online EpubSep (
175. Cotarelo, C. L., Schad, A., Kirkpatrick, C. J., Sleeman, J. P., Springer, E., Schmidt, M., Thaler, S., Detection of cellular senescence within human invasive breast carcinomas distinguishes different breast tumor subtypes. *Oncotarget* 7, 74846-74859 (2016); published online EpubNov 15 (10.18632/oncotarget.12432).
176. Reschke, M., Ferby, I., Stepniak, E., Seitzer, N., Horst, D., Wagner, E. F., Ullrich, A., Mitogen-inducible gene-6 is a negative regulator of epidermal growth factor receptor signaling in hepatocytes and human hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51, 1383-1390 (2010); published online EpubApr (10.1002/hep.23428).
177. Hobel, S., Aigner, A., Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 5, 484-501 (2013); published online EpubSep-Oct (10.1002/wnan.1228).
178. Ragni, M. V., Targeting Antithrombin to Treat Hemophilia. *The New England journal of medicine* 373, 389-391 (2015); published online EpubJul 23 (10.1056/NEJMcibr1505657).
179. Blomme, A., Costanza, B., de Tullio, P., Thiry, M., Van Simaey, G., Boutry, S., Doumont, G., Di Valentin, E., Hirano, T., Yokobori, T., Gofflot, S., Peulen, O., Bellahcene, A., Sherer, F., Le Goff, C., Cavalier, E., Mouithys-Mickalad, A., Jouret, F., Cusumano, P. G., Lifrange, E., Muller, R. N., Goldman, S., Delvenne, P., De Pauw, E., Nishiyama, M., Castronovo, V., Turtoi, A., Myoferlin regulates cellular lipid metabolism and promotes metastases in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 36, 2116-2130 (2017); published online EpubApr (10.1038/onc.2016.369).
180. Brenner, T. L., Adams, V. R., First MAb approved for treatment of metastatic breast cancer. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Washington, D.C. : 1996)* 39, 236-238 (1999); published online EpubMar-Apr (
181. Abicht, A., Lochmuller, H., Technology evaluation: edrecolomab, Centocor Inc. *Current opinion in molecular therapeutics* 2, 593-600 (2000); published online EpubOct (

-
182. Ranson, M., Mansoor, W., Jayson, G., ZD1839 (IRESSA): a selective EGFR-TK inhibitor. *Expert review of anticancer therapy* 2, 161-168 (2002); published online EpubApr (10.1586/14737140.2.2.161).
 183. Sullivan, I., Planchard, D., Next-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for Treating EGFR-Mutant Lung Cancer beyond First Line. *Frontiers in medicine* 3, 76 (2016)10.3389/fmed.2016.00076).
 184. Martinelli, E., Morgillo, F., Troiani, T., Ciardiello, F., Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. *Cancer treatment reviews* 53, 61-69 (2017); published online EpubFeb (10.1016/j.ctrv.2016.12.001).
 185. Roberts, P. J., Der, C. J., Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291-3310 (2007); published online EpubMay 14 (10.1038/sj.onc.1210422).
 186. Kim, J. H., Kim, B. J., Jang, H. J., Lee, J., Molecular targeted agents as second-line treatment for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget* 8, 102321-102327 (2017); published online EpubNov 24 (10.18632/oncotarget.21454).
 187. Sonnemann, J., Palani, C. D., Wittig, S., Becker, S., Eichhorn, F., Voigt, A., Beck, J. F., Anticancer effects of the p53 activator nutlin-3 in Ewing's sarcoma cells. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 47, 1432-1441 (2011); published online EpubJun (10.1016/j.ejca.2011.01.015).
 188. Manfe, V., Biskup, E., Johansen, P., Kamstrup, M. R., Krejsgaard, T. F., Morling, N., Wulf, H. C., Gniadecki, R., MDM2 inhibitor nutlin-3a induces apoptosis and senescence in cutaneous T-cell lymphoma: role of p53. *The Journal of investigative dermatology* 132, 1487-1496 (2012); published online EpubMay (10.1038/jid.2012.10).
 189. Nardella, C., Clohessy, J. G., Alimonti, A., Pandolfi, P. P., Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature reviews. Cancer* 11, 503-511 (2011); published online EpubJun 24 (10.1038/nrc3057).
 190. te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J., Joel, S. P., DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer research* 62, 1876-1883 (2002); published online EpubMar 15 (

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aq. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
<i>Aqua bidest</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Crm1	<i>Chromosomal maintenance 1</i>
C-terminal	carboxyterminal
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DLC1	<i>Deleted in Liver Cancer 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBS	<i>Ets binding site</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EIk	<i>E-26-like protein</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ETS	<i>E twenty-six</i>
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
F-Aktin	filamentäres Aktin
FBS	fetales bovines Serum
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FER1L3	<i>Fer-1-like protein 3</i>
FLNA	Filamin A
G	Guanin
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glu	Glutaminsäure
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanschwefelsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IEG	<i>Immediate early genes</i>
Ig	Immunglobulin
IGFR	<i>Insulin growth factor receptor</i>
IP	Immunpräzipitation
ITGA5	Integrin alpha-5

KCl	Kaliumchlorid
kDa	<i>kilo Dalton</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Leu	Leucin
LOH	<i>Loss of Heterocycgocity</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
M	molar
mA	Milliampère
MADS-Box	MCM1, Agamous, Deficiens, SRF-Box
MAL	<i>Megakaryocytic leukemia</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
mg	Milligramm
Mig6	<i>Mitogen-inducible gene 6</i>
min	Minute
MKL1	<i>Megakaryoblastic leukemia 1</i>
MKL2	<i>Megakaryoblastic leukemia 2</i>
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRTF	<i>Myocardin related transcription factor</i>
MYOF	Myoferlin
n	nano
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pEGFR	phosphorylierter <i>Epidermal growth factor receptor</i>
PEI	Polyethylenimin
pERK	<i>Phospho extracellular signal regulated Kinase</i>
PI	Proteaseinhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
pRb	phosphoryliertes Retinoblastom Protein
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastom Protein
Rho	<i>Ras homologue</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.u.	siehe unten
SAF	<i>Scaffold attachment factor</i>
SAP	SAF-A/B, Acinus und Pias
SAR	<i>Scaffold attachment region</i>
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SM22	<i>Small muscle-specific protein 22</i>
SMAD	<i>Small mothers against decapentaplegic homologue</i>
SMS	<i>Senescence-messaging secretome</i>

sog.	sogenannte
SOS	<i>Son of sevenless</i>
SRE	<i>Serum response element</i>
SRF	<i>Serum response factor</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
T	Thymin
TAD	<i>Transcription activation domain</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline Tween</i>
TCF	<i>Ternary complex factor</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
TNBC	<i>Triple negative breast cancer</i>
TNSF10	<i>Tumor necrosis factor superfamily member 10</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polysorbat 20
u. a.	unter anderem
v.a.	vor allem
v/v	Volumen zu Volumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
w/v	Gewicht zu Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar

Weitere fachliche Abkürzungen, v. a. englischer Terminologie, wurden im Text an entsprechender Stelle erläutert und sind hier nicht aufgeführt.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von SRF mit MADS-Box.....	10
Abbildung 2: Bindung von TCF an SRF.....	12
Abbildung 3: Struktur der transkriptionellen Coaktivatoren von SRF.....	18
Abbildung 4: mDia und Rho-Kinase im Modell der SRF-Aktivierung.....	20
Abbildung 5: Aktivierung und Regulation von MKL1.....	21
Abbildung 6: Domänen von Filamin A.....	25
Abbildung 7: Der Ras-GTP/GDP-Zyklus.....	30
Abbildung 8: Domänen von Myoferlin und anderen Ferlinen.....	32
Abbildung 9: Entwicklungswege einer Zelle.....	39
Abbildung 10: Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz.....	43
Abbildung 11: Stimulation der Expression von Myoferlin in Huh7-Zellen.....	87
Abbildung 12: Stimulation der Expression von Myoferlin in MDA-MB-468 Zellen.....	88
Abbildung 13: Relative Luciferaseaktivität am Myoferlin-Promotor.....	89
Abbildung 14: MKL1-Deletionskonstrukt ohne FLNA-Bindfähigkeit.....	90
Abbildung 15: Einfluss des MKL1-Deletionskonstrukts Δ 301-310 auf die Myoferlin-Expression.....	91
Abbildung 16: Hemmung der Proliferation nach MKL1/2-Depletion.....	92
Abbildung 17: Hemmung der Proliferation nach Myoferlin-Depletion.....	93
Abbildung 18: Phosphorylierung von EGFR nach Myoferlin-Knockdown.....	95
Abbildung 19: Phosphorylierung von ERK nach Myoferlin-Knockdown.....	96
Abbildung 20: β -Galaktosidaseaktivität nach MKL1/2-Depletion.....	97
Abbildung 21: β -Galaktosidaseaktivität nach Myoferlin-Depletion.....	98
Abbildung 22: Modell der Onkogen-induzierten Seneszenz mit EGFR-Aktivierung.....	108
Abbildung 23: Modell der Onkogen-induzierten Seneszenz mit ERK1/2-Aktivierung.....	110
Abbildung 24: Signalweg der Onkogen-induzierten Seneszenz nach Myoferlin-Depletion.....	113

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien mit zugehörigen Zellkulturmedien.....	45
Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmedien.....	46
Tabelle 3: Zusätze der Zellkulturmedien.....	46
Tabelle 4: Primäre Antikörper für Immunoblot	47
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für Immunoblot	48
Tabelle 6: Plasmide mit zugehörigen Vektoren	49
Tabelle 7: siRNA-Oligonukleotide mit Sequenz	50
Tabelle 8: Humane Primer für qRT-PCR mit zugehöriger Sequenz	51
Tabelle 9: Antibiotika.....	51
Tabelle 10: Enzyme	52
Tabelle 11: Inhibitoren und Stimulantien.....	52
Tabelle 12: Bakterien	53
Tabelle 13: Agar und Medium zur Bakterienkultivierung	53
Tabelle 14: Reaktions-Kits	53
Tabelle 15: Reagenzien für cDNA-Synthese und qRT-PCR.....	54
Tabelle 16: Transfektionsreagenzien.....	54
Tabelle 17: Calciumphosphat-Transfektionsreagenzien.....	55
Tabelle 18: Kralewski-Lysis-Puffer.....	55
Tabelle 19: IP-Puffer	56
Tabelle 20: SDS-PAGE-Puffer.....	57
Tabelle 21: Immunoblot-Puffer.....	58
Tabelle 22: PBS für Wasch- und Verdünnungsvorgänge	59
Tabelle 23: DEPC-H ₂ O für RNA-Resuspension	59
Tabelle 24: Detektionslösungen für Immunoblot.....	60
Tabelle 25: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE	61
Tabelle 26: Chemikalien	62
Tabelle 27: Verbrauchsgegenstände	65
Tabelle 28: Technische Gerätschaften	66
Tabelle 29: Software-Programme	68
Tabelle 30: Lösungen zur Transfektion mittels Lipofectamine [®] 2000	74

Tabelle 31: Lösungen zur Transfektion mittels Calciumphosphat	75
Tabelle 32: Reaktionsschritte der qRT-PCR.....	77
Tabelle 33: Reagenzien für Mutagenesis-PCR.....	78
Tabelle 34: Reaktionsbedingungen für PCR.....	78
Tabelle 35: Reagenzien für KLD-Verdau	79

12 Veröffentlichungen

Die folgenden Veröffentlichungen gingen aus dieser Dissertation hervor:

Originalartikel

The novel MKL target gene myoferlin modulates expansion and senescence of hepatocellular carcinoma. Hermanns C, Hampl V, Aigner A, Penkava J, Frank N, Martin DE, Maier KC, Goppelt-Struebe M, Holzer K, Singer S, Thavamani A, Nordheim A, Gudermann T, Muehlich S. **Oncogene**. 2017 Jan

Filamin A interacts with the coactivator MKL1 to promote the activity of the transcription factor SRF and cell migration. Kircher P, Hermanns C, Nossek M, Drexler MK, Grosse R, Fischer M, Sarikas A, Penkava J, Lewis T, Prywes R, Gudermann T, Muehlich S. **Science Signaling**. 2015 Nov

Vorträge

Charakterisierung von Myoferlin als MKL1/2- und SRF-abhängiges Zielgen. Symposium im Rahmen des FöFoLe-Statusseminars, Ludwig-Maximilian-Universität, Herrsching am Ammersee, Mai 2015

Charakterisierung von Myoferlin als MKL1/2- und SRF-abhängiges Zielgen. Institutsseminar, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Juni 2015

Oncogene induced senescence in pilocytic astrocytoma. Combined Neurology and Neurosurgery Rounds, Hospital for Sick Children, University of Toronto, August 2015

13 Danksagung

Frau Professorin Susanne Mühlich danke ich für die Überlassung des Themas und ihre Betreuung während der Durchführung der Dissertationsarbeit und darüber hinaus. Sie war stets mit Antworten auf meine Fragen zur Stelle und hatte immer eine offene Tür für die Diskussion wissenschaftlicher und methodischer Belange. Ihre fachliche Kompetenz und ihre ausgeglichene Art haben mich motiviert. Das Gelingen meines Studiums hat sie mit Rat und Empfehlungen unterstützt.

Herrn Professor Gudermann möchte ich zunächst dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit am Walther-Straub-Institut durchführen durfte. Er war ein guter Mentor in meinem bisherigen Studium, der mir mit seiner Unterstützung bei der Vorbereitung von Vorträgen und wertvollen fachlichen Anregungen sowie persönlichen Ratschlägen zur Seite stand und das Gelingen meines Studiums wesentlich befördert hat.

Ich danke Frau Schreier und Frau Seitz für die Hilfe bei unzähligen organisatorischen Dingen und die angenehmen Gespräche.

Frau Clara-Mae Beer danke ich für die Einarbeitung in zell- und molekularbiologische Arbeitstechniken, ihre fachliche Unterstützung und ihr jederzeit offenes Ohr.

Danke auch an die Kollegen der AG Mühlich für die Zusammenarbeit.

Desweiteren danke ich meinen Freunden und Kommilitonen Johannes Rädler, Dominik Lisowski, Thanos Tsaktanis und Stephan Ledderose für den Gedankenaustausch und die gegenseitigen Besuche im Labor.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern. Durch ihre Unterstützung in allen Lebenslagen wurde mir das Studium der Humanmedizin und schließlich der Abschluss der hier vorliegenden Dissertation erst möglich.