

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Der transkriptionelle Koaktivator Megakaryoblastische Leukämie 1
als Mediator der Tumorigenese bei Verlust des Tumorsuppressors
Deleted in Liver Cancer 1**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sahraa Khalid

aus Mossul

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Mitberichterstatter:	PD Dr. Robert Kammerer PD Dr. Barbara Mayer
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Prof. Dr. Susanne Mühlich
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	15.06.2023

Zusammenfassung

Der Verlust des Tumorsuppressorgens „Deleted in Liver Cancer“ (DLC1) spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorigenese. 50% der Leber-, Brust-, Lungen- und 70% der Darmtumore weisen eine heterozygote Deletion von DLC1 auf. Der Signalweg, der durch den DLC1-Verlust induziert wird, war bislang unklar. Die vorliegende Arbeit deckt einen neuen molekularen Mechanismus in der Tumorigenese auf, indem der Transkriptionskoaktivator „Megakaryoblastic Leukemia 1“ (MKL1) infolge eines DLC1-Verlusts aktiviert wird und die Tumortransformation vermittelt. Zum ersten Mal konnte nachgewiesen werden, dass MKL1 infolge des DLC1-Verlusts konstitutiv im Zellkern der hepatozellulären Karzinomzelllinie HuH7 und der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 lokalisiert ist. DLC1 ist ebenfalls ein RhoGAP Protein, das Rho-GTPasen wie RhoA reguliert. Des Weiteren zeigte sich, dass die nukleäre Akkumulation von MKL1 in den DLC1-defizienten Tumorzellen durch den RhoA/Aktin-Signalweg vermittelt wird. Diese mündet in eine konstitutive Aktivierung von MKL1-abhängigen, tumorrelevanten Zielgenen, wie CTGF. Schließlich führt ein Knockdown von MKL1 zur Hemmung der Zellproliferation und zu protumorigenen Veränderungen im Zytoskelett. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass der Transkriptionskoaktivator MKL1 als relevanter Mediator der Tumorigenese infolge des Verlusts des Tumorsuppressors DLC1 fungiert.

Abstract

The lack of the tumor suppressor gene „Deleted in Liver Cancer“ (DLC1) plays an important role in the tumorigenesis. 50% of all liver, breast, lung cancers and 70% of colon cancers exhibit a heterocygote deletion of DLC1. The pathway that is induced by lacking DLC1 was unclear so far. This work uncovers a new molecular mechanism in the tumorigenesis where the transcriptional coactivator „Megakaryoblastic Leukemia 1“ (MKL1) is activated by lacking DLC1 and mediates the cancerous transformation. For the first time we could prove that MKL1 is constitutively localized to the nucleus of the hepatocellular cell line HuH7 and of the mammary carcinoma cell line MDA-MB-468 in the absence of DLC1. DLC1 is also a RhoGAP protein which is regulated by Rho-GTPases like RhoA. It was shown that the nuclear accumulation of MKL1 in DLC1-deficient cancer cells is triggered by the RhoA/actin signaling pathway. This results in a constitutive activation of MKL1-dependent, tumor relevant target genes, as CTGF. Finally, a MKL1-knockdown leads to the suppression of cell proliferation and promotes protumor effects in cytoskeleton which is induced by DLC1 loss. Summarizing, this work shows that the transcriptional coactivator MKL1 acts as a mediator of tumorigenesis by loss of the tumor suppressor DLC1.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract.....	1
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung	9
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	9
1.2 Der Transkriptionsfaktor Serum Response Faktor (SRF)	10
1.2.1 Entdeckung von SRF und Serum Response Element (SRE).....	10
1.2.2 Struktur und Funktion von SRF.....	11
1.2.3 Aktivierung und Regulation von SRF	12
1.3 Der transkriptionelle Koaktivator Megakaryoblastic Leukemia 1 (MKL1)	13
1.3.1 Ursprung und Vorkommen von MKL1.....	13
1.3.2 Struktur von MKL1.....	14
1.3.3 Aktivierungsweg von MKL1	14
1.3.4 Biologische Funktion von MKL1	16
1.4 Die Rho-GTPasen	17
1.4.1 Signaltransduktion zur Aktivierung von Rho-Proteinen	17
1.4.2 Rho-GTPasen und das Zytoskelett.....	18
1.4.3 Rho A und ihre Rolle in der Tumorigenese.....	20
1.5 Der Tumorsuppressor Deleted in Liver Cancer 1 (DLC1).....	21
1.5.1 Struktur von DLC1.....	21
1.5.2 Biologische Funktion von DLC1	22
1.6 Ziel der Arbeit	24
2. Materialien.....	25
2.1 Laborgeräte	25
2.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.3 Chemikalien und Reagenzien	26
2.4 Puffer und Lösungen	27

2.5 Zelllinien	29
2.6 Kulturmedien und Antibiotika	29
2.7 Stimulatoren und Inhibitoren	29
2.8 Reaktionskits	30
2.9 Plasmide	30
2.10 Antikörper	30
2.10.1 Primäre Antikörper	30
2.10.2 Sekundäre Antikörper	31
3. Methoden	32
3.1 Zellbiologische Methoden	32
3.1.1 Kultur von Humanzellen und humanen Tumorzellen	32
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	32
3.1.3 Serumentzug	33
3.1.4 Stimulation und Inhibition der Zellen.....	33
3.1.5 Liposomen-basierte, transiente Transfektion	33
3.2 Proteinbiochemische Methoden	33
3.2.1 Proteinextraktion	33
3.2.2 Proteinquantifizierung	34
3.2.3 Aktengewinnung und -fraktionierung	34
3.2.4 SDS-PAGE.....	34
3.2.5 Western Blot.....	35
3.2.6 Detektion mit Hilfe von Antikörpern	36
3.2.7 Quantitative Helligkeitsausmessung von Western Blot-Banden	36
3.3 Immunozytochemische Methoden	36
3.3.1 Beschichtung der Deckgläser mit Fibronectin.....	37
3.3.2 Fixieren und Permeabilisieren von Zellen	37
3.3.3 Immunchemische Färbung	37
3.4 Proliferationsassay	38
3.5 Bildbearbeitung und statistische Auswertung	38

4. Ergebnisse	39
4.1 Nukleäre Lokalisation von MKL1 in Tumorzelllinien mit DLC1-Verlust	39
4.2 Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 nach DLC1-Rekonstitution	40
4.3 Nukleäre Lokalisation von MKL1 als Folge der Aktivierung des RhoA/Aktin- Signalwegs durch den DLC1-Verlust.....	41
4.3.1 Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch die Inhibierung der Rho-Kinase	41
4.3.2 Vermehrte Stressfasern in DLC1-defizienten Tumorzellen	42
4.3.3 Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch Hemmung der Aktinpolymerisation ...	45
4.4 Aktivierung von CTGF als MKL/SRF-abhängiges Zielgen in DLC1-defizienten Tumorzellen	46
4.5 MKL1 als Mediator protumorigener Zytoskelettveränderungen bei DLC1-Verlust	48
4.6 MKL1 als Mediator der Tumorzellproliferation bei DLC1-Verlust.....	49
5. Diskussion	50
5.1 Der molekulare Mechanismus der nukleären Akkumulation von MKL1 infolge des DLC1-Verlusts.....	50
5.2 Aktivierung der MKL/SRF-Zielgenexpression in DCL1-defizienten Tumorzellen.....	54
5.3 Protumorigener Einfluss von MKL1 aufs Aktinzytoskelett bei DLC1-Verlust	54
5.4 Einfluss von MKL1 auf die Tumorzellproliferation bei DLC1-Verlust	56
5.5 Neue pharmakologische Ansätze für die Behandlung von DLC1-defizienten Tumoren	57
6. Ausblick.....	60
Literaturverzeichnis	61
Eidesstattliche Versicherung	80
Danksagung	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : TCF-abhängiger Signalweg zur Aktivierung von SRF	12
Abbildung 2: Struktur von MKL1	14
Abbildung 3: Regulation der subzellulären Lokalisation und der transkriptionellen Aktivität von MKL1.....	15
Abbildung 4: GTP-Zyklus der Rho-GTPasen.....	18
Abbildung 5: Regulierung des Zytoskeletts durch Rho-Proteine	19
Abbildung 6: Regulation vom Aktinzyklus durch RhoA	19
Abbildung 7: Beteiligung der Rho-GTPasen in der Tumorentwicklung.....	20
Abbildung 8: Struktur von DLC1	21
Abbildung 9: Nukleäre Lokalisation von MKL1 in humanen hepatozellulären und Mammakarzinomzelllinien mit einem DLC1-Verlust.....	39
Abbildung 10: Relokalisation von MKL1 vom Zellkern ins Zytoplasma nach Rekonstitution von DLC1.....	40
Abbildung 11: Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch Inhibierung von ROCK	42
Abbildung 12: Vermehrte Stressfasern in DLC1-defizienten Tumorzellen.....	43
Abbildung 13: Kontrolle mit Jasplakinolide: Erfolgreiche Aufteilung von Aktin in F- und G-Aktin	44
Abbildung 14: Erhöhter F-Aktin-Gehalt in DLC1-defizienten Tumorzelllinien als Resultat der RhoA-Aktivierung	44
Abbildung 15: Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch Hemmung der Aktinpolymerisation	45
Abbildung 16: Erfolgreicher stabiler MKL1-Knockdown (KD).....	47
Abbildung 17: CTGF als ein MKL1-abhängiges Zielgen.....	47
Abbildung 18: Vermehrte und organisierte Stressfasern als MKL1-Einfluss in DLC1-defizienten Tumorzellen.....	48
Abbildung 19: MKL1 als Mediator der Tumorzellproliferation bei DLC1-Verlust	49
Abbildung 20: Modell für MKL1 als Mediator der Tumorigenese infolge des DLC1-Verlusts.....	51
Abbildung 21: Ausbildung von Filopodien durch MKL1-Einfluss in DLC1-defizienten Tumorzellen ...	55

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidisulfat
BCLC-Score	Barcelona clinic liver cancer-Score
Bp	Basenpaare
Cdc42	Cell division cycle 42
CTGF	Connective tissue growth factor
DLC1	Deleted in Liver Cancer 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetracetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FBS	Fetal bovinum Serum
GAP	GTPase activating protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide-exchange factor
GGTI	Geranylgeranyltransferasen-Inhibitor
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HSP90	Heat shock protein 90
IEG	Immediate Early Genes
LPA	Lysophosphatidic acid
MADS	MCM1, AG, DEFA und SRF (Transkriptionsfaktoren)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mDia	Mammalian Diaphanous
MKL1	Megakaryoblastic Leukemia 1
MRTF	Myocardin-related transcription factor
Opti-MEM	Reduced serum medium
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Prof.	Professor/in
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat Sarcoma
Rb	Retinoblastomprotein, Tumorsuppressor
RBM15	RNA-binding motif protein 15
RhoA	Ras homologous A
RNA	Ribonucleic Acid
ROCK	Rho-associated coiled coil kinase
Rpm	Rounds per minute
RPMI	RosLoch Park Memorial Institute
SAM	Sterile alpha-Motiv
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	Small hairpin ribonucleic acid
SR	Serinreiche Region
SRE	Serum Response Element
StAR	Steroidogenes akutes regulatorisches Protein
START	STAR-abhängiger Lipid-Transfer
TAD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
TBS	Tris-buffered Saline
TBS-T	Tris-buffered Saline mit Tween20
TCFs	ternary complex factors
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

1. Einleitung

Das hepatozelluläre Karzinom zählt zu den sechsthäufigsten Krebserkrankungen weltweit. Seine relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 15 %. Um gezielte Therapiemöglichkeiten mit verbesserter Prognose des HCC zu entwickeln, ist ein tieferes Verständnis seiner molekularen Mechanismen notwendig.

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom ist der häufigste primäre maligne Tumor der Leber, der in 85% aller Fälle auftritt. Es ist eines der aggressivsten Karzinome und wird bei circa der Hälfte aller PatientInnen erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert [1]. Es stellt den sechsthäufigsten Tumor und die vierthäufigste Todesursache weltweit dar. Männer sind 2- bis 3-mal häufiger betroffen als Frauen [2].

In über 90% der Fälle basiert das HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose [3]. Die Hauptrisikofaktoren stellen die chronische virale Hepatitis B und C, die in Schimmelpilzsporen enthaltenen Aflatoxine (häufig durch Genuss von verschimmeltem Reis), der chronische Alkoholabusus und die nichtalkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD) und -hepatitiden (NASH), auf Basis von Adipositas und von Diabetes Typ II, dar [4]. 80% der globalen HCC-Fälle kommen in süd-ostasiatischen Ländern und in südlich der Sahara gelegenen afrikanischen Ländern vor. Die Hauptursache hierfür ist die chronische Hepatitis-B-Virus-Infektion. Hingegen sind in Deutschland die chronische Hepatitis-C-Virus-Infektion und der Alkoholkonsum die führenden HCC-Auslöser [5]. Aufgrund der zunehmenden Häufigkeit einer NAFLD ist allerdings davon auszugehen, dass dieser Risikofaktor sich künftig zur häufigsten HCC-Ursache in der westlichen Welt entwickeln wird [6].

Unterschiedliche genetische Veränderungen innerhalb der Tumore scheinen für das multifaktoriell bedingte HCC verantwortlich zu sein. Mehrere Daten zeigen, dass eine gestörte Aktivierung verschiedener Signalwege zur Tumorentstehung und -progression führt [7, 8].

Die Therapie des HCC richtet sich in Europa und Nordamerika nach den Stadien des BCLC-Scores (Barcelona clinic liver cancer). Diese Klassifikation berücksichtigt neben den Tumoreigenschaften (wie Größe und Metastasierung) auch den Allgemeinzustand und die Leberfunktion (Child-Pugh-Stadium). Sie teilt sich in die fünf Stadien 0, A, B, C und D ein. In den ersten zwei frühen Stadien ist eine kurative Option mit einer Resektion oder Radiofrequenz- bzw. Mikrowellenablation möglich. Im letzten Stadium wird nur noch eine palliative Therapie mit dem Ansatz der „Best Supportive Care“ eingeleitet. Für das Stadium B wären die transarterielle Chemoembolisation (TACE) oder eine selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT) die Therapien der Wahl. Im Stadium C (Fernmetastasen oder

Pfortaderinvasion) kommt schließlich die systemische Therapie zum Einsatz. Während lange Jahre der Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) die einzige medikamentöse Therapie darstellte, stehen aktuell weitere TKIs (Lenvatinib, Regorafenib, Cabozantinib) und die Immuntherapie (Atezolizumab, Bevacizumab, Ramucirumab) zur Verfügung [9].

Die Prognose des HCC hängt vom Tumorstadium ab. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt bei ca. 15 Prozent. Hingegen überleben im fortgeschrittenen HCC-Stadium circa 2 % die nächsten 5 Jahre [10].

1.2 Der Transkriptionsfaktor Serum Response Faktor (SRF)

Eine Verbesserung der systemischen Therapie könnte die Prognose der HCC-Fälle im fortgeschrittenen Stadium verbessern. Der Fokus dieser Arbeit liegt hierbei darin, einen neuen molekularen Mechanismus in der Tumorigenese aufzudecken, der ein Angriffspunkt zukünftiger Systemtherapie des HCC sein könnte. Im Hinblick darauf wurde bei 50% der HCC-PatientInnen eine Deletion des Tumorsuppressors „Deleted in Liver Cancer 1“ (DLC1) identifiziert. Darüber hinaus wurde eine verstärkte Aktivierung des Signalwegs der GTPase RhoA für die Entwicklung des HCC verantwortlich gemacht. RhoA reguliert wiederum den Transkriptionsfaktor „Serum Response Faktor“ (SRF) durch seinen Koaktivator „Megakaryoblastic Leukemia 1“ (MKL1). In dieser Arbeit wird die Rolle von MKL1 in der Tumorigenese bei DLC1-Verlust, insbesondere in der Hepatokanzerogenese, diskutiert. Um die Zusammenhänge dieser Strukturen besser zu verstehen, werden sie im Folgenden näher vorgestellt.

1.2.1 Entdeckung von SRF und Serum Response Element (SRE)

Der „Serum Response Faktor“ (SRF) gehört zu den am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren. Er aktiviert die Transkription von „Immediate Early Genes“ (IEG), deren Namen auf deren Aktivierung innerhalb von Minuten nach Stimulation mit Serum- oder Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist [11]. Diese Zielgene sind für viele wichtige, biologische Zellprozesse wie Wachstum, Migration, Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts und Myogenese verantwortlich [12, 13, 14, 15]. Inzwischen sind mehr als 160 SRF-Zielgene bekannt [16]. Erste Hinweise für den Transkriptionsfaktor SRF ergaben sich als eine verstärkte Expression des Protoonkogens c-fos in Fibroblasten nach einer Stimulation mit Serum beobachtet wurde [17]. Daher verlieh ihm Treisman den Namen „Serum Response Faktor“ [15].

Auf der Suche nach einer Erklärung wurde im c-fos Promoter die DNA-Sequenz „Serum Response Element“ (SRE) entdeckt, die sich 300 bp (Basenpaare) vor der Stelle der Transkriptionsstartstelle befindet und an die der Transkriptionsfaktor SRF bindet [18, 15, 19, 20]. In ihrem Zentrum befindet

sich die A/T-reiche Sequenz CCATATTAGG (Basensequenz der DNA), die beidseits von symmetrisch invertierten, repetitiven Sequenzen flankiert wird. Im Promoter vieler Gene von verschiedenen Spezies wurde die gleiche Kernsequenz CC(A/T)6GG gefunden, z.B. im kardialen α -Aktin [21], in den schweren Ketten des α -Myosin (MHC) [22] sowie in dessen leichten Ketten (MLC) [23]. Diese 10 bp lange Konsensussequenz wurde als CCArgG-Box bezeichnet, heute nur noch CarG-Box genannt [24]. Die terminalen Guaninreste der CarG-Box sind für die Bindung von SRF als Homodimer essentiell [15].

1.2.2 Struktur und Funktion von SRF

SRF gehört zu der MADS-Box Familie, die die vier Transkriptionsfaktoren MCM1, AG, DEFA und SRF beinhaltet und eine gemeinsam konservierte Sequenz von 56 Aminosäuren aufweist – die MADS-Box [24, 25]. Der C-Terminus der MADS-Box von SRF dient zur Dimerisierung von zwei SRF-Monomeren und der N-Terminus zur DNA-Bindung an SRE [26, 24]. Am C-Terminus besitzt SRF eine Transkriptionsaktivierungsdomäne [27]. Am N-Terminus sind multiple Phosphorylierungsstellen vorzufinden, die die Aktivität von SRF modulieren können [28, 29, 30, 31]. Beispielsweise kommt es bei einer Phosphorylierung von Serin 103 zur erhöhten SRF-Aktivität [29].

Der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor SRF hat viele biologische Funktionen. Zum Beispiel fanden Arsenian und Kollegen (1998) heraus, dass SRF-Knockout-Mäuse nicht in der Lage waren, während der Embryogenese Mesoderm auszubilden, was zum Tod dieser Tiere in der Gastrulation führte [33]. Embryonale Stammzellen ohne SRF besitzen Defekte in der Zellspreizung, Adhäsion und Migration, die mit einer Abnormalität der Zytoskelettstrukturen und einer reduzierten Expression von Aktin und von Fokaladhäsionsproteinen wie β 1-Integrin korrelierten [34, 35]. Mit Hilfe von gewebespezifischen Deletionen des SRF-Gens konnte gezeigt werden, dass SRF für die Entwicklung verschiedener Gewebearten essentiell ist, z.B. des kardiovaskulären Systems [36], der Haut [37], der Leber [38] oder des zentralen Nervensystems [39, 40]. Zusätzlich interagiert SRF mit dem Koaktivator Myocardin und reguliert so die Expression der meisten Markergene der glatten Muskulatur [41, 42, 43, 44]. Darüber hinaus spielt SRF eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der Skelettmuskulatur. Ein Knockdown von SRF konnte die Differenzierung von Skelettmuskelzellen inhibieren. Wurde der SRF-Knockdown noch weiter erhöht, wurde auch die Proliferation dieser Zellen blockiert [45, 46]. Diese Erkenntnisse konnten auch in der Maus bestätigt werden, wo ein SRF-Knockout zu einer verringerten Muskelmasse führte [47, 48].

Der zweite Signalweg zur Aktivierung des SREs ist unabhängig von den TCFs und wird durch die kleine GTPase RhoA induziert und endet in der Aktivierung von SRF über die Koaktivatoren Megakaryoblastic Leukemia 1 und -2 (MKL1 und -2) (Abbildung 3) [62, 63]. Dieser Weg soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.3 Der transkriptionelle Koaktivator Megakaryoblastic Leukemia 1 (MKL1)

Megakaryoblastic Leukemia 1 ist ein SRF-Koaktivator, der im Zellkern die SRF-Gentranskription reguliert. Seine subzelluläre Lokalisation wird in Fibroblasten durch den RhoA-Signalweg gesteuert. RhoA wird wiederum durch RhoGAP reguliert, zu denen DLC1 gehört. Es liegt die Vermutung nahe, dass dieser Signalweg dem Einfluss von DLC1 unterliege und somit an der Entwicklung des DLC1-defizienten HCC beteiligt sein.

1.3.1 Ursprung und Vorkommen von MKL1

Im Jahr 2002 fanden Wang und seine Kollegen eine neue Gruppe von Transkriptionskoaktivatoren von SRF [50]. Diese Familie wurde „myocardin-related transcription factors“ bezeichnet (MRTFs). Das erste Mitglied dieser Familie, Myocardin, war zuerst in einer Computersuchmethode (in silico screening) gefunden worden und wird vor allem in Herz- und glatten Muskelzellen exprimiert [43]. Allerdings kommt SRF ubiquitär vor, so dass man weitere Koaktivatoren vermutete. Zur selben Zeit wurde MKL1 (auch MAL oder BSAC genannt) entdeckt, welches erstmals in der Pathogenese der akuten megakaryoblastischen Leukämie beschrieben wurde. Durch eine Translokation t(1;22) fusioniert MKL1 mit RBM15 (RNA-binding motif protein 15) und erhält somit onkogene Eigenschaften [64, 65]. Wang und seine Kollegen fanden heraus, dass das Protein MKL1 in seinem Aufbau Myocardin ähnelt und ebenfalls ein SRF-Koaktivator ist. Zusätzlich entdeckten sie ein weiteres Mitglied dieser Familie mit denselben Eigenschaften, das Protein MKL2 (auch als MAL16 bekannt). Aus diesem Grund werden die beiden Myokardinanaloge MKL1 und MKL2 auch als Myocardin-related transcription factors A and B (MRTF-A/B) bezeichnet [50].

MKL1/2 werden ubiquitär in embryonalen und adulten Geweben, sowie in embryonalen Stammzellen exprimiert [50, 66, 67]. Allerdings ist das Expressionsmuster in einzelnen Geweben unterschiedlich. MKL1 zeigt eine stärkere Expression in muskulären, mesenchymalen und epithelialen Zellen verschiedener Organe [50, 12]. Dem hingegen ist MKL2 während der Embryogenese der Maus in Arterien, die der Neuralleiste entstammen, und in anderen neuralen Strukturen stark exprimiert [68].

1.3.2 Struktur von MKL1

MKL1 teilt mit den anderen Mitgliedern der Myocardin-Proteinfamilie eine Strukturhomologie von ca. 35%, wobei einzelne Domänen stärker konserviert sein können [50] (Abbildung 2).



Abbildung 2: Struktur von MKL1

MKL1 und die anderen Myocardin-Familienmitglieder besitzen in folgenden funktionellen Domänen Homologien: 1-3 RPEL-Motive, konservierte N-terminale Domäne; B1 und B2, basische Domäne; Q, Glutaminreiche Domäne; SAP, SAF-A/B-Acinus-PIAS Domäne; LZ, leucine zipper-ähnliche Domäne und C-terminale TAD, Transaktivierungsdomäne. Abb. modifiziert nach [69]

Der N-Terminus von MKL1 besitzt drei RPEL-Motive (Arg-Pro-X-X-Glu-Leu), die freies intrazelluläres Aktin binden können [63, 70, 71]. Darüber hinaus wird die Kernlokalisierung über die RPEL-Domänen [63] und die Phosphorylierungsseite an Position 454 vermittelt [72]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich hier Regulationseinheiten befinden. Nach einer Deletion dieses Bereichs kommt es zu einer erhöhten Aktivität von SRF Zielgenen [43, 73, 74]. Zudem wurde auch in diesem Bereich eine neue Interaktionsdomäne an den Aminosäuren 301-310 identifiziert. Hier bindet das Aktin-bindende Protein Filamin A, was für die transkriptionelle Aktivität von MKL1 und die Expression von MKL/SRF-Zielgenen wichtig ist [75]. Für die Interaktion mit SRF ist die Basis-1-Domäne von MKL1 erforderlich [43, 50]. Eine Deletion dieser Region verhindert die SRF-Bindung und die SRE-Aktivierung [73]. Die SAP-Domäne, die nach den nukleär lokalisierten Proteinen SAF-A/B, Acinus und PIAS benannt ist, ist an der Regulation der chromosomalen Dynamik, dem nukleären Abbau und der Apoptose dieser Proteine beteiligt [76]. Sie besteht aus 35 Aminosäuren, bildet zwei amphiphilen α -Helices und bindet schwach an die DNA [77, 78]. Eine Deletion hat weder Einfluss auf die Transkriptionsaktivität, noch auf die Komplexbildung mit SRF [73, 63]. Es wird vermutet, dass die SAP-Domäne ihre Funktion promotorspezifisch vermittelt. Die Leucin-Zipper-ähnliche Domäne wird zur Homo- und Heterodimerisierung mit anderen MRTF-Mitgliedern verwendet. Eine Deletion dieser Domäne hat ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität von MKL1 [73, 74, 44]. Zuletzt befindet sich im Bereich des C-Terminus die Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD). Man nimmt an, dass TAD eine generelle Aktivierungsdomäne ist, die keinen Einfluss auf die Spezifität oder Bindung an SRF hat [43].

1.3.3 Aktivierungsweg von MKL1

MKL1 wird über den RhoA/Aktin-Signalweg reguliert (Abbildung 3). In unstimulierten NIH3T3 Fibroblasten ist MKL1 im Zytoplasma lokalisiert und über die RPEL-Motive an freies intrazelluläres Aktin gebunden. Durch eine Stimulation mit Serum kommt es zur Aktivierung von RhoA und damit

zur vermehrten Bildung von Aktinfasern in der Zelle. In der Folge kommt es zu einer Dissoziation des G-Aktins von MKL1 [63, 79]. Dadurch wird die nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS) in der RPEL-Domäne freigelegt, die für den Importin-vermittelten Import in den Zellkern erforderlich ist [80]. Im Zellkern aktiviert MKL1 als Koaktivator von SRF die Transkription von bestimmten Zielgenen, die in der Zellmotilität, -kontraktilität oder in muskelspezifischen Funktionen involviert sind [81]. Baarlink und Kollegen entdeckten, dass nukleär ebenfalls eine Aktinpolymerisation für die MKL1-Aktivierung notwendig ist, die durch Formin (mDia) ausgelöst wird [82]. Außerdem vermindert das nukleäre Protein MICAL-2 das nukleäre G-Aktin redoxabhängig und steigert dadurch die MKL1/SRF-Aktivität [83]. Neueste Ergebnisse zeigen, dass das Aktin-bindende Protein Filamin A an den Aminosäuren 301-310 von MKL1 gebunden ist und dass die Bindung von Aktinfasern über Filamin A an MKL1 für die Aktivierung von MKL/SRF-Zielgenen wichtig ist [75].

Die Komplexbildung von MKL1 mit nukleärem G-Aktin führt zur Inaktivierung von MKL1 und ist die Voraussetzung für den CRM-1 (Chromosomal Maintenance 1)-abhängigen, nukleären Export, der den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die subzelluläre Lokalisation von MKL1 darstellt [84].

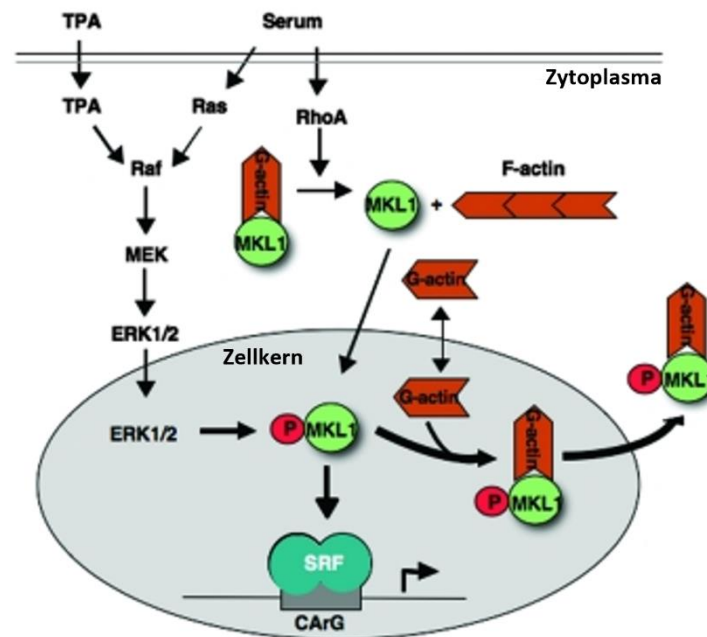


Abbildung 3: Regulation der subzellulären Lokalisation und der transkriptionellen Aktivität von MKL1

Die Serum-induzierte RhoA-Aktivierung führt durch die Aktinpolymerisation und die Ablösung des an MKL1-gebundenen G-Aktins zur nukleären Lokalisation von MKL1, zur Bindung an SRF und zur Zielgentranskription. Währenddessen die TPA (Tetradecanoylphorbol-acetat) -induzierte ERK1/2-Aktivierung durch die Phosphorylierung von MKL1 die erneuerte Bindung von MKL1 an G-Aktin und dadurch den nukleären Export von MKL1 auslöst. Abbildung modifiziert nach [72].

Zudem ist eine ERK-vermittelte Phosphorylierung von MKL1 an den Aminosäuren 449, 450 und 454 bei einer Serum- oder TPA (Tetradecanoylphorbolacetat)-Stimulation für die Bindung von MKL1 an freies Aktin und somit für die Translokation von MKL1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma notwendig [72].

1.3.4 Biologische Funktion von MKL1

MKL1 wird in den meisten menschlichen Gewebezellen exprimiert und weist viele unterschiedliche biologische Funktionen auf. Unter anderem ist es an der Differenzierung der glatten Muskulatur beteiligt und aktiviert die Transkription von für die glatte Muskulatur-spezifischen Zielgenen wie SM22 und ACTA2 [67, 85, 41]. Ebenfalls ist es für die Aufrechterhaltung des Phänotyps der glatten Muskelzellen notwendig [86]. Zusätzlich verhindert eine MKL1-Hemmung die Proliferation und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen [87]. In der Skelettmuskulatur beeinträchtigt die Inhibierung von MKL1 die Differenzierung der Zellen [74] und ein MKL1-Knockout führt in Mäusen zu kleineren Muskeln [47]. Sun und Kollegen beobachteten, dass ein Teil der Mäuseembryonen mit einem MKL1-Knockout wegen einer Herznekrose nach einigen Tagen verstarb [16]. Weiterhin konnten weibliche MKL1-Knockout Mäuse ihren Nachwuchs nicht stillen, da die für die Kontraktion der Milchdrüsen verantwortlichen Myoepithelzellen nicht ausdifferenziert waren [88, 89]. Trotzdem ist die Mehrheit der MKL1-Knockout-Mäuse überlebensfähig und fruchtbar [12]. Womöglich können die anderen MRTF-Mitglieder aufgrund ihrer großen Homologie mit MKL1 dessen Funktionsverlust kompensieren [73]. Weiterhin scheint MKL1 für die Differenzierung und Ausreifung von Megakaryozyten essentiell zu sein. MKL1-Knockout-Mäuse haben eine reduzierte Zahl an Blutplättchen in der Peripherie und ausgereifte Megakaryozyten [90]. Im Hippocampus, in der Hirnrinde und in der subventrikulären Zone führt ein MKL1/2-Knockout zu morphologischen Abnormalitäten. Als Grund dafür zeigte sich ein Fehler in der Aktinpolymerisation und konsekutiv eine Dysfunktion in der zytoskelettalen Organisation, die eine Beeinträchtigung der neuronalen Migration und der Neuritenausprossung verursacht [91].

In der Tumorigenese spielt MKL1 ebenfalls eine wichtige Rolle. Wie bereits oben erwähnt, fördert MKL1 gebunden an RBM15 durch eine Aktivierung von SRF-Zielgenen die Tumorprogression in der megakaryoblastischen Leukämie [64, 65]. Medjkane und Kollegen konnten zeigen, dass eine Herunterregulierung von MKL1 beim Mammakarzinom und beim malignen Melanom zu einer Reduktion von Zelladhäsion, -verteilung, -invasion und -bewegung führte. Ein MKL1-Knockdown konnte sogar die Lungenmetastasierung beim Mammakarzinom verhindern. Die beobachteten Phänotypen werden durch MYH9 und MYL9 reguliert, die beide Zielgene von MKL/SRF sind und

Zytoskelettproteine kodieren [92]. SCAI (suppressor of cancer cell invasion) wurde als ein neuer Bindungspartner entdeckt [93]. Nukleär inhibiert er MKL1 und verhindert somit eine MKL1/SRF-abhängige Hochregulierung der β 1-Integrin-Expression und die β 1-Integrin-abhängige Tumorzellinvasion.

Interessanterweise hat MKL1 nicht nur eine karzinogene, sondern auch eine antikarzinogene Wirkung. Das epitheliale Protein Eplin α , das als ein zytoskelettal-assoziiertes Tumorsuppressor agiert, wird durch Aktin/MKL1 reguliert [94]. In nicht-invasiv-wachsenden Zellen reduzierte die Aktivierung des G-Aktin/MKL-Signalwegs die Zellmigration durch Herunterregulierung von zytoskelettal-assoziierten Proteinen wie Integrin α 5, Plakophilin und FHL1 [95]. Weiterhin führte die Überexpression von MKL1 in Fibroblasten durch Induktion antiproliferativer Zielgene wie mig6, ein negativer Regulator der EGFR-Familie, zu antiproliferativen Effekten [96]. Zusammenfassend scheint das Expressionslevel und der Aktivierungsstatus von MKL1 bestimmend zu sein, ob Zielgene mit negativer oder positiver Auswirkung auf die Tumorigenese aktiviert werden.

1.4 Die Rho-GTPasen

Der RhoA-Signalweg ist für die Aktivierung des Transkriptionskoaktivators MKL1 verantwortlich. RhoA und andere Rho-GTPasen werden unter anderem durch RhoGAPs wie DLC1 reguliert. Die Rho-GTPasen sind Guaninnukleotid-bindende Proteine, die an der Zellmembran agieren und extrazelluläre Signale nach intrazellulär vermitteln. Aufgrund von Sequenzhomologien lassen sich diese in fünf Superfamilien einteilen [97]. Die größte darunter stellen die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie dar, zu der neben den Ras-, Rab-, Arf- und Ran-Familien die Rho-Familie gehört [98, 99, 100]. Die kleinen GTPasen werden als klein bezeichnet, weil sie ein geringes Molekulargewicht von nur 20-30 kDa haben [101, 97].

1.4.1 Signaltransduktion zur Aktivierung von Rho-Proteinen

Die Rho-Proteine und alle anderen Guaninnukleotid-bindenden Proteine haben als molekulare Schalter eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion (siehe Abb. 4). Sie besitzen eine konservierte G-Domäne, die die Nukleotide GTP und GDP binden kann [97]. Der Wechsel zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand erfolgt unter dem Einfluss der regulierenden Proteine GEFs (Guaninnukleotid-Austauschfaktoren) und GAPs (Guanosintriphosphatase-aktivierende Proteine) (Abbildung 4). Dieser Switch findet an der Zellmembran statt, an der die Rho-Proteine über eine posttranslational, C-terminal angefügte Isoprenylgruppe (meist Geranylgeranyl-) verankert sind [102].

GEFs werden durch extrazelluläre Signale aktiviert, wo sie dann spezifisch den Austausch von GDP zu GTP katalysieren [103, 104]. Nur in der aktiven GTP-gebundenen Form können die Rho-Proteine ihre Effektoren aktivieren, die dann das extrazelluläre Signal nach intrazellulär weiterleiten [105, 106]. Die Beendigung der Signalübertragung erfolgt durch GAPs, die die Hydrolyse des GTP zu GDP vermitteln [107] und damit die langsame, kaum vorhandene, intrinsische Rho-GTPase-Aktivität um das bis zu 10^5 -fache beschleunigen [108, 109]. Die Rho-Proteine unterliegen zusätzlich einem dritten Regulationsmechanismus, der den Nukleotidaustausch durch die membranassoziierten GEFs und damit die Umwandlung in die aktive GTP-gebundene Form verhindert. Das erfolgt durch die GDIs (Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren). Diese binden an den Isoprenylrest der GDP-gebundenen Rho-Proteine, die dadurch maskiert und von der Plasmamembran ins Zytoplasma überführt werden [110].

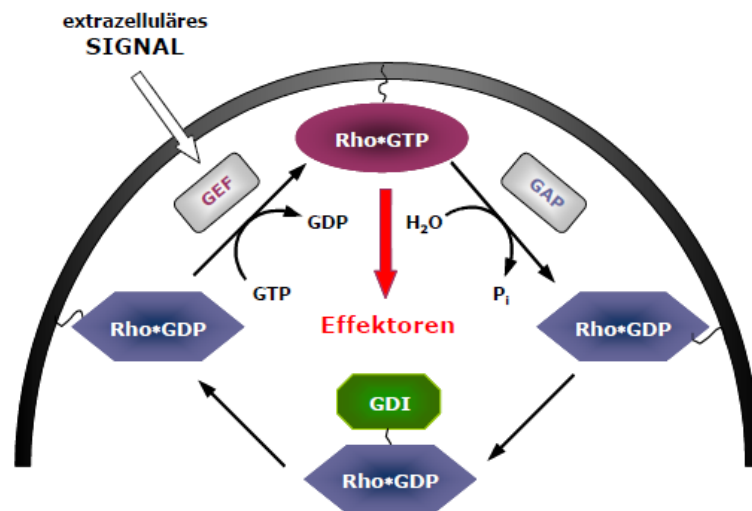


Abbildung 4: GTP-Zyklus der Rho-GTPasen

Die Rho-Proteine zirkulieren zwischen dem aktiven GTP-gebundenen und dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Dabei regulieren GEFs und GAPs die Schalterfunktion an der Membran. Durch die Relokalisation von der Membran ins Zytoplasma verhindern GDIs die Aktivierung durch GEFs. In der aktivierten Form übertragen die Rho-GTPasen das empfangene extrazelluläre Signal auf verschiedene Effektoren, die das Signal intrazellulär weiterleiten. Modifiziert nach [111]

1.4.2 Rho-GTPasen und das Zytoskelett

Die Rho-Familie wird allgemein als Regulator des Aktinzytoskeletts bezeichnet [112]. Darüber hinaus kontrolliert sie durch Übertragung der extrazellulären Reize auf intrazelluläre Signalkaskaden die Genexpression [113]. Zu den durch die Rho-Familie gesteuerten Prozesse des Aktinzytoskeletts gehören unter anderem die Morphogenese, Zell-Zell/Substrat-Adhäsion, Zellpolarität, -zyklus, -proliferation und -bewegung [114, 111, 115]. Die am besten charakterisierten Rho-GTPasen sind RhoA (**ras homologous A**), Rac1 (**Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1**) und Cdc42 (**cell division cycle 42**) [112] (Abbildung 5). RhoA bedingt die Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen,

die die extrazelluläre Matrix mittels Integrinen an das Aktinzytoskelett koppeln [116]. Rac1 führt zur Ausbildung von Lamellipodien, fächerartige Gebilde an der Zellmembran, und Cdc42 zur Formation von Filopodien, fingerförmige Ausstülpungen der Plasmamembran [117].

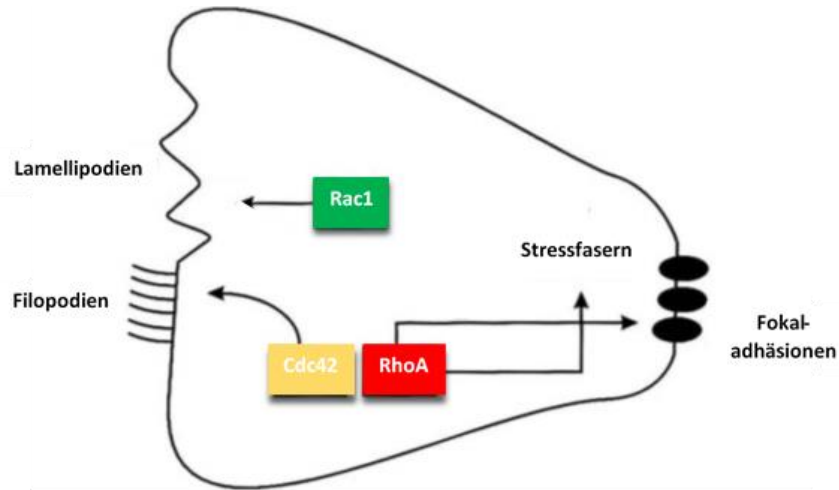


Abbildung 5: Regulierung des Zytoskeletts durch Rho-Proteine

Rac1 formiert Lamellipodien am vorderen Ende der Zelle, wodurch der Leitsaum der Zelle vorwärts geschoben wird. Cdc42 vermittelt zusätzlich die Ausbildung von Filopodien. RhoA bildet neben den Stressfasern Fokaladhäsionen am hinteren Ende der Zelle aus, die bei Verlust zur Ablösung der Zelle führen. Abb. modifiziert nach [118].

RhoA reguliert das Aktinzytoskelett durch ihre beiden Effektorproteine ROCK (Rho-associated coiled coil kinase), die Rho-Kinase, und mDia (mammalian Diaphanous protein 1), ein Protein aus der Formin-Familie [119, 120, 121] (Abbildung 6). ROCK stabilisiert die Aktinfilamente durch die Phosphorylierung der Lim-Kinase, die den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin durch Phosphorylierung inaktiviert [122, 123]. MDia aktiviert das Protein Profilin, das die Polymerisation des G-Aktins zu F-Aktin induziert [124].

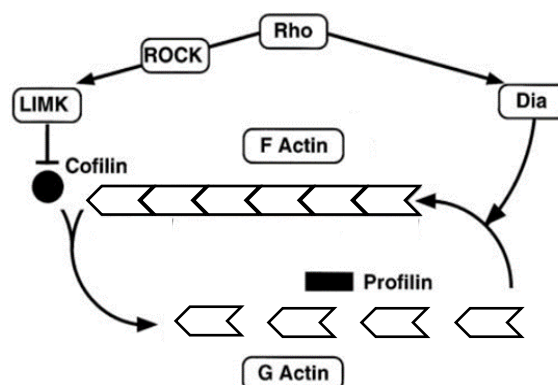


Abbildung 6: Regulation vom Aktinzyklus durch RhoA

Der Aktinzyklus wird durch die zwei RhoA-Effektorproteine ROCK und mDia reguliert. ROCK phosphoryliert die Lim-Kinase, die Cofilin (schwarzer Kreis) inhibiert und dadurch die Aktindepolymerisation verhindert. MDia aktiviert Profilin (schwarzes Rechteck), das die Polymerisation des G-Aktins (einzelne Pfeile) zu F-Aktin (zusammenhängende Pfeile) induziert. Abbildung modifiziert nach [125]

1.4.3 Rho A und ihre Rolle in der Tumorigenese

Die Rho-Familie reguliert nicht nur die Signaltransduktion in physiologischen Zellen, sondern auch in Tumorzellen. Vega und Ridley berichten, dass Rho-GTPasen an fast allen Stadien der Tumorentwicklung - nämlich Zellproliferation, -überleben, -invasion und Metastasierung - beteiligt sind [126] (Abbildung 7).

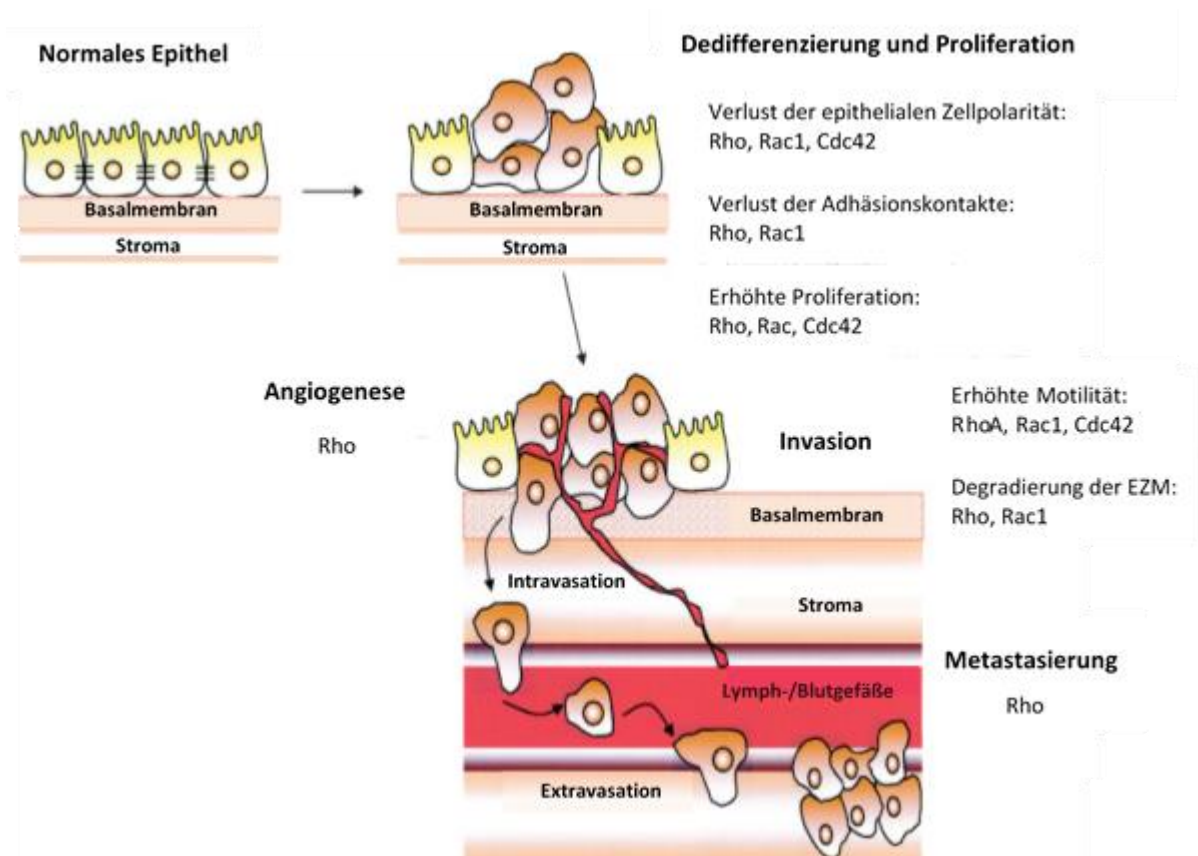


Abbildung 7: Beteiligung der Rho-GTPasen in der Tumorentwicklung

Die Rho-Proteine sind an der Dedifferenzierung, in der unkontrollierten Proliferation, gesteigerten Angiogenese, Invasion und Metastasierung verschiedener Tumore beteiligt. Sie führen zum Verlust der epithelialen Polarität und der Adhäsionskontakte, was in einer erhöhten Zellmotilität resultiert und den Tumorzellen die Fähigkeit verleiht, die extrazelluläre Matrix (EZM) zu verändern. Anschließend können die Tumorzellen die Umgebung infiltrieren, in Blut- und Lymphgefäße migrieren und in alle Regionen des Körpers metastasieren. Abbildung modifiziert nach (Gómez del Pulgar, et al., 2005)

Im Vergleich zu der Ras-Familie, bei denen es üblicherweise im Rahmen der Tumorigenese zu aktivierenden Mutationen kommt, weisen die Rho-GTPasen, deren Aktivität in Tumorzellen ebenfalls regelmäßig gesteigert ist, nur sehr selten Mutation auf [127]. Statt einer aktivierenden Mutation nimmt man eine Modulation der Rho-Regulatoren (GEFs, GAPs und GDIs) an. Dabei können die GEFs entweder als Proto-Onkogene oder die GAPs als Tumorsuppressoren fungieren. Eine Modifikation

wie ein Verlust eines Tumorsuppressors würde zu einem dauerhaft aktiven Zustand der Rho-Proteine und damit einem tumorigenen Potential dieser führen [128]. So wurde beispielsweise eine Herabregulierung von einigen RhoGAPs in Tumoren gefunden, z.B. ArhGAP8 in kolorektalen und Mammakarzinomen [129] und ArhGAP20 in Leukämien [130]. Allerdings ist die bestcharakterisierte Gruppe der RhoGAPs in der Tumorigenese die Familie der „Deleted in Liver Cancer“ (DLC)-Proteine. Es wurde herausgefunden, dass 50% der Leber-, Brust-, Lungen- und 70% der Darmtumore eine Deletion des Tumorsuppressors DLC1 aufweisen [131]. Da DLC1 als RhoGAP fungiert, könnte sein Verlust den Aktivierungszustand von RhoA regulieren und womöglich Einfluss auf den RhoA/Aktin-Signalweg und den Transkriptionsfaktor SRF und seinen Koaktivator MKL1 nehmen.

1.5 Der Tumorsuppressor Deleted in Liver Cancer 1 (DLC1)

Deleted in Liver Cancer 1 gehört zu den RhoGAPs, die den Zyklus der Rho-GTPasen regulieren. Das DLC1-Gen wurde 1998 in normalen Leberzellen auf Chromosom 8p21.3-22 entdeckt und aufgrund der häufigen Deletion eines bestimmten Genallels (auch engl. „loss of heterozygosity“ genannt, kurz LOH) in hepatozellulären Karzinomen als „deleted in liver cancer“ bezeichnet [132]. Aufgrund der damals bekannten, regelmäßigen Deletion dieses Genlocus in mehreren soliden Tumoren, kategorisierten ihn Yuan und Kollegen (1998) als einen potenziellen Tumorsuppressor. Außerdem stellten sie eine große Homologie zum „rat p122 RhoGAP“-Gen fest, so dass man ihn deshalb zu den RhoGAPs zählt [132].

1.5.1 Struktur von DLC1

DLC1, auch ArhGAP7 oder StarD12 genannt, gehört zu der DLC-Familie, die zusätzlich noch DLC2 und DLC3 umfasst [133, 134]. DLC1 und die beiden anderen Mitglieder besitzen 4 funktionelle Domänen [135] (Abbildung 8).

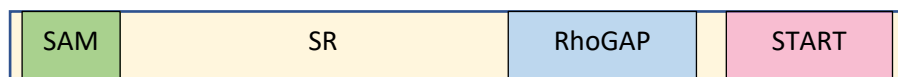


Abbildung 8: Struktur von DLC1

Im N-Terminus befindet sich das sterile alpha-Motiv (SAM), das von einer unkonservierten, serinreichen Region (SR), dann von der RhoGAP-Domäne und anschließend von der C-terminalen START-Domäne (steroidogenes akutes regulatorisches Protein (StAR)-abhängiger Lipid-Transfer) gefolgt wird. Abb. modifiziert nach [135]

Die erste Domäne ist das N-terminale sterile alpha-Motiv (SAM), über das DLC1 Homo- oder Hetero-Oligomere mit anderen SAM-Domäne-besitzenden Proteinen bilden kann. Aber auch andere Proteine, RNA oder DNA können hier binden [136]. Weiterhin vermutet man, dass die SAM-Domäne einen autoinhibitorischen Charakter aufweist, womit sie die DLC1-Funktion als RhoGAP unterbindet

[137]. Daneben liegt eine wenig unkonservierte, serinreiche (SR) Region, die für die Interaktion mit anderen Proteinen und für posttranslationale Veränderungen von DLC1, wie eine Phosphorylierung, wichtig ist [138]. Beispielsweise führt eine Phosphorylierung an Serin 327 und 431 zur Interaktion mit dem 14-3-3 Protein und damit zur Hemmung der RhoGAP-Funktion von DLC1 [139]. Eine Interaktion mit der SH2 (Src-Homologie 2) -Domäne von Tensin ermöglicht eine Lokalisation von DLC1 an Fokaladhäsionen [140], die für seine tumorsuppressive Eigenschaft wichtig ist. Die am besten charakterisierte, meist hoch konservierte Domäne der DLC-Familie ist die RhoGAP-Domäne. Allgemein können Rho-GTPase aktivierende Proteine (RhoGAPs) die Aktivität der Rho-GTPasen beschleunigen, die die Reaktion ihres aktiven GTP-gebundenen Zustandes in ihren inaktiven GDP-gebundenen Zustand katalysieren, wie ausführlich in Abschnitt 1.4.1 beschrieben ist [115]. Die RhoGAP-Domäne der DLC-Familie hat eine hohe Aktivität gegenüber der Rho-GTPase RhoA [133, 134]. Ihre Aktivität übt sie über einen konservierten ‚Arginin-Finger‘ aus [141]. Die letzte Domäne ist die C-terminale START-Domäne (steroidogenes akutes regulatorisches Protein (StAR)-abhängiger Lipid-Transfer), die an Lipide und Sterine bindet [142]. Beispielsweise aktiviert sie die Phospholipase C- δ 1, die wiederum die Proteinkinase C aktiviert und die Calciumionen-Konzentration in der Zelle steigert, was sich auf das Zytoskelett auswirkt [143]. Zusätzlich wurde eine Interaktion zwischen der START-Domäne von DLC1 und dem Tumorsuppressor Caveolin1 beobachtet, die die tumorsuppressive Funktion von DLC1 unabhängig von RhoGAP hemmt und zur Tumorprogression führt [144].

1.5.2 Biologische Funktion von DLC1

DLC1 ist in normalem Körpergewebe wie Gehirn, Herz, Lunge und Leber weit verbreitet [145]. Als RhoGAP-Protein könnte DLC1 über den Rho-Signalweg an der Regulierung der Zytoskelettorganisation beteiligt sein (Abbildung 5). Eine DLC1-Überexpression führt durch die Störung der Ausbildung von Aktinfilamenten und fokalen Adhäsionen zu morphologisch runden, abgelösten Zellen [146, 147]. Mäuseembryone mit einer DLC1-Mutation starben nach wenigen Tagen und wiesen einen gestörten Zytoskelettaufbau ihrer Fibroblasten auf [148]. Mit einem neuen Mausmodell von Lebertumoren lieferten Xue und Kollegen den direkten Beweis, dass DLC1 als Tumorsuppressor in vivo agiert [131]. Die Autoren berichteten in einer vorherigen Studie, dass eine Myc-Überexpression in p53-defizienten Leberzellen zwar einen Lebertumor induzierte, allerdings war dieser Effekt verglichen mit einer Ras-Überexpression in p53-defizienten Zellen nur ganz schwach ausgeprägt [149]. Eine zusätzliche shRNA-vermittelte Herabregulation von DLC1 in Myc-überexprimierten, p53-defizienten Leberzellen führte zu einer deutlich verstärkten Tumorprogression. Eine Deletion des Tumorsuppressors DLC1 war nicht nur in ca. 50% der

Lebertumoren, sondern auch in ca. 50% der Mamma- und Lungentumore und in ca. 70% der Kolonkarzinome zu beobachten [131]. Infolgedessen kam es bei einer Rekonstitution von DLC1 in Zelllinien dieser Karzinome unter anderem zu einer Hemmung der Zellproliferation, der Kolonienformation, des autonomen Wachstums, der Zellmotilität und der Invasion [150, 140].

Es wird vermutet, dass die Inaktivierung von DLC1 nicht nur über eine Gendeletion erfolgt. Epigenetische Mechanismen wie Methylierung und Histon-Deacetylierung scheinen ebenfalls den Aktivierungsstatus von DLC1 zu regulieren [133, 151, 152, 153].

1.6 Ziel der Arbeit

Das hepatozelluläre Karzinom gehört zu den vierthäufigsten Ursachen für einen tumorbedingten Tod und zeigt eine steigende Inzidenz in den westlichen Ländern. Ein kurativer Therapieansatz ist aktuell nur in den frühen Tumorstadien möglich. Circa die Hälfte der HCC-PatientInnen haben zum Diagnosezeitpunkt ein fortgeschrittenes Stadium und werden gemäß den internationalen Leitlinien systemisch behandelt. Aufgrund der weitgehend unbekannt, molekularen Pathogenese des HCC ist die systemische Therapie sehr limitiert. In 50% der Fälle eines HCC sowie auch in anderen Tumoren wie dem Mammakarzinom liegt ein Verlust des Tumorsuppressors „Deleted in Liver Cancer 1“ (DLC1) vor. Die Identifikation von neuen, durch den DLC1-Verlust aktivierten Zielstrukturen und molekularen Mechanismen könnte eine neue, gezielte Therapie des HCC ermöglichen. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe lieferten erste Hinweise, dass der transkriptionelle Koaktivator „Megakaryoblastic Leukemia 1“ (MKL1) eine konstitutiv nukleäre Lokalisation in DLC1-defizienten hepatozellulären Zellen und Mammakarzinomzellen aufweist und somit eine mögliche, durch den DLC1-Verlust aktivierte Zielstruktur darstellt. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob MKL1 infolge eines DLC1-Verlusts als Mediator der Tumorigenese, insbesondere der Hepatokarzinogenese, fungiert.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

- Nachweis eines DLC1-Verlustes als Ursache für die nukleäre Akkumulation von MKL1 in hepatozellulären - und Mammakarzinomzellen
- Charakterisierung des molekularen Signalweges, der zur nukleären Akkumulation und Aktivierung von MKL1 in DLC1-defizienten Tumorzellen führt
- Identifizierung von MKL1-abhängigen, tumorrelevanten Zielgenen in DLC1-defizienten Tumorzellen
- Ermittlung des direkten Einflusses von MKL1 auf die Tumorentwicklung in DLC1-defizienten Zellen
- Identifizierung möglicher Therapieansätze des HCC, die am MKL1-Signalweg angreifen könnten

2. Materialien

2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Absorption-Mikroplattenleser FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg
BioPhotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Blotting-Apparatur Mini Protean® Tetra Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank/Inkubator HeraCell 240 37 °C, 5 % CO ₂	Thermo Scientific, Schwerte
Chemilumineszenz Detektor Chemi-Smart 5100	PEQLAB, Erlangen
Gefrierschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Magnetrührer Combimag RCO	Ika, Staufen
Magnetrührer REO basic C	Ika, Staufen
Mikroskop Olympus CX22	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Mikroskop Olympus IX71	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Mikroskop Axiovert 135M	Zeiss, Jena
Konfokales Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Mikroplattenleser Victor 2 1420	PerkinElmer, USA
PH-Meter Lab850	Schott Instruments, SI Analytics, Mainz
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Power supply PeqPower 300	PEQLAB, Erlangen
Präzisionswaage Acculab VIC-612	Sartorius, Göttingen
Schüttler Max Q 6000	Thermo Scientific, Schwerte
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad SW-20C	Julabo, Seelbach
Sterilbank Heraeus HERASafe KS	Thermo Scientific, Schwerte
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Disintegrator 100W	MSE, London
Ultrazentrifuge Optima XL-90	Beckman Coulter, USA
Vortex Genie K550 GE	Bender & Hobein, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5424R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Scientific, Schwerte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckgläser	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier 0,8 mm (Whatman- Papier)	Optilab, München
Isopropanol-haltige Einfrierbox	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	SarstedtPure G, Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Sarstedt, Nümbrecht

Polycarbonatgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
UV-transparente Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
24- und 96-Well Platte	Millipore, Schwalbach
Zange	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 35 mm, 6 cm, 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x7 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fibronectin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluoromount Fluorescent Mounting Medium	Dako, California, USA
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrochlorid (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Polyvinylalkohol (Elvanol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Lumin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant Bradford-Reagenz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA (Ethylenediamintetraessigsäure)-Lösung (0,05 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Puffer und Lösungen

10 x PBS pH 7.4

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM

Kralewski Zelllysis-Puffer

Hepes pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1 %
EDTA	1 mM
Glycerol	10 %

Aktinlysis-Puffer

Hepes pH 7,4	20 mM
NaCl	50 mM
Triton X-100	0,5 %
EDTA	1 mM

10 x Laufpuffer

Tris	0,25 M
Glycin	2 M
SDS	1 %
ad H ₂ O bidest.	1 l

5 x Transferpuffer

Tris	7,25 g
Glycin	3,65 g
SDS	0,47 g
Methanol	200 ml
ad H ₂ O bidest.	1 l

10 x TBS

Tris	0,2 M
NaCl	1,4 M
ad H ₂ O reinst	5 l

10 x TBST

Tris	0,2 M
NaCl	1,4 M
Tween 20	1 %
ad H ₂ O reinst	5 l

1,5 M Tris pH 6,8

Tris	121,1 g
Adjustieren 1 N HCl bis 6,8 pH	2 %
ad H ₂ O bidest.	1 l

1,5 M Tris pH 8,8

Tris	121,1 g
Adjustieren 1 N HCl bis 8,8 pH	2 %
ad H ₂ O bidest.	1 l

4x Proteinprobenpuffer/ 4x Laemmli Probenpuffer

Tris pH 8,8	1 M
Glycerol	2 %
SDS	20%
EDTA	0,5 M
Bromphenolblau	0,01 %
β-Mercaptoethanol	5 %

10%iges Trenngel

H ₂ O		1,99 ml
Acrylamid	30%	1,67 ml
Tris pH 8,8	1,5 M	1,25 ml
SDS	10%	50 µl
APS	10%	50 µl
TEMED		2 µl

Sammelgel

H ₂ O		2,7 ml
Acrylamid	30 %	0,67 ml
Tris pH 6,8	1,5 M	1 ml
SDS	10 %	40 µl
APS	10 %	40 µl
TEMED		4 µl

2.5 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium + Selektionsmedium	Quelle
HuH7	Humanes hepatozelluläres Karzinom	DMEM	Prof. Stephan Singer, Universitätsklinikum Tübingen
HuH7-shRNA MKL1/2	Humanes hepatozelluläres Karzinom mit stabiler MKL1/2-Depletion	DMEM	Prof. Stephan Singer, Universitätsklinikum Tübingen
HepG2	Humanes Hepatoblastom	RPMI	Prof. Stephan Singer, Universitätsklinikum Tübingen
MDA-MB-468	Humanes Mammakarzinom	DMEM	Dr. Ramon Parsons, Mount Sinai Hospital, New York, USA
MDA-MB-468 -shRNA MKL1/2	Humanes Mammakarzinom mit stabiler MKL1/2-Depletion	DMEM	Dr. Ramon Parsons, Mount Sinai Hospital, New York, USA
MCF10F	Humanes Brustdrüsenepithel	DMEM:F12 Medium (1:1)	Prof. Stephan Singer, Universitätsklinikum Tübingen

2.6 Kulturmedien und Antibiotika

Kulturmedium/Antibiotika	Hersteller
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Opti-MEM	Gibco® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)/fetales Rinderserum	Gibco® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL)	Gibco® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	Calbiochem® Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
DMEM:F12 (1:1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.7 Stimulatoren und Inhibitoren

Stimulator/Inhibitor	Konzentration	Inkubation	Hersteller
Fetales Rinderserum/ Fetal Bovine Serum (FBS)	1:5 bei Serumentzug: 1:50	1 Stunde	Gibco® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Lysophosphatidsäure/ Lysophosphatidic acid (LPA)	1:1000	2 Stunden	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Latrunculin B	1:2000	1 Stunde	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Y27632	1:2000	1 Stunde	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.8 Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
Lipofectamine® 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferationsassay	Promega, Mannheim, Deutschland

2.9 Plasmide

Plasmid	Vektor	Hersteller
Wildtype human Flag-DLC1	Flag-pEFrPGKpuro	Von Prof. Monilola Olayioye, Universität Stuttgart
Wildtype human GFP-DLC1	pcDNA5/FRT/TOGFP-DLC1	Von Prof. Monilola Olayioye, Universität Stuttgart

2.10 Antikörper

2.10.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Actin (rabbit)	1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-MKL1 (rabbit)	1:500	Mühlich et al, 2008
Anti-MRTF-A (C-19) (goat)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-DLC1 (mouse)	1:500	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-CTGF (L-20) (goat)	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-Hsp90 (mouse)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-Tubulin (rat)	1:500	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Anti-Flag M2 (mouse)	1:500	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Alexa Fluor® Phalloidin	1:500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.10.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 488, mouse	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488, rabbit	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor® 555, goat	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:10000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:10000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
Anti-goat IgG, HRP-linked Antibody	1:50000 in TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-rat IgG, HRP-linked Antibody	1:1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultur von Humanzellen und humanen Tumorzellen

Die Tumorzellen HuH7 und MDA-MB-468 wurden in DMEM-Medium mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) und HepG2-Zellen in RPMI-Medium mit 10% FBS kultiviert. Für MCF10F wurde DMEM- und F12-Medium in einem Verhältnis von 1:1 mit 5% Pferdeserum, 20 ng/ml EGF, 0,01 mg/ml Insulin und 500 mg/ml Hydrocortison verwendet. Allen Medien wurde 5% Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

Die HuH7- und MDA-MB-468-Zellen, die stabil shRNA „Targeting MKL1 und MKL2“ oder Kontroll-shRNA (Nicht-Ziel-shRNA Kontroll-Vektor, SHC002, von Sigma) exprimierten, wurden ebenfalls in DMEM-Medium mit 10% FBS mit 0,5 µg/ml Puromycin kultiviert. Diese waren in Vorarbeiten durch lentivirale Infektion erzeugt worden.

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in 10 cm-Zellkulturschalen bei 37 °C in einem 5%-igen CO₂-Inkubator. Sie wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Dazu wurde zuerst das Medium aspiriert, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und diese dann mit 2 ml 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst (ca. 3 min bei 37 °C). Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob sich alle Zellen gelöst hatten. Danach wurde 3 ml Medium hinzugegeben, um die Trypsinierung zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen ausgesät, indem mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt wurde und die Zellen mit einer Verdünnung von 1:10 in neues Medium ausplattiert wurden.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren wurden Zellen in einer vollen 10 cm-Schale zuerst trypsiniert (siehe Abschnitt 3.1.1) und dann für 5 Minuten abzentrifugiert (1000 rpm). Anschließend wurde das gewonnene Pellet in 1800 µl FBS aufgenommen und mit 200 µl DMSO versetzt. Die entstandene Suspension wurde auf vier Kryoröhrchen zu 500 µl verteilt. Das schrittweise Einfrieren der Zellen erfolgte bei -80 °C für 24 h in einer speziellen Isopropanol-haltigen Einfrierbox. Danach wurden die Kryoröhrchen bei -196 °C in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C. Anschließend wurden sie sofort in 5 ml aufgewärmtes Medium gegeben und für 5 min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und in eine 10 cm-Platte mit 9 ml Medium überführt.

3.1.3 Serumentzug

Die Zellen wurden „gehungert“, indem sie zweimal mit PBS gewaschen und dann in ein „Hungermedium“ mit nur 0,2 % FBS überführt wurden. Anschließend wurden sie für 16 h über Nacht inkubiert.

3.1.4 Stimulation und Inhibition der Zellen

Die Stimulation bzw. die Inhibition erfolgte nach einem am Vortag durchgeführten Serumentzug. Der Stimulus (FBS oder LPA) bzw. der Inhibitor (Latrunculin B und Y27632) wurde nach entsprechender Verdünnung zum Hungermedium hinzugefügt und die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.1.5 Liposomen-basierte, transiente Transfektion

Für transiente Transfektionen wurden die Tumorzellen in eine 6 cm-Zellkulturschale ausgesät und am nächsten Tag bei einer erreichten Konfluenz von 70-80% transfiziert. Dazu wurde das Lipofectamine® 2000 von Invitrogen modifiziert und nach Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurden 2 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (p3xFlag DLC1, Kontrollvektor, GFP-DLC1, Cdc42ep3) und parallel 10 µl Lipofectamine® 2000 jeweils in 500 µl Opti-MEM-Medium (ohne Zusatz von Antibiotika) gelöst und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Lösungen vorsichtig durch mehrmaliges Pipettieren gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während sich die kationischen Komplexe formten, erhielten die Zellen einen Mediumwechsel mit 4 ml Opti-MEM. Die Plasmid-DNA/Lipofectamine® 2000-Mischung wurde anschließend in die 6 cm-Platte gegeben und für 4 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Mischung der Transfektionsansätze abgesaugt und durch das übliche Medium ersetzt. Die Zellen wurden 1 bis 2 Tage später weiterverarbeitet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion bzw. -gewinnung aus den Zellen diente zur Vorbereitung auf den Western Blot. Dieses Verfahren wurde zum Beispiel für die MKL1-Aufreinigung verwendet. Nach Transfektion und/oder Stimulation wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurde ein Lysispuffer mit einem Gemisch aus Proteaseinhibitoren 1:100, PMSF 1:500 und DTT 1:250 dazu gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde das Zelllysate bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (12700 rpm) und der proteinhaltige Überstand in ein neues

Eppendorfgefäß überführt. Nun konnte dieser entweder bei -20 °C aufbewahrt oder direkt für das Western Blot-Verfahren genutzt werden.

3.2.2 Proteinquantifizierung

Die Messung des Gesamtproteingehalts des Zelllysats ist zur Bereitstellung einer bestimmten Proteinmenge für den Western Blot notwendig. Sie erfolgte nach der Methode von Bradford (1976), bei dem die Proteinkonzentration photometrisch quantifiziert wurde. Zuerst wurde 1 ml der Roti®-Quant Bradford-Reagenz (verdünnt mit dest. Wasser in 1:5 Verhältnis) zu 2 µl Zelllysate gegeben. Dadurch bindet der im Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 an die Proteine. Die Proteinkonzentration entspricht der Absorption bei 595 nm im BioPhotometer. Anhand dessen wurde dann die gewünschte Proteinmenge fürs Western Blot errechnet.

3.2.3 Aktinengewinnung und -fraktionierung

Die Aktinengewinnung ist eine Form der Proteinextraktion, an die die Aktinfraktionierung anschließt. Zuerst wurden die Zellen aus einer 6 cm- Zellkulturschale zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min in 0,75 ml Aktin-Lysispuffer auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Polycarbonatgefäß überführt. Nun folgte die Fraktionierung in das lösliche G-Aktin und das unlösliche F-Aktin. Dabei wurde das Lysat bei 50000 g und 4 °C für 1 h ultrazentrifugiert. Der G-Aktin-enthaltende Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. Das F-Aktin-enthaltende Pellet wurde in 0,75 ml Aktin-Lysispuffer aufgenommen und durch Sonifikation mittels eines Ultraschall-Disintegrators für dreimal 10 Sekunden bei maximaler Leistung aufgelöst. Die beiden Fraktionen wurden anschließend bei -20 °C aufbewahrt. Für die nachfolgende Analyse mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE wurden je 20 µl der G- und F-Aktin-Fraktion mit 5 µl Ladepuffer vermischt und aufgetragen.

3.2.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode von Laemmli (1970), die basiert auf der elektrophoretischen Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe von diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen.

Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Trenn- und Sammelgel. Für die Herstellung wurde zuerst ein 10 %-iges Trenngel in eine Gelapparatur zwischen zwei Glasplatten bis 2 cm unterhalb der oberen Glaskanten gegossen. Zur Erhaltung eines geraden Gelrandes und zum Schutz vor Austrocknung wurde das Gel mit Wasser überschichtet. Nach einer 20-minütigen Polymerisationszeit wurde das überstehende Wasser entfernt und nun das Sammelgel bis zur Oberkante der Glasplatten aufgebracht. Es wurde ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt, um Taschen für die Proteinproben zu

bilden. Nach der Polymerisation des Sammelgels konnten die Gele bei 4 °C bis zur Nutzung gelagert werden. Die Gele wurden vorbereitet, indem zuerst Wasser, Acrylamid, TRIS und SDS vorgemischt wurden. Für das Starten der chemischen Polymerisation der Acrylamidmonomere wurde APS (Ammoniumperoxidisulfat) unmittelbar davor dazugegeben. TEMED (Tetramethylethyldiamin) wirkt hierbei als Katalysator.

Für die Elektrophorese wurde zuerst ein Ladepuffer hergestellt, indem 960 µl 4 x SDS-haltiger Proteinprobepuffer mit 40 µl β-Mercaptoethanol vermischt wurde. Die Funktion von SDS (Natriumdodecylsulfat) besteht darin, die Peptidketten mit negativen Ladungen zu versehen. Dadurch wird die Eigenladung der Peptidketten maskiert und es erfolgt die Auftrennung der Proteine allein nach ihrer Größe. Der Ladepuffer wurde anschließend im Verhältnis von 4:1 zum Proteinlysat hinzugegeben. Die Mischung wurde bei 95 °C für 10 min inkubiert und dann für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation (12700 rpm) wurden die Proteinproben in gleichen Mengen in die Taschen des im Laufapparat befestigten Polyacrylamidgels aufgetragen. Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurde zusätzlich ein Marker (8 µl Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder) aufgebracht. Nun wurde der 1:10 mit H₂O bidest verdünnte Laufpuffer in die Laufkammer eingefüllt. Die Proteinproben wurden für ca. 2,5 h bei konstant 100 Volt aufgetrennt. Dabei sollte die Lauffront ca. 1 cm des unteren Gelendes nicht unterschreiten. Bei diesem diskontinuierlichen Lauf werden die Proteine zuerst im Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert. Erst im Trenngel erfolgt die eigentliche Auftrennung aufgrund kleinerer Porengröße und der Änderung des pH-Wertes.

3.2.5 Western Blot

Beim Western Blot werden die mittels SDS-Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran immobilisiert [154]. Hierzu wurde die Membran mit 10 ml Methanol benetzt und für 5 min in einem Behälter mit 40 ml Transferpuffer auf einem Schüttler äquilibriert. Währenddessen wurde das Sammelgel vom Polyacrylamidgel entfernt und das übrig gebliebene Trenngel von der Glasplatte mit Hilfe eines Spatels in Transferpuffer abgelöst. Die Schwämme und Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer eingetaucht. Das im Transferpuffer enthaltene 20%-ige Methanol sorgt für eine stärkere Bindung der Proteine an die PVDF-Membran. Dann wurde der Blot aufgebaut: ein Schwamm, zwei Filterpapiere, PVDF-Membran, Trenngel, zwei Filterpapiere, ein Schwamm. Mit Hilfe eines Reagenzglases wurde jede Schicht ausgestrichen, um eine Luftblasenentwicklung zu vermeiden. Danach wurde der Blot in einer Kassette eingespannt und in die Blotapparatur eingefügt, die mit einem Kühlaggregat (-20 °C) zur Vermeidung einer übermäßigen Wärmenstehung versehen war. Die

Apparatur wurde mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Elektrotransfer erfolgte für 1 h 15 min bei konstant 350 mA. Nach Beendigung des Blottings wurde die PVDF-Membran in 5 % Milchpulver (Roti-Block-Lösung) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Damit werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt.

3.2.6 Detektion mit Hilfe von Antikörpern

Die an die PVDF-Membran-gebundenen Proteine werden mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Dazu wurde die bereits geblockte Membran dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde sie über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Dann erfolgte nach erneuertem dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 15 min eine 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Schließlich wurde die Membran dreimal mit TBS-T für 5 min gewaschen und weitere 5 min in TBS inkubiert. Alle Wasch- und Inkubationsvorgänge fanden auf dem Schüttler statt.

Abschließend wurden die Proteine an der Membran mit Hilfe des Roti-Lumin-Reagenzes detektiert. Dafür wurden die beiden Roti-Lumin-Lösungen im vorgegebenen Verhältnis von 1:1 gemischt. Nach dem Verwerfen des TBS-Puffers wurde die Membran mit den Roti-Lumin-Lösungen für 1 min benetzt. Das überschüssige Reagenz wurde entfernt und die Membran mit einer durchsichtigen Plastikfolie abgedeckt. Danach erfolgte die Detektion an der Chemismart 5100 Densitometrikamera.

Der Nachweis des gesuchten Proteins ist durch die Bindung an den spezifischen Primärantikörper möglich, gegen den die Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper gerichtet ist. Die Peroxidase zeigt nach Umsetzung eine Chemilumineszenz, die mit Hilfe der digitalen Densitometrikamera visualisiert wurde. Die Belichtungszeit variiert je nach Stärke des Signals zwischen 5 Sekunden und 10 Minuten. Zusätzlich konnten hierbei die digitalen Bilder direkt mittels Densitometrie quantifiziert werden.

3.2.7 Quantitative Helligkeitsausmessung von Western Blot-Banden

Zur Quantifizierung des Gehalts der einzelnen Western Blot-Banden wurde das Programm NIH ImageJ 1.42 verwendet. Die einzelnen Banden wurden ausgewählt und mit Hilfe des Programms deren Helligkeitsintensität errechnet. Um ein Verhältnis z.B. vom F-/G-Aktin zu bilden, wurde der Helligkeitswert der F-Aktin-Bande durch den der G-Aktin-Bande dividiert.

3.3 Immunozytochemische Methoden

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die intrazelluläre Verteilung eines gesuchten Proteins in fixierten Zellen darstellen. Der Nachweis erfolgt indirekt, indem der am gesuchten Protein gebundene

Primärantikörper mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper gekoppelt wird. Dieser kann nach einer Anregung mit bestimmten Wellenlängen eine sichtbare Fluoreszenz erzeugen.

3.3.1 Beschichtung der Deckgläser mit Fibronectin

Zur Anheftung der Zellen an die Deckgläser werden diese mit Fibronectin beschichtet. Hierzu wurde Fibronectin im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt und es wurden 400 µl des verdünnten Substrats in jeweils eine Vertiefung einer 24-Well-Platte gegeben, in die zuvor kleine Deckgläschen gelegt wurden. Es erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden die Deckgläser in der 24-Well-Platte mit 1 ml PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² dazugegeben und für 90 min bei 37 °C inkubiert.

3.3.2 Fixieren und Permeabilisieren von Zellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden sie mit 400 µl 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und abschließend zweimal mit PBS gewaschen. In diesem Zustand konnten die Zellen bei Bedarf bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahrt werden. Dann wurde die Zellwand mit 0,2% Triton X-100 in PBS für 7 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Danach wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen der immunzytochemischen Reagenzien abzusättigen, wurden die Zellen über 30 Minuten bei 37 °C in PBS mit 1 % Rinderserumalbumin (BSA) geblockt und dreimal mit PBS gewaschen.

3.3.3 Immunchemische Färbung

Zuerst wurde der primäre Antikörper mit PBS verdünnt. Auf einem Parafilm wurde für jedes Deckgläschen 80 µl eines spezifischen Antikörpers getropft. Dann wurden die Deckgläschen aus der 24-Well-Platte mit Hilfe einer Zange herausgenommen, abgetupft und umgedreht (mit den Zellen nach unten) auf die Tropfen gelegt. Dann erfolgte die Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur im zugedeckten Zustand. Anschließend wurden die Deckgläschen in die Vertiefungen der 24-Well-Platte zurückgesetzt und dreimal mit PBS gewaschen. Das gleiche Verfahren wurde für den Alexa Fluor-konjugierten Sekundärantikörper (1:1000 in PBS verdünnt) wiederholt. Da es sich hierbei um fluoreszierende Antikörper handelt, musste ab diesem Zeitpunkt in einer dunklen Färbekammer weitergearbeitet werden. Nach erneutem, dreimaligem Waschvorgang wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger in einer Versiegelungslösung (Fluoromount oder Elvanol) eingebettet. Über Nacht wurden diese bei Raumtemperatur zugedeckt inkubiert.

Die Ergebnisse wurden am Axiovert-135M Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) bzw. am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM510 von Zeiss) dokumentiert. Das LSM kann im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop durch Anwendung des konfokalen Prinzips die exakte dreidimensionale Lage eines Signals darstellen.

3.4 Proliferationsassay

Zur Erfassung der Zellvermehrung wurde der Proliferationsassay „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell“ verwendet, das auf einer colorimetrischen Methode zur Bestimmung lebender Zellen beruht. 20 µl des Reagenzes wurden direkt auf die Zellen in einer 100 µl Medium-enthaltenen Vertiefung einer 96-Well-Platte gegeben. Die Platte wurde geschwenkt, damit der im Reagenz enthaltene Farbstoff MTS Tetrazolium von den Zellen aufgenommen und in Formazan umgewandelt werden kann. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Absorptionsmessung bei 490 nm mit einem Absorption-Mikroplattenleser. Die gemessene Absorption entspricht der Menge des gebildeten löslichen Formazanproduktes und ist dadurch direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Der Proliferationsassay wurde zur gleichen Zeit fünf tagelang durchgeführt.

3.5 Bildbearbeitung und statistische Auswertung

Die Bildbearbeitung und Helligkeitsausmessung von Western Blot-Banden erfolgte mittels „NIH ImageJ 1.42“ (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, USA) und Adobe Photoshop. Die statistische Analyse und die dazugehörigen Graphiken wurden mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism[®]“ (Firma Graph Pad, La Jolla, CA, USA) erstellt. Die Daten wurden als Mittelwert mit einer \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Dabei wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Für die statistische Analyse zwischen zwei Gruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test verwendet. P-Werte von $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**) und $\leq 0,001$ (***) wurden als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe lieferten erste Hinweise, dass MKL1 in DLC1-defizienten Tumorzellen konstitutiv im Zellkern lokalisiert ist und dort eine MKL- und SRF-abhängige Genexpression auslöst. Basierend auf dieser Grundlage wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der DLC1-Verlust tatsächlich die Ursache für die nukleäre Akkumulation und Aktivierung von MKL1 in Tumorzellen darstellt. Des Weiteren wurde der molekulare Mechanismus der nukleären Akkumulation von MKL1 in Abwesenheit von DLC1 analysiert, indem zwischengeschaltete Signalmoleküle inhibiert wurden und der Effekt auf die nukleäre Lokalisation von MKL1 verfolgt wurde. Darüber hinaus wurde die MKL1-abhängige Genexpression von CTGF in DLC1-defizienten Tumorzellen untersucht. Zum Schluss wurden die Auswirkungen der MKL1-Aktivierung auf das Aktinzytoskelett und die Zellproliferation in Tumorzellen ermittelt.

4.1 Nukleäre Lokalisation von MKL1 in Tumorzelllinien mit DLC1-Verlust

Die MKL1-Lokalisation wird in Fibroblasten durch RhoA reguliert. RhoGAPs wie DLC1 können RhoA inaktivieren. Folglich würde bei einem Verlust eines RhoGAPs dessen hemmende Wirkung fehlen und RhoA dauerhaft aktiv bleiben. Das legt die Vermutung nahe, dass ein DLC1-Verlust in Tumoren über die Aktivierung von RhoA Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von MKL1 nehmen könnte.

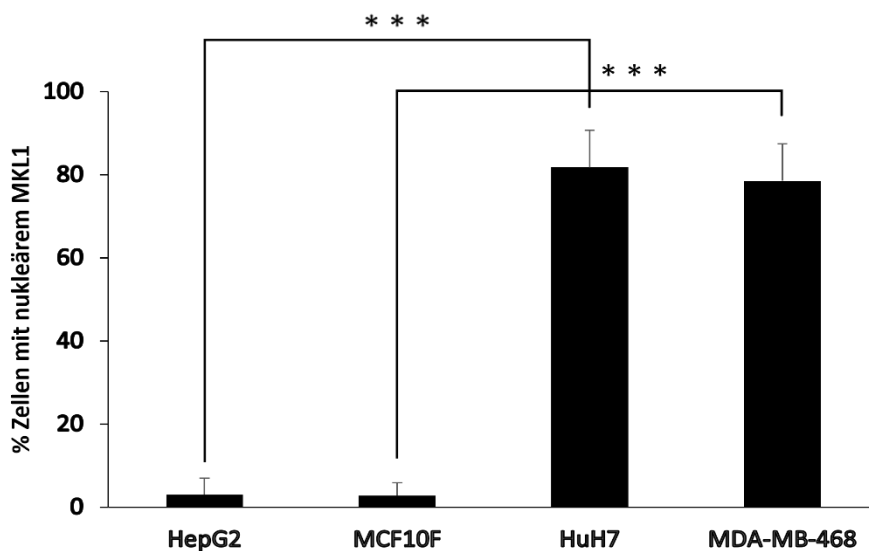


Abbildung 9: Nukleäre Lokalisation von MKL1 in humanen hepatozellulären und Mammakarzinomzelllinien mit einem DLC1-Verlust

Die Zellen HepG2, MCF10F, HuH7 und MDA-MB-468 wurden fixiert und mit dem Anti-MKL1-Antikörper immunchemisch sichtbar gemacht. In jeder Zelllinie wurde die zelluläre Lokalisation von MKL1 in vorwiegend zytoplasmatisch, vorwiegend nukleär und in beiden Zellräumen unterteilt. Dargestellt ist der Prozentanteil der Zellen, in denen sich MKL1 vorwiegend nukleär befindet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD repräsentativ für dreifach wiederholte Experimente angegeben, in denen mindestens jeweils hundert Zellen gezählt wurden (***) $p < 0,001$.

Um den Einfluss vom DLC1-Verlust auf die MKL1-Lokalisation zu untersuchen, wurden DLC1-defiziente Zelllinien vom hepatozellulären Karzinom (HuH7) und vom Mammakarzinom (MDA-MB-468) mit DLC1-exprimierenden Zelllinien vom humanen Hepatoblastomzellen (HepG2) und Mammaepithelzellen (MCF10F) mittels indirekter Immunfluoreszenz miteinander verglichen.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, weist MKL1 in den HepG2- und MCF10F-Zellen kaum eine nukleäre Lokalisation auf. Hingegen befindet sich MKL1 in den HuH7- zu 82 % und in MDA-MB-468-Tumorzellen zu 78,5 % im Zellkern. Dies lässt schlussfolgern, dass eine nukleäre Lokalisation von MKL1 in hepatozellulären und Mammakarzinomzelllinien mit einem DLC1-Verlust assoziiert ist.

4.2 Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 nach DLC1-Rekonstitution

Um die Abhängigkeit der nukleären MKL1-Lokalisation vom DLC1-Verlust weiter zu untersuchen, wurde DLC1 in den DLC1-defizienten HuH7-Tumorzellen wieder eingeführt. Dafür wurden die HuH7-Zellen transient mittels Lipofectamin mit einem humanen Flag-markierten DLC1-Plasmid oder mit dem entsprechenden Kontrollvektor transfiziert. Anschließend wurde die zelluläre Lokalisation von MKL1 durch indirekte Immunfluoreszenz ermittelt.

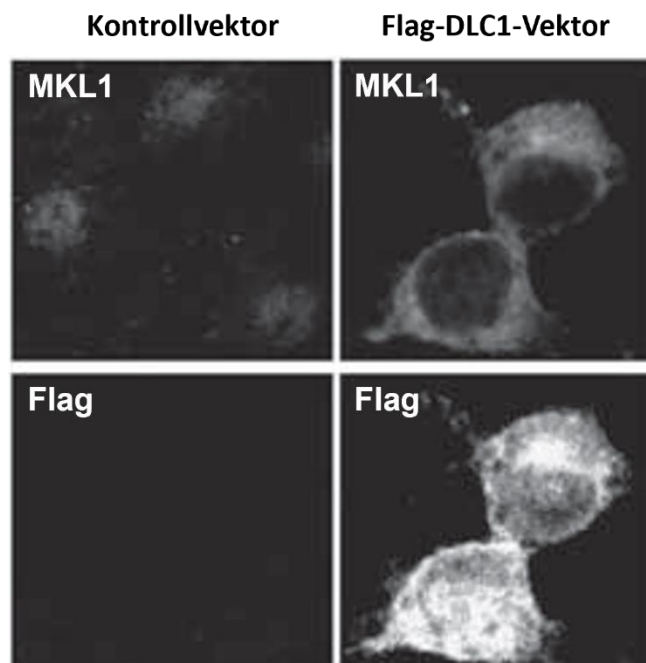


Abbildung 10: Relokalisation von MKL1 vom Zellkern ins Zytoplasma nach Rekonstitution von DLC1

Die HuH7-Zellen wurden transient mit dem humanen Flag-markierten DLC1-Plasmid (rechts) oder mit einem Kontrollvektor (links) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem anti-MKL1- (oben) und einem anti-Flag-Antikörper (unten) immunochemisch gefärbt (Muehlich, Khalid, et al., 2012).

Mit dem DLC1-Plasmid-transfizierten HuH7-Zellen zeigen eine MKL1-Relokalisation vom Zellkern ins Zytoplasma (Abbildung 10, rechts oben). Hingegen weisen die HuH7-Kontrollzellen weiterhin eine nukleäre Lokalisation von MKL1 auf (Abbildung 10, links oben). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zelluläre Lokalisation von MKL1 von DLC1 abhängig ist und dass die Abwesenheit von DLC1 eine nukleäre Translokation des transkriptionellen Koaktivators MKL1 bewirkt.

4.3 Nukleäre Lokalisation von MKL1 als Folge der Aktivierung des RhoA/Aktin-Signalwegs durch den DLC1-Verlust

Als nächstes stellt sich die Frage, wie der DLC1-Verlust in Tumorzellen zur nukleären Lokalisation von MKL1 führt. Wie eingangs erwähnt würde bei einem Verlust von DLC1 dessen hemmende Wirkung als RhoGAP gegenüber RhoA fehlen, wodurch RhoA aktiviert bleiben würde [133, 155]. Des Weiteren ist bekannt, dass eine RhoA-Aktivierung in Fibroblasten über eine Aktinpolymerisation zur nukleären Lokalisation von MKL1 führt [63].

Vor diesem Hintergrund lässt sich die Hypothese generieren, dass ein DLC1-Verlust in Tumorzellen über die Aktivierung des RhoA/Aktin-Signalwegs zur nukleären Lokalisation von MKL1 führen könnte. Der DLC1-Verlust könnte durch eine Aktivierung von RhoA diesen Signalweg induzieren, wodurch die Rho-Kinase eingeschaltet werden würde. ROCK würde über eine Stabilisierung der Aktinfilamente das G-Aktin-Gehalt reduzieren. Folglich würde das konstitutiv an G-Aktin-gebundene MKL1 dissoziieren und in den Zellkern wandern, wo es als Koaktivator an den Transkriptionsfaktor SRF binden und die Transkription von tumorrelevanten Zielgenen aktivieren würde.

Unsere Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Mühlich hatte bereits den RhoA-Status in Abhängigkeit von DLC1 analysiert und konnte zeigen, dass die DLC1-defizienten HuH7- und MDA-MB-468-Tumorzelllinien einen wesentlich höheren Gehalt an aktivem RhoA als DLC1-exprimierende Zelllinien enthalten [156], was die o.g. Hypothese stützt.

4.3.1 Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch die Inhibierung der Rho-Kinase

Der nächste Schritt im RhoA/Aktin-Signalweg stellt die Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK) durch das aktive RhoA dar. Um die Abhängigkeit der MKL1-Lokalisation von ROCK aufzuzeigen, wurde ROCK mit dem Inhibitor Y27632 in HuH7- und in MDA-MB-468-Tumorzellen gehemmt und die zelluläre Lokalisation von MKL1 mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt. Aus der Literatur weiß man, dass dieser Inhibitor teilweise die Wirkung von RhoA auf die Aktinpolymerisation blockiert [123].

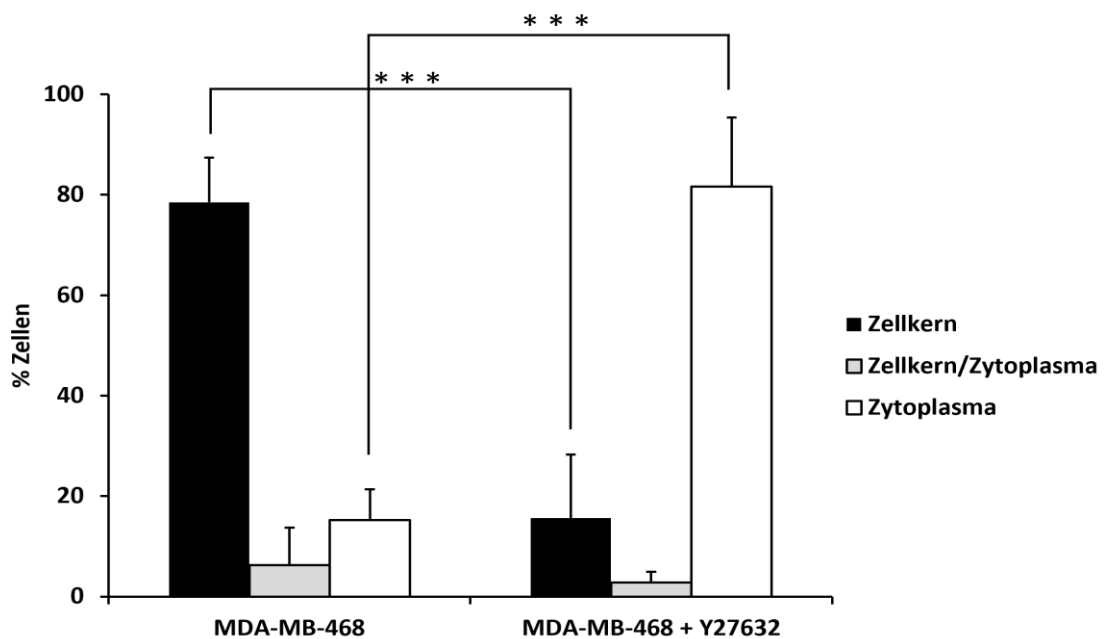


Abbildung 11: Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch Inhibierung von ROCK

Die MDA-MB-468-Zellen wurden mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 (5 μ M) für 45 min behandelt. Bei den Kontrollzellen fand keine Behandlung statt. Anschließend wurden sie fixiert und mit dem Anti-MKL1-Antikörper immunchemisch sichtbar gemacht. In beiden Zelllinien wurde die zelluläre Lokalisation von MKL1 in vorwiegend nukleär, vorwiegend zytoplasmatisch und in beiden Zellräume unterteilt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD repräsentativ für dreifach wiederholte Experimente angegeben, in denen mindestens jeweils hundert Zellen gezählt wurden (***) $p < 0,001$).

Nach Inhibition der Tumorzellen mit Y27632 kam es erwartungsgemäß zu einer deutlichen MKL1-Translokation vom Zellkern ins Zytoplasma (Abbildung 11). Somit sind RhoA und sein Effektor ROCK für die nukleäre Lokalisation von MKL1 notwendig.

4.3.2 Vermehrte Stressfasern in DLC1-defizienten Tumorzellen

Vermehrt aktives RhoA führt zur Bildung von Stressfasern [116]. RhoA vermittelt diese Wirkung unter anderem über seinen Effektor ROCK, der durch die Phosphorylierung der Lim-Kinase den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin inaktiviert und dadurch die Aktinfilamente stabilisiert [122, 123].

Um herausfinden, ob der DLC1-Verlust über die RhoA-Aktivierung zur vermehrten Stressfaserbildung führt, wurde das Aktinzytoskelett von HepG2, HuH7, MCF10F und MDA-MB-468 durch eine Anfärbung von F-Aktin mit dem bitykischen Peptid Phalloidin sichtbar gemacht. Phalloidin ist ein Gift, das aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) gewonnen wird und spezifisch an F-Aktin

bindet [157]. An dieses cyclische Peptid ist ein fluoreszierender Farbstoff gebunden, dessen abgestrahltes Licht durch die Fluoreszenzmikroskopie aufgefangen werden kann.

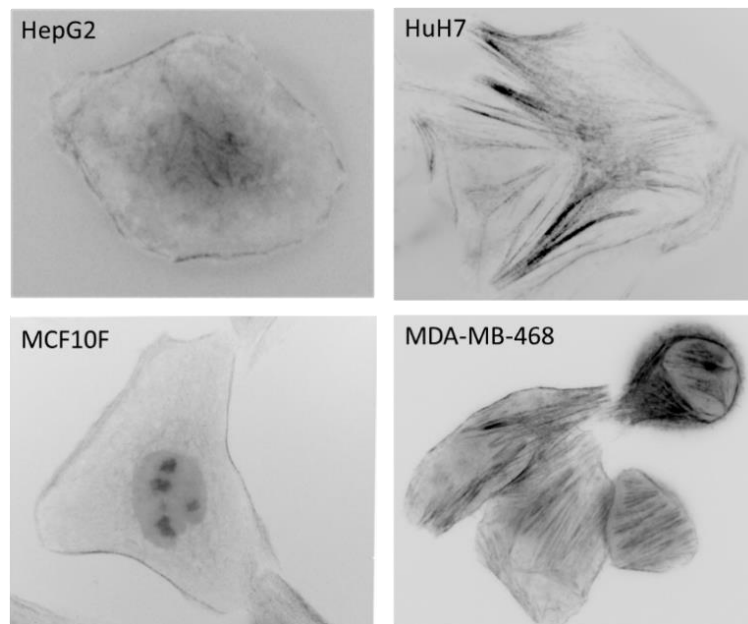


Abbildung 12: Vermehrte Stressfasern in DLC1-defizienten Tumorzellen

Das Aktinzytoskelett von HepG2, HuH7, MCF10F und MDA-MB-468 Zellen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Dabei wurde F-Aktin/die Pelletfraktion mit Alexa Fluor 488 Phalloidin gefärbt. Repräsentative Bilder sind hier dargestellt.

Die Ergebnisse der Immunofluoreszenz zeigen kaum Stressfasern in den DLC1-exprimierenden HepG2- und MCF10F-Zellen (Abbildung 12, links). Im Gegensatz dazu enthielten die DLC1-defizienten HuH7- und MDA-MB-468-Tumorzellen stark vermehrte und verdickte Stressfasern (Abbildung 12, rechts). Das spricht dafür, dass der DLC1-Verlust über das aktivierte RhoA zur vermehrten Aktinpolymerisation führt.

Um die vermehrte Stressfaserbildung in den DLC1-defizienten Tumorzellen zu bestätigen, wurde eine weitere Methode zur Quantifizierung des Aktingehalts angewandt. Dabei wurde das zelluläre Aktin mittels Ultrazentrifugation bei 50 000g in F-Aktin (entspricht der Pelletfraktion) und G-Aktin (entspricht der Überstandsfraktion) aufgetrennt. Anschließend wurden die beiden Fraktionen im Western Blot aufgearbeitet und die unterschiedliche Helligkeit der entstandenen Banden mittels des Computerprogramms „ImageJ“ errechnet.

Zuvor wurde als Kontrolle für eine korrekte Aufteilung des Aktins in seine beiden Fraktionen eine Behandlung mit dem Zytoskeletgift Jasplakinolide, das F-Aktin stabilisiert, durchgeführt. Nach der Behandlung der DLC1-defizienten HuH7-Tumorzellen mit dem Gift wurden die beiden

Aktinfraktionen im gleichen beschriebenen Verfahren voneinander getrennt und im Western Blot dargestellt.

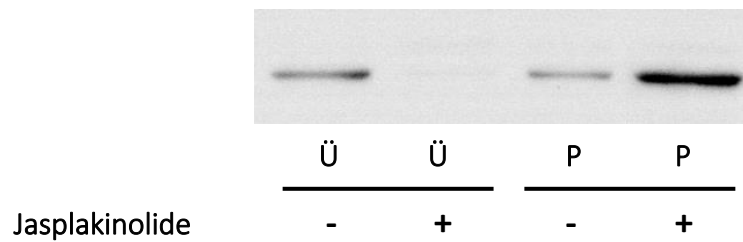


Abbildung 13: Kontrolle mit Jasplakinolide: Erfolgreiche Aufteilung von Aktin in F- und G-Aktin

HuH7-Zellen wurden vor der Zellysis und der Aufteilung in eine Überstands- (Ü) und Pelletfraktion (P) durch Ultrazentrifugation für 90 min mit Jasplakinoliden (0,3µM) behandelt. Gleiche Mengen der beiden Fraktionen wurden nach der SDS-PAGE mit Hilfe eines Anti-Aktin Antikörpers detektiert (Mühlich, Khalid et al., 2012).

Die Behandlung mit Jasplakinolide zeigte eine quantitative Umwandlung des zellulären Aktins in die Pelletfraktion/F-Aktin (Abbildung 13). Damit konnte bestätigt werden, dass die verwendete Methode zur Aufteilung des Aktins in F- und G-Aktin erfolgreich ist.

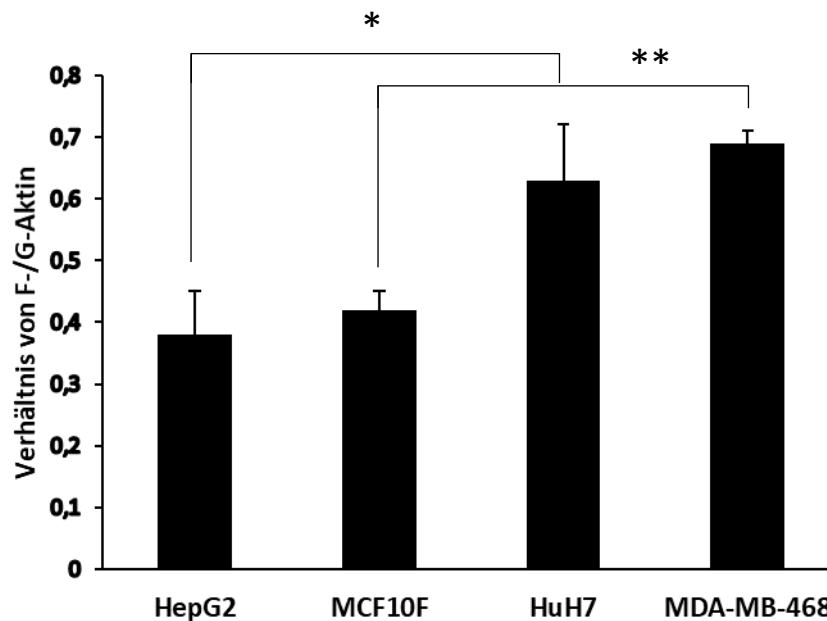


Abbildung 14: Erhöhter F-Aktin-Gehalt in DLC1-defizienten Tumorzelllinien als Resultat der RhoA-Aktivierung

Die Zellen wurden mittels Ultrazentrifugation in eine G-Aktin enthaltene Überstandsfraktion und F-Aktin tragende Pelletfraktion getrennt. Im anschließenden Western Blot wurde das G- und F-Aktin in Banden verdichtet. Die Intensität der einzelnen Banden wurde mit Hilfe des Programms ImageJ gemessen. Das F-/G-Aktin Verhältnis wurde durch das Dividieren der Helligkeitswerte der Banden von der Pellet- und Überstandsfraktion errechnet. Die Daten sind als Mittelwerte ±SD repräsentativ für dreifach wiederholte Experimente angegeben (*p < 0,05; **p < 0,01) (Mühlich, Khalid, et al., 2012).

Vereinbar mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz zeigen die DLC1-defizienten HuH7- und MDA-MB-468-Tumorzellen auch beim Versuch der quantitativen Erfassung der beiden Aktinfraktionen eine signifikante, ca. 1,7-fache Erhöhung des F-Aktin-Gehalts im Vergleich zu den DLC1-exprimierenden HepG2- und MCF10F-Zellen (Abbildung 14). Auch dieser Versuch bestätigt, dass der DLC1-Verlust über das aktivierte RhoA zur vermehrten Aktinpolymerisation führt.

4.3.3 Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch Hemmung der Aktinpolymerisation

Wie im vorherigen Abschnitt ausgeführt, resultiert eine RhoA-Aktivierung in DLC1-defizienten Tumorzellen in einer vermehrten Stressfaserbildung. Um den Einfluss der Aktinpolymerisation auf die zelluläre Lokalisation von MKL1 zu analysieren, blockierten wir diese mittels Latrunculin B und untersuchten die HuH7- und MDA-MB-468-Zellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. Latrunculin B ist ein bekanntes Gift, das die Aktinfilamente spaltet [158].

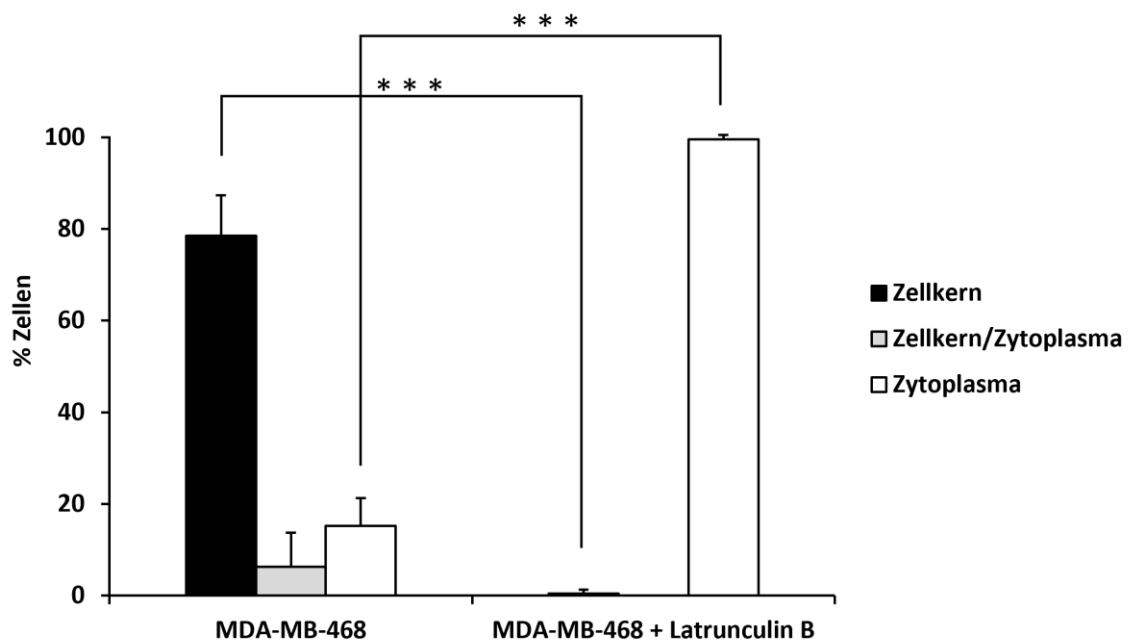


Abbildung 15: Zytoplasmatische Relokalisation von MKL1 durch Hemmung der Aktinpolymerisation

Die MDA-MB-468-Zellen wurden mit dem Inhibitor Latrunculin B (1 μ M) für 45 min behandelt. Bei den Kontrollzellen fand keine Behandlung statt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem Anti-MKL1-Antikörper immunchemisch sichtbar gemacht. In beiden Zelllinien wurde die zelluläre Lokalisation von MKL1 in vorwiegend nukleär, vorwiegend zytoplasmatisch und in beiden Zellräumen unterteilt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD repräsentativ für dreifach wiederholte Experimente angegeben, in denen mindestens jeweils hundert Zellen gezählt wurden (** $p < 0,001$).

Die Hemmung der Aktinpolymerisation in DLC1-defizienten Tumorzellen resultiert in einer Relokalisation des nukleär gelegenen MKL1 ins Zytoplasma (Abbildung 15). Folglich ist die

Stressfaserbildung ein notwendiger, vorausgehender Schritt, der die nukleäre Translokation und Akkumulation von MKL1 nach sich zieht.

Zusammenfassend legen alle Ergebnisse nahe, dass der durch den DLC1-Verlust aktivierte RhoA/Aktin-Signalweg in Tumorzellen zur nukleären Lokalisation von MKL1 führt. Durch die Abwesenheit von DLC1 kommt es zur Aktivierung von RhoA, das über seinen Effektor ROCK zur vermehrten Stressfaserbildung und zur MKL1-Dissoziation von G-Aktin führt. MKL1 kann so in den Zellkern wandern und seine Funktion als Koaktivator des Transkriptionsfaktors SRF wahrnehmen.

4.4 Aktivierung von CTGF als MKL/SRF-abhängiges Zielgen in DLC1-defizienten

Tumorzellen

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass der DLC1-Verlust in Tumorzellen über den RhoA/Aktin-Signalweg zur nukleären Lokalisation von MKL1 führt. Es ist bekannt, dass MKL1 als Koaktivator den Transkriptionsfaktor SRF im Zellkern aktiviert und so die Transkription von verschiedenen Zielgenen auslöst [50]. Zusätzlich ist DLC1 ein potenter Tumorsuppressor und sein Verlust fördert die Entstehung eines HCC [131]. Es liegt die Vermutung nahe, dass MKL1 infolge des Verlusts vom Tumorsuppressor DLC1 die Tumorigenese, insbesondere die Hepatokarzinogenese, vermittelt, in dem er die Expression von tumorrelevanten SRF-Zielgenen auslöst.

Das Protein CTGF (Connective Tissue Growth Faktor) wurde als ein Immediate Early Gen charakterisiert, dessen Expression durch SRF reguliert wird [159]. CTGF gehört zur CCN-Proteinfamilie. CCN steht für Cyr61 (cysteine-rich protein 61), CTGF und NOV (nephroblastoma overexpressed gene), die die erst entdeckten Mitglieder dieser Familie sind [160]. Diese spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen wie Zelldifferenzierung, -proliferation, -adhäsion, -migration und Angiogenese [161]. Darüber hinaus ist CTGF in die Tumorprogression von hepatozellulären - und Mammakarzinomen involviert [162, 163, 164]. Ob die CTGF-Expression in DLC1-defizienten Tumorzellen durch MKL1 vermittelt wird, wurde im Folgenden überprüft.

Um die Abhängigkeit der CTGF-Expression von durch den DLC1-Verlust aktiviertem MKL1 zu untersuchen, war es notwendig die DLC1-defizienten Tumorzelllinien mit einem MKL1/2-Knockdown mit den MKL1/2-exprimierenden Kontrollzellen zu vergleichen. Hierzu erfolgte ein Doppel-Knockdown, da in Fibroblasten mit einem einzelnen MKL1-Knockdown die Expression von Immediate Early Genen nicht ausreichend unterdrückt werden konnte [73]. Die hierfür verwendeten Zellen mit einem stabilen MKL1/2-Knockdown waren bereits in unserem Labor mit einem lentiviralen, gegen

MKL1 und MKL2 gerichteten shRNA-Vektor etabliert worden. Ebenfalls waren Kontrollzellen mit einem lentiviralen shRNA-Leervektor transfiziert worden.

Im Immunoblot konnte nachgewiesen werden, dass unter anderem die Expression von MKL1 stark reduziert war. Die Ladekontrolle mit HSP90 (heat shock protein 90), welche in verschiedenen Zellen unabhängig von den Kulturbedingungen in gleichem Maße exprimiert wird [165], zeigte eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Gesamtprotein in beiden Banden (Abbildung 16).

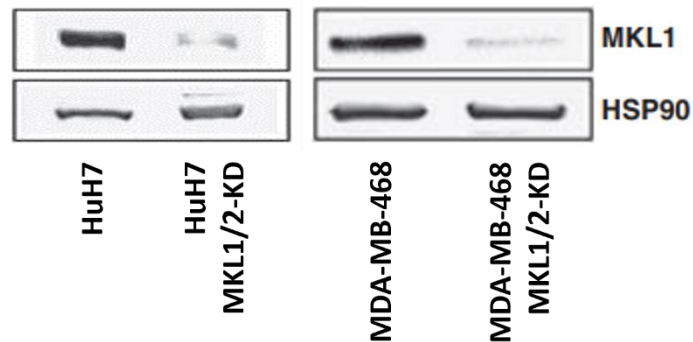


Abbildung 16: Erfolgreicher stabiler MKL1-Knockdown (KD)

Die Tumorzelllinien HuH7 und MDA-MB-468, die bereits entweder mit einer Kontroll-shRNA oder mit MKL1/2-shRNA transfiziert worden sind, wurden lysiert und gleiche Mengen des gesamten Zellproteingehalts im Immunoblot aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Detektion unter anderem mit einem Antikörper gegen MKL1. Die Ladekontrolle wurde mit einem HSP90-Antikörper überprüft. Die Blots sind repräsentativ für dreifach wiederholte Experimente (Muehlich, Khalid, et al., 2012).

Nun wurden die DCL1-defizienten Tumorzelllinien mit und ohne dem MKL1/2-Knockdown bezüglich ihrer CTGF-Expression mittels Western Blot-Verfahren miteinander verglichen.

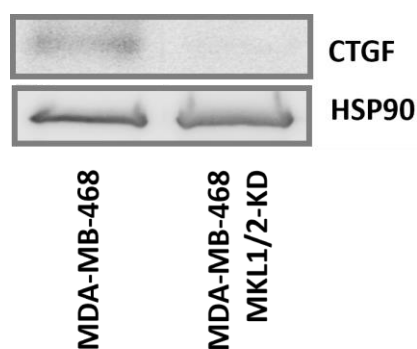


Abbildung 17: CTGF als ein MKL1-abhängiges Zielgen

Die MDA-MB-468-Kontrollzellen und die MDA-MB-468-Zellen mit dem MKL1/2-Knockdown (KD) wurden zunächst lysiert und gleiche Mengen des gesamten Zellproteingehalts in einem Immunoblot aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Detektion mit einem Antikörper gegen CTGF. Die Ladekontrolle unter Verwendung eines HSP90-Antikörpers, die aus demselben Blot gewonnen wurde, beweist eine gleichmäßige Beladung des Gels in beiden Banden.

Wie erwartet rief der MKL1-Knockdown eine sichtbare Reduktion der CTGF-Expression hervor (Abbildung 17). Damit konnte gezeigt werden, dass CTGF in DLC1-defizienten Tumorzellen nicht nur ein SRF-, sondern auch ein MKL1-abhängiges Zielgen ist.

4.5 MKL1 als Mediator protumorigener Zytoskelettveränderungen bei DLC1-Verlust

Medjkane und Kollegen fanden heraus, dass die Stilllegung von MKL1/2 in Tumorzellen die Zelladhäsion, -motilität und Metastasierung reduziert [92]. Auch konnte unsere Arbeitsgruppe demonstrieren, dass die durch den DLC1-Verlust verursachte Zellmigration durch eine Herunterregulation von MKL1/2 unterdrückt wurde [156]. Dabei wird die Zellmotilität maßgeblich durch das Aktinzytoskelett gesteuert [111]. Eine weitere Hypothese dieser Arbeit ist, dass MKL1 durch die Veränderung des Zytoskeletts einen positiven Einfluss auf die Zellmotilität und -migration von DLC1-defizienten Tumoren einnimmt.

Um den direkten Einfluss von MKL1 auf das Aktinzytoskelett zu untersuchen, wurden DLC1-defiziente HuH7-Tumorzellen ohne und mit einem MKL1/2-Knockdown miteinander verglichen. Zur Darstellung des Aktinzytoskeletts wurden die Zellen erneut mit Phalloidin gefärbt und in der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

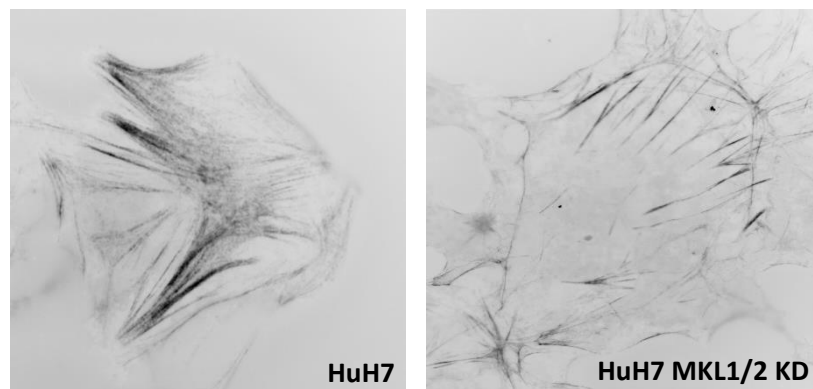


Abbildung 18: Vermehrte und organisierte Stressfasern als MKL1-Einfluss in DLC1-defizienten Tumorzellen
Der MKL1/2-Knockdown (KD) in den DLC1-defizienten HuH7 löst eine Desorganisation von Stressfasern aus und reduziert ihre Anzahl. Das Aktinzytoskelett von HuH7-Zellen, die entweder Kontroll-shRNA oder MKL1/2-shRNA stabil exprimieren, wurde durch das Färben von F-Aktin mit ALEXA Fluor 488 Phalloidin dargestellt.

Es zeigt sich, dass der MKL1/2-Knockdown in den DLC1-defizienten HuH7-Zellen eine Desorganisation des Aktinzytoskeletts und eine geringere Stressfaserbildung auslöst (Abbildung 18). Demnach ist festzustellen, dass MKL1 durch den DLC1-Verlust zu karzinogenen Strukturveränderungen im Aktinzytoskelett führt, die vor allem für die Zellmotilität und damit für die Morphogenese, Tumordinvasion und Metastasierung in der Tumorigenese von entscheidender Bedeutung sind.

4.6 MKL1 als Mediator der Tumorzellproliferation bei DLC1-Verlust

Als Weiteres wurde die Tumorzellproliferation bei DLC1-Verlust in Abhängigkeit von MKL1 analysiert. Dazu erfolgte ein Proliferationsassay über 5 Tage, um das Wachstumsverhalten der HuH7-Tumorzellen ohne und mit MKL1/2-Knockdown zu vergleichen.

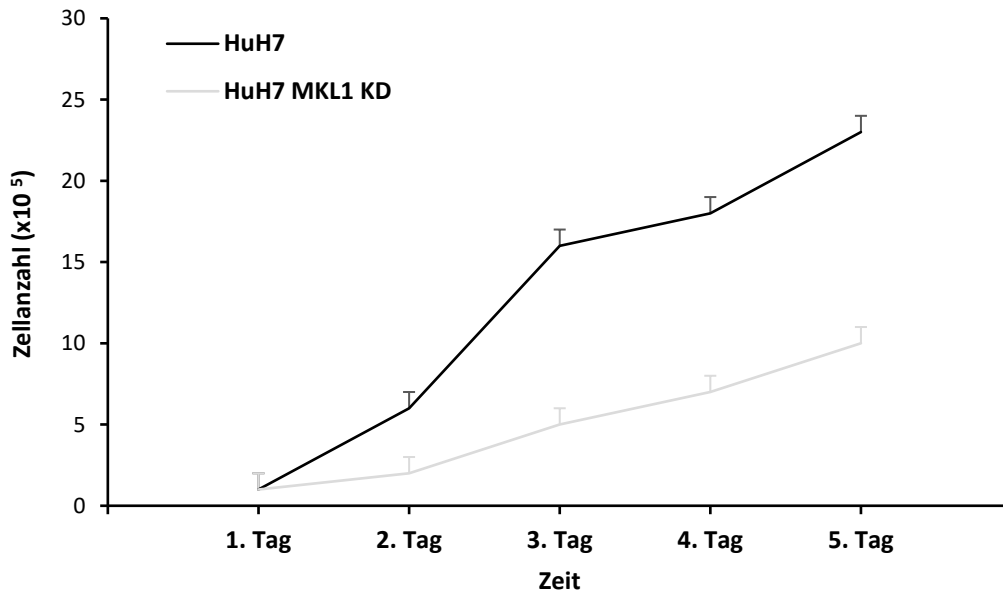


Abbildung 19: MKL1 als Mediator der Tumorzellproliferation bei DLC1-Verlust

Die DLC1-defizienten HuH7-Kontrollzellen und HuH7-Zellen mit MKL1/2-Knockdown (KD) wurden täglich für 5 Tage gezählt. Die Abbildung ist für 3 voneinander unabhängige Versuche repräsentativ.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass die Tumorzellen mit dem MKL1/2-Knockdown eine Wachstumsrate von weniger als 50% aufweisen (Abbildung 19). Daraus lässt sich schließen, dass MKL1 an der Zellproliferation in DLC1-defizienten Tumorzellen beteiligt ist.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Experimente, dass MKL1 als Folge des DLC1-Verlusts in Tumoren über den RhoA/Aktin-Signalweg in den Zellkern gelangt. Dort vermittelt er durch die Aktivierung von CTGF und vermutlich weiteren Zielgenen die protumorigenen Strukturveränderung des Aktinzytoskeletts und die Tumorzellproliferation in DLC1-defizienten Tumorzellen.

5. Diskussion

5.1 Der molekulare Mechanismus der nukleären Akkumulation von MKL1 infolge des DLC1-Verlusts

DLC1 ist ein Tumorsuppressorgen, das bei 50% der PatientInnen mit Leber-, Brust-, Lungen- und 70% der PatientInnen mit Darmkrebs eine heterozygote Deletion aufweist [166]. Wie dies zur Tumorentwicklung beiträgt, war bislang unklar. Gleichzeitig ist DLC1 ein negativer Regulator der Rho-GTPasen, der diese von der aktiven, GTP-gebundenen Form in die inaktive, GDP-gebundene Form überführt [167]. Rho-GTPasen zeigen in vielen Tumoren eine erhöhte Aktivität, weisen allerdings nur sehr selten selbst Mutationen auf [127]. Man vermutet daher, dass diese Veränderungen durch Mutationen in den regulierenden Proteinen von Rho-GTPasen entstehen. Durch die Entdeckung des Tumorsuppressors DLC1 konnte man zum ersten Mal einen direkten Bezug zwischen dem Rho-Signalweg und der Tumorigenese herstellen [168]. Die kleinen GTPasen der Rho-Familie sind an allen Stadien der Tumorentwicklung beteiligt, die Zellproliferation, -überleben, -invasion und Metastasierung umfassen [126]. In normalen Gewebearten regulieren sie viele essentielle Prozesse der Zelle, wie die Aktindynamik, die Zellzyklusprogression und die Gentranskription [115]. Hierbei spielen der ubiquitäre Transkriptionsfaktor SRF [62] und seine Koaktivatoren MKL1/2 [63, 73] eine wichtige Rolle. In Fibroblasten wandert die inaktive Form von MKL1 zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern. Eine konstitutiv nukleäre Akkumulation und Aktivierung von MKL1 kommt erst durch eine Stimulation mit Serum zustande [63, 84].

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust des Tumorsuppressorgens DLC1 in hepatozellulären und Mammakarzinomzelllinien in einer konstitutiv nukleären Akkumulation und Aktivierung des Transkriptionskoaktivators MKL1 resultiert. Wie Abbildung 20 zeigt, wurde ein neues molekulares Signaltransduktionsmodell in der Tumorigenese aufgestellt und untersucht, indem der DLC1-Verlust die GTPase RhoA aktiviert, welche zur Stressfaserbildung und dadurch zur nukleären Akkumulation und Aktivierung von MKL1 führt. Dies hat die Transkription von tumorrelevanten MKL1/SRF-abhängigen Zielgenen zur Folge, die die Tumorentwicklung wie die Zellproliferation und -migration fördern. MKL1 dient demzufolge als Mediator der Tumorigenese, speziell der Hepatokanzerogenese, infolge des DLC1-Verlusts.

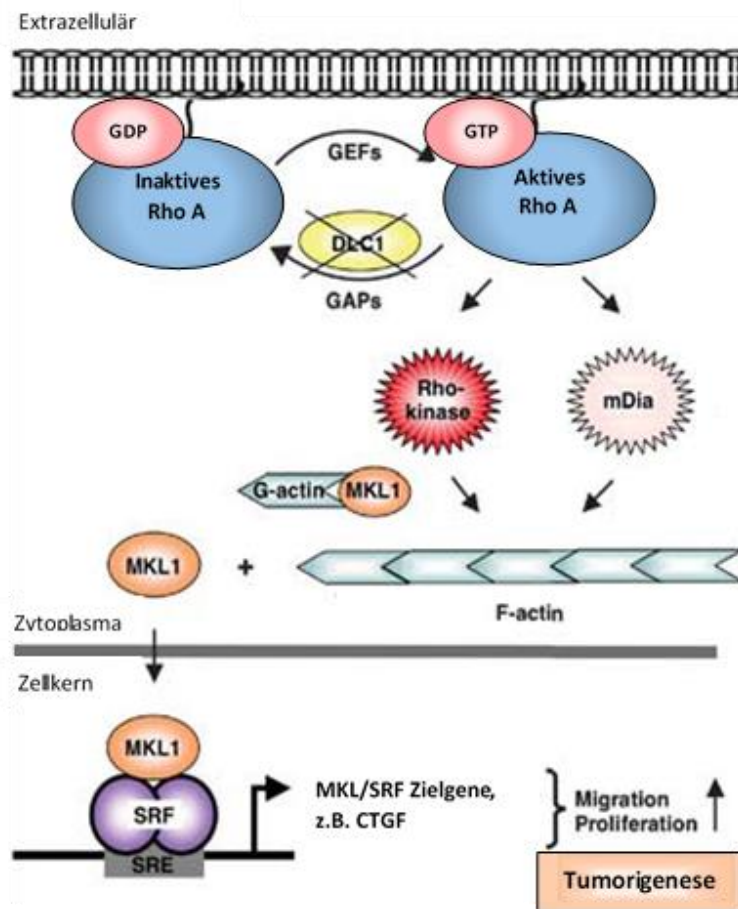


Abbildung 20: Modell für MKL1 als Mediator der Tumorigenese infolge des DLC1-Verlusts

Der Verlust der RhoGAP DLC1 aktiviert die GTPase RhoA, die über ihre beiden Effektoren, die Rho-Kinase und mDia, eine vermehrte Formation von F-Aktin nach sich zieht. Das führt wiederum zur nukleären Akkumulation des Koaktivators MKL1, der den Transkriptionsfaktor SRF und damit die Transkription von MKL1/SRF-Zielgenen aktiviert. Dieser Prozess ist für wichtige Schritte in der Tumorentwicklung wie die Zellproliferation und -migration notwendig. Abb. modifiziert nach [156].

In den letzten Jahren hat der Transkriptionskoaktivator MKL1 eine zunehmende Bedeutung in der Tumorforschung gewonnen und viele Studien zeigen seine protumorigene Wirkung in verschiedenen Karzinomen wie in der megakaryoblastischen Leukämie, im malignen Melanom, im Mamma-, Lungen-Ovarial-, Zervix- und Schilddrüsenkarzinom [64, 92, 169, 170, 171, 172, 173]. Es ist allerdings wenig darüber bekannt, wie es zur Aktivierung von MKL1 in der Tumorigenese kommt. Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust des Tumorsuppressorgens DLC1 im hepatozellulären und im Mammakarzinom zur Aktivierung von MKL1 führt, indem er seine subzelluläre Verteilung reguliert. In den DLC1-defizienten Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms HuH7 und des Mammakarzinoms MDA-MB-468 wurde eine nahezu vollständige, nukleäre Lokalisation von MKL1 beobachtet. Ein Wiedereinführen von DLC1 in diesen Zellen resultiert in einer MKL1-Relokalisation ins Zytoplasma. Im Vergleich dazu befand sich MKL1 in den DLC1-

exprimierenden Zelllinien des humanen Hepatoblastoms HepG2 und des Mammaepithels MCF10F vorwiegend im Zytoplasma. Somit zeigen die ersten Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Verlust von DLC1 in Tumoren die nukleäre Translokation von MKL1 verursacht, von wo aus MKL1 seine Funktion als Koaktivator des Transkriptionsfaktors SRF wahrnehmen und die Expression tumorrelevanter Zielgene einschalten kann. Einen anderen Grund für die nukleäre Akkumulation von MKL1 fanden Eisenach und Kollegen in einer Inhibition der Arginyltransferase 1 (ATE1), die zu einem schnellen Verlust von E-cadherin und zu einer F-Aktin-Reorganisation in den Mammakarzinomzellen MCF-7 führt [171]. In einer anderen Studie wurde vermutet, dass die nukleäre Lokalisation von MKL1 in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 durch eine Integrin-vermittelte Aktinregulation getriggert wird [174]. Kürzlich berichtete die Arbeitsgruppe von Dong, dass Rictor (Rapamycin insensitive companion of mTOR), eine Untereinheit der Tyrosinkinase mTOR, in der hepatozellulären Karzinomzelllinie HCCLM3 die Aktivierung von MKL1 auslöst. Rictor phosphoryliert das Actin-binding LIM Protein 1 (ABLIM1), das über die Regulation der Aktindynamik zur MKL1-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern führt [175]. All diese Beobachtungen decken sich auch mit der bereits 2003 veröffentlichten Arbeit von Miralles, der in nicht-tumorösen Fibroblasten festgestellt hat, dass durch eine Serumstimulation ausgelöste Aktinpolymerisation zur nukleären Translokation von MKL1 führt [63]. Es zeigt sich, dass es verschiedene Zelllinien-abhängige Auslöser gibt, die eine nukleäre Akkumulation und Aktivierung von MKL1 in Tumoren nach sich ziehen. Allen gemeinsam liegt hier eine Regulation der Aktindynamik zugrunde.

Auch in dieser Arbeit konnten wir die bedeutende Rolle des Aktinzytoskeletts im MKL1-Aktivierungsweg kristallisieren. DLC1 ist ein negativer Regulator der Rho-GTPasen, die als Regulatoren des Aktinzytoskeletts gelten [112]. Zuerst konnte unsere Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Mühlich zeigen, dass der DLC1-Verlust in Tumoren zur konstitutiven RhoA-Aktivierung führt. Die DLC1-defizienten Tumorzelllinien HuH7 und MDA-MB-468 wiesen einen wesentlich höheren Gehalt an aktivem RhoA als die DLC1-exprimierenden Zelllinien HepG2 und MCF10F auf [156]. Dies ist auch im Einklang mit Ergebnissen vorheriger Studien [176, 177]. So konnten Xue und Kollegen außerdem zeigen, dass die Zunahme der RhoA-Aktivität durch den DLC1-Verlust zur Hepatokarzinogenese in vivo führt [166]. RhoA führt seine Signale unter anderem über seinen Effektor ROCK aus [121]. Dieser stabilisiert die Aktinfilamente, vor allem durch die Inaktivierung von Cofilin, ein Aktin-depolymerisierendes Protein [122, 123]. In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Inhibierung von ROCK durch Y27632 zur zytoplasmatischen Relokalisation von MKL1 in den HuH7- und MDA-MB-468-Tumorzellen führt. Ergänzend könnte man mittels Western Blot ein MKL1-abhängiges, tumorrelevantes Protein vor und nach der Inhibierung von ROCK detektieren und

anschließend dessen Expression miteinander vergleichen. Somit könnte man neben der ROCK-abhängigen nukleären MKL1-Akkumulation eine definitive ROCK-abhängige MKL1-Aktivierung im Zellkern nachweisen. Ähnlich konnte in der Arbeit von Duggirala und Kollegen die MKL1-Aktivität bestätigt werden, indem eine Hemmung von ROCK die Transkription des MKL1-abhängigen Zielgens CCN1 unterband [178]. Somit zeigt diese Arbeit weiterhin, dass der RhoA-Effektor ROCK, der durch den DLC1-Verlust und die daraus resultierende RhoA-Aktivierung in Tumoren aktiviert wurde, an der nukleären Akkumulation von MKL1 beteiligt ist.

Als nächstes wurde der direkte Zusammenhang zwischen dem Aktinzytoskelett, dem DLC1-Verlust und der subzellulären MKL1-Lokalisation ermittelt. In Fibroblasten führt die Rho-Aktivierung zur Stressfaserbildung [116]. Diese Arbeit veranschaulicht, dass dieser Effekt in den HuH7 und MDA-MB-468-Tumorzellen auf einen DLC1-Verlust zurückzuführen ist. Im Vergleich zu den DLC1-exprimierenden HepG2- und MCF10F-Zellen enthalten die Tumorzellen vermehrt Stressfasern und haben einen höheren Gehalt an F-Aktin. Auch in anderen Studien wurde eine Hemmung der Zytoskelettformation durch eine DLC1-Expression beschrieben [179, 180], die sich mit den Daten dieser Arbeit deckt. In einem weiteren Versuch dieser Arbeit mit DLC1-defizienten Tumorzellen zeigt die Inhibierung der Aktinpolymerisation durch Latrunculin B eine Relokalisation des konstitutiv nukleär-gelegenen MKL1s ins Zytoplasma. Das zeigt, dass die Aktinzytoskelettformation ein wichtiger Zwischenschritt in der Regulation von MKL1 und eine Voraussetzung für die nukleäre MKL1-Akkumulation in DLC1-defizienten Tumoren darstellt. Somit vermittelt MKL1 über die Stressfaserbildung den Effekt des Verlusts vom Tumorsuppressor DLC1 in Tumoren. Interessanterweise wurde ein anderer, F-Aktin-unabhängiger, molekularer Mechanismus entdeckt, der zur nukleären Translokation von MKL1 in Fibroblasten führt. Hierbei konkurriert die WH2/V-Region des Proteins JMY (Junction-mediating and regulatory protein) mit G-Aktin um die RPEL-Region (Bindungsstelle von G-Aktin an MKL1), wodurch das von G-Aktin dissoziierte MKL1 in den Zellkern gelangt und die SRF-abhängige Transkription aktiviert (Kluge, et al., 2018). Es wäre interessant zu wissen, ob dieser Mechanismus nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in Tumorzellen vorkommt.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit den neu aufgestellten Signalweg in der Tumorigenese bestätigen, in dem der Transkriptionskoaktivator MKL1 infolge des Verlusts des Tumorsuppressors DLC1 in Tumoren über den RhoA/Aktin-Signalweg konstitutiv in den Zellkern gelangt (Abbildung 20): Die Abwesenheit von DLC1 aktiviert die GTPase RhoA, die unter anderem über ihren Effektor ROCK zur Stressfaserbildung und somit zur nukleären Akkumulation von MKL1 führt.

5.2 Aktivierung der MKL/SRF-Zielgenexpression in DLC1-defizienten Tumorzellen

Die nukleäre Lokalisation von MKL1 ist eine Voraussetzung für seine Funktion als Koaktivator des Transkriptionsfaktors SRF [50] und damit für die Transkription von SRF-Zielgenen [81]. Diese als IEG (Immediate Early Genes) bekannten Gene regulieren viele wichtige Prozesse in der Zelle, wie das Wachstum, die Migration und die Zytoskelettorganisation [12].

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob ein DLC1-Verlust in hepatozellulären - und Mammakarzinomen zu einer Expression von tumorrelevanten MKL1-abhängigen Zielgenen führt. CTGF ist ein SRF-abhängiges Zielgen [159, 92] und in die Tumorprogression von hepatozellulären Karzinomen und Mammakarzinomen involviert [162, 164, 163]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die DLC1-defizienten Tumorzellen eine signifikant höhere CTGF-Expression im Vergleich zu den gleichen Zellen mit einem MKL1/2-Knockdown aufweisen. Damit lässt sich CTGF nicht nur als ein SRF-, sondern auch als MKL1-abhängiges, tumorrelevantes Zielgen verifizieren. In einer Mikroarrayanalyse von Medjkane und Kollegen wurde ebenfalls in einer Mammakarzinomzelllinie die Abhängigkeit der CTGF-Expression von MKL1 festgestellt, allerdings ist hier der Status der DLC1-Präsenz unbekannt [92]. Ergänzend zu dieser Arbeit konnte die Arbeitsgruppe von Mühlich in einem weiteren Versuch die CTGF-Abhängigkeit von DLC1 bestätigen. Durch das Wiedereinführen von DLC1 wurde die CTGF-Expression in den HuH7- und MDA-MB-468-Tumorzellen stark supprimiert. Auch konnten sie dadurch die Expression von weiteren, tumorrelevanten, MKL1/SRF-abhängigen Genen signifikant herunterregulieren: Itga5 und Cyr61 [156]. Eine ähnliche Wirkungsweise wurde für MKL1 durch die Fusion mit dem RBM15 Gen in den Zellen der Megakaryoblastischen Leukämie beschrieben [64]. Das RBM15-MKL1 Fusionsprotein zeigt eine konstitutiv nukleäre Lokalisation und aktiviert die Transkription von SRF-Zielgenen, die diese bestimmte Leukämieform vorantreibt. Somit konnte in dieser und in der weiterführenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe belegt werden, dass MKL1 die Expression von MKL1/SRF-abhängigen, tumorrelevanten Zielgenen infolge des Verlusts des Tumorsuppressors DLC1 in Tumoren aktiviert.

5.3 Protumorigener Einfluss von MKL1 aufs Aktinzytoskelett bei DLC1-Verlust

Im Abschnitt 5.1 wurde aufgezeigt, dass das Aktinzytoskelett am Signalweg von MKL1 beteiligt ist. Eine Hemmung der Aktinpolymerisation in den DLC1-defizienten Tumorzellen führte zur zytoplasmatischen Relokalisation von MKL1 und somit zu seiner Inaktivierung als Transkriptionskoaktivator im Zellkern. Auf der anderen Seite wurde ebenfalls in dieser Arbeit ein Einfluss von MKL1 auf das Aktinzytoskelett beobachtet. In der Immunhistochemie zeigen die HuH7-Tumorzellen eine vermehrte und organisierte Stressfaserformation mit Vergleich zu denen mit einem

MKL1/2-Knockdown. Das lässt darauf schließen, dass MKL1 zu den protumorigenen Veränderungen des Zytoskeletts in den DLC1-defizienten Tumorzellen führt. Um dieses Ergebnis zu stützen wurde versucht, den F- und G-Aktin Gehalt mittels Ultrazentrifugation, Western Blot und Messung der Helligkeitsintensität der Banden quantitativ zu bestimmen. Erwartet war, dass das Verhältnis von F-/G-Aktin in den HuH7-Kontrollzellen höher als das in den HuH7-Zellen mit MKL1/2-Knockdown ist. Allerdings kam es zu unterschiedlichen widersprüchlichen Ergebnissen. Trotz der Anpassung der F- und G-Aktin-Lademengen im Western Blot und mehreren Versuchswiederholungen, auch von einem anderen Untersucher und mit der MDA-MB-468-Tumorzelllinie mit und ohne MKL1/2-Knockdown, konnte das gewünschte Ergebnis nicht reproduziert werden. Allerdings zeigte der gleiche Versuch mit den HepG2- und MCF10F-Zellen gegenüber den HuH7- bzw. MDA-MB-468-Tumorzellen ein signifikantes Ergebnis (Abbildung 14). Es scheint, als ob während der Zelllyse sich der F- und G-Aktin Gehalt in den Knockdownzellen veränderte. Eine Erklärung hierfür wurde nicht gefunden.

Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse von der Immunhistochemie eindeutig den protumorigenen Einfluss von MKL1 auf das Aktinzytoskelett, den ebenfalls die Arbeitsgruppe von Prof. Mühlich belegen konnte. Sie fand heraus, dass MKL1 neben der vermehrten und organisierten Stressfaserbildung (Abbildung 18) die Ausbildung von Filopodien fördert (Abbildung 21) [156].

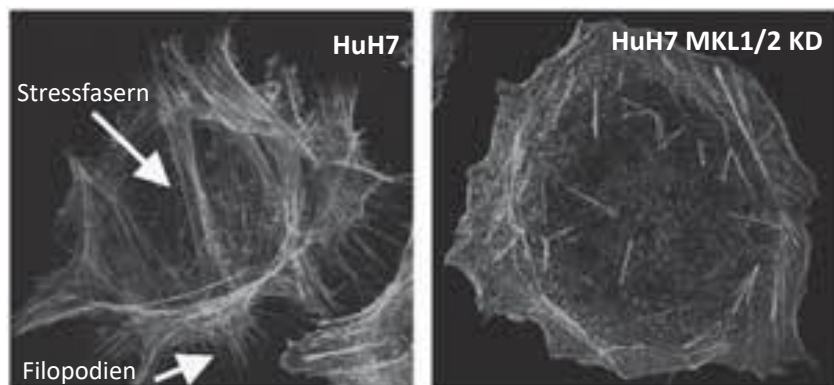


Abbildung 21: Ausbildung von Filopodien durch MKL1-Einfluss in DLC1-defizienten Tumorzellen

In der Immunhistochemie zeigen die HuH7-Zellen im Vergleich zu den HuH7-Zellen mit MKL1/2-Knockdown (KD) die Ausbildung von Filopodien und vermehrte Stressfasern [156].

All diese Aktinveränderungen sind für die Zellmigration von Tumorzellen charakteristisch [181]. So zeigen die HuH7- und die MDA-MB-468-MKL1/2-Knockdownzellen eine reduzierte Zellmigration im Vergleich zu dem Wildtyp [156]. Salvany und Kollegen fanden in einem Drosophila- und humanem Mammarykarzinommodell heraus, dass Aktin ein MKL/SRF-abhängiges Hauptzielgen ist und durch die MKL/SRF-Regulation die invasive Zellmigration steuert. Durch die Regulation der subzellulären MKL1-Lokalisation nimmt Aktin ebenfalls Einfluss auf die MKL1/SRF-Aktivität, womit ein

homöostatisches Feedbacksystem für die zelluläre Aktindynamik entsteht [182]. Auch die Arbeitsgruppe von Medjkane beobachtete eine Hemmung der Zellmigration durch einen MKL1/2-Knockdown in MDA-MB-231 Mammakarzinom- und B16F2 Melanomzellen [92]. Darüber hinaus wurde von einem kindlichen Fall mit einer homozygoten Mutation von MKL1 berichtet, der aufgrund eines Defekts der Aktinpolymerisation, einer reduzierten Zellmotilität und reduzierten, chemotaktischen Antwort von Neutrophilen an einer Immundefizienz und schlechter Wundheilung verstarb. Aktin, mehrere Aktin-verwandte und zytoskelettal-assoziierte Proteine wie AIP1 (actin-interacting protein 1) und PFN1 (profilin 1) waren dabei herunterreguliert [183]. Die MKL1/SRF-Aktivität kann ebenfalls die Expression von Proteinen beeinflussen, die die Aktinpolymerisation kontrollieren. Zum Beispiel wurde eine gestörte Zellmigration in MKL1-defizienten Nervenzellen durch eine Hemmung des Aktin-depolymerisierenden Faktors Cofilin beobachtet, der zuvor durch das MKL1/SRF-Zielgen Cdk16 phosphoryliert und dadurch verändert wurde [91].

Interessanterweise hat MKL1 nicht nur eine fördernde, sondern auch eine hemmende Wirkung auf die Zellmigration. In Fibroblasten reduziert die Aktivierung des Aktin/MKL-Signalweges die Zellmigration durch Herunterregulierung von zytoskelettal-assoziierten Proteinen wie Integrin $\alpha 5$, Plakophilin und FHL1 (Four and a half LIM domain protein 1) [95]. Das lässt vermuten, dass abhängig vom Zelltyp unterschiedliche MKL1-Zielgene exprimiert und MKL1-Effekte erzeugt werden können.

5.4 Einfluss von MKL1 auf die Tumorzellproliferation bei DLC1-Verlust

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob MKL1 neben seinem protumorigenen Einfluss auf das Aktinzytoskelett und die Zellmigration ebenfalls die Zellproliferation fördert. In der Studie von Xue und Kollegen wurde ein hoher Proliferationsindex in den DLC1-defizienten HCC-Zellen beschrieben [131]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MKL1 diesen Effekt triggert. Ein MKL1/2-Knockdown konnte die Zellproliferation in DLC1-defizienten HCC- und Mammakarzinom-Zelllinien deutlich hemmen. Das Wiedereinführen von DLC1 in diesen Zelllinien resultierte ebenfalls in einer verminderten Zellproliferation [156]. Somit konnte gezeigt werden, dass MKL1 für die erhöhte Tumorzellproliferation infolge des DLC1-Verlusts verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu hatte ein MKL1/2-Knockdown in den DLC1-exprimierenden HepG2-Zellen keinen Einfluss auf die Zellproliferation [156]. Medjkane und Kollegen berichten, dass der MKL1/2 keine Auswirkung auf die Zellproliferation in MDA-MB-231 Mammakarzinom- und B16F2 Melanomzellen hat [92]. Diese Diskrepanz könnte sich durch die Anwesenheit von DLC1 in diesen Zellen erklären.

Darüber hinaus entdeckte unsere Arbeitsgruppe, dass der Verlust von MKL1/2 das Wachstum von HCC-Xenografts verhindert. Der molekulare Mechanismus für den antiproliferativen Effekt des

MKL1/2-Knockdowns wurde durch die Onkogen-induzierte Seneszenz begründet [184]. Die zelluläre Seneszenz ist als ein stabiler Zellzyklusstopp definiert, indem die Zellen nicht mehr fähig sind, sich zu teilen. In den DLC1-defizienten HCC-Zellen führt der MKL1/2-Verlust zur Aktivierung des Onkogens Ras, was wiederum in eine erhöhte Expression des Tumorsuppressors p16 mündet. Anschließend wird durch eine Hypophosphorylierung der Tumorsuppressor Retinoblastomprotein (Rb) aktiviert [184]. Rb lässt die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verharren und schaltet somit die Seneszenz ein [185, 186, 187].

Bislang wurde vermutet, dass ein Knockdown von beiden MKL1- und 2-Genen notwendig ist, um die SRF-Zielgenexpression zu verhindern [73, 92]. Anders als bisher fand unsere Arbeitsgruppe von Prof. Mühlich heraus, dass ein einzelner Knockdown von MKL1 bereits ausreicht, um das Wachstum eines HCC-Xenografts zu hemmen [184].

5.5 Neue pharmakologische Ansätze für die Behandlung von DLC1-defizienten Tumoren

Das hepatozelluläre Karzinom wird häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem wenig therapeutische Optionen verfügbar sind. Aufgrund der weitgehend unklaren, molekularen Pathogenese des HCC ist die Identifikation von neuen, onkogenen Einflussstrukturen von enormer Bedeutung, um eine gezielte Therapie mit verbesserten Überlebens- und Ansprechraten zu entwickeln. Die Entdeckung von MKL1 als Mediator in der Tumorigenese und seines molekularen Aktivierungswegs infolge des DLC1-Verlusts und der Induktion der RhoA/Aktin-Signalkette könnten neue Ansätze in der systemischen Therapie von DLC1-defizienten Tumoren, insbesondere vom HCC, anbieten.

Wie bereits erwähnt ist eine Inaktivierung von DLC1 nicht nur auf genetische, sondern ebenfalls auf epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung, zurückzuführen [133, 151, 152, 153]. Ein Ansatz wäre hier die pharmakologische Reaktivierung der Tumorsuppressorfunktion von DLC1 durch die Regulierung der epigenetischen Mechanismen. Der Pflanzenstoff Curumin weist eine hemmende Wirkung auf die DNA-Methylierung des DLC1-Promotors auf und konnte durch die Reaktivierung von DLC1 das Tumorstadium des Mammakarzinoms in In-vitro und in In-vivo-Experimenten inhibieren [188]. Der bekannte DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin führt ebenfalls durch Demethylierung zur Aktivierung der DLC1-Expression in MDS-PatientInnen [189]. In einer Phase-I/II-Studie zeigt eine niedrigdosierte Decitabin-Verabreichung eine effektive Therapie mit einem günstigen Nebenwirkungsprofil in HCC-PatientInnen [190]. Ein weiterer Inhibitor der gleichen Wirkstoffgruppe ist Guadecitabin, der in einem

Xenograft-Mausmodell das Zell- und Tumorwachstum in HCC hemmen konnte [191]. Eine klinische Studie mit Guadecitabine in Kombination mit Durvalumab (ein anti-PD-L1 monoklonaler Antikörper) zur Behandlung von soliden Tumoren, u.a. HCC, ist aktuell am Laufen [192]. In mehreren Studien mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren konnte ebenfalls eine Reaktivierung von DLC1 und eine antitumorogene Wirkung beobachtet werden [193, 194].

Weiterhin kann man RhoA durch die Inhibition von Geranylgeranyltransferasen (GGTase) blockieren, die posttranslational eine Isoprenylgruppe an RhoA anhängen und dadurch die Verankerung an die Plasmamembran ermöglichen [102]. Die Wirkung der Inhibitoren der GGTase (GGTI) wurde bereits in verschiedenen Karzinomen geprüft. In PC-3 Prostatakarzinomzellen zeigte eine Behandlung mit GGTI eine verminderte Migration und Invasion [195], ähnlich wie in einer vorherigen Studie mit Pankreaskarzinomzellen [196]. In einem Xenograft-Mausmodell führte die GGTI P61A6 zu einer Wachstumshemmung des Pankreaskarzinoms [197]. In einer weiteren Studie wurde eine Inhibitor der Proliferation, eine verschlechterte Zellzyklusentwicklung und eine Beeinträchtigung der Zytoskelettorganisation und der Fokaladhäsionsausbildung in Pankreaskarzinomen nach einer RhoA-Inaktivierung durch einen neu entdeckten GGTI beobachtet [198]. Bislang gibt es keine Studie, die den Einfluss von GGTI auf HCC untersucht.

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, die Wirkung von RhoA indirekt durch ROCK-Inhibitoren zu hemmen. Der GASC1-Inhibitor (gene amplified in squamous cell carcinoma 1) SD70 inaktiviert den Rho-Signalweg durch Hemmung von ROCK2. Dies führte zur Beeinträchtigung des Tumorwachstums in HCC-Zelllinien und in einem Xenograft-Mausmodell [199]. Der GASC1-Inhibitor könnte in einer personalisierten Therapie des HCC Einsatz finden und sollte in Therapiestudien weiter erprobt werden.

Am Ende der durch den DLC1-Verlust aktivierten RhoA/Aktin-Signalkette steht MKL1, der ein potentiell und vielversprechendes antitumoröses Ziel darstellen könnte. Die Unterdrückung seiner nukleären Lokalisation und damit seiner Funktion als Koaktivator des Transkriptionsfaktors SRF verhindert die Expression von multiplen Zielgenen, die am Wachstum, an der Migration und Invasion von DLC1-defizienten HCC-Zellen beteiligt sind. Evelyn und Kollegen sind die Ersten, die den neuen MKL1-Inhibitor CCG-1423 entdeckten und feststellten, dass er das Wachstum von Melanoma-Zelllinien und die Invasion von Prostatakarzinomzellen PC-3 verhindern kann [200]. CCG-1423 bindet spezifisch an die NLS Region von MKL1 und verhindert die Interaktion zwischen MKL1 und Importin α/β 1, resultierend in einer Inhibition des nukleären Imports von MKL1 [201]. Ein Derivat von CCG-1423 stellt der Inhibitor CCG-203971 dar, der ihm gegenüber ein reduziertes, toxisches Potential

aufweist [202, 203, 204]. In In-vitro- und In-vivo-Modellen konnte CCG-203971 das Wachstum und die Metastasierung des malignen Melanoms hemmen [205]. In Zukunft sollte die therapeutische Wirksamkeit von CCG-203971 ebenfalls auf das tumorigene Verhalten von DLC1-defizienten HCC Zellen untersucht werden.

Weiterhin identifizierte die Arbeitsgruppe von Prof. Mühlich Myoferlin als ein MKL1-abhängiges Zielgen [206]. Myoferlin ist ein Mitglied der Proteinfamilie Ferlin, das eine zentrale Rolle in der Endozytose spielt und in Rab7-positiven späten Endosomen lokalisiert ist [207, 208, 209]. Darüber hinaus charakterisierten Turtoi und Kollegen Myoferlin als einen spezifischen Regulator des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) in Mammakarzinomzellen, dessen Herunterregulierung den Abbau an phosphoryliertem EGFR verhindert und die simultane EGF-induzierte Zellmigration und Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) inhibiert [210]. Die Arbeitsgruppe von Prof. Mühlich fand heraus, dass Myoferlin die Zellinvasion, die Proliferation und das autonome Zellwachstum in HCC-Zellen vermittelt. Bei einer Inhibition von Myoferlin werden EGFR und die nachgeschaltete MAPK- (Ras/MEK/ERK) Kaskade, sowie der p15-/Rb-Signalweg aktiviert, was zur Seneszenzantwort in HCC-Zellen führt [206]. Kürzlich wurde ein direkter Inhibitor von Myoferlin, namens WJ460, entdeckt, der die Funktion der späten Lysosomen beeinträchtigt und der Metastasierung in Mammakarzinomzellen entgegenwirkt [211]. Es stellt sich die Frage, ob der Myoferlininhibitor WJ460 ebenfalls als antitumoröse Therapie im DLC1-defizienten HCC eingesetzt werden kann.

6. Ausblick

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der MKL1-Signalweg infolge des DLC1-Verlusts im hepatozellulären und Mammakarzinom einen relevanten Treiber in der Tumorigenese spielt. Aufgrund der vielen Interaktionspartner in diesem Signalweg könnten die Reaktivierung der DLC1-Funktion, die Verhinderung der RhoA-Aktivierung, die Inhibierung seines Effektors ROCK und die Hemmung von MKL1 und seines Zielgens Myoferlin potentielle, therapeutische Ziele von DLC1-defizienten Tumoren darstellen.

Allerdings wäre eine Hemmung am Ende der Signalkette als Behandlungsziel am effektivsten. Wie die Literatur oben zeigt, wurden in den letzten Jahren neben dem DLC1-Verlust andere Trigger in verschiedenen Tumoren gefunden, die alle gemeinsam über eine MKL1-Aktivierung zur Tumorentwicklung führen. Zudem weisen nur 50% der HCC- und Mammakarzinomfälle einen DLC1-Verlust auf. Es stellt sich die Frage, ob MKL1 in den restlichen DLC1-exprimierenden Tumorfällen ebenfalls an der Tumorentwicklung beteiligt ist und einen anderen Trigger für seine Aktivierung aufweist.

Des Weiteren scheint die Polymerisation von Aktin ein gemeinsamer, zwischengeschalteter Signalschritt in der Aktivierung von MKL1 in Tumoren zu sein. Interessanterweise wurde in Fibroblasten ein F-Aktin-unabhängiger Mechanismus entdeckt, der ebenfalls zur nukleären Akkumulation von MKL1 und damit auch zur SRF-abhängigen Zielgenexpression führt. Auch hier bleibt die Frage offen, ob ein solcher Mechanismus ebenfalls in Tumoren vorliegt.

Schlussendlich wäre es therapeutisch sinnvoller, das Ende des MKL1-Signalwegs zu blockieren, um der MKL1-abhängigen Tumortransformation entgegenzuwirken. Das bedeutet, dass der Fokus auf die Inhibierung von MKL1 und seiner Zielgene liegen sollte. Dabei stellt die Suche nach weiteren, tumorrelevanten MKL1-Zielgenen eine wichtige Herausforderung dar.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Tinkle und D. Haas-Kogan, „Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools,“ *Biologics*, Bd. 6, pp. 207-19, 2012.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Siegel, L. Torre und A. Jemal, „Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,“ *CA Cancer J Clin*, Bd. 68, pp. 394-424, 2018.
- [3] A. Villanueva, „Hepatocellular carcinoma,“ *N Engl J Med*, Bd. 380, p. 1450–1462, 2019.
- [4] A. Marengo, C. Rosso und E. Bugianesi, „Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis,“ *Annu Rev Med*, Bd. 67, pp. 103-117, 2016.
- [5] EASL, „Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma,“ *J Hepatol*, Bd. 69, pp. 182-236, 2018.
- [6] R. Younes und E. Bugiansesi, „Should we undertake surveillance for HCC in patients with NAFLD?,“ *J Hepatol*, Bd. 68, pp. 326-334, 2018.
- [7] P. Farazi und R. DePinho, „Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment.,“ *Nat Rev Cancer*, Bd. 6, pp. 674-87, 2006.
- [8] J. Llovet und J. Bruix, „Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma,“ *Hepatology*, Bd. 48, pp. 1312-27, 2008.
- [9] D. K. A. Deutsche Krebsgesellschaft, „Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie: Diagnostik und Therapie des Hepatozellären Karzinoms und biliärer Karzinome,“ Stand Juni 2021.
- [10] Z. f. Krebsregisterdaten, „Leberkrebs,“ Stand 13. April 2021.
- [11] J. Winkles, „Serum- and polypeptide growth factor-inducible gene expression in mouse fibroblasts.,“ *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, Bd. 58, pp. 41-78, 1998.
- [12] G. Pipes, E. Creemers und E. Olson, „The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis,“ *Genes Dev*, Bd. 20, pp. 1545-1556, 2006.
- [13] F. Johansen und R. Prywes, „Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation,“ *Biochimica et biophysica acta*, Bd. 1242, pp. 1-10, 1995.
- [14] S. Takeda, D. North, M. Lakich, S. Russell und R. Whalen, „A possible regulatory role for conserved promoter motifs in an adult-specific muscle myosin gene from mouse,“ *The Journal of biological chemistry*, Bd. 267, pp. 16957-16967, 1992.

- [15] R. Treisman, „Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors,“ *Cell*, Bd. 46, pp. 567-574, 1986.
- [16] Q. Sun, G. Chen, J. Streb, X. Long, Y. Yang, C. J. Stoeckert und J. Miano, „Defining the mammalian CArGome,“ *Genome research*, Bd. 16, pp. 197-207, 2006a.
- [17] M. Greenberg und E. Ziff, „Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene,“ *Nature*, Bd. 311, Nr. 5985, pp. 433-438, 1984.
- [18] R. Treisman, „Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences,“ *Cell*, Bd. 42, Nr. 3, pp. 889-902, 1985.
- [19] J. Deschamps, R. Mitchell, F. Meijlink, W. Kruijer, D. Schubert und I. Verma, „Proto-oncogene fos is expressed during development, differentiation and growth,“ *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Bd. 50, pp. 733-745, 1985.
- [20] R. Prywes und R. Roeder, „Inducible binding of a factor to the c-fos enhancer,“ *Cell*, Bd. 47, Nr. 5, pp. 777-784, 1986.
- [21] A. Minty und L. Kedes, „Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 6, Nr. 6, pp. 2125-2136, 1986.
- [22] J. Molkenkin, S. Jobe und B. Markham, „Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter.,“ *J Mol Cell Cardiol*, Bd. 28, Nr. 6, pp. 1211-1225, 1996.
- [23] S. Henderson, M. Spencer, A. Sen, C. Kumar, M. Siddiqui und K. Chien, „Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene. Identification of a 250-base pair fragment which confers cardiac-specific expression,“ *J Biol Chem*, Bd. 264, Nr. 30, pp. 18142-8, 1989.
- [24] P. Shore und A. Sharrocks, „The MADS-box family of transcription factors,“ *European journal of biochemistry / FEBS*, Bd. 229, pp. 1-13, 1995.
- [25] L. Pellegrini, S. Tan und T. Richmond, „Structure of serum response factor core bound to DNA,“ *Nature*, Bd. 376, Nr. 6540, pp. 490-498, 1995.
- [26] M. Affolter, J. Montagne, U. Walldorf, J. Groppe, U. Kloter, M. LaRosa und W. Gehring, „The Drosophila SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development,“ *Development*, Bd. 120, Nr. 4, pp. 743-753, 1994.
- [27] F. Johansen und R. Prywes, „Identification of transcriptional activation and inhibitory domains in serum response factor (SRF) by using GAL4-SRF constructs,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 13, Nr. 8, pp. 4640-7, 1993.

- [28] R. Misra, V. Rivera, J. Wang, P. Fan und M. Greenberg, „The serum response factor is extensively modified by phosphorylation following its synthesis in serum-stimulated fibroblasts,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 11, Nr. 9, pp. 4545-54, 1991.
- [29] V. Rivera, C. Miranti, R. Misra, D. Ginty, R. Chen, J. Blenis und M. Greenberg, „A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 13, Nr. 10, pp. 6260-73, 1993.
- [30] D. Iyer, N. Belaguli, M. Flück, B. Rowan, L. Wei, N. Weigel, F. Booth, H. Epstein, R. Schwartz und A. Balasubramanyam, „Novel phosphorylation target in the serum response factor MADS box regulates alpha-actin transcription,“ *Biochemistry*, Bd. 42, Nr. 24, pp. 7477-86, 2003.
- [31] D. Iyer, D. Chang, J. Marx, L. Wei, E. Olson, M. Parmacek, A. Balasubramanyam und R. Schwartz, „Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 103, Nr. 12, pp. 4516-21, 2006.
- [32] S. Arsenian , B. Weinhold , M. Oelgeschlager, U. Ruther und A. Nordheim, „Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis,“ *The EMBO journal*, Bd. 17, pp. 6289-6299, 1998.
- [33] G. Schratt, U. Philippar, J. Berger, H. Schwarz, O. Heidenreich und A. Nordheim, „Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells,“ *The Journal of cell biology*, Bd. 156, pp. 737-750, 2002.
- [34] G. Schratt, B. Weinhold, A. Lundberg, S. Schuck, J. Berger, H. Schwarz, R. Weinberg, U. Ruther und A. Nordheim, „Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 21, Nr. 8, pp. 2933-43, 2001.
- [35] A. Parlakian, D. Tuil, G. Hamard, G. Tavernier, D. Hentzen, J. Concordet , D. Paulin, z. Li und D. Daegelen, „Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality,“ *Molecular and cellular biology*, Bd. 24, pp. 5281-5289, 2004.
- [36] A. Verdoni, S. Ikeda und A. Ikeda, „Serum response factor is essential for the proper development of skin epithelium,“ *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, Bd. 21, pp. 64-76, 2010.
- [37] K. Sun, M. Battle, R. Misra und S. Duncan, „Hepatocyte expression of serum response factor is essential for liver function, hepatocyte proliferation and survival, and postnatal body growth in mice,“ *Hepatology*, Bd. 49, pp. 1645-1654, 2009.
- [38] S. Alberti, S. Krause, O. Kretz, U. Philippar, T. Lemberger, E. Casanova, F. Wiebel, H. Schwarz, M. Frotscher, G. Schutz und et al, „Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor,“ *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, Bd. 102, pp. 6148-6153, 2005.

- [39] K. Nader, A. Krysiak, A. Beroun, M. Pekala, M. Szymanska, B. Kuzniewska, K. Radwanska, L. Kaczmarek und K. Kalita, „Loss of serum response factor in mature neurons in the dentate gyrus alters the morphology of dendritic spines and hippocampus-dependent behavioral tasks,” *Brain Struct Funct*, Bd. 224, Nr. 8, pp. 2691-2701, 2019.
- [40] B. Cen, A. Selvaraj und R. Prywes, „Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression,” *J Cell Biochem*, Bd. 93, Nr. 1, pp. 74-82, 2004.
- [41] G. Owens, M. Kumar und B. Wamhoff, „Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease,” *Physiol Rev*, Bd. 84, Nr. 3, pp. 767-801, 2004.
- [42] D. Wang, P. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J. Richardson, E. Small, P. Krieg und E. Olson, „Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor,” *Cell*, Bd. 105, pp. 851-862, 2001.
- [43] Z. Wang, D. Wang, G. Pipes und E. Olson, „Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 100, Nr. 12, pp. 7129-34, 2003.
- [44] M. Soulez, C. Rouviere, P. Chafey, D. Hentzen, M. Vandromme, N. Lautredou, N. Lamb, A. Kahn und D. Tuil, „Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor,” *Molecular and cellular biology*, Bd. 16, pp. 6065-6074, 1996.
- [45] C. Gauthier-Rouviere, M. Vandromme, D. Tuil, N. Lautredou, M. Morris, M. Soulez, A. Kahn, A. Fernandez und Lamb N, „Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts,” *Mol Biol Cell*, Bd. 7, Nr. 5, pp. 719-729, 1996.
- [46] S. Li, M. Czubyrt, J. McAnally, R. Bassel-Duby, J. Richardson, F. Wiebel, A. Nordheim und E. Olson, „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 U S A*, Bd. 102, pp. 1082-7, 2005.
- [47] C. Charvet, C. Houbron, A. Parlakian, J. Giordani, C. Lahoute, A. Bertrand, A. Sotiropoulos, L. Renou, A. Schmitt, J. Melki, Z. Li, D. Daegelen und D. Tuil, „New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways,” *Mol Cell Biol*, Bd. 26, Nr. 17, pp. 6664-74, 2006.
- [48] J. Chai und A. Tarnawski, „Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing,” *J Physiol Pharmacol*, Bd. 53, Nr. 2, pp. 147-57, 2002.
- [49] D. Wang, S. Li, D. Hockemeyer, L. Sutherland, Z. Wang, G. Schratt, J. Richardson, A. Nordheim und E. Olson, „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*, Bd. 99, pp. 14855-14860, 2002.

- [50] N. Belaguli, J. Sepulveda, V. Nigam, F. Charron, M. Nemer und R. Schwartz, „Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 20, Nr. 20, pp. 7550-8, 2000.
- [51] J. Manak und R. Prywes, „Mutation of serum response factor phosphorylation sites and the mechanism by which its DNA-binding activity is increased by casein kinase II,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 11, Nr. 7, pp. 3652-9, 1991.
- [52] N. Belaguli, W. Zhou, T. Trinh, M. Majesky und R. Schwartz, „Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 19, Nr. 7, pp. 4582-91, 1999.
- [53] P. Kemp und J. Metcalfe, „Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity,“ *Biochem J*, Bd. 345, Nr. 3, pp. 445-51, 2000.
- [54] B. Camoretti-Mercado , H. Liu, A. Halayko, S. Forsythe, J. Kyle , B. Li, Y. Fu, J. McConville, P. Kogut, J. Vieira, N. Patel, M. Hershenson, E. Fuchs, S. Sinha, J. Miano, M. Parmacek, J. Burkhardt und J. Solway, „Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor,“ *J Biol Chem*, Bd. 275, Nr. 39, pp. 30387-93, 2000.
- [55] F. Johansen und R. Prywes, „Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor,“ *Mol Cell Biol*, Bd. 14, Nr. 9, pp. 5920-8, 1994.
- [56] A. Sharrocks, „The ETS-domain transcription factor family,“ *Nature reviews Molecular cell biology*, Bd. 2, pp. 827-837, 2001.
- [57] R. Treisman, „Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators,“ *Current opinion in genetics & development*, Bd. 4, pp. 96-101, 1994.
- [58] R. Treisman, „Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE,“ *The EMBO journal*, Bd. 14, pp. 4905-13, 1995.
- [59] G. Buchwalter, C. Gross und B. Wasylyk, „Ets ternary complex transcription factors,“ *Gene*, Bd. 324, pp. 1-14, 2004.
- [60] G. Posern und R. Treisman, „Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction,“ *Trends in cell biology*, Bd. 16, pp. 588-596, 2006.
- [61] C. Hill, J. Wynne and R. Treisman, "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF," *Cell*, vol. 81, p. 1159–1170, 1995.
- [62] F. Miralles, G. Posern, A. Zaromytidou und R. Treisman, „Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL,“ *Cell*, Bd. 113, pp. 329-342, 2003.

- [63] Z. Ma, S. Morris, V. Valentine, M. Li, J. Herbrick, X. Cui, D. Bouman, Y. Li, P. Mehta und D. Nizetic, „Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia,“ *Nature genetics*, Bd. 28, pp. 220-221, 2001.
- [64] T. Mercher, M. Coniat, R. Monni, M. Mauchauffe, K. F. Nguyen, L. Gressin, F. Mugneret, T. Leblanc, N. Dastugue, R. Berger und O. Bernard, „Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 98, Nr. 10, pp. 5776-79, 2001.
- [65] T. Sasazuki, T. Sawada, S. Sakon, T. Kitamura, T. Kishi, T. Okazaki, M. Katano, M. Tanaka, M. Watanabe, H. Yagita, K. Okumura und H. Nakano, „Identification of a novel transcriptional activator, BSAC, by a functional cloning to inhibit tumor necrosis factor-induced cell death,“ *J Biol Chem*, Bd. 277, Nr. 32, pp. 28853-60, 2002.
- [66] K. Du, M. Chen, J. Li, J. Lepore, P. Mericko und M. Parmacek, „Megaaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells,“ *The Journal of biological chemistry*, Bd. 279, pp. 17578-86, 2004.
- [67] J. Oh, J. Richardson und E. Olson, „Requirement of myocardin-related transcription factor-B for remodeling of branchial arch arteries and smooth muscle differentiation,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 102, Nr. 42, pp. 15122-27, 2005.
- [68] M. Scharenberg, R. Chiquet-Ehrismann und M. Asparuhova, „Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis,“ *Int J Biochem Cell Biol*, Bd. 42, Nr. 12, pp. 1911-14, 2010.
- [69] S. Guettler, M. Vartiainen, F. Miralles, B. Larijani und R. Treisman, „RPEL motifs link the serum response factor cofactor MAL but not myocardin to Rho signaling via actin binding,“ *Molecular and cellular biology*, Bd. 28, pp. 732-742, 2008.
- [70] S. Mouilleron, S. Guettler, C. Langer, R. Treisman und N. McDonald, „Molecular basis for G-actin binding to RPEL motifs from the serum response factor coactivator MAL,“ *The EMBO journal*, Bd. 27, pp. 3198-208, 2008.
- [71] S. Muehlich, R. Wang, S. Lee, T. Lewis, C. Dai und R. Prywes, „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*, Bd. 28, pp. 6302-13, 2008.
- [72] B. Cen, A. Selvaraj, R. Burgess, J. Hitzler, Z. Ma, S. Morris und R. Prywes, „Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes,“ *Mol Cell Biol.*, Bd. 18, pp. 6597-6608, 2003.
- [73] A. Selvaraj und R. Prywes, „Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation,“ *The Journal of biological chemistry*, Bd. 278, pp. 41977-87, 2003.

- [74] P. Kircher, C. Hermanns, M. Nossek, M. Drexler, R. Grosse, M. Fischer, A. Sarikas, J. Penkava, T. Lewis, R. Prywes, T. Gudermann und S. Muehlich, „Filamin A interacts with the coactivator MKL1 to promote the activity of the transcription factor SRF and cell migration,“ *Sci Signal*, Bd. 8, Nr. 402, p. ra112, 2015.
- [75] L. Aravind und E. Koonin, „SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization,“ *Trends in biochemical sciences*, Bd. 25, pp. 112-114, 2000 .
- [76] F. Göhring, B. Schwab, P. Nicotera, M. Leist und F. Fackelmayer, „The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown,“ *The EMBO journal*, Bd. 16, pp. 7361-71 , 1997.
- [77] M. Kipp, F. Göhring, T. Ostendorp, C. van Drunen, R. van Driel, M. Przybylski und F. Fackelmayer, „SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA,“ *Molecular and cellular biology*, Bd. 20, pp. 7480-89 , 2000.
- [78] G. Posern, F. Miralles, S. Guettler und R. Treisman, „Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL,“ *The EMBO journal*, Bd. 23, pp. 3973-83 , 2004.
- [79] R. Pawlowski, E. Rajakyla, M. Vartiainen und R. Treisman, „An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A,“ *The EMBO journal*, Bd. 29, pp. 3448-3458, 2010.
- [80] E. Olson und A. Nordheim, „Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions,“ *Nature reviews Molecular cell biology*, Bd. 11, pp. 353-365, 2010.
- [81] C. Baarlink, H. Wang und R. Grosse, „Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL,“ *Science*, Bd. 340, pp. 864-867, 2013.
- [82] M. Lundquist, A. Storaska, T. Liu, S. Larsen, T. Evans, R. Neubig und S. Jaffrey, „Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling,“ *Cell*, Bd. 156, Nr. 3, pp. 563-76, 2014.
- [83] M. Vartiainen, S. Guettler, B. Larijani und R. Treisman, „Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL,“ *Science*, Bd. 316, p. 1749–1752, 2007.
- [84] A. Selvaraj und R. Prywes, „Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent,“ *BMC molecular biology*, Bd. 5, p. 13, 2004.
- [85] T. Minami, K. Kuwahara, Y. Nakagawa, M. Takaoka, H. Kinoshita, K. Nakao, Y. Kuwabara, Y. Yamada, C. Yamada, J. Shibata, S. Usami, S. Yasuno, T. Nishikimi, K. Ueshima, M. Sata, H. Nakano, T. Seno, Y. Kawahito, K. Sobue, A. Kimura, R. Nagai und K. Nakao, „Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice,“ *EMBO J*, Bd. 31, Nr. 23, pp. 4428-40, 2012.

- [86] M. Smith, C. Hudson, T. Kimura, S. White, G. Sala-Newby, A. Newby und M. Bond, „Divergent Regulation of Actin Dynamics and Megakaryoblastic Leukemia-1 and -2 (Mkl1/2) by cAMP in Endothelial and Smooth Muscle Cells,“ *Sci Rep*, Bd. 7, Nr. 1, p. 3681, 2017.
- [87] Y. Sun, K. Boyd, W. Xu, J. Ma, C. Jackson, A. Fu, J. Shillingford, G. Robinson, L. Hennighausen, J. Hitzler und e. al, „Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function,“ *Molecular and cellular biology*, Bd. 26, pp. 5809-26, 2006b.
- [88] S. Li, S. Chang, X. Qi, J. Richardson und E. Olson, „Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells,“ *Molecular and cellular biology*, Bd. 26, pp. 5797-808, 2006.
- [89] E. Cheng, Q. Luo, E. Bruscia, M. Renda, J. Troy, S. Massaro, D. Tuck, V. Schulz, S. Mane, N. Berliner und e. al, „Role for MKL1 in megakaryocytic maturation,“ *Blood*, Bd. 113, pp. 2826-34, 2009.
- [90] M. Mokalled, A. Johnson, Y. Kim, J. Oh und E. Olson, „Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development,“ *Development*, Bd. 137, pp. 2365-74, 2010.
- [91] S. Medjkane, C. Perez-Sanchez, C. Gaggioli, E. Sahai und R. Treisman, „Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis,“ *Nature cell biology*, Bd. 11, pp. 257-268, 2009.
- [92] D. Brandt, C. Baarlink, T. Kitzing, E. Kremmer, J. Ivaska, P. Nollau und R. Grosse, „SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1integrin,“ *Nature cell biology*, Bd. 11, pp. 557-568, 2009.
- [93] L. Leitner, D. Shaposhnikov, A. Descot, R. Hoffmann und G. Posern, „Epithelial Protein Lost in Neoplasm alpha (Eplin-alpha) is transcriptionally regulated by G-actin and MAL/MRTF coactivators,“ *Molecular cancer*, Bd. 9, p. 60, 2010.
- [94] L. Leitner, D. Shaposhnikov, A. Mengel, A. Descot, S. Julien, R. Hoffmann und G. Posern, „MAL/MRTF-A controls migration of non-invasive cells by upregulation of cytoskeleton-associated proteins,“ *Journal of cell science*, Bd. 124, pp. 4318-4331, 2011.
- [95] A. Descot, R. Hoffmann, D. Shaposhnikov, M. Reschke, A. Ullrich und G. Posern, „Negative regulation of the EGFR-MAPK cascade by actin-MAL-mediated Mig6/Errfi-1 induction,“ *Molecular cell*, Bd. 35, pp. 291-304, 2009.
- [96] H. Bourne, D. Sanders und F. McCormick, „The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism,“ *Nature*, Bd. 349, Nr. 6305, pp. 117-27, 1991.
- [97] Y. Takai, T. Sasaki und T. Matozaki, „Small GTP-binding proteins,“ *Physiol Rev*, Bd. 81, Nr. 1, pp. 153-208, 2001.
- [98] J. Colicelli, „Human RAS superfamily proteins and related GTPases,“ *Sci STKE*, Bd. 2004, Nr. 250, p. RE13, 2004.

- [99] K. Wennerberg, K. Rossman und C. Der, „The Ras superfamily at a glance,“ *J Cell Sci*, Bd. 118, pp. 843-846, 2005.
- [100] H. Bourne, D. Sanders und F. McCormick, „The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions,“ *Nature*, Bd. 348, Nr. 6297, pp. 125-132, 1990.
- [101] Y. Hori, A. Kikuchi, M. Isomura, M. Katayama, Y. Miura, H. Fujioka, K. Kaibuchi und Y. Takai, „Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins,“ *Oncogene*, Bd. 6, Nr. 4, pp. 515-522, 1991.
- [102] R. Cerione und Y. Zheng, „The Dbl family of oncogenes,“ *Curr Opin Cell Biol*, Bd. 8, Nr. 2, pp. 216-222, 1996.
- [103] Y. Zheng, „Dbl family guanine nucleotide exchange factors,“ *Trends Biochem Sci*, Bd. 26, Nr. 12, pp. 724-732, 2001.
- [104] A. Bishop und A. Hall, „Rho GTPases and their effector proteins,“ *Biochem J*, Bd. 348, pp. 241-255, 2000.
- [105] L. Van Aelst und C. D'Souza-Schorey, „Rho GTPases and signaling networks,“ *Genes Dev*, Bd. 11, Nr. 18, pp. 2295-9322, 1997.
- [106] N. Lamarche und A. Hall, „GAPs for rho-related GTPases,“ *Trends Genet*, Bd. 10, Nr. 12, pp. 436-440, 1994.
- [107] A. Wittinghofer, K. Scheffzek und M. Ahmadian, „The interaction of Ras with GTPase-activating proteins,“ *FEBS Lett*, Bd. 410, Nr. 1, pp. 63-67, 1997.
- [108] D. Graham, J. Eccleston und P. Lowe, „The conserved arginine in rho-GTPase-activating protein is essential for efficient catalysis but not for complex formation with Rho.GDP and aluminum fluoride,“ *Biochemistry*, Bd. 38, Nr. 3, pp. 985-991, 1999.
- [109] B. Olofsson, „Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling,“ *Cell Signal*, Bd. 11, Nr. 8, pp. 545-54, 1999.
- [110] S. Etienne-Manneville und A. Hall, „Rho GTPases in cell biology,“ *Nature*, Bd. 420, pp. 629-635, 2002.
- [111] A. Hall, „Rho GTPases and the actin cytoskeleton,“ *Science*, Bd. 279, pp. 509-514, 1998.
- [112] D. Mackay und A. Hall, „Rho GTPases,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 273, pp. 20685-20688, 1998.
- [113] L. Van Aelst und C. D'Souza-Schorey, „Rho GTPases and signaling networks,“ *Genes Dev*, Bd. 11, pp. 2295-2322, 1997.
- [114] A. Jaffe und A. Hall, „Rho GTPases: biochemistry and biology,“ *Annual review of cell and developmental biology*, Bd. 21, pp. 247-269, 2005.

- [115] A. Ridley und A. Hall, „The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors,“ *Cell*, Bd. 70, pp. 389-399, 1992.
- [116] C. Nobes und A. Hall, „Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia,“ *Cell*, Bd. 81, Nr. 1, pp. 53-62, 1995.
- [117] D. Bar-Sagi und A. Hall, „Ras and Rho GTPases: a family reunion,“ *Cell*, Bd. 103, pp. 227-238, 2000.
- [118] S. Narumiya, T. Ishizaki und N. Watanabe, „Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton,“ *FEBS Lett*, Bd. 410, Nr. 1, pp. 68-72, 1997.
- [119] N. Watanabe, T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki und S. Narumiya, „Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization,“ *Nature Cell Biology*, Bd. 1, pp. 136-143, 1999.
- [120] T. Ishizaki, M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Fujita, N. Watanabe, Y. Saito, A. Kakizuka, N. Morii und S. Narumiya, „The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase,“ *EMBO J*, Bd. 15, pp. 1885-1893, 1996.
- [121] A. Sotiropoulos, D. Gineitis, J. Copeland und R. Treisman, „Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics,“ *Cell*, Bd. 98, pp. 159-169, 1999.
- [122] M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno und S. Narumiya, „Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase,“ *Science*, Bd. 285, Nr. 5429, pp. 895-898, 1999.
- [123] N. Watanabe, P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B. Jockusch und S. Narumiya, „p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin,“ *EMBO J*, Bd. 16, Nr. 11, pp. 3044-56, 1997.
- [124] O. Geneste, J. Copeland und R. Treisman, „LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics,“ *The Journal of Cell Biology*, Bd. 157, pp. 831-8, 2002.
- [125] F. Vega und A. Ridley, „Rho GTPases in cancer cell biology,“ *FEBS Lett*, Bd. 582, pp. 2093-2101, 2008.
- [126] E. Sahai und C. Marshall, „RHO-GTPases and cancer,“ *Nature reviews Cancer*, Bd. 2, pp. 133-142, 2002.
- [127] T. Gómez del Pulgar, S. Benitah, P. Valerón, C. Espina und J. Lacal, „Rho GTPase expression in tumorigenesis: evidence for a significant link,“ *Bioessays*, Bd. 27, Nr. 6, pp. 602-613, 2005.

- [128] C.-B. S. C. L. B. X. N. H. H. H. S. R. P. J. C. A. R. A. Johnstone CN, „ARHGAP8 is a novel member of the RHOGAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP: mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers,“ *Gene*, Bd. 336, pp. 59-71, 2004.
- [129] C. Kalla, H. Nentwich, M. Schlotter, D. Mertens, K. Wildenberger, H. Döhner, S. Stilgenbauer und P. Lichter, „Translocation t(X;11)(q13;q23) in B-cell chronic lymphocytic leukemia disrupts two novel genes,“ *Genes Chromosomes Cancer*, Bd. 42, Nr. 2, pp. 128-143, 2005.
- [130] W. Xue, A. Krasnitz, R. Lucito, R. Sordella, L. Vanaelst, C. Cordon-Cardo, S. Singer, F. Kuehnel, M. Wigler, S. Powers und et al , „DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma,“ *Genes & development*, Bd. 22, pp. 1439-1444, 2008.
- [131] B. Yuan, M. Miller, C. Keck, D. Zimonjic, S. Thorgeirsson and N. Popescu, "Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP.," *Cancer research*, vol. 58, pp. 2196-2199, 1998.
- [132] C. Wong, J. Lee, Y. Ching, D. Jin und I. Ng, „Genetic and epigenetic alterations of DLC1 gene in hepatocellular carcinoma,“ *Cancer research*, Bd. 63, pp. 7646-7651, 2003.
- [133] M. Durkin, B. Yuan , X. Zhou, D. Zimonjic, D. Lowy, S. Thorgeirsson und N. Popescu, „DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor,“ *Journal of cellular and molecular medicine*, Bd. 11, pp. 1185-1207, 2007.
- [134] D. Lukasik, E. Wilczek, A. Wasiutynski und B. Gornicka, „Deleted in liver cancer protein family in human malignancies (Review),“ *Oncol Lett.*, Bd. 2, pp. 763-768, 2011.
- [135] F. Qiao und J. Bowie, „The many faces of SAM,“ *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, p. re7, 2005.
- [136] T. Kim, K. Healy, C. Der, N. Sciaky, Y. Bang und R. Juliano, „Effects of structure of Rho GTPase-activating protein DLC-1 on cell morphology and migration,“ *The Journal of biological chemistry*, Bd. 283, pp. 32762-70, 2008.
- [137] P. Tompa, „Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion,“ *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Bd. 25, pp. 847-855, 2003.
- [138] R. Scholz, J. Regner, A. Theil, P. Erlmann, G. Holeiter, R. Jahne, S. Schmid, A. Hausser und M. Olayioye, „DLC1 interacts with 14-3-3 proteins to inhibit RhoGAP activity and block nucleocytoplasmic shuttling,“ *Journal of cell science*, Bd. 122, pp. 92-102 , 2009.
- [139] X. Qian, G. Li, H. Asmussen, L. Asnaghi, W. Vass, R. Braverman, K. Yamada, N. Popescu, A. Papageorge und D. Lowy, „Oncogenic inhibition by a deleted in liver cancer gene requires cooperation between tensin binding and Rho-specific GTPaseactivating protein activities.,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 104, pp. 9012-17, 2007.

- [140] N. Fidyk und R. Cerione, „Understanding the catalytic mechanism of GTPase-activating proteins: demonstration of the importance of switch domain stabilization in the stimulation of GTP hydrolysis,“ *Biochemistry*, Bd. 41, pp. 15644-53, 2002.
- [141] L. Iyer, E. Koonin und L. Aravind, „Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily,“ *Proteins*, Bd. 43, pp. 134-144, 2001.
- [142] Y. Liao, Y. Shih und S. Lo, „Mutations in the focal adhesion targeting region of deleted in liver cancer-1 attenuate their expression and function,“ *Cancer Res*, Bd. 68, pp. 7718-22, 2008.
- [143] X. Du, X. Qian, A. Papageorge, A. Schetter, W. Vass, X. Liu, R. Braverman, A. Robles und D. Lowy, „Functional interaction of tumor suppressor DLC1 and caveolin-1 in cancer cells,“ *Cancer research*, Bd. 72, pp. 4405-16, 2012.
- [144] M. Durkin, B. Yuan, S. Thorgeirsson und N. Popescu, „Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (Arhgap7),“ *Gene*, Bd. 288, pp. 119-127, 2002.
- [145] T. Kim, J. Lee, H. Kim, H. Jong, T. Kim, M. Jung und Y. Bang, „DLC-1, a GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma,“ *Biochemical and biophysical research communications*, Bd. 355, pp. 72-77, 2007.
- [146] M. Sekimata, Y. Kabuyama, Y. Emori und Y. Homma, „Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho,“ *The Journal of biological chemistry*, Bd. 274, pp. 17757-62, 1999.
- [147] M. Durkin, M. Avner, C. Huh, B. Yuan, S. Thorgeirsson und N. Popescu, „DLC-1, a Rho GTPase-activating protein with tumor suppressor function, is essential for embryonic development,“ *FEBS letters*, Bd. 579, pp. 1191-1196, 2005.
- [148] L. Zender, M. Spector, W. Xue, P. Flemming, C. Cordon-Cardo, J. Silke, S. Fan, J. Luk, M. Wigler, G. Hannon, D. Mu, R. Lucito, S. Powers und S. Lowe, „Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach,“ *Cell*, Bd. 125, pp. 1253-67, 2006.
- [149] C. Wong, J. Yam, Y. Ching, T. Yau, T. Leung, D. Jin und I. Ng, „Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma,“ *Cancer Res*, Bd. 65, Nr. 19, pp. 8861-8868, 2005.
- [150] B. Yuan, M. Durkin und N. Popescu, „Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers,“ *Cancer genetics and cytogenetics*, Bd. 140, pp. 113-117, 2003a.
- [151] T. Kim, H. Jong, S. Song, A. Dimtchev, S. Jeong, J. Lee, T. Kim, N. Kim, M. Jung und Y. Bang, „Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells,“ *Oncogene*, Bd. 22, pp. 3943-51, 2003.
- [152] M. Guan, X. Zhou, N. Soulitzis, D. Spandidos und N. Popescu, „Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: potential clinical

applications," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Bd. 12, pp. 1412-19, 2006.

- [153] H. Towbin, T. Staehelin und J. Gordon, „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 76, pp. 4350-54, 1979.
- [154] M. Durkin, B. Yuan, X. Zhou, D. Zimonjic, D. Lowy, S. Thorgeirsson und N. Popescu, „DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor," *Journal of cellular and molecular medicine*, Bd. 11, pp. 1185-1207, 2007b.
- [155] S. Muehlich, V. Hampl, S. Khalid, S. Singer, N. Frank, K. Breuhahn, T. Gudermann und R. Prywes, „The transcriptional coactivators megakaryoblastic leukemia 1/2 mediate the effects of loss of the tumor suppressor deleted in liver cancer 1," *Oncogene*, Bd. 31, pp. 3913-3923, 2012.
- [156] P. Dancker, I. Low, W. Hasselbach und T. Wieland, „Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin," *Biochimica et biophysica acta*, Bd. 400, pp. 407-414, 1975.
- [157] I. Spector, N. Shochet, Y. Kashman und A. Groweiss, „Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells," *Science*, Bd. 219, pp. 493-495, 1983.
- [158] S. Muehlich, I. Cicha, C. Garlichs, B. Krueger, G. Posern und M. Goppelt-Struebe, „Actindependent regulation of connective tissue growth factor," *American journal of physiology Cell physiology*, Bd. 292, pp. C1732-1738, 2007.
- [159] K. P. Holbourn, K. R. Acharya und B. Perbal, „The CCN family of proteins: structure–function relationships," *Trends Biochem Sci.*, Bd. 33, Nr. 10, pp. 461-473, 2008.
- [160] A. Leask und D. Abraham, „Leask A, Abraham DJ (2006) All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker," *Journal of cell science*, Bd. 119, pp. 4803-4810, 2006.
- [161] A. Mazzocca, E. Fransvea, F. Dituri, L. Lupo, S. Antonaci und G. Giannelli, „Down-regulation of connective tissue growth factor by inhibition of transforming growth factor beta blocks the tumor-stroma cross-talk and tumor progression in hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, Bd. 51, pp. 523-534, 2010.
- [162] M. Xiu, Y. Liu, D. Brigstock, F. He, R. Zhang und R. Gao, „Connective tissue growth factor is overexpressed in human hepatocellular carcinoma and promotes cell invasion and growth," *World journal of gastroenterology*, Bd. 18, pp. 7070-7078, 2012.
- [163] D. Xie, K. Nakachi, H. Wang, R. Elashoff und H. Koeffler, „Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features," *Cancer research*, Bd. 61, pp. 8917-8923, 2001.

- [164] S. Greer, R. Honeywell, M. Geletu, R. Arulanandam und L. Raptis, „Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells,“ *Journal of immunological methods*, Bd. 355, pp. 76-79, 2010.
- [165] W. Xue, A. Krasnitz, R. Lucito, R. Sordella, L. Vanaelst, C. Cordon-Cardo, S. Singer, F. Kuehnel, M. Wigler, S. Powers und et al , „DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma,“ *Genes & development*, Nr. 22, pp. 1439-1444, 2008.
- [166] N. Lamarche und A. Hall, „GAPs for rho-related GTPases,“ *Trends Genet*, Bd. 10, Nr. 12, pp. 436-440, 1994.
- [167] B. Yuan, M. Miller, C. Keck, D. Zimonjic, S. Thorgeirsson and N. Popescu, "Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. 58;," *Cancer research*, vol. 58, pp. 2196-2199, 1998.
- [168] X. Cheng, S. Xu, J. Pan, J. Zheng, X. Wang, H. Yu, J. Bao, Y. Xu, H. Guan und L. Zhang, „MKL1 overexpression predicts poor prognosis in patients with papillary thyroid cancer and promotes nodal metastasis,“ *J Cell Sci*, Bd. 132, p. jcs231399, 2019.
- [169] P. Zheng, Z. Yin, Y. Wu, Y. Xu, Y. Luo und T.-C. Zhang, „LncRNA HOTAIR promotes cell migration and invasion by regulating MKL1 via inhibition miR206 expression in HeLa cells,“ *Cell Commun Signal.*, Bd. 16, p. 5, 2018.
- [170] P. A. Eisenach, F. Schikora und G. Posern, „Inhibition of arginyltransferase 1 induces transcriptional activity of myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) and promotes directional migration,“ *J Biol Chem*, Bd. 289, pp. 35376-87, 2014.
- [171] M. B. Asparuhova, C. Secondini, C. Rüegg und R. Chiquet-Ehrismann, „Mechanism of irradiation-induced mammary cancer metastasis: A role for SAP-dependent Mkl1 signaling,“ *Mol Oncol*, Bd. 9, pp. 1510-27, 2015.
- [172] X. Wenping, H. Xu, M. Fang, X. Wu und Y. Xu, „MKL1 links epigenetic activation of MMP2 to ovarian cancer cell migration and invasion,“ *Biochem Biophys Res Commun*, Bd. 487, pp. 500-508, 2017.
- [173] M.-R. Hermann, M. Jakobson, G. P. Colo, E. Rognoni, M. Jakobson, C. Kupatt, G. Posern und R. Fässler, „Integrins synergise to induce expression of the MRTF-A-SRF target gene ISG15 for promoting cancer cell invasion.,“ *J Cell Sci*, Bd. 129, pp. 1391-1403, 2016.
- [174] X. Dong, M. Feng, H. Yang, H. Llu, H. Guo, X. Gao, Y. Liu, R. Liu, N. Zhang, R. Chen und R. Kong, „Rictor promotes cell migration and actin polymerization through regulating ABLIM1 phosphorylation in Hepatocellular Carcinoma,“ *Int J Biol Sci*, Bd. 16, pp. 2835-52, 2020.
- [175] K. Healy, L. Hodgson, T. Kim, A. Shutes, S. Maddileti, R. Juliano, K. Hahn, T. Harden, Y. Bang und C. Der, „DLC-1 suppresses non-small cell lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms,“ *Molecular carcinogenesis*, Bd. 47, pp. 326-337, 2008.

- [176] C. Wong, J. Lee, Y. Ching, D. Jin und I. Ng, „Genetic and epigenetic alterations of DLC1 gene in hepatocellular carcinoma,“ *Cancer research*, Bd. 63, pp. 7646-7651, 2003.
- [177] A. Duggirala, T. E. Kimura, G. B. Sala-Newby, J. L. Johnson, Y.-J. Wu, A. C. Newby und M. Bond, „cAMP-induced actin cytoskeleton remodelling inhibits MKL1-dependent expression of the chemotactic and pro-proliferative factor, CCN1,“ *J Mol Cell Cardiol*, Bd. 79, pp. 157-168, 2015.
- [178] G. Holeiter, J. Heering, P. Erlmann, S. Schmid, R. Jahne und M. Olayioye, „Deleted in liver cancer 1 controls cell migration through a Dia1-dependent signaling pathway,“ *Cancer research*, Bd. 68, pp. 8743-8751, 2008.
- [179] C. Wong, C. Wong, F. Ko, L. Chan, Y. Ching, J. Yam und I. Ng, „Deleted in liver cancer 1 (DLC1) negatively regulates Rho/ROCK/MLC pathway in hepatocellular carcinoma,“ *PloS one*, Bd. 3, p. e2779, 2008.
- [180] M. P. Sheetz, D. Felsenfeld, C. G. Galbraith und D. Choquet, „Cell migration as a five-step cycle,“ *Biochem. Soc. Symp.*, Bd. 65, pp. 233-243, 1999.
- [181] L. Salvany, J. Muller, E. Guccione und P. Rorth, „The core and conserved role of MAL is homeostatic regulation of actin levels,“ *Genes Dev.*, Bd. 28, pp. 1048-1053, 2014.
- [182] E. G. G. Sprenkeler, S. S. V. Henriët, A. T. J. Tool, I. C. Kreft, I. v. d. Bijl, C. E. M. Aarts und et al., „MKL1 deficiency results in a severe neutrophil motility defect due to impaired actin polymerization,“ *Blood*, Bd. 135, pp. 2171-181, 2020.
- [183] V. Hampl, C. Martin, A. Aigner, S. Hoebel, S. Singer, N. Frank, A. Sarikas, O. Ebert, R. Prywes, T. Gudermann und S. Muehlich, „Depletion of the transcriptional coactivators megakaryoblastic leukaemia 1 and 2 abolishes hepatocellular carcinoma xenograft growth by inducing oncogene-induced senescence,“ *EMBO Mol Med*, Bd. 5, Nr. 9, pp. 1367-82, 2013.
- [184] A. Lin, M. Barrada, J. Stone, L. van Aelst, M. Serrano und S. Lowe, „Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling,“ *Genes & development*, Bd. 12, pp. 3008-3019, 1998.
- [185] M. Serrano, A. Lin, M. McCurrach, D. Beach und S. Lowe, „Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a,“ *Cell*, Bd. 88, pp. 593-602, 1997.
- [186] G. Stein, M. Beeson und L. Gordon, „Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts,“ *Science*, Bd. 249, pp. 666-669, 1990.
- [187] Y. Liu, J. Zhou, Y. Hu, J. Wang und C. Yuan, „Curcumin inhibits growth of human breast cancer cells through demethylation of DLC1 promoter,“ *Mol Cell Biochem*, Bd. 425, p. 47–58, 2017.
- [188] H. Y. Fu, H. R. Zhou, J. G. Yan, C. J. Chen und J. Z. Shen, „Clinical significance of hypermethylation of DLC-1 gene in myelodysplastic syndrome patients and effects of decitabine on DLC-1 gene expression,“ *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, Bd. 97, pp. 412-417, 2017.

- [189] Q. Mei, M. Chen, X. Lu, X. Li, F. Duan, M. Wang, G. Luo und W. Han, „An open-label, single-arm, phase I/II study of lower-dose decitabine based therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma,“ *Oncotarget.*, Bd. 6, pp. 16698-711, 2015.
- [190] M. Liu, L. Zhang, H. Li, T. Hinoue, W. Zhou, H. Ohtani, A. El-Khoueiry, J. Daniels, C. O'Connell, T. Dorff, Q. Lu, D. Weisenberger und G. Liang, „Integrative Epigenetic Analysis Reveals Therapeutic Targets to the DNA Methyltransferase Inhibitor Guadecitabine (SGI-110) in Hepatocellular Carcinoma,“ *Hepatology*, Bd. 68, pp. 1412-28, 2018.
- [191] „NCT03257761“.
- [192] X. Zhou, X. Yang und N. Popescu, „Synergistic antineoplastic effect of DLC1 tumor suppressor protein and histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), on prostate and liver cancer cells: Perspectives for therapeutics,“ *Int J Oncol*, Bd. 36, Nr. 4, pp. 999-1005, 2010.
- [193] J. Guo, X.-Q. Feng, S.-M. Nie, Z. Su, X. Shi, Z.-G. Cui, L. Zhang, S.-G. Liu, F.-J. Meng und C.-T. Zhao, „Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine combined with trichostatin A on RPMI-8226 cell proliferation, apoptosis and DLC-1 gene expression,“ *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, Bd. 22, pp. 357-63, 2014.
- [194] S. Virtanen, J. Sandholm, G. Yegutkin, K. H. Vaananen und P. Harkonen, „Inhibition of GGTase-I and FTase disrupts cytoskeletal organization of human PC-3 prostate cancer cells,“ *Cell Biol. Int.*, Bd. 34, pp. 815-826, 2010.
- [195] T. Kusama, M. Mukai, M. Tatsuta, Y. Matsumoto, H. Nakamura und M. Inoue, „Selective inhibition of cancer cell invasion by a geranylgeranyltransferase-I inhibitor,“ *Clin Exp Metastasis*, Bd. 20, pp. 561-7, 2003.
- [196] J. Lu, L. Chan, H. D. G. Fiji, R. Dahl, O. Kwon und F. Tamanoi, „In vivo antitumor effect of a novel inhibitor of protein geranylgeranyltransferase-I,“ *Mol Cancer Ther.*, Bd. 8, pp. 1218-26, 2009.
- [197] L. N. Chan, H. D. G. Fijii, M. Watanabe, O. Kwon und F. Tamanoi, „Identification and characterization of mechanism of action of P61-E7, a novel phosphine catalysis-based inhibitor of geranylgeranyltransferase-I,“ *PLoS One*, Bd. 6, p. e26135, 2011.
- [198] N. Shao, J. Cheng, H. Huang, X. Gong, Y. Lu, M. Idris, X. Peng, B. X. Ong., Q. Zhang, F. Xu und C. Liu, „GASC1 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting the degradation of ROCK2,“ *Cell Death & Disease*, Bd. 12, p. 253, 2021.
- [199] C. Evelyn, S. Wade, Q. Wang, M. Wu, J. Iniguez-Lluhi und S. Merajver, „CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling,“ *Mol Cancer Ther.*, Bd. 6, Nr. 8, p. 2249–2260, 2007.
- [200] K. Hayashi, B. Watanabe, Y. Nakagawa, S. Minami und T. Morita, „RPEL Proteins Are the Molecular Targets for CCG-1423, an Inhibitor of Rho Signaling,“ *PLoS One*, Bd. 9, Nr. 2, p. e89016, 2014.

- [201] A. Haak, P. Tsou, M. Amin, J. Ruth, P. Campbell, D. Fox, D. Khanna, S. Larsen und R. Neubig, „Targeting the myofibroblast genetic switch: inhibitors of myocardin-related transcription factor/serum response factor-regulated gene transcription prevent fibrosis in a murine model of skin injury,“ *J Pharmacol Exp Ther*, Bd. 349, Nr. 3, pp. 480-486, 2014.
- [202] C. Evelyn, J. Bell, J. Ryu, S. Wade, A. Kocab, N. Harzdorf, H. Hollis Showalter, R. Neubig und S. Larsen, „Design, synthesis and prostate cancer cell-based studies of analogs of the Rho/MKL1 transcriptional pathway inhibitor, CCG-1423,“ *Bioorg Med Chem Lett*, Bd. 20, pp. 665-672, 2010.
- [203] J. Bell, A. Haak, S. Wade, P. Kirchhoff, R. Neubig und S. Larsen, „Optimization of novel nipepotic bis(amide) inhibitors of the Rho/MKL1/SRF transcriptional pathway as potential anti-metastasis agents,“ *Bioorg Med Chem Lett*, Bd. 23, p. 3826–3832, 2013.
- [204] A. J. Haak, K. M. Appleton, E. M. Lisabeth, S. A. Misek, Y. Ji, S. M. Wade, J. L. Bell, C. E. Rockwell, M. Airik, M. A. Krook, S. D. Larsen, M. Verhaegen, E. R. Lawlor und R. R. Neubig, „Pharmacological Inhibition of Myocardin-related Transcription Factor Pathway Blocks Lung Metastases of RhoC-Overexpressing Melanoma,“ *Mol Cancer Ther.*, Bd. 16, pp. 193-204, 2017.
- [205] C. Hermanns, V. Hampl, K. Holzer, A. Aigner, J. Penkava, N. Frank, D. Martin, K. Maier, N. Waldburger, S. Roessler, M. Goppelt-Struebe, I. Akrap, A. Thavamani, S. Singer, A. Nordheim, T. Gudermann und S. Muehlich, „The novel MKL target gene myoferlin modulates expansion and senescence of hepatocellular carcinoma,“ *Oncogene*, Bd. 36, Nr. 24, pp. 3464-3476, 2017.
- [206] P. Bernatchez, A. Sharma, P. Kodaman und W. Sessa, „Myoferlin is critical for endocytosis in endothelial cells,“ *American journal of physiology Cell physiology*, Bd. 297, pp. C484-492, 2009.
- [207] G. Redpath, R. Sophocleous, L. Turnbull, C. Whitchurch und S. Cooper, „Ferlins show tissue-specific expression and segregate as plasma membrane/late endosomal or trans-Golgi/recycling ferlins,“ *Traffic*, Bd. 17, p. 245–266, 2016.
- [208] A. Blomme, K. Fahmy, O. Peulen, B. Costanza, M. Fontaine, I. Struman, D. Baiwir, E. de Pauw, M. Thiry, A. Bellahcène, V. Castronovo und A. Turtoi, „Myoferlin is a novel exosomal protein and functional regulator of cancer-derived exosomes,“ *Oncotarget*, Bd. 7, p. 83669–83683, 2016.
- [209] A. Turtoi, A. Blomme, A. Bellahcene, C. Gilles, V. Hennequiere, P. Peixoto, E. Bianchi, A. Noel, E. De Pauw, E. Lifrange und et al., „Myoferlin is a key regulator of EGFR activity in breast cancer,“ *Cancer research*, Bd. 73, pp. 5438-5448, 2013.
- [210] T. Zhang, J. Li, Y. He, F. Yang, Y. Hao, W. Jin, J. Wu, Z. Sun, Y. Li, Y. Chen, Z. Yi und M. Liu, „A small molecule targeting myoferlin exerts promising anti-tumor effects on breast cancer,“ *Nat Commun*, Bd. 9, Nr. 1, p. 3726, 2018.
- [211] S. Leung und N. Miyamoto, „Point mutational analysis of the human c-fos serum response factor binding site,“ *Nucleic Acids Res*, Bd. 17, Nr. 3, pp. 1177-95, 1989.

- [212] C. Norman, M. Runswick, R. Pollock und R. Treisman , „Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element,“ *Cell*, Bd. 55, pp. 989-1003, 1988.
- [213] S. Lee, M. Vasishtha und R. Prywes, „Activation and repression of cellular immediate early genes by serum response factor cofactors,“ *The Journal of biological chemistry*, Bd. 285, pp. 22036-22049, 2010b.
- [214] R. Siegel, K. Miller und A. Jemal, „Cancer statistics, 2019,“ *CA Cancer J Clin*, Bd. 69, pp. 7-34, 2019.
- [215] M. Reig, A. Darnell, A. Forner, J. Rimola, C. Ayuso und J. Bruix, „Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: the issue of treatment stage migration and registration of progression using the BCLC-refined RECIST,“ *Semin Liver Dis*, Bd. 34, Nr. 4, pp. 444-455, 2014.
- [216] S. Mikhail, D. Cosgrove und A. Zeidan, „Hepatocellular carcinoma: systemic therapies and future perspectives,“ *Expert Rev Anticancer Ther*, Bd. 14, Nr. 10, pp. 1205-18, 2014.
- [217] C. Raggi, V. Factor, D. Seo, A. Holzbauer, M. Gillen, J. Marquardt, J. Andersen, M. Durkin und S. Thorgeirsson, „Epigenetic reprogramming modulates malignant properties of human liver cancer,“ *Hepatology*, Bd. 59, Nr. 6, pp. 2251-2262, 2014.
- [218] M. Dong, B. Yan, J. Liao, Y. Lam, G. Yip und C. Yu, „Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases,“ *Drug Discov. Today*, Bd. 15, pp. 622-629, 2010.
- [219] F. Kluge, J. Weissbach, A. Weber, T. Stradal und G. Posern, „Regulation of MRTF-A by JMY via a nucleation-independent mechanism,“ *Cell Commun Signal*, Bd. 16, Nr. 1, p. 86, 2018.
- [220] J. Weiß und A. Geier, „Hepatozelluläres Karzinom. Welche medikamentöse Therapien sind aktuell verfügbar?,“ *Arzneimitteltherapie*, Bd. 38, pp. 2-9, 2020.
- [221] C. Weinl, H. Riehle, Park Dongjeong, C. Stritt, S. Beck, G. Huber, H. Wolburg, E. N. Olson, M. W. Seeliger, R. H. Adams und A. Nordheim, „Endothelial SRF/MRTF ablation causes vascular disease phenotypes in murine retinae.,“ *J. Clin. Invest.*, Bd. 123, pp. 2193-206, 2013.
- [222] M. Bitzer, M. Horger, E. Giannini, T. Ganten, M. Wörns, J. Siyeke und et al, „Resminostat plus sorafenib as second-line therapy of advanced hepatocellular carcinoma - The SHELTER study,“ *J Hepatol.*, Bd. 65, pp. 280-8, 2016.
- [223] W. Tak, B. Ryoo, H. Lim, D. Kim, T. Okusaka, M. Ikeda, H. Hidaka und et al, „Phase I/II study of first-line combination therapy with sorafenib plus resminostat, an oral HDAC inhibitor, versus sorafenib monotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in east Asian patients,“ *Invest New Drugs*, Bd. 36, pp. 1072-1084, 2018.
- [224] J. Miano, X. Long und K. Fujiwara, „Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus,“ *Am J Physiol Cell Physiol*, Bd. 292, pp. 70-81, 2007.

- [225] R. S. Finn, Q. Shukui, M. Ikeda, P. R. Galle, M. Ducreux und et al, „Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma,“ *N Engl J Med*, Bd. 382, pp. 1894-905, 2020.
- [226] H. Kim, S. Son und I. Shin, „Role of the CCN protein family in cancer,“ *BMB Rep*, Bd. 51, pp. 486-492, 2018.

Eidesstattliche Versicherung

Khalid, Sahraa

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Der transkriptionelle Koaktivator Megakaryoblastische Leukämie 1 als Mediator der Tumorigenese bei Verlust des Tumorsuppressors Deleted in Liver Cancer 1“

selbständig 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 01.08.2023

Sahraa Khalid

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die diesen Weg mit mir gegangen sind und so zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben. Mein herzlichster Dank gilt insbesondere:

Prof. Dr. Thomas Gudermann für seine Bereitschaft, die Masterarbeit am Walther-Straub-Institut zu vertreten, und für die große Unterstützung bei der Abgabe meiner Dissertation.

meiner Betreuerin **Prof. Susanne Mühlich** für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die sehr gute und engagierte Betreuung und für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten.

Dr. med. Christina Maria Berr-Kirmair für die großartige und stetige Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung und Korrektur dieser Arbeit, die maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat.

Allen anderen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im Labor.

Meiner **Familie**, meiner **Freundin Martina Jöchle** und **meinem Mann**, die die Quelle meiner Kraftschöpfung sind und mich stetig unterstützt und motiviert haben.