

# The actin cross-linker Filamin A/Cheerio mediates tumor malignancy downstream of JNK signaling

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Eva Külshammer

geboren in Linz

Köln, den 04.03.2013

## Zusammenfassung

Essentielle Prozesse wie Zellformänderungen, Motilität, Zellteilung und Proliferation sind vom Aktinzytoskelett abhängig. Maligne Tumorzellen verwenden das Aktinnetzwerk für Wachstum und Migration. Aus diesem Grund ist das Verständnis der Funktion von Aktinregulatoren in der Tumorgenese von zentraler Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich das Aktin-quervernetzende Protein Cherio (Cher), das *Drosophila* Ortholog von humanem Filamin A (FLNA) als Vermittler von Tumormalignität identifizieren. Dabei wurde das Epithel der Augenimaginalscheibe als genetisch definiertes *Drosophila* Tumormodell verwendet. Invasive Tumore entstehen darin durch die Expression von aktiviertem Ras Onkogen ( $ras^{V12}$ ) in Zellen mit gestörter epithelialer Zellpolarität, die durch Mutationen in einem der Tumorsuppressoren Scribble (Scrib), Disc large (Dlg) oder Lethal giant larvae (Lgl) verursacht wird (Brumby and Richardson, 2003; Pagliarini and Xu, 2003). Diese klonalen Tumore gleichen in verschiedenen Eigenschaften humanen Karzinomen. Ich konnte zeigen, dass Cher in invasiven  $ras^{V12}scrib^1$  Tumoren auf mRNA und Protein-Ebene stark hochreguliert ist. Außerdem erbringe ich den Nachweis, dass das *cher* Gen abhängig von Jun N-terminal kinase (JNK) und Fos reguliert wird und ein direktes Zielgen des JNK Signalweges ist.

Obwohl Cher für das normale Epithel der Augenimaginalscheibe nicht essentiell ist, wird es in den Tumorzellen für Wachstum und Invasivität benötigt. Der Verlust der Cher Funktion in  $ras^{V12}scrib^1$  Zellen führt in den Tumoren zu einer verminderten Proliferationsrate und zur Verringerung der Fähigkeit Gewebegrenzen zu durchbrechen. Die reduzierte Invasivität und die wiederhergestellte neuronale Differenzierung von  $ras^{V12}scrib^1cher^1$  Tumorzellen resultiert in einer erhöhten Überlebensrate der Tiere und ermöglicht das Schlüpfen adulter Fliegen.

Der Verlust von *cher* beeinflusst die Morphologie der klonalen Tumore und hat besonders starke negative Auswirkungen auf Klone, die im apikalen peripodalen Epithel (PE) der Augenimaginalscheibe entstanden sind. Diese Klone werden häufig von dem PE in Richtung des basalen columnaren Zylinderepithels (columnar epithelium, CE) abgestoßen, wo sie zwischen PE und CE eingeschlossen bleiben. Somit repräsentiert das intakte PE eine mechanische Barriere gegen die Ausbreitung der Tumorzellen, die nur von Tumoren mit ausreichender Größe überwunden werden kann.

Desweiteren konnte ich Zipper (Zip), die schwere Untereinheit von Nicht-Muskel Myosin II (MyoII), als neuen Interaktionspartner von Cher identifizieren. Durch diese Interaktion stärkt Cher das kortikale Aktinmyosin-Netzwerk und verstärkt die mechanische Spannung innerhalb der invasiven Tumore, da es die Aktivität von MyoII positiv beeinflusst.

Cher ist in *ras<sup>V12</sup>scrib<sup>1</sup>* Tumoren für die Beeinträchtigung des Hippo (Hpo) Signalweges erforderlich, was auf eine Verbindung zwischen Cher-abhängiger Spannung und Verminderung der Hpo Signalübertragung in dem Tumorkontext hinweist. Meine vorläufigen Daten legen nahe, dass bösartige *ras<sup>V12</sup>scrib<sup>1</sup>* Tumore ähnlich wie humane Tumore ihren Stoffwechsel in Richtung aerober Glykolyse umprogrammieren, um den glykolytischen Fluss zu steigern. Dieser Prozess erfordert die Funktion von JNK und Cher.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass Cher ein neues direktes Ziel des JNK Signalweges ist, welches die Dynamik des Zytoskeletts mit der Tumorprogression verbindet.

## Abstract

Cell shape dynamics, motility, cell division and cell proliferation all depend on the actin cytoskeleton. Malignant cancer cells hijack the actin network to grow and migrate to secondary sites. Function analysis of actin regulators is therefore of major importance to better understand the tumorigenic process.

Here, I identify the actin cross-linking protein Cheerio (Cher) the fly ortholog of human Filamin A (FLNA), as a mediator of tumor malignancy. In a genetically defined *Drosophila* tumor model in the eye/antennal imaginal disc (EAD) epithelium, cooperation of activated Ras (*ras*<sup>V12</sup>) with disrupted epithelial cell polarity, caused by mutation in one of the tumor suppressors such as Scribble (Scrib), Disc large (Dlg) or Lethal giant larvae (Lgl) (Brumby and Richardson, 2003; Pagliarini and Xu, 2003), results in the formation of invasive tumors. These clonal tumors recapitulate several hallmarks of human cancer. I show that Cher is highly up-regulated in these invasive *ras*<sup>V12</sup>*scrib*<sup>1</sup> tumors on the mRNA and protein level. Further, I provide evidence that *cher* expression is regulated in a Jun N-terminal kinase (JNK) and Fos-dependent manner and identify *cher* as a direct target of JNK signaling.

Although non-essential in the normal EAD epithelium, Cher becomes required in the tumor cells for their growth and invasiveness. When deprived of Cher (*cher*<sup>1</sup>), these tumor clones lose their full potential to proliferate and breach tissue boundaries. Reduced invasiveness and restored photoreceptor differentiation of *ras*<sup>V12</sup>*scrib*<sup>1</sup>*cher*<sup>1</sup> tumors improve survival of tumor bearing animals, resulting in emergence of several adults. Loss of *cher* affects the morphology of clonal tumors, with a major impact on clones generated in the apical peripodial epithelium (PE) of the EAD, which are frequently extruded and stay confined between the PE and the underlying columnar epithelium (CE). Therefore, the intact PE presents a mechanical barrier to tumor cell expansion, which only those tumors large enough can overcome.

I identify nonmuscle myosin II (MyoII) heavy chain subunit Zipper (Zip) as novel interaction partner of Cher. Through binding to Zip, Cher likely strengthens the cortical actomyosin network and reinforce mechanical tension within the invasive tumor, as Cher positively affects MyoII activity. Further, in *ras*<sup>V12</sup>*scrib*<sup>1</sup> tumors Cher is necessary for deregulation of Hippo (Hpo)/Yki signaling independent of the JNK pathway, suggesting a possible link between Cher-dependent mechanical tension and attenuation of Hpo signaling in the tumor context. My preliminary data also

suggest that similar to mammalian cancer cells, malignant *ras*<sup>V12</sup>*scrib*<sup>1</sup> tumors reprogram cellular metabolism towards aerobic glycolysis, boosting glycolytic flux, a process which requires JNK and Cher function.

In summary, this study identifies Cher as a new target of JNK signaling that links cytoskeleton dynamics to tumor progression.