

Summary of Dissertation:

Yes-associated protein (YAP)-dependent overexpression of the spliceosome regulator U2AF Homology Motif Kinase 1 (UHMK1) promotes cell cycle progression in human liver cancer

Teng Wei

for Dr. sc.hum. degree

Fach/Einrichtung: Tumorbiologie

Doktorvater: PD. Dr. nat. Kai Breuhahn

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver tumor worldwide with high socio-economic relevance. Due to the inter-individual and intra-tumoral heterogeneity, the underlying molecular mechanism involved in tumor initiation and progression poorly understood and hampers the development of new therapeutic approaches. Recent studies highlighted the importance of the transcriptional co-activator yes-associated protein (YAP) in liver tumorigenesis. In human HCCs, YAP activation is characterizing more than 30% of HCC patients with poor clinical outcome. A plethora of experimental in vitro and in vivo data support the oncogenic properties of YAP in hepatocarcinogenesis, however, a detailed understanding of the functionally relevant transcriptional YAP targets is missing. In addition, these downstream effectors could represent promising points-of-interference for upcoming perturbation approaches.

Based on a comparison of transcriptomic data derived from liver cancer cells, the serine/threonine kinase U2AF homology motif kinase 1 (UHMK1) was identified as a transcriptional target of YAP, which supports proliferation and cell cycle progression. YAP induced UHMK1 expression through the transcription factor FOXM1 but not TEAD family members. In vivo, the stable delivery of murine UHMK1 in the liver via hydrodynamic tail vein injection did not induce tumor formation, ruling out the

hypothesis that UHMK1 may act as an oncogene. As expected from the functional data, expression profiling analysis of HCC cell after genetic knockdown of UHMK1 revealed a highly significant enrichment of genes involved in cell cycle regulation and DNA replication. A BirA-based proteomic approach identified 153 potential UHMK1 interacting proteins including the splicing factor 1 (SF1) and splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1). Subsequent bioinformatic enrichment analysis and confirmatory Co-IP experiments suggested a central role of UHMK1 in spliceosome activity. Lastly, UHMK1 overexpression as well as co-expression with YAP was confirmed in human HCC cohorts.

Together, these results illustrate that UHMK1 is a downstream effector of oncogenic YAP in liver cancer cells relevant for support tumor progression but not tumor initiation. Preliminary analyses suggest a role of UHMK1 in spliceosome regulation. Therefore, its inhibition for example by highly specific YAP or FOXM1 inhibitors or perturbation of spliceosome activity may represent a promising therapeutic approach in a subgroup of HCC patients with YAP/UHMK1 activation.

Zusammenfassung

Das humane hepatozelluläre Karzinom (hepatocellular carcinoma; HCC) ist die häufigste primäre Lebertumorerkrankung mit hoher sozio-ökonomischer Relevanz. Aufgrund molekularer Heterogenität sind die Ursachen, welche zur Tumorentstehung und Progression führen, bisher nur unzureichend geklärt. Dies beeinträchtigt auch die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Aktuelle Studien verdeutlichen die hohe Relevanz des transkriptionellen Ko-aktivators yes-associated-protein (YAP) in der Lebertumorigenese. In humanen HCCs liegt YAP in über 30% aller Fälle aktiviert vor und korreliert mit einer schlechten Prognose. Obwohl zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Experimente die onkogene Funktion von YAP in der Hepatokarzinogenese belegen, sind die funktionell relevanten Effektormechanismen bisher kaum verstanden. Diese YAP-abhängigen Regulatoren könnten vielversprechende *points-of-interference* für zukünftige Therapien darstellen.

Basierend auf einem Vergleich von Transkriptomdaten aus Leberkrebszellen, konnte die Serin-/Threonin-Kinase U2AF homology motif kinase 1 (UHMK1) als transkriptionelles Zielgen von YAP identifiziert werden, welche die Zellproliferation und den Zellzyklus reguliert. YAP induziert die UHMK1 Expression durch den Transkriptionsfaktor FOXM1 aber nicht die TEAD Proteinfamilie. *In vivo*, führt die stabile Expression von murinem UHMK1 durch hydrodynamische Injektion nicht zur Tumorentstehung in der Leber, was verdeutlicht, dass UHMK1 in diesem Organ kein unabhängiges Onkogen darstellt. Expressionsanalysen nach Inhibierung von UHMK1 in HCC Zellen führt zu einer signifikanten Anreicherung von regulierten Genen, welche in die Prozesse der Zellzykluskontrolle und DNA Replikation eingebunden sind. Basierend auf einem BirA-Proteomics Ansatz konnten 153 potentielle UHMK1 Interaktionspartner wie z.B. splicing factor 1 (SF1) and splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1) identifiziert werden. Eine nachfolgende bioinformatische Analyse und Co-IP Experimente deuten auf eine mögliche Funktion von UHMK1 in der Regulation des Splicosomes hin. Darüber hinaus konnte die Überexpression von UHMK1 als auch Koexpression mit YAP an einer HCC Patientenkohorte nachgewiesen werden.

Dies Daten verdeutlichen, dass UHMK1 ein Effektor von onkogen wirkendem YAP in Leberkrebszellen ist, welches die Tumorzellprogression aber nicht die Initiation unterstützt. Erste Interaktionsstudien legen einen regulatorischen Einfluss von UHMK1 auf die Funktion des Splicosomes nahe. Somit könnte die Inhibierung von YAP oder FOXM1 als auch Perturbationsansätze, welche gegen das Splicosom gerichtet sind, vielversprechende therapeutische Ansätze in der Subgruppe von HCC Patienten mit hoher YAP/UHMK1 Expression darstellen.