



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski
Agnieszka Łucja Rybarczyk

*Analiza ekspresji elementów szlaku Hippo: YAP1 i LATS1
oraz ich znaczenie prognostyczne w raku jasnokomórkowym nerki*

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor
Dr hab. inż. Piotr Mieczysław Wierzbicki

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Histologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec
Gdańsk 2019

*Pragnę podziękować wszystkim,
bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.*

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi
Panu doktorowi habilitowanemu Piotrowi Wierzbickiemu
za opiekę naukową, cenne wskazówki, życzliwość
i wszelką pomoc okazaną w trakcie realizacji pracy doktorskiej.*

*Pragnę podziękować Kierownikowi
Katedry i Zakładu Histologii GUMed
Panu Profesorowi Zbigniewowi Kmiecowskiemu
za przekazaną wiedzę, życzliwość, wyrozumiałość
oraz zapewnienie znakomych warunków do pracy naukowej.*

*Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Histologii
za życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy.*

Dziękuję moim Rodzicom, za wsparcie i troskę.

*Mojemu Mężowi Piotrowi dziękuję za wiarę w moje możliwości
i wsparcie podczas powstawania tej pracy.*

*Pracę dedykuję mojemu mężowi Piotrowi
i dzieciom: Zosi, Julci, Teosiowi i Felicji*

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Wykaz skrótów.....	2
<i>List of abbreviations</i>	2
Publikacja oryginalna oraz artykuły poglądowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	4
<i>List of publications included in the phd dissertation</i>	4
1. Streszczenie	5
2. Charakterystyka problemu naukowego	8
3. Materiał i metody	15
4. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	17
4.1. Praca oryginalna	17
4.2. Prace poglądowe.....	19
5. Podsumowanie wyników i wnioski	25
<i>English version</i>	26
1. Abstract	26
2. Objectives of the work	29
3. Material and methods	30
4. Reviews of the publications included in the doctoral dissertation	32
4.1. Original paper.....	32
4.2. Review papers	34
5. Summary and conclusions.....	39
Dorobek naukowy	40
Piśmiennictwo	43
<i>References</i>	43
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	49
<i>Publications included in the PhD dissertation</i>	49

WYKAZ SKRÓTÓW

LIST OF ABBREVIATIONS

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AMOT	angiomin
APC	adenomatous polyposis coli
AREG	amphiregulin
AXL	Axl receptor Tyrosine kinase
BAX	Bcl-2 associated X-protein
CK1	casein kinase 1
ccRCC	clear-cell renal cell carcinoma
CRC	colorectal cancer
CTGF	connective tissue growth factor
DVL	Dishevelled protein
E3	ubiquitin protein ligase
ECM	extracellular matrix
EGFR	epithelial growth factor receptor
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
FAT	FAT atypical cadherin
FasR	Fas receptor
FZD	Frizzled protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLUT1	Glucose transporter 1
GPCR	G protein coupled receptor
GUSB	beta-glucuronidase
HIF1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
MS-HRM-	
-qPCR	methylation-specific high-resolution-melting quantitative PCR
ISC	intestinal stem cell
KO	knock out
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LATS1/2	large tumor suppressor kinase 1/2
Lgr5	leucine-rich repeat-containing GPCR5
mccRCC	metastasized clear-cell renal cell carcinoma
MOB1	MOB kinase activator 1
MST1/2	serine/threonine kinase 4/3
NF2	neurofibromin 2
Oct-4	octamer-binding transcription factor 4
OS	overall survival
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PFS	progression-free survival
PML	promyelocytic leukemia
PUMA	BCL2 binding component 3
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RASSF	Ras association (RalGDS/AF-6) family member
RCC	renal cell carcinoma
SAV1	Salvador family WW domain containing protein 1
Sd	Scalloped

SOCS	suppresor of cytokine signaling
STRIPAK	striatin interacting phosphate and kinase complex
TAZ	taffazin
TCF4	transcription factor 4
TEAD	TEA domain family member
TJ	tight junction
TP53	tumor protein TP53
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel Lindau tumor suppressor
WB	Western blot technique
WNTS	Wnt signalling pathway
YAP1	Yes-associated protein 1
ZO-2	Zonula occludens -2

PUBLIKACJA ORYGINALNA ORAZ ARTYKUŁY POGLĄDOWE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

LIST OF PUBLICATIONS INCLUDED IN THE PHD DISSERTATION

1. A. Rybarczyk, J. Kłacz, A. Wrońska, M. Matuszewski, Z. Kmiec, P. Wierzbicki. „Overexpression of the YAP1 oncogene in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor outcome”.
Oncol. Rep. 2017; vol. 38, nr 1, s. 427-439.
Impact Factor – 2,662; Punktacja MNiSW – 20
<https://www.spandidos-publications.com/or/38/1/427>
2. A. Rybarczyk, P. Wierzbicki, A. Kowalczyk, Z. Kmiec. „Rola szlaku Hippo w kontroli proliferacji komórkowej i wielkości narządów oraz jego zaburzenia w chorobach nowotworowych”.
Post. Hig. Med. Dośw. (online) 2014; vol. 68, s. 503-515.
Impact Factor – 0,573; Punktacja MNiSW – 15
<https://phmd.pl/resources/html/article/details?id=55760>
3. P. M. Wierzbicki, A. Rybarczyk. „The Hippo pathway in colorectal cancer”.
Folia Histochem. Cytobiol. 2015; vol. 53, nr 2, s. 105-119.
Impact Factor – 1,060; Punktacja MNiSW – 15
https://journals.viamedica.pl/fovia_histochemica_cytobiologica/article/view/42583
Łączny współczynnik **Impact Factor** (Total Impact Factor): 4,295 .
Łączna **punktacja MNiSW** (Total number of points according to list of journals by Ministry of Science and Higher Education) : **50**
Liczba cytowań na dzień 16.03.2019 wg bazy **Web of Science**: **26**.
Total number of citations: 26 (Web of Science, 16.03.2019)
Indeks Hirscha h= 4

Praca oryginalna, w której jestem pierwszym autorem została wykonana w ramach grantu NCN nr N402 683940 kierowanym przez prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Kmiec.

The original work in which I am the first author was made within the NCN grant no. N402 683940, Principal Investigator Profesor Zbigniew Kmiec.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej uzyskały akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody NKEBN/4/2011).

Research carried out as part of the doctoral thesis was approved by the Independent Bioethics Commission at the Medical University of Gdańsk (approval number NKEBN / 4/2011).

1. STRESZCZENIE

Rak nerkowokomórkowy (RCC) stanowi ponad 90% wszystkich nowotworów nerki, spośród których najczęstszą odmianą jest jasnokomórkowy rak nerki (ccRCC). Pomimo zanotowanego nieznacznego spadku śmiertelności wśród chorych na RCC w ostatnich latach – wynikającego z wcześniejszego wykrycia choroby – okazuje się, że już w momencie wykrycia guza, u ok. 20-40% chorych diagnozuje się przerzuty lokalne i odległe [1].

Główne środowiskowe czynniki ryzyka w sporadycznych postaciach RCC to palenie tytoniu i otyłość. W dziedzicznych przypadkach RCC najczęstsze zmiany to mutacje genetyczne w rejonie kodującym gen *VHL* – von Hippel Lindau. Prawidłowe białko VHL w warunkach normoksji prowadzi do degradacji czynników HIF1 α . Delecje fragmentów chromosomu 3 skutkują zmianą w strukturze białka VHL, co prowadzi do nadmiernej produkcji czynników HIF1 α oraz czynników wzrostowych takich jak np. VEGF i PDGF, a to wpływa na wzmożoną proliferację komórkową, rozwój guza oraz angiogenezę [2].

Szlak Hippo odpowiada w komórce za regulację: proliferacji komórkowej, przeżycia komórki, mechanotransdukcji, samoodnowy komórek macierzystych oraz kontrolę wielkości organów i organogenezy [3–6]. Główną kaskadę fosforylacji w szlaku Hippo u ssaków tworzą dwie kinazy: MST1/2 oraz LATS1/2 wraz z białkami adaptorowymi: MOB1 i SAV1, odpowiednio do każdej z kinaz. Aktywacja szlaku np. na skutek inhibicji kontaktowej tj. poprzez białka zaangażowane w połączenia międzykomórkowe, prowadzi do fosforylacji efektorowego białka YAP1 i jego retencji w cytoplazmie [6,7]. Nieaktywne kinazy MST1/2 oraz LATS1/2 nie fosforylują YAP1 co powoduje, że w tej formie YAP1 – kofaktor czynników transkrypcyjnych, takich jak TEAD1-4, wiąże się z DNA, umożliwiając transkrypcję określonych genów. Zarówno szlak Hippo, jak i elementy komórkowe od niego niezależne, mogą oddziaływać z YAP1, a tym samym wpływać na proliferację, różnicowanie lub apoptozę w komórce [8,9].

Mutacje genetyczne w onkogenach i supresorach, tworzących szlak Hippo zostały już opisane w wielu nowotworach m.in. w raku wątrobowokomórkowym, raku niedrobnokomórkowym płuc czy w raku jelita grubego [10–12]. Jak dotychczas, nie przeprowadzono badań nad ewentualnymi zmianami szlaku Hippo w materiale

kliničnym raka jasnokomórkowego nerki, chociaż badania na liniach komórkowych raka nerki wskazywały na istotną rolę genu i białka YAP1 w regulacji proliferacji i apoptozy tych komórek [13].

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej była ocena poziomu ekspresji najważniejszych elementów szlaku Hippo w materiale klinicznym raka jasnokomórkowego nerki: YAP1, LATS1, MST2 oraz analiza znaczenia prognostycznego zmian ekspresji tych genów dla pacjentów z ccRCC.

W pracy „Overexpression of the *YAP1* oncogene in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor outcome” (*Oncology Reports*, 2017) przeprowadzono analizę poziomu ekspresji trzech kluczowych genów dla szlaku Hippo: *LATS1*, *MST2* i *YAP1* zarówno na poziomie mRNA (dla 86 pacjentów) jak i białka (dla 58 pacjentów). Dla *LATS1* i *MST2* oszacowano dodatkowo stopień metylacji rejonów promotorowych. W tkankach pochodzących z guza wykazano pięciokrotne podwyższenie ekspresji *YAP1* na poziomie mRNA i dwukrotne na poziomie białka. Dla *LATS1* stwierdzono zaś trzykrotne obniżenie na poziomie mRNA i czterokrotne obniżenie na poziomie białka. W pracy wykazano, że zaburzenia w poziomie mRNA/białka dla LATS1 lub YAP1, ale nie MST2, w tkance jasnokomórkowego raka nerki, wykazują pozytywną zależność z progresją choroby oraz skróconym czasem przeżycia chorych.

Oprócz pracy badawczej do rozprawy doktorskiej włączono dwie prace przeglądowe. Praca „Rola szlaku Hippo w kontroli proliferacji komórkowej i wielkości narządów oraz jego zaburzenia w chorobach nowotworowych” (Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2014) opisuje poszczególne elementy składowe szlaku Hippo, zarówno u *Drosophila* jak i u ssaków, z uwzględnieniem nadrzędnych regulatorów tego szlaku. Dodatkowo w pracy opisano niektóre przykłady chorób związanych z zaburzeniami funkcjonowania elementów składowych szlaku Hippo.

Praca pogładowa: „The Hippo pathway in colorectal cancer” (*Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2015), na przykładzie jelita grubego, opisuje zaburzenia w funkcjonowaniu szlaku Hippo, a także w jego interakcjach z innymi szlakami biochemicznymi, ważnymi dla homeostazy nabłonka jelitowego, które mogą prowadzić do zmian nowotworowych.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że zarówno obniżenie poziomu mRNA i/lub białka dla *LATS1* oraz podwyższenie poziomu mRNA/białka dla *YAP1* ma

istotny statystycznie wpływ na gorsze rokowanie dla pacjentów z ccRCC, przejawiające się skróceniem czasu przeżycia i okresu bez progresji choroby.

2. CHARAKTERYSTYKA PROBLEMU NAUKOWEGO

Rak nerkowokomórkowy (renal cell carcinoma, RCC) stanowi 2-3% przypadków nowotworów wykrywanych u dorosłych oraz 90-95% wszystkich wykrywanych nowotworów nerki. W 2008 roku na świecie zdiagnozowano około 209 000 nowych przypadków raka nerkowokomórkowego, z czego 102 000 zakończyło się zgonem [1]. W 2010 w samej Unii Europejskiej odnotowano 65 000 nowych przypadków i 25 000 zgonów. Pomimo spadku śmiertelności obserwowanego w ostatnich trzech dekadach (z 4,8/100 000 w latach 1990-1994 na 4,1/100 000 w latach 2000-2004), wynikającego najprawdopodobniej z wcześniejszej, choć przypadkowej diagnozy podczas badań rutynowych, szacuje się, że już w momencie wykrycia choroby około 20-40% chorych ma zdiagnozowane przerzuty (najczęstsze miejsca przerzutów to płuca, kości, wątroba i mózg) [1].

Zaobserwowano pewne różnice w częstości zachorowań na raka nerkowokomórkowego w zależności od płci, rasy i wieku. Wiadomo, że choroba ta występuje 2 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet, zaś średnia wieku w momencie wykrycia choroby to około 64. rok życia (6-7 dekada życia) dla sporadycznego raka nerkowokomórkowego (młodszy pacjenci najczęściej wykazują dziedziczne cechy zapadalności na tę chorobę) [1]. RCC jest rozpoznawany częściej w Europie i Ameryce Północnej niż w Azji, a większe ryzyko zachorowań występuje wśród osobników rasy białej niż czarnej. W samej Europie obserwuje się przypadki zachorowań na RCC głównie na wschodzie i północy kontynentu, natomiast Hiszpania i Portugalia mają najniższy wskaźnik zachorowań na raka nerkowokomórkowego [14].

Według histologicznej klasyfikacji Heidelberga, wśród raków nerkowokomórkowych można wyróżnić następujące typy: rak jasnokomórkowy (*clear cell RCC*) – stanowiący 60-80% diagnozowanych przypadków; rak brodawkowy (*papillary RCC*) – stanowiący 10-15% diagnozowanych przypadków; rak chromofobowy (*chromophobe RCC*) – stanowiący 5% diagnozowanych przypadków; onkocytoma (*oncocytoma*) – stanowiący 5% diagnozowanych przypadków; rak wywodzący się z kanalików zbiorczych (*collecting duct carcinoma*) – stanowiący 1% diagnozowanych przypadków [2]. Pierwsze trzy z wymienionych wyżej typów nowotworów stanowią łącznie ponad 90% diagnozowanych przypadków, jednakże to jasnokomórkowy rak nerki (ccRCC) jest najbardziej powszechnym i najbardziej

agresywnym typem raka nerkowokomórkowego. Według danych statystycznych wykazuje on największą szybkość lokalnej inwazji, przerzutowania i najwyższą śmiertelność [15].

Do głównych czynników ryzyka zachorowania na sporadyczne postacie ccRCC zalicza się: nadciśnienie, otyłość i palenie tytoniu [16]. Dziedziczne postacie ccRCC zazwyczaj pojawiają się w około 30-40 roku życia i cechuje je obustronność i wieloogniskowość guza [16]. Najczęstszą mutacją spotykaną w dziedzicznej postaci raka jasnokomórkowego nerki jest mutacja w obrębie ramienia krótkiego chromosomu 3, obejmującego rejon kodujący białko supresorowe VHL (*von Hippel Lindau tumor suppressor*). Białko VHL wchodzi w skład kompleksu ligazy ubikwityny i prowadzi do degradacji proteosomalnej m.in. czynników HIF1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha*) podczas normoksji [2]. Delecja fragmentu 3p25-26 lub utrata ramiona krótkiego chromosomu 3 to najczęstsze mutacje genetyczne spotykane w chorobie von Hippel-Lindau. Zmiany te w efekcie komórkowym powodują nadmierną produkcję czynnika transkrypcyjnego HIF1 α oraz czynników wzrostowych – VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*) oraz transporterów glukozy – GLUT1 lub GLUT8 [2]. Prowadzi to do wzmożonej proliferacji komórkowej, angiogenezy i wzrostu guza.

Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje wyniki analiz molekularnych wybranych genów i białek szlaku Hippo jako potencjalnych markerów prognostycznych raka jasnokomórkowego nerki, gdyż ich rola w progresji ccRCC dotychczas była słabo opisana w literaturze.

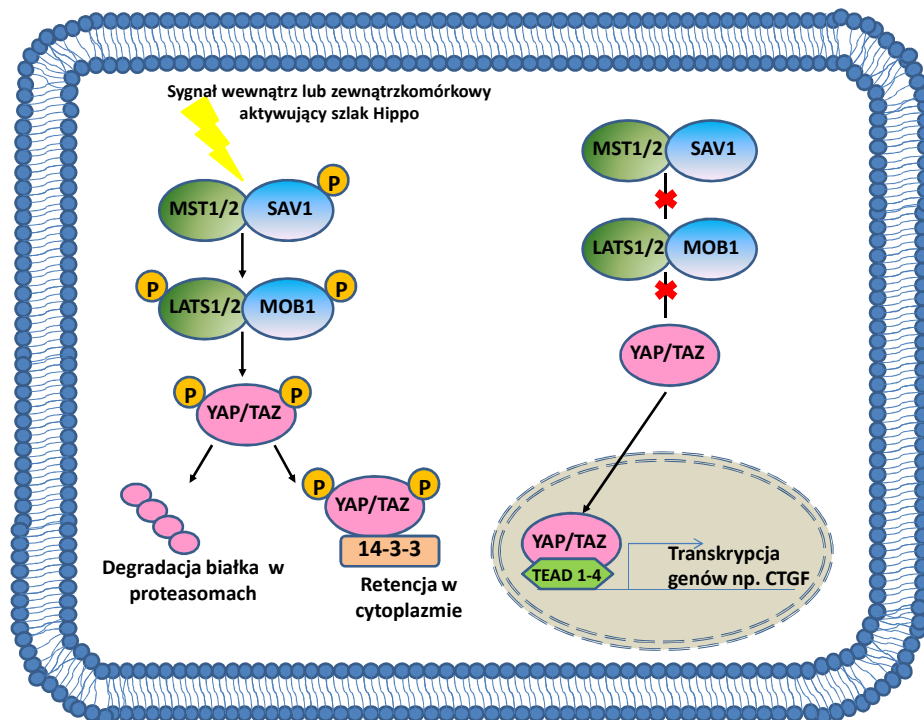
Szlak Hippo (Hpo) został pierwotnie opisany u *Drosophila melanogaster* [17], jednak najważniejsze elementy tego szlaku pozostały zakonserwowane ewolucyjnie u ssaków [18]. Do najważniejszych procesów biologicznych, w których bierze udział szlak Hippo, zaliczyć można m.in. regulację proliferacji komórkowej, przeżycia komórki, mechanotransdukcji, organogenezy, samoodnowy komórek macierzystych i kontroli wielkości organów [3–6].

Główną ścieżkę fosforylacji szlaku Hippo stanowią dwie kinazy serynowo – treoninowe: MST1/2 (*serine/threonine kinase 4/3*; odpowiednik kinazy Hippo u *Drosophila*), LATS1/2 (*large tumor suppressor kinase 1/2*; odpowiednik

kinazy Warts), oraz dwa białka adaptorowe: SAV1 (*Salvador family WW domain containing protein 1*; odpowiednik białka Salvador) oraz MOB1 (*MOB kinase activator 1*, odpowiednik białka Mats). Wymienione białka tworzą tzw. kasetę rdzenia szlaku Hippo (Rys. 1). Białkami efektorowymi szlaku są kofaktory transkrypcji YAP1/2 lub TAZ (*Yes-associated protein 1, taffazin*; odpowiedniki Yki) oraz współdziałające z nimi czynniki transkrypcji z rodziny TEAD1-4 (*TEA domain family member 1-4*; odpowiedniki Sd) [3,7,19]. Aktywność kaskady fosforylacji Hippo jest zależna od gęstości komórek otaczających (inhibicja kontaktowa), biegunowości i rozmiaru komórki, naprężenia elementów matriks zewnątrzkomórkowej, zmian w cytoszkieletcie, jak również docierających do receptora błonowego GPCR sygnałów zewnątrzkomórkowych takich jak hormony, czynniki wzrostowe lub chemokiny [20]. Aktywacja szlaku powoduje, że kinaza MST1/2 fosforyluje kinazę LATS1/2 na C-terminalnym motywie hydrofobowym, prowadząc jednocześnie do autofosforylacji LATS1/2. Dodatkowo, MST1/2 fosforyluje białko adaptorowe MOB1 wzmacniając jego oddziaływanie z LATS1/2 i powodując jego pełną aktywację [21–23]. Kinaza MST1/2 fosforyluje także SAV1, które to białko współdziała w fosforylacji LATS1/2 [21]. Aktywowany LATS1/2 fosforyluje reszty serynowe na YAP1 (Ser127 i Ser381), co powoduje zatrzymanie YAP1 w cytoplazmie i dalszą fosforylację przez kinazę kazeinową 1 (CK1δ/ε), aktywację fosfodegronu, która prowadzi do poliubikwitynacji przez ligazę E3 i degradację proteosomalną białka YAP1 [6]. Dotychczas opisano 5 miejsc fosforylacji na YAP1 dla LATS1/2 (Ser61, Ser109, Ser127, Ser164, Ser397). W zależności od sygnału wywołującego proces fosforylacji, aktywowane mogą być różne kinazy (także nienależące do szlaku Hippo), białka hamujące lub aktywujące, które mogą bezpośrednio oddziaływać z YAP1 [24]. Pod wpływem tych oddziaływań, w komórce zachodzą odpowiednie zmiany, związane z transkrypcją genów, odpowiadających albo za podtrzymanie przeżycia komórki i proliferację albo za apoptozę [25].

W przypadku deaktywacji szlaku Hippo, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w procesie nowotworowym, nie dochodzi do fosforylacji białka YAP1. Skutkuje to translokacją YAP1 do jądra i połączeniem YAP1 jako kofaktora transkrypcji z czynnikami transkrypcyjnymi, głównie TEAD 1-4, Smad, Runx1/2, p73, ErbB4, co powoduje aktywację transkrypcji genów pozostających pod ich kontrolą np. *ANKRD1* (czynnik transkrypcyjny), *CYR61* (czynnik wzrostu) czy *CTGF*

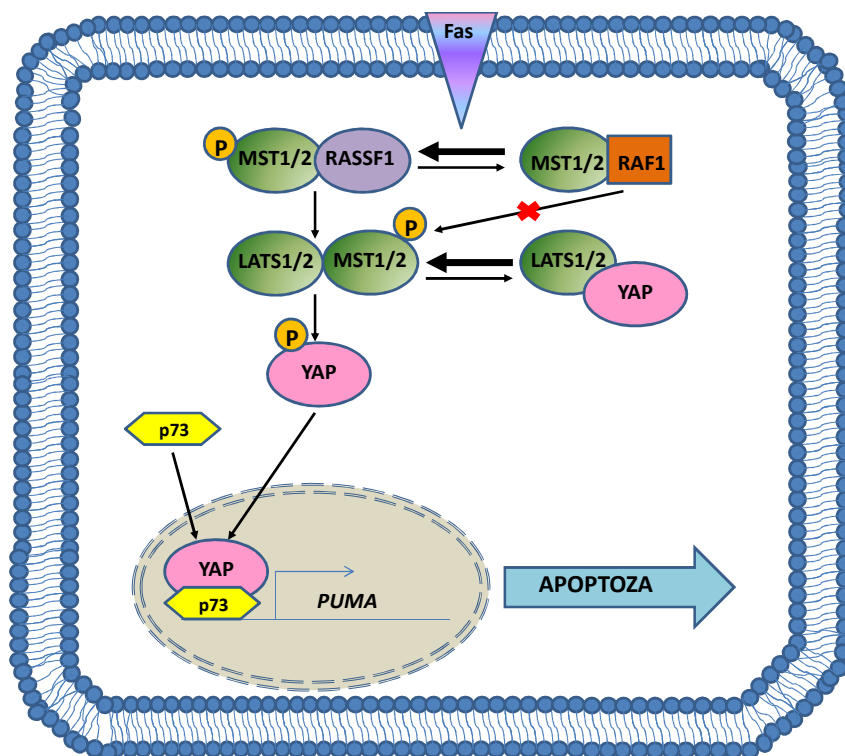
(czynnik wzrostu), skutkujących proliferacją, różnicowaniem komórek oraz stymulujących proces angiogenezy (Rys. 1) [26–28].



Rys. 1. Schemat działania głównych elementów szlaku Hippo u ssaków (opracowanie własne). Kiedy szlak jest aktywny pod wpływem sygnałów zewnętrznych lub wewnątrzkomórkowych, MST1/2 fosforyluje kinazę LATS1/2, a ta kinaza fosforyluje YAP/TAZ wyłączając jego aktywność transkrypcyjną. Przy braku sygnału i stymulacji szlak pozostaje wyłączony, co prowadzi do translokacji YAP/TAZ do jądra, połączenia z odpowiednimi czynnikami transkrypcyjnymi i włączenia transkrypcji odpowiednich genów docelowych.

Inną rolę szlaku Hippo i białka YAP1 w komórce zaobserwował zespół Matallanas i wsp. w 2007 roku (Rys. 2) [8]. Opisali oni po raz pierwszy prawdopodobną ścieżkę aktywacji apoptozy z udziałem elementów szlaku Hippo, aktywowaną związaniem liganda do receptora FasR [8]. We wcześniejszych doniesieniach wykazano, że w komórce oddziaływanie białka RAF1 z kinazą MST1/2 uniemożliwia jej autofosforylację i aktywację [29]. Okazało się, że do rozpadu tego wiązania może dojść pod wpływem RASSF1A (*Ras association (RalGDS/AF-6) family member*), który poprzez domenę SARAH wiąże się z MST1/2, blokując jego połączenie z RAF1. Zaktywowana w tym kompleksie kinaza MST1/2 fosforyluje LATS1/2, która w konsekwencji fosforyluje YAP1 na Ser 127, powodując jego

transport do jądra i oddziaływanie z czynnikiem transkrypcji p73, a tym samym włączenie transkrypcji proapoptotycznego genu *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) [8]. Inny sposób aktywacji apoptozy opisali Lapi i wsp. w 2008 roku. Wykazali oni, że pod wpływem uszkodzenia DNA, YAP1 może oddziaływać wspólnie z PML i p73, prowadząc do transkrypcji genów proapoptotycznych *BAX* i *PML* [30]. Również pod wpływem uszkodzenia DNA, kinaza tyrozynowa c-ABL fosforyluje YAP1 (Y357), powodując jego oddziaływanie z p73 i indukcję apoptozy [9].



Rys. 2. Mechanizm aktywacji apoptozy w komórce poprzez Fas-RASSF1A-MST2-YAP1-p73-PUMA (opracowanie własne). Aktywacja receptora FAS powoduje uwolnienie kinazy MST2 z kompleksu hamującego z RAF1 pod wpływem związania z RASSF1A. Prowadzi to do fosforylacji LATS1 i fosforylacji YAP1, które przemieszcza się do jądra. Tam, współdziałając z p73, powoduje transkrypcję genu *PUMA* i włączenie apoptozy [8].

Rola poszczególnych elementów szlaku Hippo w wielu nowotworach została dość dokładnie opisana. W nowotworach wątroby np. typu rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma*), rak dróg żółciowych (*cholangiocarcinoma*), czy w wątrobiaku zarodkowym (*hepatoblastoma*), odnotowano podwyższoną ekspresję

YAP1, oznaczoną w próbach klinicznych. Wykazano, że nadekspresja białka *YAP1* połączona była z jego wzmożoną aktywnością jądrową, skorelowaną z obniżeniem aktywności *LATS1* [10].

W raku jelita grubego zaobserwowano podwyższenie poziomu białka *YAP1* połączone ze wzmożoną lokalizacją jądrową w 52,5% (73/139) analizowanych przypadków klinicznych. Dodatkowo zaobserwowano pozytywną korelację nadekspresji *YAP1* z zaawansowaniem guza w skali TNM, wzmożoną ekspresją cykliny D1 oraz skróconym czasem przeżycia dla pacjentów [11].

W raku niedrobnokomórkowym płuc także wykazano podniesioną ekspresję białka *YAP1* (66,3%; 61/93 przypadków), wraz ze zwiększoną lokalizacją w jądrze komórkowym, która połączona była z zaawansowaniem guza w skali TNM. Ponadto prowadzone przez tę samą grupę badania na liniach komórkowych potwierdziły rolę *YAP1* w promocji proliferacji i inwazji komórek nowotworowych w raku niedrobnokomórkowym płuc [12].

Mutacje genetyczne i aberracje chromosomowe to zaburzenia prowadzące do transformacji nowotworowej w komórkach. Podobne konsekwencje dla komórek niosą zmiany epigenetyczne tj. niekodowane w sekwencji DNA modyfikacje (przekazywane zarówno podczas podziałów mitotycznych jak i mejotycznych), wpływające na nieprawidłowy poziom ekspresji genów [31]. Obecnie przyjmuje się, że transformacja nowotworowa to wieloetapowy proces, polegający na przypadkowej aktywacji onkogenów lub/i wyciszeniu genów supresorowych na skutek genetycznych oraz epigenetycznych modyfikacji [32]. Do najpowszechniejszych zmian epigenetycznych, opisanych w różnych typach nowotworów, zalicza się przede wszystkim zmiany stopnia zmetylowania wysp CpG rejonów promotorowych oraz modyfikacje na poziomie histonów (acetylacja, metylacja i fosforylacja) [33]. Baylin i wsp. w 1986 roku opisali miejscowo specyficzną zmianę w metylacji, polegającą na podwyższeniu poziomu zmetylowania nici DNA w rejonie kodującym kalcytoninę, w drobnokomórkowym raku płuc [34]. Natomiast zależność między hipermetylacją rejonów promotorowych a wyciszeniem genów supresorowych opisano po raz pierwszy na przykładzie genu retinoblastoma *RB* [35]. Dla dziedzicznej postaci raka nerki opisano hipermetylację rejonów promotorowych w obszarze kodującym *VHL* prowadzącą do wyciszenia tego genu [31].

Wyjściowy przegląd dostępnego piśmiennictwa wykazał, że jak dotąd nie przeprowadzono badań nad ewentualnymi zmianami szlaku Hippo w materiale klinicznym raka jasnokomórkowego nerki, chociaż badania na liniach komórkowych raka nerki wskazywały na istotną rolę genu i białka YAP1 w regulacji proliferacji i apoptozy tych komórek [13]. Przeprowadzone w pracy analizy zmian na poziomie molekularnym obejmowały ocenę zarówno poziomu mRNA i białka oraz we wskazanych przypadkach także określenie stopnia zmetylowania rejonów promotorowych w badanych próbach.

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej była ocena poziomu ekspresji najważniejszych elementów szlaku Hippo w materiale klinicznym raka jasnokomórkowego nerki: YAP1, LATS1, MST2 oraz analiza ich znaczenia prognostycznego u chorych na raka jasnokomórkowego nerki.

3. MATERIAŁ I METODY

Wszystkie badania, na podstawie których powstała niniejsza praca, prowadzone były na materiale klinicznym pozyskanym od pacjentów Kliniki Urologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania uzyskały akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody NKEBN/4/2011) a każdy pacjent zakwalifikowany do projektu, wyraził pisemną zgodę na udział w badaniu.

Badania, opisane w rozprawie, zostały przeprowadzone na 86 próbach, pobranych od pacjentów. Chorzy ze zdiagnozowanym rakiem jasnokomórkowym nerki byli operowani w Klinice Urologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w okresie od stycznia 2011 roku do września 2013 roku.

Wiek pacjentów, biorących udział w badaniu, wahał się od 33-83 lat (średnia wieku $62,16 \pm 11,24$; $n \leq 62 = 45$; $n > 62 = 41$), kobiet było 38 a mężczyzn 48. Wielkość guza w trakcie diagnozy ≤ 7 cm zdiagnozowano w 50 przypadkach a > 7 cm w 36 przypadkach. Zróżnicowanie w skali Fuhrman i TNM przedstawiono odpowiednio w tabeli nr 1 i 2.

W trakcie operacji (najczęściej radykalnej nefrektomii) pobrane od pacjentów próby, w zależności od miejsca pochodzenia, oznaczono jako C – próba kontrolna pobrana z miejsca niezmiennego nowotworowo ($n=86$); T – próba pobrana z guza pierwotnego ($n=86$); M - próba zawierająca przerzutujące komórki nowotworowe z guza nerki, pobrana albo z nadnerczy albo stanowiąca regionalny węzeł chłonny ($n=12$). Od każdego pacjenta pobrano fragment o wymiarach $8 \times 8 \times 8$ mm z okolicy zmienionej nowotworowo i takich samych wymiarów fragment z okolic niezmiennego nerki. Fragmenty tkanki zostały podzielone na 4 mniejsze fragmenty (o wymiarach ok. $2 \times 2 \times 8$ mm) i każdy fragment umieszczono w osobnej probówce zawierającej *RNA later* (2 probówki) lub 4% buforowaną formalinę (2 probówki). Pozyskane w ten sposób fragmenty tkankowe przechowywano w -80°C do dalszych analiz tzn. izolacji RNA i oceny poziomu mRNA, izolacji i oceny poziomu białek (RNA later) lub w 4°C do immunocytochemicznej oceny lokalizacji białek w tkance (formalina). Pozyskany materiał kliniczny po zaklasyfikowaniu przez patomorfologa jako jasnokomórkowy rak nerki (próby T) lub przerzut regionalny (M) był następnie poddawany dalszym analizom.

W momencie diagnozy obecności przerzutów nie stwierdzono w grupie 37 pacjentów. U pozostałych 49 (57%) pacjentów zdiagnozowano lokalne przerzuty do nadnerczy lub pobliskich węzłów chłonnych, chociaż pośród nich u 5 osób stwierdzono przerzuty odległe do płuc (n=2), mózgu (n=2) oraz mózgu i wątroby (n=1). Przed operacją żaden z pacjentów nie został poddany chemioterapii i radioterapii.

Średni okres obserwacji pacjentów wynosił 21 miesięcy (od 3 do 48 miesięcy). Z 86 pacjentów, biorących udział w badaniu do dnia zakończenia obserwacji przeżyło 45 osób (52%). Mediana czasu przeżycia pacjentów, biorących udział w badaniu, wynosiła 12 miesięcy a mediana czasu bez przerzutów po operacji wynosiła 6 miesięcy.

Tabela 1. Podział pacjentów biorących udział w badaniu na podgrupy w zależności od stopnia zróżnicowania guza w skali Fuhrman.

Stopień według skali Fuhrman	Liczba pacjentów
1	4
2	33
3	23
4	26

Tabela 2. Podział pacjentów biorących udział w badaniu na podgrupy w zależności od stopnia zróżnicowania guza w skali TNM.

Stopień według TNM	Liczba pacjentów
I (T1-2N0M0)	37
II (T2N0M0)	8
III (T1-2N1M0 lub T3N01M0)	12
IV (T4N0-2M0 lub T1-4N2M0 lub T1-4N0-2M1)	29

W niniejszej rozprawie wszystkie oznaczenia zmian ekspresji genów (ilościowe analizy mRNA) zostały przeprowadzone z wykorzystaniem techniki qPCR, znormalizowanej do wyznaczonego wcześniej genu referencyjnego, właściwego dla materiału klinicznego, pochodzącego z tkanek pobranych z jasnokomórkowego raka nerki – *GUSB* [36].

4. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

4.1. PRACA ORYGINALNA

Jestem głównym autorem w pracy dotyczącej badań nad analizą elementów składowych szlaku Hippo w raku jasnokomórkowym nerki. W trakcie prowadzenia badań zajmowałam się opracowywaniem koncepcji badawczej i pisanem załączonej publikacji. Podczas pracy w laboratorium zajmowałam się zabezpieczaniem materiału pozyskiwanego od pacjentów z Kliniki Urologii GUMed oraz obróbką materiału genetycznego tj.: izolacją mRNA, odwrotną transkrypcją i przeprowadzeniem optymalizacji i oznaczeń w badanych próbach metodą qPCR.

4.1.1. Praca „Overexpression of the YAP1 oncogene in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor outcome”, w której jestem pierwszym autorem, została opublikowana w roku 2017 w *Oncology Reports*. Jak dotąd praca była cytowana 2 razy (baza Web of Science).

Celem badań przedstawionych w pracy była analiza ekspresji trzech kluczowych komponentów szlaku Hippo: kinaz MST2, LATS1 oraz pozostającego pod ich kontrolą efektora jądrowego białka YAP1 w próbach pochodzących od 86 chorych na raka jasnokomórkowego nerki (ccRCC). Próby pobrano z tkanki zmienionej nowotworowo (T), kontrolnej tkanki nerki niezmienionej makroskopowo i mikroskopowo (C) oraz z tkanek pobranych z przerzutów regionalnych (M). Dodatkowo dokonano oceny stopnia metylacji rejonów promotorowych dla genów *LATS1* i *MST2* przy wykorzystaniu techniki MS-HRM-qPCR (*methylation-specific high-resolution-melting quantitative PCR*).

Analiza ekspresji na poziomie mRNA dla *YAP1* wykazała w próbach pobranych z guza (T) i przerzutowych (M) odpowiednio pięcio- i czterokrotne podwyższenie w porównaniu z kontrolą ($p < 0,01$). Dla *LATS1* podobna analiza wykazała odpowiednio trzykrotne i dwudziestopięciokrotne obniżenie ekspresji w próbach pobranych z guza (T) i przerzutowych (M) ($p < 0,05$). Porównanie wyników analizy molekularnej z danymi klinicznymi pacjentów, umożliwiło sformułowanie następujących wniosków: dla pacjentów z guzem zaklasyfikowanym wg skali Fuhrman 3 lub 4 stwierdzono obniżoną ekspresję *LATS1*, z jednoczesnym

podwyższeniem ekspresji *YAP1*, w porównaniu do prób kontrolnych. Także w przypadku pacjentów z ccRCC ze stwierdzonymi w momencie operacji lokalnymi lub odległymi przerzutami obserwowane jest podwyższenie poziomu mRNA dla *LATS1* i obniżenie dla *YAP1*. Dla *MST2* nie obserwowano różnic znamiennej statystycznie.

Półilościowa analiza poziomu białka normalizowana w odniesieniu do poziomu białka GAPDH została przeprowadzona na 58 próbach pobranych z guza i 8 pobranych z przerzutów z wykorzystaniem techniki Western Blot. Poziom *YAP1* był dwukrotnie wyższy w 81% (n=47) z analizowanych przypadków pochodzących z guza (T), zaś poziom białka *LATS1* był czterokrotnie obniżony w 72% (n=42) prób T w porównaniu z kontrolą. Porównanie uzyskanych wyników z danymi klinicznymi ujawniło, że w przypadku pacjentów z wyższym stopniem guza w skali Fuhrman (3 i 4) obserwuje się wzrost poziomu białka *YAP1*, przy jednoczesnym spadku poziomu białka *LATS1*. W przypadku białka *MST2* nie wykazano różnic pomiędzy tkanką niezmienną nowotworowo i tkanką pobraną z guza, jednakże stwierdzono obniżenie ekspresji mRNA *MST2* w próbach z przerzutami lokalnymi.

Ocena stopnia metylacji rejonów promotorowych przeprowadzona została dla 58 prób pochodzących ze zmienionej nowotworowo tkanki i 10 prób kontrolnych. Oznaczenia wykonano za pomocą nowoczesnej metody jakościowo-ilościowej MS-HRM-qPCR wykorzystaną i opisaną szczegółowo również we wcześniejszych badaniach dotyczących zmian ekspresji genu *RASSF1A* w ccRCC [37]. Zgodnie ze standardami analiz próby zaklasyfikowano do czterech grup o odpowiednim stopniu metylacji: 1, 0-10%; 2, 10-25%; 3, 25-50%; 4, 50-100%. Bazując na wynikach uzyskanych z 10 prób kontrolnych oraz prezentowanych w naszej wcześniejszej publikacji [37] ustalono wartość >25% jako status hipermetylacji dla promotorów *LATS1* lub *MST2*. Hipermetylację regionów promotorowych DNA zanotowano w 28 próbach (48%) dla *LATS1* oraz 22 próbach (38%) dla *MST2*. Dla *LATS1* dodatkowo wykazano powiązanie hipermetylacji z wyższym stopniem zaawansowania guza w skali Fuhrmana (3 i 4) oraz z obecnością lokalnych lub odległych przerzutów. Porównanie wyników hipermetylacji z poziomem mRNA/białka obecnym w tych samych analizowanych próbach wykazało, że hipermetylacja promotorów jest skorelowana z obniżeniem ilości mRNA/białka dla *LATS1*, ale nie dla *MST2*.

Poszukiwanie zależności pomiędzy poziomami białka lub mRNA w parach *LATS1*-*YAP1*, *LATS1*-*MST2* oraz *MST2*-*YAP1* pozwoliło określić negatywną

korelację pomiędzy spadkiem poziomu białka LATS1 a wzrostem poziomu białka YAP1 w 58 analizowanych próbach ($rs=-0,51$; $p<0,05$).

Skorelowanie danych klinicznych z wynikami molekularnymi pozwoliło na sformułowanie następujących wniosków: czas przeżycia pacjentów (overall survival, OS) oraz czas bez progresji choroby (progression-free survival, PFS) były ściśle związane ze stopniem zaawansowania choroby zarówno w skali TNM jak i w skali Fuhrman. Wyniki molekularnych analiz pokazały, że podwyższony poziom YAP1 (zarówno mRNA oraz białka) jak również hipermetylacja rejonów promotorowych dla *LATS1* były skorelowane z krótszym PFS i OS.

Analiza czasu przeżycia z wykorzystaniem modelu Coxa wykazała, że poziom mRNA dla *YAP1* może stanowić niezależny wskaźnik przeżycia pacjentów (OS) z jasnokomórkowym rakiem nerki w połączeniu z szacowaniem stopniowania guza w skali Fuhrman, jednakże tych samych zależności nie uzyskano dla analiz okresu bez progresji choroby (PFS).

Podsumowując prezentowane wyniki można stwierdzić, że zaburzenia w poziomie mRNA/białka dla LATS1 lub YAP1, ale nie MST2, w tkance jasnokomórkowego raka nerki, wykazują zależność z progresją choroby oraz skróconym czasem przeżycia chorych. Co więcej, pomiar mRNA *YAP1* w tkance kontrolnej i guza nerki może stanowić niezależny czynnik prognostyczny w ccRCC.

4.2. PRACE POGLĄDOWE

W skład rozprawy doktorskiej włączono dwie prace poglądowe, które opisują elementy składowe szlaku Hippo, zarówno u *Drosophila melanogaster* jak i u ssaków, wraz z mechanizmami oddziaływań, występującymi pomiędzy poszczególnymi elementami szlaku. Rolę zaburzeń szlaku Hippo w trakcie nowotworzenia bardziej szczegółowo przedstawiono w drugiej z tych prac na przykładzie raka jelita grubego. Dogłębne zaznajomienie się z tą tematyką pozwoliło w konsekwencji na wytyczenie celów badawczych, zrealizowanych w pracy oryginalnej wchodzącej w skład niniejszej rozprawy doktorskiej poświęconych zmianom ekspresji komponentów szlaku Hippo w raku jasnokomórkowym nerki. Stąd też, moja rola w powstaniu przedstawionych prac poglądowych była kluczowa.

4.2.1. Praca „Rola szlaku Hippo w kontroli proliferacji komórkowej i wielkości narządów oraz jego zaburzenia w chorobach nowotworowych” opublikowana w roku 2014 w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* opisuje poszczególne elementy składowe szlaku Hippo. Praca była cytowana 3 razy (baza Web of Science).

Kinazy wchodzące w skład szlaku zostały odkryte podczas badań, prowadzonych w celu poszukiwania nowych genów supresorowych na organizmie modelowym *Drosophila* [17]. Kinaza Warts wraz ze swoim kofaktorem – białkiem Mats oraz kinaza Hippo wraz z białkiem Salvador, będącym jej kofaktorem tworzą kaskadę fosforylacji, kontrolującą, w zależności od potrzeb komórki, aktywność białka efektorowego –Yorkie [38,39]. Yorkie to koaktywator transkrypcji, którego regulacja aktywności przez kaskadę fosforylacji Hippo, polega głównie na retencji cytoplazmatycznej, czyli odseparowaniu go od odpowiednich czynników transkrypcyjnych np. Scalloped [40]. W wyniku fosforylacji reszt serynowych, utworzone zostają miejsca wiązania z białkami cytoplazmatycznymi, zatrzymującymi Yki w cytoplazmie i/lub kierującymi go do degradacji w proteasomach [41].

W publikacji zostały opisane również niektóre z mechanizmów tzw. nadrzędnej regulacji szlaku Hippo. W mechanizmach tych białka komórkowe zaangażowane m.in. w połączenia międzykomórkowe, takie jak kadheryny Dachous czy Fat oraz białka pośredniczące w ich oddziaływaniu z kinazami szlaku Hippo, są odpowiedzialne za transdukcję sygnałów zewnątrzkomórkowych do wnętrza komórki oraz odpowiednio zatrzymanie podziałów komórkowych lub też aktywację apoptozy np. pod wpływem inhibicji kontaktowej [42,43]. Do kompleksów przekazujących sygnały wzrostowe ze środowiska zewnętrznego komórki jest zaliczany zespół białek Kibra-Expanded-Merlin związanych poprzez domenę FERM z białkiem F-aktyną cytoszkieletu lub białkami błony komórkowej [44,45]. Wszystkie białka z tego kompleksu mogą synergistycznie oddziaływać na kinazy szlaku Hippo aktywując je, dodatkowo bezpośrednie wiązanie Expanded z Yki również powoduje retencję cytoplazmatyczną Yki i zahamowanie jego aktywności transkrypcyjnej [40,46].

Innym białkiem nadrzędnie regulującym szlak Hippo i wiążącym domenę FERM jest białko Crumbs. C-końcowa domena tego białka odpowiedzialna jest za

oddziaływanie z kompleksami regulującymi biegunowość komórki (motyw PDZ) natomiast w N-końcowym rejonie obecny motyw FBM (*FERM-binding motif*) aktywująco oddziałuje na białko Expanded z kompleksu Kibra-Expanded-Merlin wpływając na aktywność szlaku Hippo i regulację proliferacji komórkowej [47].

W późniejszych latach okazało się, że wszystkie istotne dla funkcjonowania tegoż szlaku elementy składowe posiadają swoje ssacze homologi. U ssaków mechanizm działania głównej kaskady fosforylacji opiera się na oddziaływaniu kinazy MST1/2 wraz z kofaktorem SAV1 kontrolującymi aktywność kinazy LATS1/2, która wraz z kofaktorem –białkiem MOB1, fosforylują białko YAP1 lub jego paralog białko TAZ [48]. Aktywne kinazy powodują wyłączenie aktywności transkrypcyjnej białka YAP/TAZ i odseparowanie go od czynników transkrypcyjnych z rodziny TEAD [49]. W zależności od sygnałów docierających do komórki, YAP może funkcjonować jako białko antyapoptotyczne, prowadząc do ekspresji białek hamujących apoptozę jak np. cIAP1 (Birc2) lub surwiwyna (Birc5) [18]. Istnieją również doniesienia ukazujące silne właściwości proapoptotyczne YAP np. pod wpływem uszkodzenia DNA i aktywacji receptora Fas [8,50]. Oprócz wpływu na regulację proliferacji i śmierci komórkowej YAP może również brać udział w promowaniu lub hamowaniu różnicowania komórek macierzystych, w zależności od rodzajów czynników transkrypcyjnych, z którymi oddziałuje w jądrze komórkowym np. interakcja z czynnikiem RunX2, pod wpływem fosforylacji przez kinazę Src/Yes, prowadzi do regulacji różnicowania osteoblastów [51].

W pracy opisano przykłady zmian w poziomie ekspresji genów, kodujących białka składowe kaskady Hippo, zbadane w różnych typach nowotworów. W przypadku kinaz rdzenia kasety szlaku obserwowane zmiany miały charakter supresorowy; obniżenie ekspresji *MST1/2* i *LATS1* stwierdzono np. w raku żołądka, czy też dla *LATS1* obniżenie ekspresji w raku wątrobowokomórkowym lub hepatoblastoma wieku dziecięcego [10,52]. Podczas zahamowania aktywności kinaz kontrolujących działanie YAP, w wielu typach nowotworów obserwuje się jego onkogenny charakter z jednoczesną amplifikacją locus 11q22 oraz powiązaniem z tym gorszym rokowaniem dla pacjentów (rak niedrobnokomórkowy płuca i rak żołądka) [12,53]. Zmiany w poziomie ekspresji w materiale klinicznym potwierdzone w niektórych przypadkach również w doświadczeniach z liniami komórkowymi

dodatkowo wyjaśniły pewne niepowodzenia chemioterapii z wykorzystaniem cytostatyków takich jak doksorubicyna czy paklitaksel [54,55].

4.2.2. Praca pogładowa: „**The Hippo pathway in colorectal cancer**” ukazała się w roku 2015 w *Folia Histochemica et Cytobiologica*. W pracy opisano zaburzenia szlaku Hippo w nowotworzeniu na przykładzie raka jelita grubego z uwzględnieniem zaangażowania w ten proces białek komórkowych nie związanych bezpośrednio ze szlakiem Hippo lub interakcji innych szlaków biochemicznych z elementami kaskady fosforylacji Hippo. Praca była cytowana 24 razy (baza Web of Science).

Istnieją mechanizmy regulacji efektorów szlaku Hippo – białek YAP i TAZ, niezwiązane bezpośrednio z głównymi elementami tegoż szlaku. Białka, związane z połączeniami komórkowymi, takie jak angiomotyna (AMOT) czy ZO-2, pośredniczące w połączeniach typu ścisłego, mogą odpowiednio wzmacniać fosforylację YAP przez LATS1/2 [56] lub powodować wzrost poziomu YAP w jądrze i/lub związanie TAZ w kompleksach połączeń ścisłych [57,58]. W połączeniach zawierających białko α -katenina wraz z ufosforylowaną formą YAP1 i białkiem 14-3-3 tworzą kompleks hamujący aktywność YAP1 [59].

W omawianej pracy pogładowej przedstawiono również zależności elementów składowych szlaku Hippo z innymi szlakami, istotnymi dla homeostazy komórek nabłonkowych wyściełających jelita. Komponenty szlaku Wnt/ β -katenina (WNTS) kontrolują aktywność efektora – jądrowego koaktywatora transkrypcji β -kateniny, kontrolującego ekspresję genów, dla których produkty białkowe regulują procesy np. odnowy komórek macierzystych czy przejścia nabłonkowo-mezenchymatycznego (EMT) [60,61]. Jedną ze składowych szlaku WNTS – białko Dishevelled (DVL) oddziałuje z białkiem TAZ w aktywnym układzie szlaku Hippo, powodując restrikcję sygnałowania WNT, co odblokowuje kompleks degradujący β -kateninę [62]. W sytuacji wyłączenia fosforylacji TAZ, czyli inaktywacji szlaku Hippo, promowana jest jego translokacja do jądra i odseparowanie od białka Dishevelled oraz związana z tym akumulacja β -kateniny w cytoplazmie i jądrze [62].

Drugi z omawianych szlaków – EGFR/KRAS jest powiązany z degradacją YAP1 przy udziale kompleksu poliubikwitującego SOCS5/6. Podczas kancerogenezy

EGFR zaktywowany białkiem Ras powoduje obniżenie ekspresji SOCS5/6, co jednocześnie prowadzi do wzrostu YAP1 w cytoplazmie [63]. Dodatkowo wykazano, że nieufosforylowana forma YAP1 może indukować ekspresję genów kodujących EGFR oraz amfireguliny (AREG). Amfiregulina wiąże się z receptorem dla EGF i działa jako autokryny czynnik komórkowy (sprzężenie zwrotne), co może być jedną z przyczyn niepowodzeń terapii z wykorzystaniem inhibitorów EGFR, stosowanych między innymi w raku przełyku [64].

Kolejna część pracy pogładowej to analiza funkcji szlaku Hippo w nabłonku jelitowym w stanie homeostazy, regeneracji oraz kancerogenezy. Pierwsze doniesienia, dotyczące onkogennej roli YAP1 w nabłonku jelitowym, wykazywały jego zasadniczą ekspresję głównie w podstawach krypt, czyli niszy ISC [65]. Uwzględniając interakcję szlaków Hippo i Wnt, zaobserwowano, że na dnie krypt jelitowych w komórkach macierzystych istnieje podniesiony poziom sygnałowania Wnt [66].

W doświadczeniach z uszkodzeniem nabłonka jelitowego zaobserwowano konstytutywną aktywację szlaku Hippo podczas regeneracji komórek/tkanek przy jednoczesnym stwierdzeniu nieaktywnego YAP1 w stanie homeostazy komórkowej. Dodatkowo supresory procesu kancerogenezy, nadrzędnie regulujące aktywność YAP1 w stanie fizjologicznym, mogą prowadzić do przerostu nabłonka i tworzenia guza [67].

Najczęstsze mutacje dla raka jelita grubego dotyczą głównie genu *APC* oraz rozregulowania sygnałowania WNT. Analizę ekspresji genów, kodujących najważniejsze elementy składowe szlaku Hippo, przeprowadził Liang i wsp. Opisali oni obniżony poziom mRNA dla *YAP*, *TAZ*, *TEAD* i *OCT4* w raku jelita grubego w porównaniu ze zdrową tkanką [68]. Pozytywną korelację pomiędzy poziomem mRNA dla *YAP1* i *TAZ* oraz, pozostającymi pod ich kontrolą, genami docelowymi *AXL* i *CTGF* zaobserwowano na grupie 522 pacjentów [69]. Zaproponowano, że pacjenci posiadający podwyższony poziom ekspresji jednego, dwóch lub trzech genów z grupy *TAZ*, *AXL* i *CTGF* posiadają rosnące ryzyko progresji choroby [69]. Dodatkowe badania z wykorzystaniem techniki mikromacierzy wykazały inne geny docelowe dla *TAZ*, związane z przejściem nabłonkowo-mezenchymatycznym, migracją i inwazją, progresją raka jelita grubego oraz angiogenezą. Pacjenci z wysokim poziomem ekspresji w grupie genów *TAZ* - *AXL* - *CTGF* posiadający obniżony poziom mRNA

dla jednego lub dwóch genów z grupy *ANO1-SQLE* wykazują większe szanse przeżycia niż grupa z podwyższoną ekspresją *ANO1 – SQLE* [69].

Ostatnia część pracy dotyczy spersonalizowanych terapii z wykorzystaniem chemoterapeutyków takich jak *Cetuximab*, stosowanych w leczeniu pacjentów z rakiem jelita grubego. Analiza wyników leczenia z uwzględnieniem aktywności YAP1 wykazała, że tylko grupa pacjentów z nieaktywnym YAP1 reagowała na monoterapię z wykorzystaniem *Cetuximabu* – guz ulegał częściowej lub całkowitej remisji (n=80, z wyłączeniem z badań grupy pacjentów z TNM=IV) [70].

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Szlak Hippo w raku jasnokomórkowym nerki został dotychczas słabo poznany. W pracy oryginalnej przedstawionej w niniejszej rozprawie doktorskiej, oznaczono zmiany na poziomie molekularnym dla najważniejszych elementów tego szlaku, a na podstawie uzyskanych wyników oraz zebranych danych klinicznych pacjentów, sformułowano następujące wnioski:

- Wzrost poziomu mRNA i białka dla *YAP1* oraz wyższy stopień hipermetylacji regionów promotorowych dla *LATS1* są skorelowane z krótszym czasem przeżycia i skróceniem czasu bez progresji choroby dla pacjentów z ccRCC;
- Wartość prognostyczna wyznaczona wg modelu Coxa dla pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki określona została dla poziomu mRNA dla *YAP1* w połączeniu ze stopniem szacowania guza według skali Fuhrman;
- Głównym mechanizmem epigenetycznym odpowiedzialnym za obniżoną ekspresję genu *LATS1* w ccRCC jest hipermetylacja regionów promotorowych;
- Proponuje się włączenie pomiaru poziomu genu *YAP1* na poziomie mRNA lub białka oraz metylacji DNA genu *LATS1* do badań nad molekularnym panelem prognostycznym w ccRCC.

ENGLISH VERSION

Analysis of the expression of Hippo pathway elements: YAP1 and LATS1 and their prognostic significance in clear cell renal cell carcinoma

1. ABSTRACT

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for over 90% of all kidney tumors, of which the most common type is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). In recent years, there has been a decrease in mortality among patients with renal cell carcinoma, resulting from earlier detection of the disease. However, it turns out that metastases are detected already at the time of diagnosis in about 20-40% of cases [1].

The main environmental risk factors in sporadic RCC are cigarette smoking and obesity. In heritable cases of RCC, the most common changes are genetic mutations in the chromosomal region encoding the *VHL* (von Hippel Lindau) gene. Intact (normal) VHL protein causes rapid degradation of HIF1 α transcription factor in normoxic conditions. Mutations of *VHL* gene lead to inactivation of VHL protein, followed by excessive production of HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha) and growth factors such as VEGF (vascular endothelial growth factor) and PDGF (platelet derived growth factor), which affects increased cell proliferation, tumor development and angiogenesis [2].

The Hippo pathway maintains the regulation of the cell proliferation, cell survival, mechanotransduction, stem cell self-renewal as well as control of organ size and organogenesis [3–6]. The main phosphorylation cascade in the mammalian Hippo pathway is formed by two core kinases: MST1/2 (serine/threonine kinase 4/3) and LATS1/2 (large tumor suppressor kinase 1/2), together with their adapter proteins: MOB1 (MOB kinase activator 1) and SAV1 (Salvador family WW domain containing protein 1), respectively. Activation of the pathway, e.g. due to contact inhibition through proteins involved in intercellular connections, leads to phosphorylation of the effector protein YAP1 (Yes-associated protein 1) and its retention in the cytoplasm

[6,7]. If Hippo signalling is inactive, the MST1/2 and LATS1/2 kinases do not phosphorylate YAP1, thus, YAP1 is transferred to the cell nucleus and acts as cofactor of transcription factors. Together with TEAD1-4 transcription factors, YAP1 triggers expression of genes which affect proliferation, differentiation or cell apoptosis [8,9].

Genetic mutations in oncogenes and tumor suppressors that form the Hippo pathway have already been described in many cancers, including hepatocellular carcinoma, non-small cell lung cancer or colorectal cancer [10–12]. To date, there is no studies on possible changes in the Hippo pathway in the clinical material of RCC, however analyzes on RCC cell lines indicated an important role of the *YAP1* gene and protein in the regulation of proliferation and cell apoptosis [13].

The main objectives of this research were to assess the expression level of the most important elements of the Hippo pathway: YAP1, LATS1 and MST2 in the clinical material of ccRCC and to analyze their prognostic significance in patients with ccRCC.

The analysis of the expression level of three key genes for the Hippo pathway: *LATS1*, *MST2* and *YAP1* at both the mRNA and protein levels was presented in the manuscript "Overexpression of the *YAP1* oncogene in clear cell renal cell carcinoma with associated outcome" (*Oncology Reports*, 2017) based on biopsies of 86 ccRCC patients. For *LATS1* and *MST2*, the degree of methylation of the promoter regions was further estimated. In tumor ccRCC tissues, five-fold increase in *YAP1* expression at the mRNA level and two-fold at the protein level was demonstrated. For *LATS1*, a three-fold reduction at the mRNA level and a four-fold reduction at the protein level were identified. The study showed that disturbances in the level of mRNA / protein for *LATS1* or *YAP1*, but not *MST2*, in the tissue of clear cell RCC, show a positive relationship with the progression free survival (PFS) and shortened overall survival (OS).

In addition to the original paper, two review papers are included in the presented doctoral thesis. "The role of the Hippo pathway in the control of cellular proliferation and organ size and its disorders in cancer" (*Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014, written in Polish language) describes the individual components of the Hippo pathway, both in *Drosophila* and in mammals, including the

precedent regulators of this pathway. In addition, the paper describes some examples of diseases related to functional disorders of Hippo pathway components.

The paper "Hippo pathway in colorectal cancer" (*Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2015) reviews disorders in the functioning of the Hippo pathway in the large intestine cancer, as well as its interactions with other biochemical pathways, important for intestinal epithelial homeostasis, which may lead to tumor formation.

It can be concluded that both the reduction of mRNA and/or protein level of *LATS1* and the increase in mRNA/protein level of *YAP1* have a statistically significant effect on the worsened prognosis for patients with ccRCC, resulting in a reduction of OS and PFS.

2. OBJECTIVES OF THE WORK

The main objective of the research presented in this doctoral thesis was to assess the expression level of the Hippo pathway the most important elements in the clinical material of clear cell renal cell carcinoma: YAP1, LATS1, MST2 and analysis of their prognostic significance for patients with ccRCC.

3. MATERIAL AND METHODS

All studies constituting this doctoral thesis were conducted on the clinical material obtained from patients of the Department of Urology of the Medical University of Gdańsk. The research received the approval of the Independent Bioethics Commission at the Medical University of Gdańsk (permission number NKEBN/4/2011) and a written consent was obtained before the surgery from each patient.

The investigations described in the thesis, were carried out on samples obtained from 86 ccRCC patients. Patients diagnosed with clear cell renal cell carcinoma underwent a surgical total one-sided nephrectomy at the Urology Clinic of the Medical University of Gdańsk, from January 2011 to September 2013. The age of patients participating in the study ranged from 33-83 years (mean age 62, 16 ± 11 , 24; $n \leq 62 = 45$; $n > 62 = 41$), there were 38 women and 48 men. Tumors of the size less or equal to 7 cm during surgery were found in 50 cases and tumors larger than 7 cm were found in 36 cases. Differences in the Fuhrman grades and TNM stages are presented in tables 1 and 2, respectively.

During the surgery, the samples taken from the patients, depending on the place of origin, were marked as C - a control sample taken from the unchanged kidney part ($n = 86$); T - sample taken from the tumor ($n = 86$); M - a metastasized sample taken either from the adrenal gland or constituting an lymph node ($n = 12$). A tissue fragment of 8 x 8 x 8 mm was taken from each patient from the neoplastic area, and a fragment of the same dimensions was taken from the area of the unchanged kidneys. The tissue fragments were divided into 4 smaller fragments (approximately 2 x 2 x 8 mm) and each was placed in a separate tube containing *RNAlater* reagent (2 tubes) or 4% buffered formalin (2 tubes). The tissue fragments obtained in this way were stored at -80°C for further analyses, i.e. RNA isolation and mRNA level assessment, isolation and assessment of the protein levels (*RNAlater*) and at 4°C for immunohistochemical (IHC) assessment of the protein localization in the tissue (formalin-preserved samples). The collected clinical material, after being classified by the pathomorphologist as a clear cell renal cell carcinoma in T samples and ccRCC-derived metastasis in M samples, was then subjected to further analyses.

Table 1. Division of patients participating in the study into subgroups depending on the degree of differentiation of the tumor cells according to the Fuhrman grading system.

Degree according to Fuhrman grading	Number of patients
1	4
2	33
3	23
4	26

Table 2. Division of patients participating in the study into subgroups depending on the degree of tumor differentiation according to the TNM scale.

Degree according to TNM staging	Number of patients
I (T1-2N0M0)	37
II (T2N0M0)	8
III (T1-2N1M0 or T3N01M0)	12
IV (T4N0-2M0 or T1-4N2M0 or T1-4N0-2M1)	29

At the time of the diagnosis, presence of metastases was not observed in a group of 37 patients. In the remaining 49 (57%) patients, local metastases to the adrenal glands or local lymph nodes were diagnosed, although among them 5 patients had distant metastases to the lungs (n = 2), brain (n = 2) and brain and liver (n = 1). Before the operation, none of the patients underwent chemotherapy or radiotherapy.

The average follow-up period was 21 months (from 3 to 48 months). Of 86 patients who participated in the study, 45 persons (52%) survived by the day of observation. The average survival time of the patients participating in the study was 12 months and the median post-operative non-metastatic time was 6 months.

In this dissertation, all determinations of gene expression changes (quantitative mRNA analysis) were carried out using the qPCR technique, normalized to the previously designated reference gene, appropriate for the clinical material, derived from tissues collected from ccRCC - GUSB [36].

4. REVIEWS OF THE PUBLICATIONS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION

4.1. ORIGINAL PAPER

I am the first author of the original paper that describes the research studies on the Hippo pathway components analysis in ccRCC in the discussed papers. During these investigations I was involved in the development of the research concept and writing of manuscripts. During the laboratory work, I was collecting and preparing the material obtained from patients from the Urology Clinic of Medical University of Gdańsk. I was also responsible for processing of genetic material, i.e. mRNA isolation from the samples, reverse transcription and optimization of the qPCR method.

4.1.1. The publication "**Overexpression of the YAP1 oncogene in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor outcome**", in which I am the first author, was published in 2017 in *Oncology Reports* 2017; 38 (1): 427-439. So far, the work has been cited twice (Web of Science).

The aim of the study was to analyse the expression of three key components of the Hippo pathway: MST2 and LATS1 kinases and the nuclear effector protein YAP1 in samples taken from 86 patients with ccRCC from cancerous tissue (T), control renal tissue unchanged macroscopically and microscopically (C) and in tissues taken from local metastases (M). Additionally, the degree of methylation of promoter regions for *LATS1* and *MST2* genes was assessed using the MS-HRM-qPCR technique (*methylation-specific high-resolution-melting quantitative PCR*).

Analysis of the expression at the mRNA level for *YAP1* revealed in the samples taken from the tumor (T) and metastatic (M) a five- and four-fold increase, respectively, as compared to the control ($p < 0.01$). For *LATS1*, a similar analysis showed a three-fold and twenty-five-fold decrease in the expression of samples taken from tumor (T) and metastatic (M) ($p < 0.05$), respectively. A comparison of the molecular analysis results with clinical data of the patients made it possible to formulate the following conclusions: for patients with a tumor classified according to the Fuhrman 3 or 4 grade, decreased *LATS1* expression was observed, while the expression of *YAP1* was increased, as compared to controls. Also for patients with ccRCC with local or distant metastases detected at the time of surgery, an increased

level of *LATS1* mRNA and a decreased for *YAP1* was observed. No statistically significant differences were observed for *MST2*.

Semi-quantitative analysis of the protein level normalized with the GAPDH protein level was carried out on 58 samples taken from the tumor and 8 from metastases using the Western blot technique. The level of YAP1 was twice as high in 81% (n = 47) of the analyzed cases from the tumor (T), and the LATS1 protein level was reduced four times in 72% (n = 42) T samples compared to the control. Comparison of the obtained results with clinical data revealed that in the case of patients with a higher tumor grade on the Fuhrman scale (3 and 4), an increase in the level of YAP1 protein is observed, while the level of LATS1 protein decreases. In the case of MST2 protein, there were no differences between the tumor tissue and the control.

The evaluation of the methylation degree of the promoter regions was carried out for 58 samples originating from neoplastic tissue and 10 control samples. The assays were made using the modern quality-quantitative method MS-HRM-qPCR used and described in detail also in our previous studies on changes in RASSF1A gene expression in ccRCC [37]. According to the analysis standards, the samples were classified into four groups with the appropriate degree of methylation: 1, 0-10%; 2, 10-25%; 3, 25-50%; 4, 50-100%. Based on the results obtained from 10 control samples and presented in another publication [30], the value > 25% was set as the hypermethylation status for the *LATS1* or *MST2* promoters. Hypermethylation of promoters was recorded in 28 ccRCC samples (48%) for *LATS1* and 22 samples (38%) for *MST2*. For *LATS1*, the hypermethylation was also associated with a higher Fuhrman degree (3 and 4) and the presence of local or distant metastases (TNM 3 and 4). Comparison of the hypermethylation results with the level of mRNA/protein present in the same analyzed samples showed that promoter hypermethylation is correlated with a decrease in the amount of mRNA/protein for *LATS1*, but not for *MST2*.

The analysis of possible associations between protein or mRNA levels in LATS1-YAP1, LATS1-MST2 and MST2-YAP1 pairs revealed the negative correlation between LATS1 and YAP1 protein levels in 58 analysed samples (rs = -0.51, p <0.05).

Correlating the clinical data with the results of molecular analyses allowed to formulate the following conclusions: patients' overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were closely related to the progress of the disease both on the TNM scale and on the Fuhrman scale. The results of molecular analyses showed that increased expression of YAP1 (both mRNA and protein) as well as hypermethylation of promoter regions for LATS1 were correlated with shorter PFS and OS.

Summing up the presented results, it can be concluded that disturbances in the level of mRNA/protein for LATS1 or YAP1, but not MST2, in the tissue of clear cell renal cell carcinoma, show a positive relationship with disease progression and reduced survival time.

4.2.REVIEW PAPERS

4.2.1. The publication "**The role of the Hippo pathway in the control of cell proliferation and organ size and its disorders in cancer**", was published in 2014 in Polish in the journal *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014; 68: 503-515. The review describes the role of individual components of the Hippo pathway in the biology of normal and cancer cells. The work has been cited 3 times (Web of Science).

The Hippo pathway kinases were discovered during the search for new suppressor genes on the *Drosophila* model organism [17]. Warts kinase with its cofactor - Mats protein and Hippo kinase along with its cofactor, the Salvador protein, form a cascade of phosphorylation, controlling the effector protein activity – Yorkie, depending on the needs of the cell [38,39]. Yorkie is a co-activator of transcription factors. Regulation of Yorkie activity by the Hippo phosphorylation cascade consists mainly of cytoplasmic retention, i.e. isolation from appropriate transcription factors [40]. As a result of serine residues phosphorylation, binding sites for cytoplasmic proteins are established and retain Yorkie in the cytoplasm and/or direct it to the degradation in proteasomes [41].

The paper contains the description of the upstream mechanisms of the Hippo pathway regulation. This machinery uses cellular proteins involved in intercellular

connections such as Dachsous cadherins or Fat cadherins, but also proteins mediating in their interaction with Hippo pathway components. The above mentioned elements are responsible for the transduction of extracellular signals to the interior of the cell and arresting cell division or activation of apoptosis, for example, during contact inhibition [42,43]. The complexes that transmit growth signals from the external environment of the cell include the Kibra-Expanded-Merlin protein complex bound via the FERM domain to the cytoskeletal F-actin protein or cell membrane proteins [44,45]. All proteins from this complex may synergistically interact with the Hippo pathway kinases by activating them. In addition, the direct binding Expanded with Yki also results in cytoplasmic Yki retention and inhibition its transcriptional activity [40,46].

Another protein that regulates the Hippo pathway and bind the FERM domain is the Crumbs protein. C-terminal domain of this protein is responsible for interaction with complexes regulating the polarity of the cell (PDZ motif) while in the N-terminal region containing FBM motif (FERM-binding motif) activates the Expanded protein from the Kibra-Expanded-Merlin complex affecting the activity of the Hippo pathway and regulates cell proliferation [47].

Afterwards, it turned out that all the components essential for the functioning of this pathway had their mammalian homologous. In mammals, the mechanism of the main phosphorylation cascade is based on the interaction of MST1/2 kinase together with the SAV1 adaptor protein controlling LATS1/2 kinase activity which, together with the MOB1 adaptor protein, phosphorylate the YAP1 protein or its paralog – TAZ protein [48]. Active kinases exclude the transcription activity of the YAP/TAZ protein and separate them from TEAD family transcription factors [49]. Depending on the signals received by the cell, YAP can function as an anti-apoptotic protein leading to the expression of apoptosis-inhibiting proteins such as cIAP1 (Birc2) or survivin (Birc5) [17]. There are also reports showing a strong pro-apoptotic properties of YAP, e.g. under the influence of DNA damage and activation of the Fas receptor [8,50]. In addition to affecting the regulation of cell proliferation and death, YAP may also contribute to the promotion or inhibition of the stem cell differentiation, depending on the types of transcription factors with which it interacts in the cell nucleus. For example, interaction with the RunX2 factor, phosphorylated by Src/Yes kinase, leads to regulation of osteoblast differentiation[51].

The paper describes the examples of changes in the level of gene expression coding the Hippo cascade proteins examined in various types of tumors. In the case of Hippo pathway kinases, the observed changes were suppressor-like. The reduction of MST1/2 and LATS1 expression was found, for example, in gastric cancer or for LATS1, lowering the expression in hepatocellular carcinoma or hepatoblastoma of childhood [10,52]. During the inhibition of YAP-controlling kinases, in many types of tumors, its oncogenic nature is observed with the simultaneous amplification of the 11q22 locus and the associated worsened prognosis for patients (i.e. non-small cell lung cancer and gastric cancer) [12,53]. Changes in the level of gene expression observed in the clinical material was additionally confirmed (in some cases) by the experiments with cell lines. The results of these experiments further clarified certain failures of chemotherapy with the use of such cytostatics as doxorubicin or paclitaxel [54,55].

4.2.2. A review paper "**The Hippo pathway in colorectal cancer**" was published in 2015 in *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2015; 53 (2): 105-119. This paper describes the disturbances of the Hippo pathway in cancer on the example of colorectal cancer, taking into account the involvement of cellular proteins not directly related to the pathway or the interaction of other biochemical pathways with elements of the Hippo phosphorylation cascade. The work was quoted 24 times (Web of Science).

There are mechanisms regulating the effectors of the Hippo pathway, YAP and TAZ proteins, which are indirectly related to the main elements of this pathway. Proteins associated with cellular junctions such as angiomin (AMOT) or ZO-2, present in tight junctions, may increase YAP phosphorylation by LATS1/2 [56], or cause an increase in the level of YAP in the nucleus and/or binding of TAZ in the complexes of tight junctions [57,58]. In cellular junctions containing the α -catenin together with the phosphorylated form of YAP1 and the 14-3-3 protein, they form a complex that inhibits the activity of YAP1 [59].

This review article presents also the cross-talk between components of the Hippo pathway and other pathways important for the homeostasis of epithelial cells. Components of the Wnt / β -catenin (WNTS) pathway control the activity of the nuclear transcription co-activator β -catenin, which is involved in the control of the expression

of genes responsible for regulation processes such as stem cell renewal or epithelial-mesenchymal transition [60,61]. One of the components of the WNTS pathway, Dishevelled protein (DVL), interacts with the TAZ protein in the active Hippo pathway, causing restriction of WNT signaling, which unblocks the β -catenin-destruction complex [62]. In the situation of TAZ phosphorylation exclusion (inactivation of the Hippo pathway), its translocation to the nucleus and separation from the Dishevelled protein and the related accumulation of β -catenin in the cytoplasm and nucleus, are promoted [62].

The second discussed pathway, i.e. EGFR/KRAS, is associated with the degradation of YAP1 with the participation of the SOCS5/6 polyubiquitinating complex. During carcinogenesis, EGFR is activated by the Ras protein and cause SOCS5/6 expression reduction, which also leads to an increase YAP1 concentration in the cytoplasm [63]. In addition, it has been shown that the non-phosphorylated form of YAP1 can induce the expression of genes encoding EGFR and amphiregulin (AREG). Amphiregulin binds to the EGF receptor and acts as an autocrine cellular factor (feedback), which may be one of the causes of therapy failure in esophageal cancer when using EGFR inhibitors [64].

Another part of the review paper is the analysis of the Hippo pathway function in the intestinal epithelium during homeostasis, regeneration and carcinogenesis. The first reports on the oncogenic role of YAP1 in the intestinal epithelium showed its primary expression mainly in the bases of crypts, the ISC niche [65]. Taking into account the interactions of the Hippo and Wnt pathways, it was found that at the bottom of intestinal crypts, there is an increased level of Wnt signalling in stem cells [66].

In experiments with damaged intestinal epithelium, constitutive activation of the Hippo pathway during cell/tissue regeneration was observed while the inactive YAP1 was found in the state of cellular homeostasis. In addition, tumor suppressors, which upstream regulate the activity of YAP1 in the physiological state, can lead to epithelial hypertrophy and tumor formation [67].

The most common mutations for colorectal cancer concern mainly the *APC* gene and the deregulation of WNT signalling. The analysis of the genes expression encoding the most important components of the Hippo pathway was carried out by Liang et al. They described the decreased level of mRNA for *YAP*, *TAZ*, *TEAD* and

OCT4 in colon cancer compared to healthy tissue [68]. A positive correlation between the level of mRNA for *YAP1* and *TAZ* and the target genes *AXL* and *CTGF* under their control was observed on a group of 522 patients [69]. It has been proposed that patients with elevated levels of one, two or three genes from the *TAZ*, *AXL* and *CTGF* groups have an increased risk of disease progression [69]. Additional studies using the microarray technique showed other target genes for *TAZ* related to epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion, progression of colorectal cancer and angiogenesis. Patients with high levels of expression in the *TAZ* - *AXL* - *CTGF* gene group with reduced mRNA levels for one or two genes from the *ANO1* - *SQLE* group have a greater chance of survival than the group with increased *ANO1* - *SQLE* expression [69].

The last part of the review concerns personalized therapies using chemotherapeutics such as Cetuximab in patients with colorectal cancer. Analysis of the treatment results, including *YAP1* activity, showed that only the group of patients with inactive *YAP1* responded to monotherapy using Cetuximab and the cancer was partially or completely remitted (n = 80, with the exception of patients with TNM = IV) [70].

5. SUMMARY AND CONCLUSIONS

So far, the Hippo pathway in the clear cell carcinoma of the kidney has been poorly understood. The original studies constituting the doctoral thesis described the changes at the molecular level for the most important Hippo pathway elements. The obtained results together with clinical data allowed to formulate the following conclusions:

- The increase in mRNA and protein levels for *YAP1* and the higher degree of hypermethylation of promoter regions for *LATS1* correlate with shorter survival times and shortened progression-free survival for patients with ccRCC.
- The prognostic value according to the Cox model for patients with clear cell renal cell carcinoma was determined both for the mRNA level for *YAP1* gene in combination with the degree of tumor progression according to the Fuhrman scale.
- Hypermethylation of promoter of *LATS1* is probably the main epigenetic regulator of the expression of this gene in ccRCC.
- Further studies to check whether the mRNA assessment of *YAP1* gene in tumor ccRCC tissues may be treated as an independent prognostic factor in ccRCC are proposed.

DOROBIEK NAUKOWY

1. Oryginalne opublikowane naukowe prace twórcze:

- A. Piotrowska, J. Wierzbicka, A. Rybarczyk, R.C. Tuckey, A.T. Słomiński, M. Żmijewski (2019). Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and decarbazine in the human melanoma A375 cell line. *Int. J. Oncol.*; vol 54, nr 4, s. 1481-1495.
- A. Rybarczyk, J. Kłacz, A. Wrońska, M. Matuszewski, Z. Kmiec, P. Wierzbicki (2017). Overexpression of the YAP1 oncogene in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor outcome. *Oncol. Rep.*; vol. 38, nr 1, s. 427-439.
- J. Kłacz, P. M. Wierzbicki, A. Wrońska, A. Rybarczyk, M. Stanisławowski, T. Ślebioda, A. Olejniczak, M. Matuszewski, Z. Kmiec (2016). Decreased expression of RASSF1A tumor suppressor gene is associated with worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Oncol.*; vol. 48, nr 1, s. 55-66.
- P.M. Wierzbicki, J. Kłacz, A. Rybarczyk, T. Ślebioda, M. Stanisławowski, A. Wrońska, A. Kowalczyk, M. Matuszewski, Z. Kmiec (2014). Identification of a suitable qPCR reference gene in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Tumor Biol.*; t. 35, nr 12, s. 12473-12487.
- P. Wierzbicki, M. Kogut-Wierzbicka, J. Ruczyński, K. Siedlecka-Kroplewska, L. Kaszubowska, A. Rybarczyk, M. Alenowicz, P. Rekowski, Z. Kmiec (2014). Protein and siRNA delivery by transportan and transportan 10 into colorectal cancer cell line. *Folia Histochem. Cytobiol.* Vol. 52, nr 4, s. 270-280.

2. Pozostałe publikacje: (prace kazuistyczne, prace poglądowe, prace popularno - naukowe)

- A. Rybarczyk, P. Wierzbicki, A. Kowalczyk, Z. Kmiec. (2014) Rola szlaku Hippo w kontroli proliferacji komórkowej i wielkości narządów oraz jego zaburzenia w chorobach nowotworowych. *Post. Hig. Med. Dośw.* (online); vol. 68, s. 503-515
- P. M. Wierzbicki, A. Rybarczyk (2015) The Hippo pathway in colorectal cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.*; vol. 53, nr 2, s. 105-119.
- Z. Kmiec, P. Wierzbicki, A. Śliwińska-Jewsiewicka, K. Kirstein-Smardzewska, A. Ławniczak, A. Rybarczyk, M. Wierzbicki (2010) The role of toll-like receptor 5 in normal and pathological immune responses. *Ann. Acad. Med. Gedan.* T. 40, s.155-165.
- A. Piotrowska, A. Rybarczyk, P. Wierzbicki, M. Kotwas, A. Wrońska, Z. Kmiec (2009) Interferencja RNA – mechanizm i możliwości terapeutycznego wykorzystania. *Pol. Ann. Med.* t. 16, nr 1, s. 138-147

3. Opublikowane streszczenia zjazdowe:

- Wierzbicki P., Kłacz J., Kotulak-Chrząszcz A., Wrońska A., Stanisławowski M., Rybarczyk A., Ludziejewska A., Matuszewski M., Kmiec Z. (2018) Analiza wartości prognostycznych genów VHL, HIF-1A, HIF-2A i VEGFA w raku jasno komórkowym nerki 52. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa

Histochemików i Cytochemików : Immunohistochemia i biologia molekularna w morfologii, Białystok, 13-16 września 2018 : streszczenia prezentacji ustnych oraz plakatuowych s.84-85

- Wierzbicki P., Rybarczyk A., Guzek M., Wrońska A., Stanisławowski M., Ślebioda T., Kobiela J. Altered expression of RASSF1A and YAP1 genes are associated with the progression of colorectal cancer (2018) Przegl. Gastroenterol. Supl. 1 s 89-90. XVIII Kongres Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Warszawa, 20-22 września 2018
- Wierzbicki P., Rybarczyk A., Wrońska A., Stanisławowski M., Kłacz J., Ślebioda T., Matuszewski M., Kmiec Z. (2017) Altered expression of RASSF1A and YAP1 genes is associated with progression of clear cell renal cell carcinoma. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry "From molecules to diseases" : ICHC 2017, Turkey, Antalya, May 18-21, 2017 : abstract book s. 283
- Wierzbicki P., Kłacz J., Rybarczyk A., Stanisławowski M., Ślebioda T., Wrońska A., Olejniczak A., Matuszewski M., Kmiec Z. (2016) The elements of the Hippo pathway are deregulated in clear-cell renal cell carcinoma 50 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików : Od przeszłości do teraźniejszości..., Wojanów, 5-8 września 2016, Książka abstraktów s 71
- Kłacz J., Wierzbicki P., Rybarczyk A., Stanisławowski M., Ślebioda T., Wrońska A., Kmiec Z., Matuszewski M. (2015) Analysis of alternative signaling pathway in clear-cell renal cell carcinoma: first announcement. World J. Urol. Vol 33, suppl. 1 s 110. 35th Congress of the Société Internationale d'Urologie, Melbourne, Australia, October 15-18, 2015
- Kłacz J., Wierzbicki P., Stanisławowski M., Wrońska A., Ludziejewska A., Rybarczyk A., Kmiec Z., Matuszewski M. (2015) Expression analysis of VHL, HIF1A and VEGF-A in clinical samples of clear-cell renal cell carcinoma. World J. Urol. Vol 33, suppl. 1 s 158. 35th Congress of the Société Internationale d'Urologie, Melbourne, Australia, October 15-18, 2015
- Kłacz J., Wierzbicki P., Stanisławowski M., Wrońska A., Ludziejewska A., Rybarczyk A., Krukowski J., Kmiec Z., Matuszewski M. (2015) Analiza ekspresji genów VHL, HIF1A i VEGF-A w próbkach klinicznych raka jasnokomórkowego nerki. Centr. Eur. J. Urol. Vol 68, suppl 1 s.36-37 The 45th Scientific Congress of the Polish Urological Association, Warsaw, Poland, September 17-19, 2015
- Kłacz J., Michajłowski J., Matuszewski M., Wierzbicki P., Rybarczyk A., Stanisławowski M., Ślebioda T., Wrońska A., Kmiec Z. (2014) Analiza szlaku Hippo u chorych na raka jasnokomórkowego nerki. Centr. Eur. J. Urol. Vol 67, suppl.1 s 60-61. The 44th Scientific Congress of the Polish Urological Association, Warsaw, Poland, September 4-6, 2014
- Kłacz J., Wierzbicki P., Rybarczyk A., Stanisławowski M., Ślebioda T., Wrońska A., Kmiec Z., Matuszewski M. (2014) Hippo signaling pathway in clear-cell renal cell carcinoma. Eur. Urol. Suppl. Vol. 13, nr 6 s e1399 (document elektroniczny)

EAU 14th Central European Meeting (CEM), Cracow, Poland, 10-12 October 2014

- Kłacz J., Wierzbicki P., Rybarczyk A., Stanisławowski M., Kowalczyk A., Kmiec Z., Matuszewski M. (2014) The search for new prognostic factors for patients with ccRCC : new markers found. Eur. Urol. Suppl. Vol. 13, nr 6 s e1401 (document elektroniczny) EAU 14th Central European Meeting (CEM), Cracow, Poland, 10-12 October 2014
- Kłacz J., Michajłowski J., Matuszewski M., Wierzbicki P., Kmiec Z., Rybarczyk A., Stanisławowski M., Kowalczyk A. (2013) Poszukiwanie nowych markerów genetycznych jako czynników prognostycznych raka jasnokomórkowego nerki : prezentacja pierwszych wyników. Cetr. Eur. J. Urol. Suppl. 1, s 57-58. The 43rd Scientific Congress of the Polish Urological Association, Jachranka, September 5-7, 2013
- Wierzbicki P., Kłacz J., Rybarczyk A., Ślebioda T., Stanisławowski M., Kartanowicz D., Matuszewski M. (2013) TP53-independent apoptotic pathway in clear cell renal cell carcinoma : in vitro and in vivo studies. XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: From labs to clinics : common aim, various techniques, with Satellite Symposium: Modulating the structure of the adipocyte in response to changes in energy balance, Olsztyn, 4-6 September, 2013 : abstracts s. 95-96
- Rybarczyk A., Wierzbicki P., Kłacz J., Stanisławowski M., Matuszewski M., Kmiec Z. (2013) YAP1 (Yes associated protein 1) gene expression analysis in clear cell renal cell carcinoma. XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: From labs to clinics : common aim, various techniques, with Satellite Symposium: Modulating the structure of the adipocyte in response to changes in energy balance, Olsztyn, 4-6 September, 2013 : abstracts s. 85-86

PIŚMIENNICTWO

REFERENCES

1. Gupta, K.; Miller, J.D.; Li, J.Z.; Russell, M.W.; Charbonneau, C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): A literature review. *Cancer Treat. Rev.* **2008**, *34*, 193–205, doi:10.1016/j.ctrv.2007.12.001.
2. Akhtar, M.; Al-Bozom, I.A.; Al Hussain, T. Molecular and Metabolic Basis of Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Adv. Anat. Pathol.* **2018**, *25*, 1, doi:10.1097/PAP.000000000000185.
3. Zhao, B.; Tumaneng, K.; Guan, K.-L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 877–883, doi:10.1038/ncb2303.
4. Varelas, X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* **2014**, *141*, 1614–1626, doi:10.1242/dev.102376.
5. Yu, F.-X.; Zhao, B.; Guan, K.-L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **2015**, *163*, 811–828, doi:10.1016/j.cell.2015.10.044.
6. Zhao, B.; Li, L.; Lei, Q.; Guan, K.-L. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 862–74, doi:10.1101/gad.1909210.
7. Zhao, B.; Lei, Q.-Y.; Guan, K.-L. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 638–46, doi:10.1016/j.ceb.2008.10.001.
8. Matallanas, D.; Romano, D.; Yee, K.; Meissl, K.; Kucerova, L.; Piazzolla, D.; Baccarini, M.; Vass, J.K.; Kolch, W.; O’neill, E. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 962–75, doi:10.1016/j.molcel.2007.08.008.
9. Keshet, R.; Adler, J.; Ricardo Lax, I.; Shanzer, M.; Porat, Z.; Reuven, N.; Shaul, Y. c-Abl antagonizes the YAP oncogenic function. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 935–45, doi:10.1038/cdd.2014.182.
10. Li, H.; Wolfe, A.; Septer, S.; Edwards, G.; Zhong, X.; Abdulkarim, A.B.; Ranganathan, S.; Apte, U. Deregulation of Hippo kinase signalling in human hepatic malignancies. *Liver Int.* **2012**, *32*, 38–47, doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02646.x.
11. Wang, Y.; Xie, C.; Li, Q.; Xu, K.; Wang, E. Clinical and prognostic significance of Yes-associated protein in colorectal cancer. *Tumor Biol.* **2013**, *34*, 2169–2174, doi:10.1007/s13277-013-0751-x.
12. Wang, Y.; Dong, Q.; Zhang, Q.; Li, Z.; Wang, E.; Qiu, X. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 1279–85, doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01511.x.
13. Cao, J.-J.; Zhao, X.-M.; Wang, D.-L.; Chen, K.-H.; Sheng, X.; Li, W.-B.; Li, M.-C.;

- Liu, W.-J.; He, J. YAP is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma and its knockdown reduces cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol. Rep.* **2014**, 32, 1594–600, doi:10.3892/or.2014.3349.
14. Protzel, C.; Maruschke, M.; Hakenberg, O.W. Epidemiology, Aetiology, and Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol. Suppl.* **2012**, 11, 52–59, doi:10.1016/J.EURSUP.2012.05.002.
15. Amin, M.B.; Amin, M.B.; Tamboli, P.; Javidan, J.; Stricker, H.; de-Peralta Venturina, M.; Deshpande, A.; Menon, M. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **2002**, 26, 281–91.
16. Lipworth, L.; Tarone, R.E.; Lund, L.; McLaughlin, J.K. Epidemiologic characteristics and risk factors for renal cell cancer. *Clin. Epidemiol.* **2009**, 1, 33–43.
17. Justice, R.W.; Zilian, O.; Woods, D.F.; Noll, M.; Bryant, P.J. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* **1995**, 9, 534–46.
18. Dong, J.; Feldmann, G.; Huang, J.; Wu, S.; Zhang, N.; Comerford, S.A.; Gayyed, M.F.; Anders, R.A.; Maitra, A.; Pan, D. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* **2007**, 130, 1120–33, doi:10.1016/j.cell.2007.07.019.
19. Liu, H.; Jiang, D.; Chi, F.; Zhao, B. The Hippo pathway regulates stem cell proliferation, self-renewal, and differentiation. *Protein Cell* **2012**, 3, 291–304, doi:10.1007/s13238-012-2919-3.
20. Nakatani, K.; Maehama, T.; Nishio, M.; Goto, H.; Kato, W.; Omori, H.; Miyachi, Y.; Togashi, H.; Shimono, Y.; Suzuki, A. Targeting the Hippo signalling pathway for cancer treatment. *J. Biochem.* **2016**, 161, mvw074, doi:10.1093/jb/mvw074.
21. Callus, B.A.; Verhagen, A.M.; Vaux, D.L. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J.* **2006**, 273, 4264–76, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x.
22. Praskova, M.; Khoklatchev, A.; Ortiz-Vega, S.; Avruch, J. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem. J.* **2004**, 381, 453–62, doi:10.1042/BJ20040025.
23. Wu, S.; Huang, J.; Dong, J.; Pan, D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* **2003**, 114, 445–56.
24. Hao, Y.; Chun, A.; Cheung, K.; Rashidi, B.; Yang, X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 5496–509, doi:10.1074/jbc.M709037200.
25. Fallahi, E.; O’Driscoll, N.A.; Matallanas, D. The MST/Hippo Pathway and Cell Death: A Non-Canonical Affair. *Genes (Basel)*. **2016**, 7, 28, doi:10.3390/genes7060028.
26. Stein, C.; Bardet, A.F.; Roma, G.; Bergling, S.; Clay, I.; Ruchti, A.; Agarinis, C.; Schmelzle, T.; Bouwmeester, T.; Schübeler, D.; et al. YAP1 Exerts Its Transcriptional

- Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005465, doi:10.1371/journal.pgen.1005465.
27. Mo, J.-S.; Park, H.W.; Guan, K.-L. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 642–56, doi:10.15252/embr.201438638.
28. Kodaka, M.; Hata, Y. The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 285–306, doi:10.1007/s00018-014-1742-9.
29. O'Neill, E.; Rushworth, L.; Baccarini, M.; Kolch, W. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* **2004**, *306*, 2267–70, doi:10.1126/science.1103233.
30. Lapi, E.; Di Agostino, S.; Donzelli, S.; Gal, H.; Domany, E.; Rechavi, G.; Pandolfi, P.P.; Givol, D.; Strano, S.; Lu, X.; et al. PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 803–14, doi:10.1016/j.molcel.2008.11.019.
31. Gokul, G.; Khosla, S. DNA Methylation and Cancer. In; Springer, Dordrecht, 2013; pp. 597–625.
32. Feinberg, A.P.; Tycko, B. The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 143–153, doi:10.1038/nrc1279.
33. Hatziapostolou, M.; Iliopoulos, D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 1681–1702, doi:10.1007/s00018-010-0624-z.
34. Baylin, S.B.; Höppener, J.W.; de Bustros, A.; Steenbergh, P.H.; Lips, C.J.; Nelkin, B.D. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 2917–22.
35. Greger, V.; Passarge, E.; Höpping, W.; Messmer, E.; Horsthemke, B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum. Genet.* **1989**, *83*, 155–8.
36. Wierzbicki, P.M.; Klacz, J.; Rybarczyk, A.; Slebiada, T.; Stanislawowski, M.; Wronska, A.; Kowalczyk, A.; Matuszewski, M.; Kmiec, Z. Identification of a suitable qPCR reference gene in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 12473–87, doi:10.1007/s13277-014-2566-9.
37. Klacz, J.; Wierzbicki, P.M.; Wronska, A.; Rybarczyk, A.; Stanislawowski, M.; Slebiada, T.; Olejniczak, A.; Matuszewski, M.; Kmiec, Z. Decreased expression of RASSF1A tumor suppressor gene is associated with worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*, 55–66, doi:10.3892/ijo.2015.3251.
38. Udan, R.S.; Kango-Singh, M.; Nolo, R.; Tao, C.; Halder, G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 914–20, doi:10.1038/ncb1050.
39. Huang, J.; Wu, S.; Barrera, J.; Matthews, K.; Pan, D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* **2005**, *122*, 421–34, doi:10.1016/j.cell.2005.06.007.

40. Oh, H.; Irvine, K.D. Yorkie: the final destination of Hippo signaling. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 410–7, doi:10.1016/j.tcb.2010.04.005.
41. Ren, F.; Zhang, L.; Jiang, J. Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Dev. Biol.* **2010**, *337*, 303–12, doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.046.
42. Reddy, B.V.V.G.; Rauskolb, C.; Irvine, K.D. Influence of fat-hippo and notch signaling on the proliferation and differentiation of Drosophila optic neuroepithelia. *Development* **2010**, *137*, 2397–408, doi:10.1242/dev.050013.
43. Simon, M.A.; Xu, A.; Ishikawa, H.O.; Irvine, K.D. Modulation of fat:dachsous binding by the cadherin domain kinase four-jointed. *Curr. Biol.* **2010**, *20*, 811–7, doi:10.1016/j.cub.2010.04.016.
44. Baumgartner, R.; Poernbacher, I.; Buser, N.; Hafen, E.; Stocker, H. The WW domain protein Kibra acts upstream of Hippo in Drosophila. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 309–16, doi:10.1016/j.devcel.2009.12.013.
45. Hamaratoglu, F.; Willecke, M.; Kango-Singh, M.; Nolo, R.; Hyun, E.; Tao, C.; Jafar-Nejad, H.; Halder, G. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 27–36, doi:10.1038/ncb1339.
46. Oh, H.; Reddy, B.V.V.G.; Irvine, K.D. Phosphorylation-independent repression of Yorkie in Fat-Hippo signaling. *Dev. Biol.* **2009**, *335*, 188–197, doi:10.1016/j.ydbio.2009.08.026.
47. Chen, C.-L.; Gajewski, K.M.; Hamaratoglu, F.; Bossuyt, W.; Sansores-Garcia, L.; Tao, C.; Halder, G. The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 15810–15815, doi:10.1073/pnas.1004060107.
48. Halder, G.; Johnson, R.L. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* **2011**, *138*, 9–22, doi:10.1242/dev.045500.
49. Zhao, B.; Ye, X.; Yu, J.; Li, L.; Li, W.; Li, S.; Yu, J.; Lin, J.D.; Wang, C.-Y.; Chinnaiyan, A.M.; et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1962–71, doi:10.1101/gad.1664408.
50. Strano, S.; Monti, O.; Pediconi, N.; Baccarini, A.; Fontemaggi, G.; Lapi, E.; Mantovani, F.; Damalas, A.; Citro, G.; Sacchi, A.; et al. The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 447–59, doi:10.1016/j.molcel.2005.04.008.
51. Zaidi, S.K.; Sullivan, A.J.; Medina, R.; Ito, Y.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Lian, J.B.; Stein, G.S. Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. *EMBO J.* **2004**, *23*, 790–9, doi:10.1038/sj.emboj.7600073.
52. Xu, Z.P.; Zhu, J.S.; Zhang, Q.; Wang, X.Y. A Breakdown of the Hippo Pathway in Gastric Cancer. *Hepatogastroenterology* **2011**, *58*, 1611–7, doi:10.5754/hge10669.
53. Kang, W.; Tong, J.H.M.; Chan, A.W.H.; Lee, T.-L.; Lung, R.W.M.; Leung, P.P.S.; So, S.

- K.K.Y.; Wu, K.; Fan, D.; Yu, J.; et al. Yes-associated protein 1 exhibits oncogenic property in gastric cancer and its nuclear accumulation associates with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2130–9, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2467.
54. Ji, D.; Deeds, S.L.; Weinstein, E.J. A screen of shRNAs targeting tumor suppressor genes to identify factors involved in A549 paclitaxel sensitivity. *Oncol. Rep.* **2007**, *18*, 1499–505.
55. Kawahara, M.; Hori, T.; Chonabayashi, K.; Oka, T.; Sudol, M.; Uchiyama, T. Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. *Blood* **2008**, *112*, 3856–3866, doi:10.1182/blood-2007-09-111773.
56. Zhao, B.; Li, L.; Lu, Q.; Wang, L.H.; Liu, C.-Y.; Lei, Q.; Guan, K.-L. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 51–63, doi:10.1101/gad.2000111.
57. Oka, T.; Remue, E.; Meerschaert, K.; Vanloo, B.; Boucherie, C.; Gfeller, D.; Bader, G.D.; Sidhu, S.S.; Vandekerckhove, J.; Gettemans, J.; et al. Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* **2010**, *432*, 461–72, doi:10.1042/BJ20100870.
58. Remue, E.; Meerschaert, K.; Oka, T.; Boucherie, C.; Vandekerckhove, J.; Sudol, M.; Gettemans, J. TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 4175–80, doi:10.1016/j.febslet.2010.09.020.
59. Schlegelmilch, K.; Mohseni, M.; Kirak, O.; Pruszek, J.; Rodriguez, J.R.; Zhou, D.; Kreger, B.T.; Vasioukhin, V.; Avruch, J.; Brummelkamp, T.R.; et al. Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* **2011**, *144*, 782–95, doi:10.1016/j.cell.2011.02.031.
60. Batra, H.; Antony, V.B. The pleural mesothelium in development and disease. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 284, doi:10.3389/fphys.2014.00284.
61. Sokol, S.Y. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development* **2011**, *138*, 4341–4350, doi:10.1242/dev.066209.
62. Varelas, X.; Miller, B.W.; Sopko, R.; Song, S.; Gregorieff, A.; Fellouse, F.A.; Sakuma, R.; Pawson, T.; Hunziker, W.; McNeill, H.; et al. The Hippo Pathway Regulates Wnt/ β -Catenin Signaling. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 579–591, doi:10.1016/j.devcel.2010.03.007.
63. Hong, X.; Nguyen, H.T.; Chen, Q.; Zhang, R.; Hagman, Z.; Voorhoeve, P.M.; Cohen, S.M. Opposing activities of the Ras and Hippo pathways converge on regulation of YAP protein turnover. *EMBO J.* **2014**, *33*, 2447–57, doi:10.15252/embj.201489385.
64. Song, S.; Honjo, S.; Jin, J.; Chang, S.-S.; Scott, A.W.; Chen, Q.; Kalhor, N.; Correa, A.M.; Hofstetter, W.L.; Albarracin, C.T.; et al. The Hippo Coactivator YAP1 Mediates EGFR Overexpression and Confers Chemoresistance in Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 2580–2590, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2191.
65. Camargo, F.D.; Gokhale, S.; Johnnidis, J.B.; Fu, D.; Bell, G.W.; Jaenisch, R.; Brummelkamp, T.R. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 2054–60, doi:10.1016/j.cub.2007.10.039.

66. Vermeulen, L.; Snippert, H.J. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 468–480, doi:10.1038/nrc3744.
67. Cai, J.; Zhang, N.; Zheng, Y.; de Wilde, R.F.; Maitra, A.; Pan, D. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 2383–8, doi:10.1101/gad.1978810.
68. Zhang, C.; Liang, K.; Zhou, G.; Zhang, Q.; Li, J. Expression of hippo pathway in colorectal cancer. *Saudi J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 188, doi:10.4103/1319-3767.133025.
69. Yuen, H.-F.; McCrudden, C.M.; Huang, Y.-H.; Tham, J.M.; Zhang, X.; Zeng, Q.; Zhang, S.-D.; Hong, W. TAZ expression as a prognostic indicator in colorectal cancer. *PLoS One* **2013**, *8*, e54211, doi:10.1371/journal.pone.0054211.
70. Lee, K.-W.; Lee, S.S.; Kim, S.-B.; Sohn, B.H.; Lee, H.-S.; Jang, H.-J.; Park, Y.-Y.; Kopetz, S.; Kim, S.S.; Oh, S.C.; et al. Significant association of oncogene YAP1 with poor prognosis and cetuximab resistance in colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 357–64, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1374.

**PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

PUBLICATIONS INCLUDED IN THE PhD DISSERTATION