



*Ministero dell'Università
e della Ricerca Scientifica*



*Università degli Studi
di Palermo*

**PhD Programme in Experimental and Applied Medical Sciences and
Biotechnology:**

**Genomics and Proteomics applied to Oncological and Endocrine-
Metabolic research**

Graduation year 2016

**DIVERSIFICATION OF HIPPO SIGNALING COMPONENTS
IN SELECTED METAZOAN SPECIES**

PhD Thesis by:
Rosalia La Tona

Director of PhD Programme:
Prof.ssa Carla Giordano

Supervisor:
Prof.ssa Carla Giordano

Advisor:
Dott.ssa Maria Grazia Di Bernardo

Abstract

The Hippo signalling pathway plays a key role in organ size control, regulating cell proliferation, apoptosis and stemness. In addition, this pathway is deregulated in many types of cancer. Hippo pathway has been named from one of its key signalling components, the *Drosophila melanogaster* protein kinase Hippo (Hpo). *Hippo* gene mutations lead to tissue overgrowth and enormous organ development. First discovered in *Drosophila*, many Hippo pathway components have been identified in mammals. The mammalian Hippo pathway core machinery consists of the protein kinases Mst1/2, also called STK3/4, and Lats1/2, respectively homologues of *Drosophila* Hpo and Warts (Wts), and of the regulatory proteins SAV1, and Mob1, the mammalian orthologs of Sav, and Mats. The downstream effectors are the coactivators YAP/TAZ (Yorkie) and the transcription factors TEAD1-4 (Scalloped).

When Hippo signaling is ON, YAP/TAZ are phosphorylated and sequestered in the cytoplasm, where they can be subjected to proteasome-mediated degradation. When Hippo signaling is OFF, non-phosphorylated YAP/TAZ enter the nucleus and, interacting with TEAD transcription factors, drive target gene expression and promote cell proliferation.

Hippo pathway responds to a wide and complex range of *stimuli*, and a number of molecules act as upstream regulators. One of the upstream members is KIBRA, “KIDney and BRAin expressed protein”, also called WWC1 (Kibra), which once bound to Merlin/NF2, stimulates Lats1/2 phosphorylation.

I have analyzed the evolutionary conservation of some selected orthologous proteins and genes participating in the Hippo signaling pathway, in Metazoan organisms belonging to different *phyla*. Hippo-like components were identified by the use of the basic sequence tools (blastp blastn, tblastn) and the domain structures were inspected with the web-based programs Conserved Domain Database, InterPro, SMART and Eukaryotic Linear Motif. Amino acid or nucleotide sequences were aligned with Clustal Omega, EMBOSS, COBALT, and phylogenetic analyses were performed by the estimation of Maximum Likelihood (ML) trees and the use of Guidance and MEGA6.

Notably, I placed emphasis in Hippo members of Echinodermata, which occupy a key position in the tree of life at the base of the deuterostome branch, and represent the sister group of chordates. Sea urchins, among the most representative members of this animal clade, have become important experimental models in developmental biology, functional genomics, ecology and molecular evolution, giving an essential contribute about the emergence of the chordate body plans within the deuterostome lineage. I have identified Mst/Stk, Lats, KIBRA, YAP, and TEAD of the sea urchin species *Strongylocentrotus purpuratus* and *Paracentrotus lividus*, and compared them to the orthologous proteins of selected Metazoa. As expected, results show that Hippo pathway members in

sea urchins display higher similarity to chordate deuterostome than to protostome counterparts, confirming that the sea urchin “gene-toolkit” is highly similar to the related proteins of the deuterostome group. In addition, results showing relationships among proteins and protein domains of different selected *taxa* were obtained by the estimation of the derived phylogenetic trees.

This analysis can be considered preparatory to molecular and functional studies to be conducted using the sea urchin embryonic model, aiming at discovering how Hippo signaling pathway has been coopted in cell specification events that guide early development, including the embryonic epithelial to mesenchymal transition.



*Ministero dell'Istruzione, dell'Università
e della Ricerca*



*Università degli Studi
di Palermo*

**Dottorato di Ricerca in
Scienze e Biotecnologie Mediche Sperimentali e Applicate:
indirizzo in Genomica e Proteomica nella Ricerca Oncologica ed
Endocrino-metabolica**

Ciclo XXV: 2012-2014
Settore Scientifico Disciplinare: MED/13

**ANALISI MOLECOLARE COMPARATIVA DI COMPONENTI
DEL PATHWAY "HIPPO" NEI METAZOI**

Tesi di Dottorato di:
Rosalia La Tona

Rosalia La Tona

Coordinatore:

Prof.ssa Carla Giordano

Tutor:

Prof.ssa Carla Giordano

Co-tutor:

Dott.ssa Maria Di Bernardo

Abstract

La via di segnalazione intracellulare conosciuta come *Hippo pathway* svolge un ruolo chiave nei processi che regolano il controllo della dimensione degli organi, la proliferazione, l'apoptosi, il mantenimento delle caratteristiche di staminalità cellulare. Alterazioni nel *pathway* sono state descritte in molti tipi di tumori. Il nome deriva da una delle sue componenti principali, la proteina chinasi Hippo (Hpo), identificata per la prima volta in *Drosophila melanogaster*. Mutazioni nel gene Hpo inducevano la crescita abnorme di tessuti e organi.

Componenti del *pathway* Hippo sono stati successivamente individuati anche nei mammiferi. Gli elementi fondamentali sono costituiti dalle proteine chinasi MST1/2 (denominate anche STK3/4) e Lats1/2, omologhe rispettivamente di Hpo e Warts (Wts) di *Drosophila* e dalle proteine regolatrici SAV1 e Mob1, (Sav e Mats in *D. melanogaster*). A valle di questa cascata sono i co-attivatori YAP/TAZ (Yorkie) e i fattori della trascrizione TEAD1-4 (Scalloped).

Quando la via di segnalazione Hippo è attiva, gli effettori YAP/TAZ vengono fosforilati e sequestrati nel citoplasma dove possono essere sottoposti a degradazione da parte del complesso proteasomico; quando invece i segnali sono spenti, YAP/TAZ entrano nel nucleo e, interagendo con i fattori di trascrizione TEAD, inducono l'espressione dei geni bersaglio e promuovono la proliferazione cellulare.

Il segnali che regolano a monte la cascata di chinasi sono numerosi e complessi. Tra i regolatori identificati vi è KIBRA, "KIDney and BRAin", chiamata anche WWC1 (Kibra), che in complesso con Merlin/NF2, favorisce la fosforilazione di Lats1/2.

Il lavoro condotto durante il mio percorso di studi riguarda l'analisi *in silico* di alcune proteine e geni ortologhi coinvolti nella via di segnalazione *Hippo* in organismi animali appartenenti a diversi *phyla*. A questo scopo ho utilizzato strumenti per l'identificazione di sequenze nucleotidiche o amminoacidiche (blastp blastn, tblastn) e per lo studio dei domini strutturali delle proteine (Conserved Domain Database, InterPro, SMART and Eukaryotic Linear Motif). Le sequenze sono state allineate mediante l'uso di Clustal Omega, EMBOSS, COBALT e l'analisi filogenetica è stata eseguita costruendo i rispettivi alberi (Maximum Likelihood, ML) con l'ausilio dei programmi Guidance e MEGA6.

In particolare, ho posto la mia attenzione sull'analisi di componenti del *pathway* Hippo nel *phylum* degli Echinodermi. Gli Echinodermi occupano una posizione chiave nell'albero evolutivo, sono posti alla base del ramo dei deuterostomi e costituiscono uno dei gruppi affini ai cordati. I ricci di mare sono tra i membri più rappresentativi di questo gruppo di animali. Hanno acquisito nel tempo grande importanza come modello sperimentale negli studi di biologia dello sviluppo, genomica funzionale, ecologia ed evoluzione molecolare, fornendo un contributo essenziale alla conoscenza dei

meccanismi evolutivi che hanno dato origine alla diversità delle diverse forme animali, in particolare dei deuterostomi.

Dopo aver identificato Mst/Stk, Lats, Kibra, YAP e TEAD utilizzando le banche dati dei ricci di mare *Strongylocentrotus purpuratus* e *Paracentrotus lividus* attualmente disponibili, ne ho confrontato le sequenze con quelle di vari gruppi di Metazoi. In generale, i risultati ottenuti hanno dimostrato che proteine e geni di riccio di mare sono più simili ed affini a quelli dei cordati deuterostomi che ad ortologi di organismi ritenuti filogeneticamente più distanti. Sulla base delle relazioni tra le sequenze proteiche o dei singoli domini funzionali, ho potuto inoltre costruire e fare una stima dei corrispondenti alberi filogenetici.

Questa analisi può essere considerata propedeutica a studi molecolari e funzionali da condurre utilizzando il modello embrione riccio di mare. L'analisi molecolare e funzionale di membri del *pathway* Hippo in questo sistema potrebbe fornire indicazioni preziose sul ruolo che questa via di segnalazione svolge nei processi di specificazione cellulare che guidano gli eventi precoci dello sviluppo e sul loro coinvolgimento nella transizione epitelio-mesenchimale embrionale.