

**Learning from the fly:
Oncogenic JNK signaling is linked to
Hippo pathway via its downstream effectors
Cheerio and Ftz-F1**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Merve Kılınç

aus Istanbul-Bakırköy, Türkei

Köln 2018

Gutachter:

Prof. Dr. Mirka Uhlirova

Prof. Dr. Rudolf Wiesner

Tag der mündlichen Prüfung: 18. April 2018

Abstract

Tumor formation and progression is a multistep process that arises from the aberrant activities of signaling networks that normally orchestrate cellular events in response to extrinsic and intrinsic stimuli. Deregulation of multiple signaling activities endows cells with tumor hallmarks to sustain oncogenic functions, including increased cell proliferation and invasion. The Jun-N-terminal kinase (JNK) signaling pathway plays a crucial role in tumorigenesis. Involved in both pro- and anti-tumorigenic response, JNK cooperates with other signaling pathways to promote proliferation, survival and invasive capability of tumor cells. The Hippo (Hpo) signaling is a kinase cascade that particularly regulates tissue growth, cell proliferation, and survival. In the present study, we used the established epithelial tumor model in *Drosophila* to understand the mechanisms that might link JNK to Hpo signaling that is responsible for malignant transformation.

In the first part, we focus on the Actin-crosslinking protein Cheerio (Cher) that is upregulated in malignant *ras*^{V12}*scrib*¹ tumors in a JNK-dependent manner, and that mediates tumor growth and malignancy by regulating Hpo/Yki signaling activity. We identify two possible underlying mechanisms that link Cher to tumor growth: (1) As an Actin cross-linking protein, Cher increases cytoskeletal tension, which correlates with tumor growth. Additionally, as a mechanosensitive protein, three-dimensional conformation of Cher regulates tumor growth. The mechanosensitive mutant Cher protein having an open state or lacking its mechanosensitive region (MSR) maintain the increased tumor size, whereas the closed state inhibits tumor growth. (2) As a scaffold protein, Cher interacts with proteins that regulate the Hpo signaling activity. Using an unbiased biochemical approach, we identify the PDZ domain protein Big bang (Bbg) and the negative regulator of Yki, 14-3-3 protein as novel interaction partners of Cher. We demonstrate that Cher-Bbg interaction requires the MSR which alters the cellular localization of Bbg in tumor context. On the other hand, Cher and 14-3-3 physically interact irrespective of mechanosensing function of Cher. Genetic interaction studies show that removal of 14-3-3 from *cher*-depleted tumors restores tumor growth and invasiveness, similar to phenotypes that are reestablished by Yki activation. Conversely, 14-3-3 overexpression in *ras*^{V12}*scrib*¹ tumors phenocopies Cher loss, as reflected by downregulation of Yki targets, reduced tumor mass and malignancy, and improved animal viability. However, the forced activation of known growth promoting pathways, including Hpo/Yki signaling, do not reestablish tumor growth and malignancy in 14-3-3 overexpressing clones, suggesting that 14-3-3 exerts its tumor suppressive effects through an alternative or combinatorial mechanism.

In the second part, we study the function of the nuclear receptor Fushi Tarazu Factor 1 (Ftz-F1), as a novel oncogene that promotes tumor growth and malignancy downstream of JNK signaling and regulate Hpo/Yki target transcription. Although Ftz-F1 does not cooperate with oncogenic Ras^{V12} to

drive malignancy, its context-dependent expression switches between proliferative and apoptotic states, indicating that Ftz-F1 might have a dual function during tumor development. Moreover, gain or loss of function experiments mostly cause developmental defects in flies, suggesting that Ftz-F1 has crucial roles during development in addition to its oncogenic activity. Collectively, our study provides novel insights into oncogenic functions of two novel proteins, Cher and Ftz-F1, that link JNK to Hpo signaling.

Zusammenfassung

Tumorbildung und -entwicklung ist ein mehrstufiger Prozess, der von den anormalen Aktivitäten von Signalnetzwerken herrührt, die normalerweise zelluläre Ereignisse als Reaktion auf extrinsische und intrinsische Stimuli schalten. Die Deregulierung multipler Signalwege verleiht den Zellen Tumormerkmale, die onkogene Funktionen begünstigen, einschließlich erhöhter Zellproliferation und Gewebeinvasion. Der Jun-N-terminale Kinase (JNK) Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese. JNK ist sowohl an der pro- als auch an der anti-tumorigenen Reaktion beteiligt und kooperiert mit anderen Signalwegen, um die Proliferation, das Überleben und die invasive Fähigkeit von Tumorzellen zu fördern. Der Hippo (Hpo) -Signalweg basiert auf einer Kinsekaskade, die insbesondere das Gewebewachstum, die Zellteilung und den Tumorfortbestand reguliert. In der vorliegenden Studie haben wir das etablierte epitheliale Tumormodell in *Drosophila* verwendet, um die Mechanismen zu verstehen, die JNK mit der für die maligne Transformation verantwortlichen Hpo-Signalübertragung verbinden könnten.

Im ersten Teil konzentrieren wir uns auf das Aktin-vernetzende Protein Cheerio (Cher), das in malignen *ras*^{V12}*scrib*¹-Tumoren JNK-abhängig hochreguliert wird und das Tumorwachstum und die Malignität durch Regulierung der Hpo / Yki-Signalkette vermittelt. Wir identifizieren zwei mögliche zugrunde liegende Mechanismen, die Cher mit dem Tumorwachstum verbinden: (1) Als Actin-Vernetzungsprotein erhöht Cher die Zytoskelettspannung, die mit dem Tumorwachstum korreliert. Darüber hinaus reguliert die dreidimensionale Konformation von Cher als mechanosensitives Protein das Tumorwachstum. Das mechanosensitive mutierte Cher-Protein, das sich im offenen Zustand befindet oder dessen mechanosensitive Region (MSR) fehlt, verändert die erhöhte TumorgroÙe nicht, wohingegen der geschlossene Zustand das Tumorwachstum inhibiert. (2) Als Gerüstprotein interagiert Cher mit Proteinen, die die Hpo-Signalaktivität regulieren. Unter Verwendung eines unvoreingenommenen biochemischen Ansatzes identifizieren wir das PDZ-Protein Big Bang (Bbg) und den negativen Regulator von Yki 14-3-3 als neue Interaktionspartner von Cher. Wir zeigen, dass Cher-Bbg-Interaktion die MSR benötigt, die die zelluläre Lokalisation von Bbg im Tumorkontext verändert. Auf der anderen Seite interagieren Cher und 14-3-3 physikalisch unabhängig von der mechanosensierenden Funktion von Cher. Genetische Interaktionsstudien zeigen, dass die Entfernung von 14-3-3 aus Cher-armen Tumoren Tumorwachstum und Invasivität wiederherstellt, ähnlich der Phänotypen, die durch Yki-Aktivierung wiederhergestellt werden. Umgekehrt stimmt die Überexpression von 14-3-3 in *ras*^{V12}*scrib*¹ Tumoren mit dem Phenotyp eines Cher-Verlustes überein. Diese beinhalten unter anderem die Runterregulation von Yki-Zielgenen, reduzierte Tumormasse, geringere Malignität und verbessertes Tierüberleben. Die erzwungene Aktivierung bekannter wachstumsfördernder Signalwege, einschließlich des Hpo / Yki-Signalweges, stellt jedoch bei 14-3-3-

überexprimierenden Klonen das Tumorwachstum und die Malignität nicht wieder her. Dies deutet darauf hin, dass 14-3-3 seine tumorsuppressive Wirkung über einen alternativen oder kombinatorischen Mechanismus ausübt.

Im zweiten Teil untersuchen wir die Funktion des nukleären Rezeptors Fushi Tarazu Faktor 1 (Ftz-F1) als neuartiges Onkogen, das Tumorwachstum und Malignität stromabwärts des JNK Signalweges fördert und die Hpo / Yki Zieltranskription reguliert. Obwohl Ftz-F1 nicht mit onkogenem Ras^{V12} kooperiert, um Malignität zu steuern, schaltet seine kontextabhängige Expression zwischen proliferativen und apoptotischen Zuständen. Diese Beobachtung legt eine Doppelfunktion von Ftz-F1 während der Tumorentwicklung nahe. Darüber hinaus führen die Überexpression als auch der Verlust von Ftz-F1 zu Entwicklungsdefekten bei Fliegen, welches eine entscheidende Rolle während der Entwicklung aufzeigt. Zusammenfassend liefert unsere Studie neue Einblicke in die onkogene Funktion zweier Proteine, Cher und Ftz-F1, die JNK mit der Hpo-Signalübertragung verbinden.