

Rola wpływu białka MCP1P1 na kluczowe elementy osi sygnalizacyjnej procesu przejścia epithelialno-mezenchymalnego w jasnokomórkowym raku nerki

STRESZCZENIE

Rak jasnokomórkowy nerki (ang. *clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC) jest najczęściej występującym nowotworem nerki o wysoce agresywnym fenotypie i złym rokowaniu. Kluczowym procesem w progresji nowotworu jest przejście epithelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), w wyniku którego komórki nabywają zdolności do przerzutowania. Ważnym induktorem procesu EMT jest stan zapalny. Negatywnym regulatorem stanu zapalnego jest białko MCP1P1 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induced Protein 1*), które regulując odpowiedź immunologiczną może przyczynić się do zahamowania progresji nowotworu. Szczególną funkcją białka MCP1P1 jest aktywność RNazowa regulująca poziom ekspresji mRNA i miRNA. W naszych badaniach sprawdzaliśmy w jaki sposób białko MCP1P1 wpływa na proces EMT, aktywność migracyjną i poziom genów supresorowych w liniach komórkowych jasnokomórkowego raka nerki, tkankach nowotworowych pacjentów i modelu ksenotransplantacji *in vivo*. Wykazaliśmy, że MCP1P1 reguluje proces EMT zapobiegając nabywaniu przez komórki fenotypu mezenchymalnego. MCP1P1, dzięki aktywności RNazowej, degradowa miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p i miRNA-520c-3p, tym samym aktywnie wpływając na poziomy inhibitorów SFRP4, KREMEN1, ZNRF3, CXXC4 i CSNK1A1 oraz hamowanie szlaku Wnt przez dezaktywację β -kateniny i w konsekwencji hamowanie procesu EMT. Ponadto, MCP1P1 reguluje poziom białek Rho, fosforylację kinaz FAK i Src, a w konsekwencji przebudowę aktywny. Uzyskane wyniki wskazują, że brak aktywności RNazowej MCP1P1 aktywuje geny i procesy związane z aktywnością migracyjną komórek nowotworowych. Podsumowując, wyniki otrzymane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wskazały, że MCP1P1 może regulować progresję jasnokomórkowego raka nerki wpływając na poziom czynników proangiogennych i prometastatycznych oraz proces EMT.

PODŁOŻE MOLEKULARNE JASNOKOMÓRKOWEGO RAKA NERKI

Rak nerkowokomórkowy (ang. *renal cell carcinoma*, RCC) odpowiada za 80-90% pierwotnych złośliwych nowotworów nerki i jest ósmym pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym u dorosłych [1]. Najczęstszym typem nowotworu nerki jest jasnokomórkowy rak nerki (ang. *clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC), stanowiący 80% wszystkich przypadków oraz około 3% wszystkich ludzkich nowotworów [2,3]. Pomimo postępów w diagnostyce, około 30% pacjentów ma przerzuty w momencie rozpoznania nowotworu, a niemal 60% w ciągu pierwszych 2-3 lat po diagnozie [4]. Najczęstszymi miejscami przerzutów są płuca, kości i mózg [5]. 5-letnie przeżycie obserwuje się nawet u 90% pacjentów z wczesną, zlokalizowaną chorobą, które spada do 12% u chorych z odległymi przerzutami [5].

Rozwój jasnokomórkowego raka nerki wynika z uwarunkowań środowiskowych i hormonalnych, a istotnie zwiększone ryzyko występowania nowotworu nerki obserwuje się u osób z predyspozycjami genetycznymi, jednak jego molekularne podłoże jest nie do końca poznane. Genetycznie, ccRCC cechuje się wysoką częstotliwością występowania mutacji, delecji lub metylacji w obrębie chromosomu 3p [6,7], najczęściej jednym lub dwoma nabytymi somatycznie wariantami pojedynczego nukleotydu lub małymi insercjami i delecjami (indelami) na megapare zasad (około 3000 do 6000 mutacji na nowotwór) [6,7]. Program TRACERx Renal, w ramach którego prospektywnie pobrano próbki tkanki nowotworowej od po-

ARTYKUŁ OPUBLIKOWANY W RAMACH

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Firmy Merck sp. z o.o. za Najlepszą Pracę Doktorską z Biochemii im. Witolda Drabikowskiego

Laureat (wyróżnienie): dr Judyta Górka

TYTUŁ ROZPRAWY: Rola wpływu białka MCP1P1 na kluczowe elementy osi sygnalizacyjnej procesu przejścia epithelialno-mezenchymalnego w jasnokomórkowym raku nerki

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Miękus, prof. UJ

dr Judyta Górka✉

dr hab. Katarzyna Miękus

Zakład Biochemii Ogólnej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

https://doi.org/10.18388/pb.2017_594

✉autor korespondujący: judyta.gorka@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: MCP1P1, szlak Wnt, β -katenina, ccRCC, nerka

Wykaz skrótów: AXIN – nazwa białka i genu kodującego białko aksynę; ccRCC – jasnokomórkowy rak nerki (ang. *clear cell renal cell carcinoma*); CSNK1A1 – izoforma α kinazy kazeinowej 1 (ang. *Casein Kinase 1 a 1*); CTNBN1 – gen kodujący białko β -katenina (ang. *cadherin-associated protein*); CXXC4 – białko z domeną palca cynkowego typu CXXC (ang. *CXXC finger protein 4*); DICER – endorybonukleaza DICER klasy III; ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*); EMT – przejście epithelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*); E-kadheryna – kadheryna nabłonkowa (ang. *epithelial cadherin*); GSK3 β – kinaza syntazy glikogenowej 3 β ; (ang. *glycogen synthase kinase 3 β*); HIF – czynnik indukowany przez hipoksję (ang. *hypoxia-inducible factor*); KREMEN1 – gen kodujący białko KREMEN1 (ang. *kringle containing transmembrane protein 1*); MCP1P1 – białko indukowane przez czynnik MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1 induced protein 1*); MMP – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinase*); N-kadheryna – kadheryna neuronalna (ang. *neural cadherin*); pre-miRNA – prekursorowe mikroRNA (ang. *precursor microRNA*); pri-miRNA – pierwotne mikroRNA (ang. *primary microRNA*); RISC – kompleks wyciszający indukowany RNA (ang. *RNA-induced silencing complex*); SFRP – białko zależne od Frizzled (ang. *secreted frizzled related protein*); TCF – czynnik transkrypcyjny komórek T (ang. *T-cell factor*); UTR – region mRNA nieulegający translacji (ang. *untranslated region*); ZNRF3 – transbłonowa ligaza ubikwityny E3 (ang. *zinc and ring finger 3*); VHL – białko von Hippel-Lindau (ang. *von Hippel Lindau tumor suppressor*);

nad 100 pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki, w tym wiele próbek z każdego guza, wykazał, że utrata krótkiego ramienia chromosomu 3 jest najwcześniejszym zdarzeniem w ontogenezie raka nerki, prawdopodobnie występującym w okresie dojrzewania [8,9]. Do najczęściej zmutowanych genów w ccRCC należą: *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *MTOR*, *TCEB1*, *PIK3CA*, *KDM5C*, *TP53* oraz *PTEN*.

Predyspozycją do występowania dziedzicznej postaci jasnokomórkowego raka nerki jest zespół von Hippel-Lindau [10]. Osoby dotknięte chorobą mogą mieć *de novo* mutację genu *VHL* (ang. *von Hippel Lindau tumor suppressor*, *VHL*) linii zarodkowej lub odziedziczyć niefunkcjonalny allel *VHL* od jednego z rodziców [10]. Późniejsza wtórna inaktywacja drugiego allelu jest związana z rozwojem guzów zarówno nerek, głównie jasnokomórkowego raka nerki, jak i guzów pozanerkowych (guzy worka endolimfatycznego, guzy neuroendokryne trzustki, guzy chromochłonne nadnerczy i naczyniaki zarodkowe siatkówki/ośrodkowego układu nerwowego) [11]. Ryzyko wystąpienia nowotworu w zespole von Hippel-Lindau wynosi powyżej 70% u osób do 60 roku życia [11].

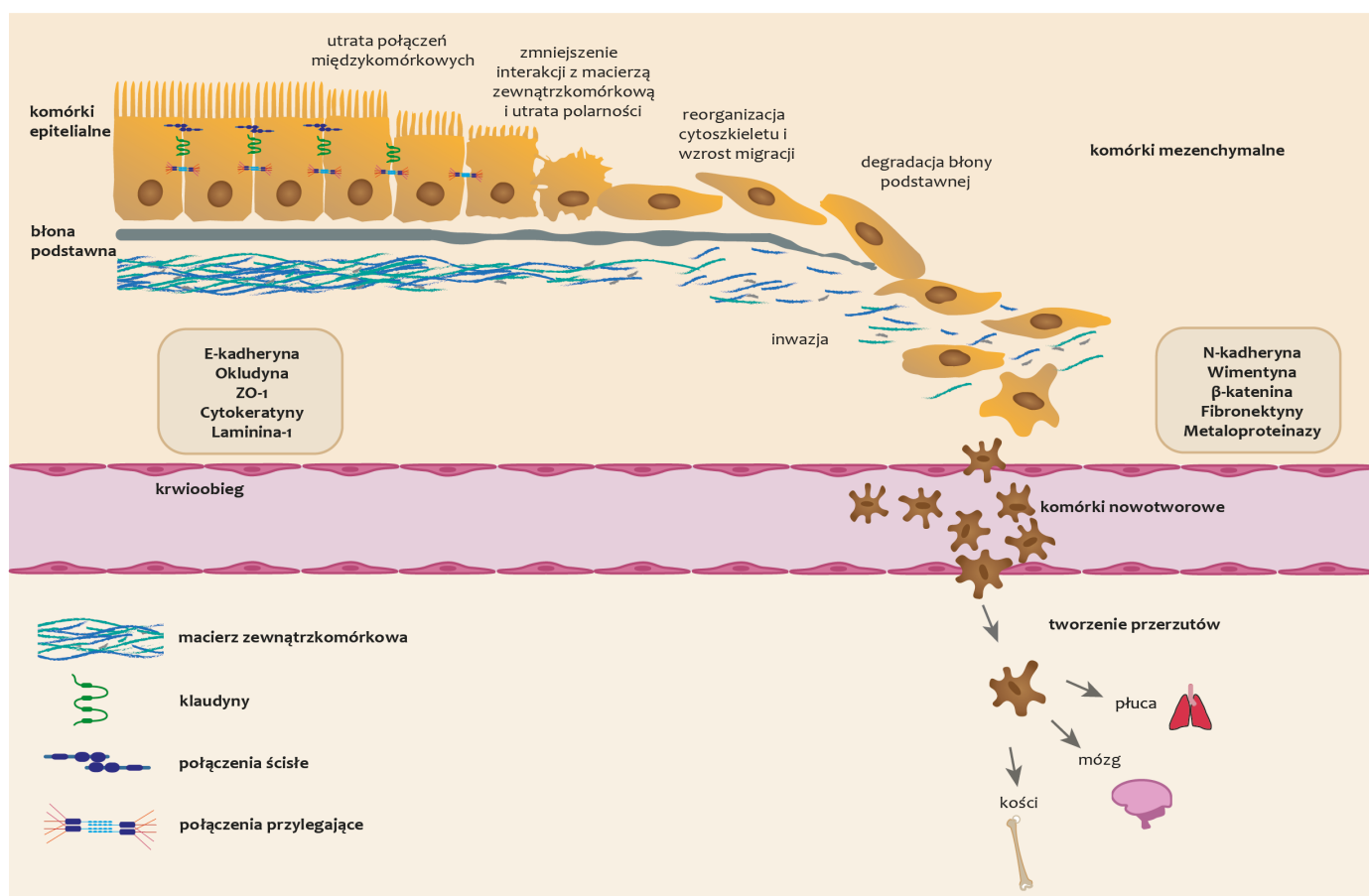
PROCES PRZEJŚCIA EPITELIALNO-MEZENCHYMALNEGO

CHARAKTERYSTYKA I REGULACJA PROCESU PRZEJŚCIA EPITELIALNO-MEZENCHYMALNEGO

W procesie przerzutowania istotne jest uzyskanie przez komórki nowotworowe właściwości, które umożliwiają

opuszczenie pierwotnego ogniska i migrację w celu zasiedlenia nowej niszy. W początkowym etapie tworzenia przerzutów kluczowe jest nabycie przez komórki cech mezenchymalnych w wyniku przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT). Proces ten polega na zmianie fenotypu komórki z epitelialnego, cechującego się biegunowością wierzchołkowo-podstawną i ścisłymi połączeniami komórka-komórka, charakterystycznego dla komórek nabłonkowych, na mezenchymalny, dzięki któremu komórki zyskują polaryzację, nabywają możliwość trawienia białek macierzy zewnątrzkomórkowej i przemieszczania się na dalekie odległości [12,13]. Przejście epitelialno-mezenchymalne zaobserwowano w procesach fizjologicznych i patologicznych [14]. W warunkach fizjologicznych proces EMT zachodzi w czasie implantacji, formowania się zarodka, w gastrulacji i organogenezie [14]. W warunkach patologicznych EMT występuje podczas włóknienia tkanek [15,16], gojenia się ran [17] oraz w nowotworach [18]. Proces EMT zachodzący w komórkach nowotworowych zwiększa ich właściwości inwazyjne, wpływa na obecność krążących komórek nowotworowych oraz nowotworowych komórek macierzystych, a także odpowiada za nabywanie oporności na leki przeciwnowotworowe [19,20].

Proces EMT odbywa się w kilku następujących po sobie etapach. Do pierwszych etapów tego procesu należy utrata połączeń pomiędzy komórkami, zmiana polaryzacji komórki oraz zmniejszenie interakcji z macierzą zewnątrzkomórkową (Ryc. 1) [12,19,21]. Ten etap charakteryzuje się utratą ekspresji genu *CDH1* kodującego E-kadherynę [22]. Nastę-



Rycina 1. Schemat przedstawiający proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego [12,19,21,23].

nie dochodzi do rearanżacji cytoskieletu oraz zmiany profilu ekspresji genów i poziomu białek, charakterystycznych dla komórek nabłonkowych i mezenchymalnych, zwanych często markerami EMT [21,23]. Markery epitelialne, takie jak E-kadheryna, cytokeratyny, okludyny, desmoplakiny, czy mucyna-1 są zastępowane markerami mezenchymalnymi, takimi jak wimentyna, N-kadheryna i fibronektyna [21,23]. W kolejnym etapie, dzięki formowaniu się lamelipodiów, filopodiów i invadopodiów komórki nabywają zdolność do ruchu, a wzrost ekspresji metaloproteinaz, które umożliwiają trawienie składników macierzy zewnątrzkomórkowej, aktywuje zdolności inwazyjne. W przypadku komórek nowotworowych nabycie zdolności do aktywności migracyjnej pozwala komórkom na przejście przez błonę podstawną i przedostanie się do krwiobiegu poprzez ściany naczyń krwionośnych [21,24]. W kolejnych etapach krążące komórki nowotworowe opuszczają krwiobiegi, tworząc mikroprzerzuty i kontynuują wzrost w miejscach przerzutów [18] (Ryc. 1).

Procesem odwrotnym do EMT jest przejście mezenchymalno-epitelialne (ang. *Mesenchymal-Epithelial Transition*, MET), które umożliwia komórkom powrót do ich pierwotnego stanu. Proces ten zaobserwowano m.in. w trakcie rozwoju nerek [25], ale także w tworzeniu przerzutów nowotworowych [26]. Procesy EMT i MET mogą zachodzić w komórkach wielokrotnie, po powrocie do pierwotnego fenotypu nabłonkowego komórka jest w stanie zainicjować nowy proces różnicowania się w komórkę mezenchymalną [19,27].

Regulacja procesu EMT zależy od zaangażowania wielu szlaków sygnalizacyjnych indukujących ten proces. Wśród czynników aktywujących proces EMT wyróżniamy: TGF- β (ang. *transforming growth factor β*) [28], EGF (ang. *epidermal growth factor*) [29], czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*, HGF) [30], czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*, FGF) [31], czynnik indukowany hipoksją 1 α (HIF1- α) [32], płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF) [33], receptor insulinowego czynnika wzrostu (ang. *insulin-like growth factor*, IGF) [34], interleukina-6 (IL-6) [35,36], czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego [37,38] i czynnik transkrypcyjny KLF8 (ang. *Kruppel-like factor 8*) [39]. Działanie tych czynników prowadzi do aktywacji szlaków sygnalizacyjnych m.in.: szlaku PI3K-Akt [12,40], ERK, p38 i JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) [41], szlaku sygnalizacyjnego kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK) RAS-RAF-MEK-ERK [42], szlaku Notch [43] oraz szlaku NF κ B [44,45]. Do nabywania przez komórki właściwości mezenchymalnych prowadzi również aktywacja szlaków sygnalizacyjnych, takich jak JAK2/STAT3 przez ektopową ekspresję IL-6 [36] i szlak STAT1 przez stymulację IL-27 [46]. Co więcej, niedotlenienie może promować EMT przez aktywację HIF1 α [47], który aktywuje ekspresję czynnika TWIST [32]. Istotnym białkiem pełniącym rolę w procesie EMT jest także receptor c-MET, którego aktywacja w procesach fizjologicznych umożliwia regenerację tkanek i gojenie ran [48,49]. W rozwoju i progresji nowotworów zaobserwowano udział osi HGF-MET, która aktywuje szlaki MAPK, Wnt/ β -katenina, FAK oraz PI3K-Akt-mTOR [48,49], pośrednio wpływając na procesy

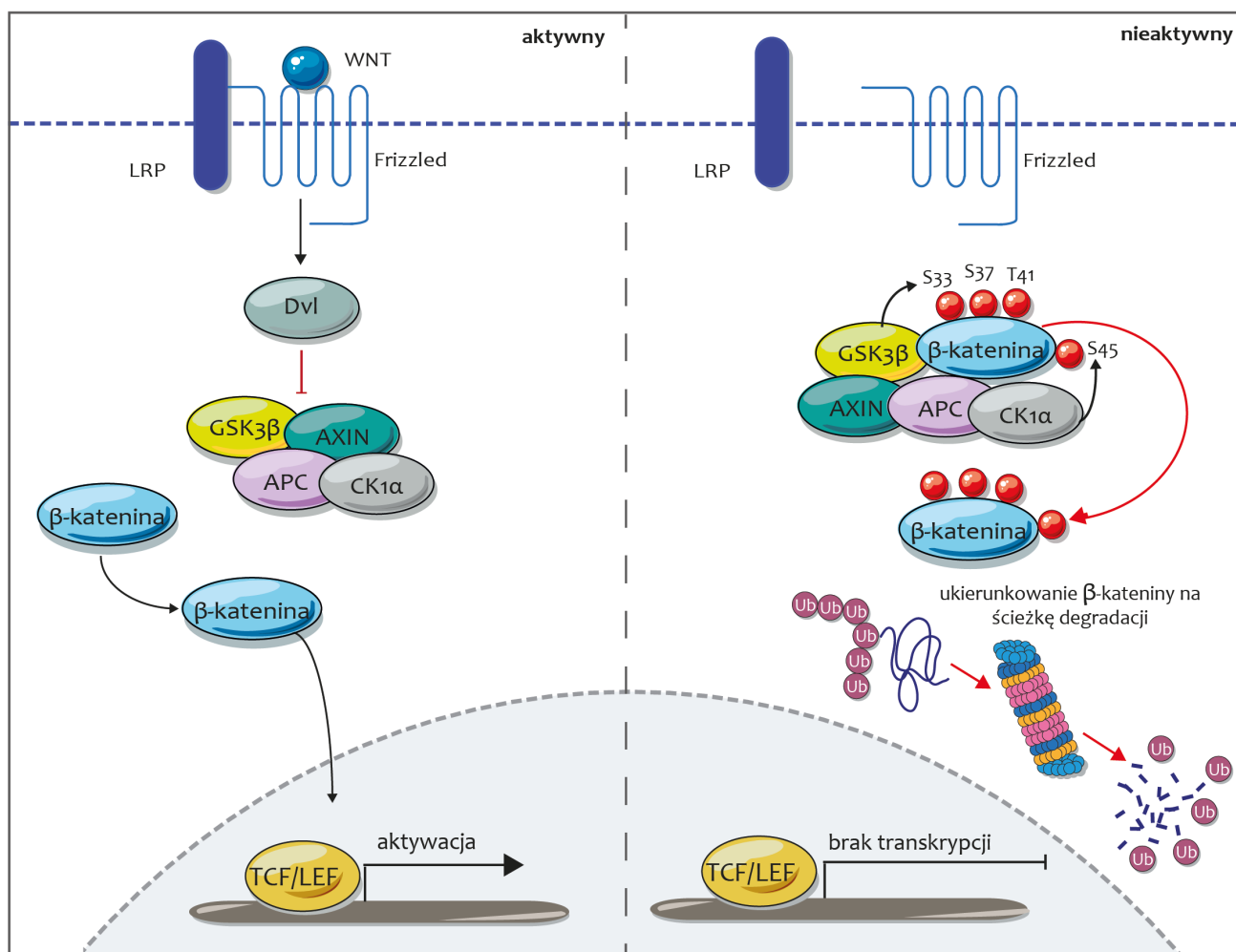
charakterystyczne dla EMT [50,51]. Jednym z ważnych induktorów EMT podczas progresji nowotworu jest również stan zapalny [52,53], a niektóre badania wskazują nawet na proces EMT jako punkt łączący stan zapalny i rozwój procesu nowotworowego [52]. Czynniki transkrypcyjne NF- κ B, główny regulator odpowiedzi zapalnej, może bezpośrednio wpływać na ekspresję potencjalnych aktywatorów EMT, takich jak Snail lub Zeb [53]. Wykazano również, że cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 lub IL-6, mogą promować EMT [54,55].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE W PROCESIE PRZEJŚCIA EPITELIALNO-MEZENCHYMALNEGO

W aktywację procesu EMT zaangażowane są czynniki transkrypcyjne (ang. *transcription factor*, TF), które zgodnie z klasyfikacją ludzkich czynników transkrypcyjnych [56] dzielą się na dwie główne klasy, w zależności od występującego w nich motywu białkowego: czynniki zawierające strukturę palca cynkowego (ang. *zinc finger*, ZF) lub motywu Helisa-Pętla-Helisa (ang. *Helix-Loop-Helix*, HLH) [57].

ZEB1/2 (ang. *Zinc finger E-box binding homeobox 1/2*) to czynniki transkrypcyjne o strukturze palców cynkowych należące do rodziny palców cynkowych typu delta-EF1/ZFH-1 C2H2, która obejmuje ZEB1/Tcf8 i ZEB2/Sip1 [58]. W komórkach czynniki transkrypcyjne ZEB1/2 wiążą się bezpośrednio z sekwencją konsensusową (5-CANNTG-3) w miejscach wiązania DNA E-box działając jako represor transkrypcji na promotorze genu *CDH1* kodującego E-kadherynę [59]. ZEB1 oddziałuje także z kompleksami SMAD, w tym SMAD1, SMAD2 i SMAD3 [60]. Wiążąc aktywowany SMAD, ZEB1 upraszcza składanie kompleksu p300, po czym następuje dysocjacja ZEB1 od kompleksu SMAD i p300 przekształca ZEB1 z represora transkrypcji w koaktywator [60]. ZEB1 aktywuje w ten sposób transdukcję sygnału TGF- β , który jest głównym induktorem EMT [28].

Czynnikami transkrypcyjnymi zawierającymi palec cynkowy i aktywowanymi podczas procesu EMT jest także rodzina białek SNAIL (Snai1, Snai2/Slug, Snai3/Smuc) [61,62]. U wszystkich członków rodziny białkowej SNAIL obecna jest domena SNAG (SNAI1/GFI: aa 1-9) na N-końcowym fragmencie białka [61]. Domena SNAG zawiera sekwencję konsensusową PRSFLV, która umożliwia pełnienie funkcji represora transkrypcji [61]. SNAI1 i SNAI2 aktywują się podczas EMT [63]. Czynniki z rodziny SNAIL wiążą się z sekwencjami konsensusowymi E-box w promotorze *CDH1* za pomocą lokalnych modyfikacji struktury chromatyntyny po rekrutacji SIN3A, deacetylaz histonowych HDAC1 i HDAC2 oraz składników kompleksu Polycomb 2 [63-65]. SNAI1 zmniejsza ekspresję genów ektodermalnych w mezodermie i hamuje ekspresję genów adhezyjnych [62,63]. Głównym regulatorem SNAI1 jest Wnt3a, który hamując fosforylację SNAIL zwiększa jego poziom [66]. Zaobserwowano, że większość szlaków sygnalizacyjnych, które mogą inicjować EMT, zbiega się przy indukcji represorów E-kadheryny, a w szczególności genów *SNAI1* i *SNAI2* [67]. Przykładowo, szlak Ras-MAPK aktywowany przez stymulację różnych receptorowych kinaz tyrozynowych może indukować *SNAI1* i *SNAI2* [67].



Rycina 2. Przekaz sygnału w szlaku Wnt/ β -katenina. Po lewej przedstawiono zaktywowany szlak, po prawej zahamowanie sygnalizacji szlaku Wnt/ β -katenina. Zmodyfikowano na podstawie: [80,81].

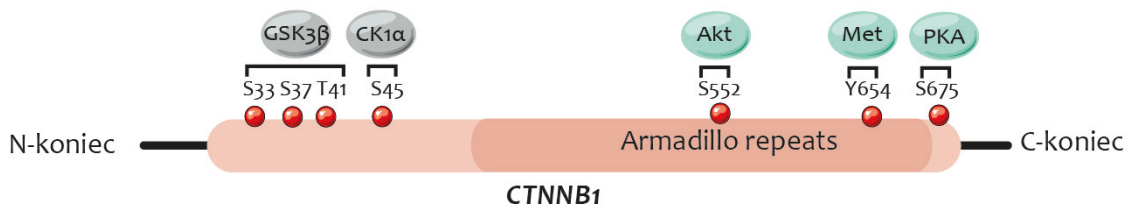
Druga grupa czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w proces EMT posiada w budowie motyw bHLH, który charakteryzuje się dwiema α -helisami połączonymi pętlą. Czynniki transkrypcyjne należące do tej grupy zawierają helisę z zasadowymi aminokwasami wiążącymi się z sekwencją konsensusową E-box na promotorze [68]. Głównym przedstawicielem tej grupy czynników jest TWIST1. Ekspresja genu *TWIST* zmniejsza poziom genów nabłonkowych poprzez zmniejszenie białka gruczolakowatego polipa okrężnicy (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*, APC) i zwiększenie poziomu białek charakterystycznych dla fenotypu mezenchymalnego, takich jak fibronektyna, N-kadheryna i kolagen IV [69]. Ekspresja genu *TWIST* zmniejsza także poziom E-kadheryny i kładyny-7 [70].

SZLAK WNT/ β -KATENINA W PROCESIE ROZWOJU NOWOTWORU

Jednym ze szlaków ważnych dla aktywacji procesu EMT jest szlak Wnt. Nazwa szlaku wywodzi się od pierwszych opisanych białek: Wg (ang. *Wingless*, gen u muszek owocowych) oraz Int (ang. *MMTV integration site*, gen u kręgowców), które jak wykazały późniejsze badania są homologami [71,72]. Sygnalizacja szlaku Wnt odpowiada za organi-

zację tkanek podczas embriogenezy i utrzymuje strukturę tkanek podczas życia człowieka, a także odpowiada za różnicowanie, apoptozę, migrację, przeżywalność i proliferację komórek [73,74]. Nieprawidłowe funkcjonowanie szlaku Wnt zaobserwowano w różnych typach nowotworów [75,76], chorobach neurodegeneracyjnych [73] oraz metabolicznych [77]. Na sygnalizację Wnt składa się ścieżka klasyczna (kanoniczna - zależna od β -kateniny) i kilka ścieżek nieklasycznych [78]. Kanoniczny szlak Wnt jest zwykle wysoce konserwatywny i aktywowany przez wiązanie zewnątrzkomórkowych ligandów Wnt do receptorów błonowych (Ryc. 2). Elementy szlaku Wnt/ β -katenina obejmują 19 ligandów oraz ponad 15 receptorów i koreceptorów [79].

Aktywacja szlaku Wnt uruchamia kaskadę przekazu sygnału prowadząc do aktywności czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w szlak sygnalizacyjny Wnt (Ryc. 2) [80]. W przypadku aktywacji szlaku ligandy Wnt oddziałują z kompleksem receptorowym składającym się z białka Frizzled (ang. *Frizzled Class Receptor*, FZD) i białka związanego z receptorem lipoproteinowym 5 (ang. *LDL Receptor Related Protein 5*, LRP5) lub LRP6 na powierzchni komórki [79-81]. Aktywacja ta prowadzi do rekrutacji białka DVL



Rycina 3. Budowa β -kateniny z głównymi miejscami fosforylacji. Przygotowano na podstawie: [82–84].

(ang. *dishevelled segment polarity protein*) i kompleksu aktywna-GSK3 β -APC-CK1 do receptora [80,81].

Centralnym białkiem kanonicznej ścieżki szlaku Wnt jest białko β -katenina, kodowana przez gen *CTNNB1* [80]. β -katenina występuje w błonie komórkowej tworząc kompleks z cytoplazmatyczną domeną E-kadheryny. Zadaniem tego kompleksu jest ochrona β -kateniny przed jej fosforylacją i degradacją przez kompleks ligazy ubikwitynowej E3 [80]. β -katenina ma budowę domenową, z czego centralna domena składa się z 12 powtórzeń Armadillo (reszty 141–664), które zawiera około 42 reszt, tworzących trzy helisy ułożone w trójkątny kształt 12 sąsiadujących powtórzeń tworzy superhelisę, która ma długi, dodatnio naładowany rowek, w którym trzecia spirala każdego powtórzenia tworzy dno tego rowka [82]. Domeny końcowe to N-koniec, który zawiera miejsce wiązania dla α -kateniny oraz miejsca fosforylacji przez kinazę 3 β syntazy glikogenu (ang. *glycogen synthase kinase 3 beta*, GSK3 β) i kinazę kazeinową 1 (ang. *Casein Kinase 1*, CK1), które są rozpoznawane przez β -ligazę ubikwityny TrCP oraz domenę C-końcową zawierającą miejsca jej fosforylacji (Ryc. 3) [83,84].

W obecności sygnału Wnt, hamowana jest fosforylacja β -kateniny na N-końcu, co prowadzi do jej akumulacji w cytoplazmie [85]. Wolna β -katenina przemieszcza się do jądra, gdzie tworzy kompleks z czynnikiem komórek T / czynnikiem wiążącym wzmacniacz limfoidalny (ang. *T-cell factor/ Lymphoid Enhancer Binding Factor*, TCF/LEF) i aktywuje docelowe geny szlaku Wnt/ β -katenina (Ryc. 2.) [80,81] β -katenina jest również fosforylowana na C-końcu w kilku lokalizacjach, które zwiększają jej stabilność i pozwalają na jej kierowanie do jądra komórkowego [86–88]. Fosforylacja przez kinazę białkową A (PKA) na serynie 675 (S675) zwiększa stabilność β -kateniny [86], fosforylacja seryny 552 (S552) przez kinazę białkową B (Akt) jest odpowiedzialna za akumulację β -kateniny zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze [87]. Z kolei, fosforylacja seryny 191 (S191) i 605 (S605) przez kinazę c-Jun ma kluczowe znaczenie dla lokalizacji jądrowej β -kateniny [88]. Aktywna β -katenina migruje do jądra i wiąże się z białkiem wiążącym DNA z rodziny TCF/LEF zmieniając konformację tego białka, co prowadzi do odłączenia białka Groucho oraz deacetylazy histonów [89]. Następnym etapem jest inicjacja przyłączenia acetylazy histonów CBP/p300 (ang. *CREB binding protein*), która wzmacnia aktywność transkrypcyjną w danym obszarze chromatyny [89,90]. Utworzony w jądrze kompleks β -katenina/TCF, może być regulowany m.in. przez białka Legless oraz Pygopus wspierające wiązanie kompleksu do chromatyny [91]. Istnieją także mechanizmy hamujące działanie kompleksu β -katenina/TCF, które prowadzą do jego rozpadu, angażując białka

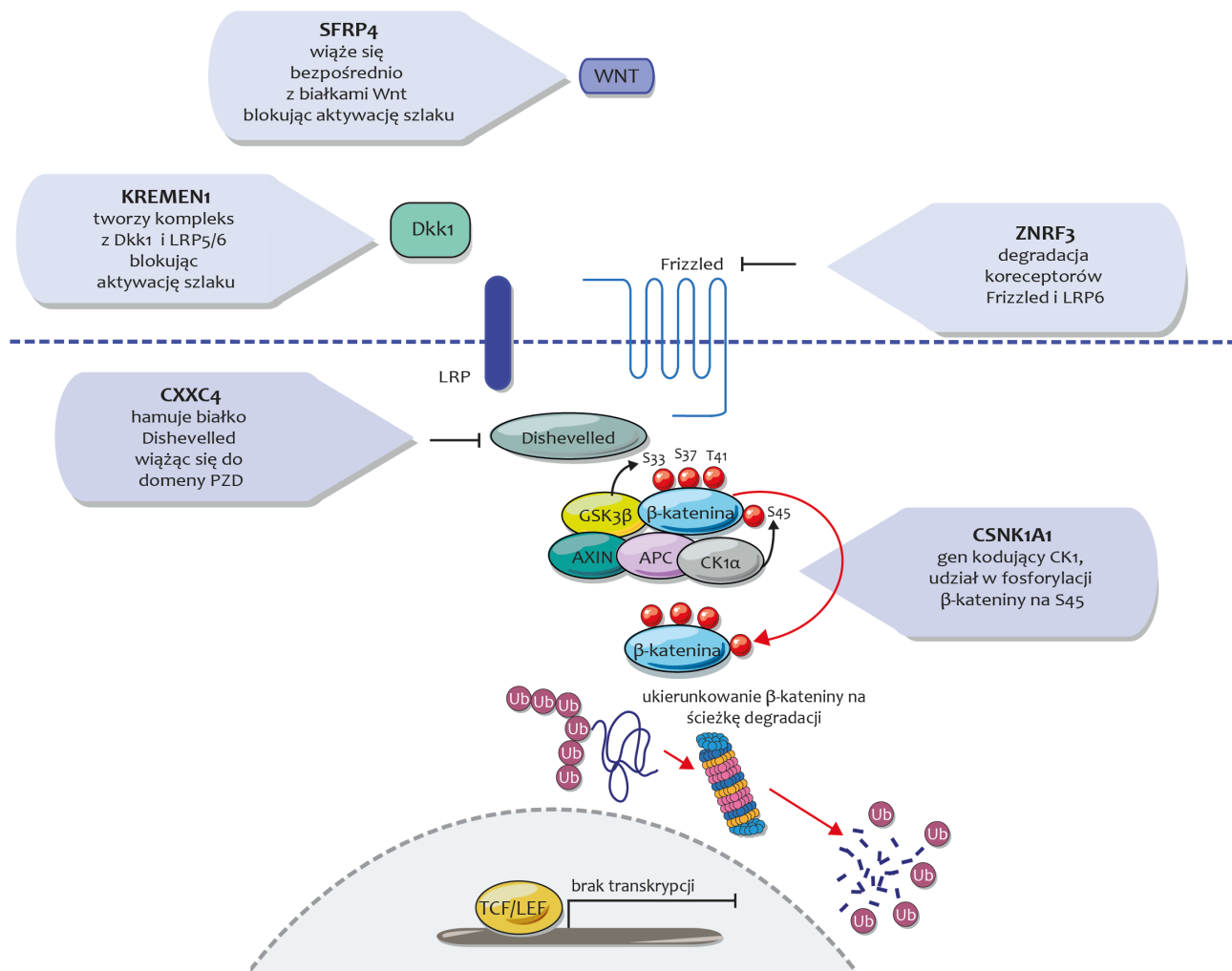
takie jak Chibby [92], ICAT (ang. *inhibitor of β -catenin and TCF4*) [93] oraz kinaza NLK (ang. *Nemo-like kinase*) [94], co w konsekwencji zaburza regulację genów docelowych szlaku Wnt [95].

Inaktywacja β -kateniny zachodzi przez tzw. kompleks degradacyjny obejmujący GSK3 β , APC, CK1 i aktywny szlak Wnt, β -katenina jest rekrutowana do kompleksu degradującego, w którym kinaza CK1 fosforyluje β -kateninę na serynie 45 (S45), przygotowując β -kateninę do późniejszej fosforylacji przez kinazę GSK3 β na serynie 33, 37 (S33, S37) oraz treoninie 41 (T41) [96]. Zdarzenia fosforylacji naczynają β -kateninę do późniejszej ubikwitynacji przez ligazę ubikwityny E3 zawierającą powtórzenia β -transducyny (β -TrCP), a następnie degradacji w proteasomie oraz zapobiegają translokacji β -kateniny do jądra komórkowego (Ryc. 2) [84,85].

Wśród innych modyfikacji potranslacyjnych β -kateniny warto wymienić ubikwitynację i acetylację [97–103]. Ubikwitynacja na lizynie 19 (K19) i 49 (K49) kieruje białko do degradacji [97], natomiast na lizynie 11 (K11) i 63 (K63) powoduje wzrost poziomu β -kateniny [98]. Stabilność β -kateniny zwiększa ubikwitynacja na lizynie 11 (K11) i 29 (K29) oraz na lizynie 394 (K394) [99,100]. Acetylacja na lizynie 19 (K19) i 49 (K49) także zwiększa stabilność β -kateniny [103]. Co więcej, acetylacja na lizynie 49 (K49) może skutkować zahamowaniem zdolności β -kateniny do aktywacji genu c-Myc [101], a na lizynie 345 (K345) skutkuje wzmocnieniem interakcji β -kateniny z TCF4 [102]. Aktywna β -katenina może bezpośrednio wiązać się z czynnikami transkrypcyjnymi związanymi z promotorami kluczowych induktorów procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego, takimi jak SNAIL2, ZEB1 oraz TWIST i zwiększać ekspresję tych induktorów [104]. Ewentualne modyfikacje β -kateniny mogą skutkować odmiennym zachowaniem komórek nowotworowych [104].

NEGATYWNA REGULACJA SZLAKU WNT/ β -KATENINA

Elementy szlaku Wnt/ β -katenina obejmują 19 ligandów oraz ponad 15 receptorów i koreceptorów [79]. Szlak Wnt może być regulowany aktywnością receptorów Frizzled, działaniem ligandów Wnt i inhibitorami szlaku Wnt (Ryc. 4) [79–81]. Wśród białek hamujących działanie szlaku Wnt można wyszczególnić inhibitory zewnątrzkomórkowe, takie jak SFRP4, KREMEN1 i ZNRF3 oraz wewnątrzkomórkowe: CXXC4 oraz kinaza CK1 kodowana przez gen *CSN-K1A1* (Ryc. 4).



Rycina 4. Negatywne regulatory szlaku Wnt. Przygotowano na podstawie: [79–81,84,105–108].

Na początkowym etapie negatywna regulacja szlaku Wnt obejmuje wiązanie ligandów Wnt podczas ich transportu do komórek docelowych. Przed połączeniem ligandów z błonowym receptorem endogenne inhibitory z rodziny białek SFRP (ang. *secreted frizzled related protein*, wśród nich SFRP4 [105], posiadające w swojej N-końcowej domenie fragment bogaty w cysteinę z wysokim powinowactwem do białek Wnt) wiążą się do ligandów Wnt uniemożliwiając im przyłączenie się do receptorów. Skutkuje to zahamowaniem zewnątrzkomórkowej aktywacji szlaku Wnt (Ryc. 4.) [105].

Wśród zewnątrzkomórkowych antagonistów szlaku Wnt wyróżnia się także białka z rodziny Dickkopf (ang. *Dickkopf-related proteins*, DKK1-4), które jako składnik kompleksu błonowego modułują sygnalizację szlaku Wnt [80,81,106]. Białko DKK1 wspólnie z receptorami transbłonowymi KREMEN1/2 tworzą kompleks z ko-receptorami LRP5/6 [107] i ulegają internalizacji, co uniemożliwia im tworzenie kompleksu Wnt-Frizzled-LRP5/6 i dalszy przekaz sygnału przez błonę komórkową (Ryc. 4) [106,107].

Przekaz sygnału w szlaku Wnt podlega również regulacji przez proces ubikwitynacji receptorów Frizzled [80,108]. Modyfikacja receptorów Frizzled jest zależna od ligaz

ubikwitynowych E3, wśród których wyróżnia się białko ZNRF3 [108]. ZNRF3 pośredniczy w ubikwitynacji receptorów Frizzled, inicjując ich internalizację i proces endocytozy, zmniejszając tym samym błonową pulę receptorów i aktywację ścieżki Wnt (Ryc. 4) [108].

Szlak Wnt podlega regulacji również wewnątrzkomórkowej, m.in. przy udziale białka CXXC4, który oddziałuje z DVL (Ryc. 4) [80,81,109]. Zablockowane białko DVL nie hamuje sygnału do tworzenia kompleksu degradacyjnego β-keniny [80,81,109]. W kolejnym etapie kinaza CK1 wpływa na aktywność szlaku Wnt i inicjuje proces degradującego β-keninę [84,96]. Kinaza CK1 kodowana przez gen CSNK1A1, wchodzi w skład kompleksu degradacyjnego β-keniny i fosforyluje β-keninę na serynie 45 (S45), hamując dalszy przekaz sygnału w szlaku Wnt/ β-kenina (Ryc. 4) [80,84].

Regulacja szlaku Wnt zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo jest ważna dla utrzymania homeostazy w komórkach [79–81]. Konsekwencją aktywacji szlaku Wnt jest zablokowanie aktywności kompleksu naznaczającego β-keninę do degradacji proteosomalnej [84]. Jednak niedobór inhibitorów szlaku Wnt i nadmierna jego aktywacja prowadzi do zwiększenia w cytoplazmie puli wolnej β-keniny [81,84].

Natomiast nadmierne działanie inhibitorów może doprowadzić do zahamowania sygnalizacji szlaku Wnt poprzez relokalizację β -kateniny do błony komórkowej [84,96,110]. Znaczenie aktywności inhibitorów szlaku Wnt jest istotne w kontekście kontroli cytoplazmatycznej, błonowej i jądrowej puli β -kateniny oraz regulacji transkrypcji genów docelowych szlaku Wnt/ β -katenina [80,84].

CHARAKTERYSTYKA I BUDOWA BIAŁKA MCPIP1

Jednym z ważnych regulatorów procesu zapalnego jest białko MCPIP1 nazywane również Regnazą-1 [111,112]. Białko to należy do rodziny białek MCPIP (1-4) obejmującej produkty genów *ZC3H12A*, *ZC3H12B*, *ZC3H12C* i *ZC3H12D* [113,114]. Cechą charakterystyczną grupy białek MCPIP jest obecność pojedynczej domeny palca cynkowego typu CCCH, która służy wiązaniu białek do RNA w celu regulacji poziomu transkryptów [115]. MCPIP1 jest zbudowany z 599 aminokwasów i charakteryzuje się budową domenową. W jego strukturze wyróżnia się domenę NTD oddziałującą z domeną katalityczną o aktywności RNazy PIN (ang. *Pi1T N-terminal (PIN)-like RNase domain*) i zawierającą domenę wiążącą ubikwitynę (ang. *Ubiquitin association domain*, UBA), region bogaty w prolinę (ang. *Proline rich region*, PRR), motyw palca cynkowego typu CCCH, region natywnie nieuporządkowany (ang. *natively disordered region*, NDR) i region bogaty w prolinę oraz konserwatywny region C-końcowy (ang. *conservative C-terminal region*, CCR) [116–121] (Ryc. 5).

Najlepiej poznaną funkcją białka MCPIP1 jest degradacja transkryptów wielu prozapalnych cytokin i negatywna regulacja stanu zapalnego [111,117, 118, 120, 121,122] dzięki aktywności RNazowej domeny PIN.

MCPIP1 jako endorybonukleaza może rozpoznawać kilka rodzajów pętli w regionie niepodlegającym translacji 3'UTR (ang. *untranslated region*) degradując specyficzne substraty RNA o różnej zawartości nukleotydów i strukturze [117]. Jednym z mechanizmów działania MCPIP1 jest degradowanie transkryptów w sposób niezależny od elementów bogatych w AU (ang. *AU-rich elements*, ARE), a także poprzez rozpoznanie sekwencji w 3'UTR cząsteczek mRNA, które nie znajdują się w regionach bogatych w adeninę i uracyl [123]. Wykazano także, że MCPIP1 rozpoznaje sekwencje tworzące struktury „spinki do włosów” w

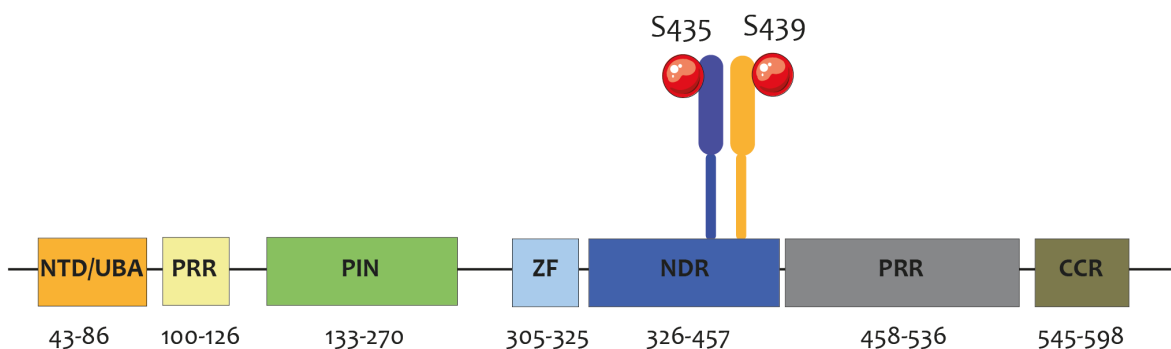
regionie 3'UTR oraz jednoniciowe RNA (ang. *single stranded RNA*, ssRNA) [117,124].

Dotychczas wykazano, że białko MCPIP1 degraduje mRNA takich cytokin jak IL-2 [123], IL-1 β [122], IL-8 [125], IL-6 [116,124,126] i IL-12b [116]. MCPIP1 degraduje także transkrypty receptorów IL-17RA i IL-17RC, wpływając tym samym na przekaz sygnału od IL-17, co ma miejsce m.in. w schorzeniach takich jak infekcja grzybiczna *Candida albicans* oraz w chorobach autoimmunologicznych, m.in. w łuszczycy [127,128]. MCPIP1 reguluje również produkcję TNF α w wielu typach komórek, m.in. w mysich makrofagach w linii komórkowej RAW264.7 [114], w myszach z delecją *Mcpip1* [129], w mysich embrionalnych fibroblastach (MEF) [126], w otrzewnowych mysich makrofagach linii mieloidalnej z delecją *Mcpip1* [130] oraz w linii komórek ludzkiego wątrobiaka HepG2 [121]. Wykazano także, że MCPIP1 może działać jako deubikwitynaza, regulując sygnalizację szlaku JNK i NF- κ B poprzez celowanie w białka z rodziny TRAF (ang. *TNF receptor associated factor*), w tym TRAF2, TRAF3 oraz TRAF6 [131]. Obecnie wiadomo, że MCPIP1 tworzy kompleks białkowy TANK-MCPIP1-USP10, co potwierdza jego udział w procesie deubikwitynacji [132]. Aktywność deubikwitynazy, jak i RNazy MCPIP1 odgrywają kluczową rolę w polaryzacji makrofagów M2 [130,133,134], co skutkuje zmniejszoną produkcją cytokin prozapalnych i zwiększonym uwalnianiem mediatorów przeciwzapalnych i naprawczych [130] regulując przy tym poziom miRNA-155, miRNA-223 i miRNA-146 [129].

Zaburzenia w funkcjonowaniu białka MCPIP1 mogą prowadzić m.in. do ostrych stanów autoimmunologicznych. Potwierdzają to badania nad myszami, u których wyciszono gen *Zc3h12a* [116]. U wszystkich osobników zaobserwowano opóźniony wzrost, anemię oraz śmierć w przeciągu 12 tygodni [116]. Dowodzi to kluczowej roli białka MCPIP1 w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu.

ROLA MCPIP1 W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Dotychczas białko MCPIP1 uważane było jedynie za regulator stanu zapalnego, jednak coraz więcej dowodów wskazuje na to, że białko MCPIP1 odgrywa także rolę w procesie nowotworzenia. MCPIP1 reguluje żywotność i proliferację komórek neuroblastoma HeLa, HepG2, ccRCC i raka piersi [135–138]. MCPIP1 degraduje również mRNA transkryptów genów antyapoptotycznych m.in. *BCL2L1*,



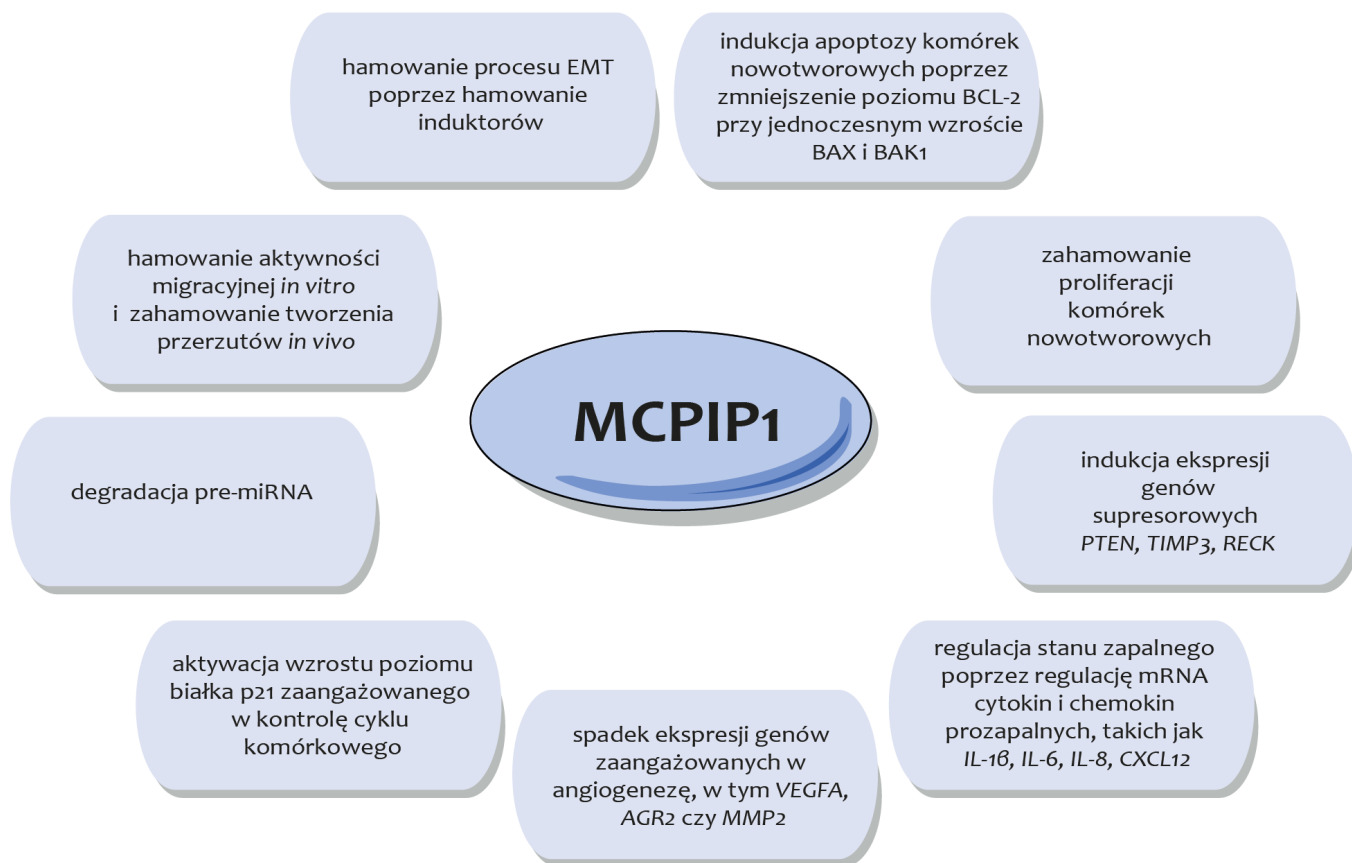
Rycina 5. Budowa domenowa białka MCPIP1. Podano miejsca fosforylacji oraz numeracje aminokwasów z podziałem na poszczególne domeny. Przygotowano na podstawie: [111,112,116–121].

BCL2A1, *RELB*, *BIRC3* i *BCL3* w komórkach raka piersi, co prowadzi do apoptozy i regresji guza [138].

Zaangażowanie MCPIP1 w procesy związane z apoptozą zostało potwierdzone także w liniach jasnokomórkowego raka nerki Caki-1 i Caki-2, gdzie zaobserwowaliśmy spadek transkryptu *BCL2* przy jednoczesnym wzroście proapoptotycznych genów *BAX* i *BAK1* w komórkach z nadekspresją MCPIP1 [139]. Natomiast w liniach komórkowych pozbawionych aktywności RNazowej białka MCPIP1, poziom transkryptu *BCL2* wzrastał przy jednoczesnym spadku *BAX* i *BAK1*, co wskazuje na zaangażowanie domeny PIN w regulację procesu apoptozy w jasnokomórkowym raku nerki [139,140]. Ostatnie badania wykazały, że MCPIP1 może również regulować mRNA antyapoptotycznego białka MCL-1 wpływając tym samym na indukcję apoptozy [141].

Działanie antyproliferacyjne MCPIP1 zostało również potwierdzone w badaniach komórek raka jasnokomórkowego nerki, gdzie nadekspresja powodowała spadek proliferacji *in vitro* i hamowanie wzrostu guzów *in vivo* [142]. Jednym z mechanizmów wyjaśniających w jaki sposób MCPIP1 może kontrolować proliferację jest regulacja poziomu transkryptów bezpośrednio regulujących cykl komórkowy. Ostatnie badania pokazały, że nadekspresja MCPIP1 w dwóch liniach neuroblastomy powoduje spadek ekspresji cyklin A2, B1, D1, D3 i E2, a także spadek fosforylowanych kinaz CDK2 i CDK3 oraz białka Rb, czego efektem jest blokada w punkcie kontrolnym G1/S i areszt komórek w fazie G1 [143].

Białko MCPIP1 może również odgrywać kluczową rolę w procesie angiogenezy i przerzutowania. Badania naszej grupy wykazały, że MCPIP1 dzięki swojej aktywności RNazowej reguluje poziom czynników proangiogennych, takich jak VEGF, IL-8 i IL-6 promując unaczynienie i aktywując komórki śródbłonna naczyńniowego, prowadząc do progresji nowotworu [142]. Oprócz bezpośredniej regulacji cytokin proangiogennych, MCPIP1 może pośrednio regulować angiogenezę. Stwierdzono, że nadekspresja VEGF stymuluje angiogenezę poprzez indukcję SDF-1 (ang. *Stromal Derived Factor 1*), chemotaktycznej chemokiny dla proangiogennych komórek szpiku i komórek progenitorowych śródbłonna ze szpiku kostnego [144,145]. Co więcej, aktywność RNazowa MCPIP1 reguluje poziom transkryptu dla *SDF-1* [142]. Nasze badania wykazały także, że obniżenie poziomu MCPIP1 w komórkach jasnokomórkowego raka nerki było także skorelowane z nabywaniem mezenchymalnego fenotypu, który jest istotny dla procesu przerzutowania [142]. Komórki nowotworowe z obniżonym poziomem MCPIP1 charakteryzował spadek poziomu E-kadheryny, wzrost poziomu wimentyny i β -kateniny, a w konsekwencji wzrost aktywności migracyjnej [142] i zwiększona liczba krążących komórek nowotworowych we krwi myszy, jak i zwiększona ilość przerzutów do płuc [142]. Z kolei nadekspresja MCPIP1 w komórkach jasnokomórkowego raka nerki hamowała wzrost poziomu markerów mezenchymalnych, indukowała wzrost E-kadheryny i wpływała na zmniejszenie liczby przerzutujących komórek nowotworowych [146]. Inne badania potwierdzają, że poziom białka MCPIP1 jest



Rycina 6. Podsumowanie wpływu białka MCPIP1 na procesy nowotworowe.

obniżony także w innych nowotworach, w tym w raku piersi [147,148], czerniaku [149], neuroblastomie [143] i kostniakomięsaku [150].

Wyniki badań naszej grupy wykazały także, że nadekspresja MCPIP1 może, przynajmniej częściowo, chronić przed rozwojem i progresją choroby nowotworowej. Co więcej, wysoki poziom MCPIP1 zmniejsza wzrost guza i przerzuty do płuc w guzach opornych na leczenie sunitynibem i sorafenibem [151]. Wysoki poziom MCPIP1 wpływa również na zmniejszone poziomy czynniki promujących progresję nowotworową: VEGF, IL-6, receptora c-MET kinazy Src i czynnika transkrypcyjnego STAT3 [151].

Jedną z charakterystycznych cech EMT jest nabywanie zdolności migracyjnych regulowanych przez zmiany w fenotypie i cytoszkieletu komórek, a także w ekspresji genów umożliwiających ruch. Pierwsze doniesienia wskazujące na rolę MCPIP1 w regulacji potencjału migracyjnego wskazały analizy transkryptomu komórek raka piersi różniących się aktywnością migracyjną [148]. Komórki z wysokim poziomem białka MCPIP1 wykazywały niską ruchliwość *in vitro* i niski poziom przerzutowania *in vivo* [148]. Potwierdziły to badania przeprowadzone na jasnokomórkowym raku nerki [142]. Z kolei zmniejszony poziom MCPIP1 w komórkach ccRCC powodował wzrost zdolności komórek nowotworowych do opuszczenia pierwotnego guza i migracji do płuc i wzrost ilości przerzutów. Co więcej, utrata aktywności RNazowej MCPIP1 powodowała reorganizację cytoszkieletu aktynowego, wzrost poziomu białek Rho i fosforylację kinazy ogniskowo-adhezyjnej (ang. *Focal Adhesion Kinase*, FAK) oraz kinazy Src, co skutkowało wzrostem aktywności migracyjnej komórek jasnokomórkowego raka nerki [152]. Dodatkowo, analiza mikromacierzy tkanek od pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki, wykazała zmiany w ekspresji genów skorelowanych z migracją oraz z fenotypem mezenchymalnym wraz z postępowaniem choroby nowotworowej [146,152]. Dotychczasowe badania wskazują, że MCPIP1 pełni ważną rolę w nabywaniu potencjału migracyjnego regulując proces EMT i podkreślają znaczenie MCPIP1 jako supresora rozwoju i progresji nowotworu nerki (Ryc. 6).

ROLA miRNA W ccRCC

Odkrycie miRNA zmieniło postrzeganie procesu nowotworowego, którego rozwój do niedawna tłumaczono głównie mutacjami w genach protoonkogennych i supresorowych kontrolujących podziały komórkowe [153]. W zależności od swojego działania, miRNA mogą aktywować lub hamować rozwój nowotworu. Onkogenne miRNA stymulujące rozwój nowotworu (onkomiry) zazwyczaj hamują ekspresję mRNA genów supresorowych nowotworów. Z kolei miRNA hamujące proces nowotworzenia zmniejszają ekspresję genów zaangażowanych w rozwój i progresję nowotworu [154,155]. miRNA to małe, jednoniciowe cząsteczki RNA o wielkości 17-25 nukleotydów powstające z dwuniciowych prekursorów. Pojedyncza cząsteczka miRNA może jednocześnie kontrolować ekspresję setek docelowych genów [156]. miRNA przemieszczają się między przedziałami subkomórkowymi, aby kontrolować szybkość translacji oraz transkrypcji [157]. Ponadto, miRNA są wydzielane do

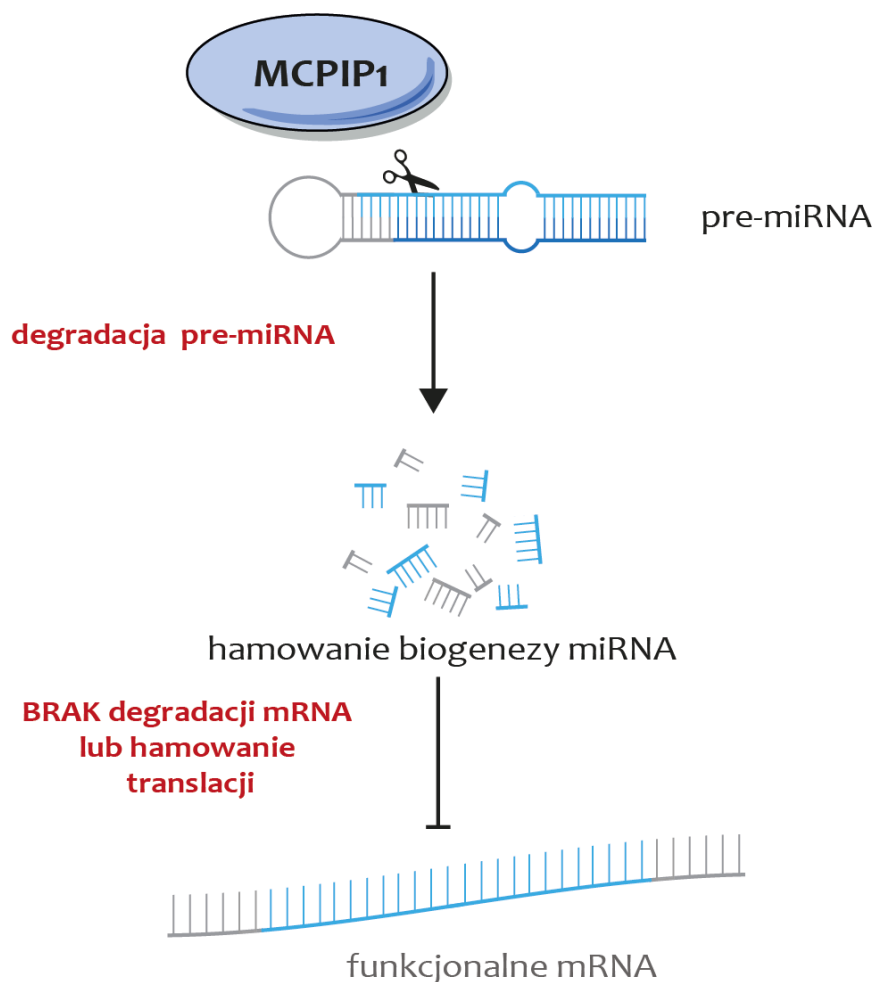
płynów pozakomórkowych, a zewnątrzkomórkowe miRNA są także opisywane jako potencjalne biomarkery różnych chorób oraz cząsteczki sygnalizacyjne do pośredniczenia w komunikacji międzykomórkowej [158]. W badaniach globalnego poziomu ekspresji miRNA, tzw. profilowania miRNomu dla różnych nowotworów wykazano m.in., że wzór ekspresji miRNA może być skorelowany z typem nowotworu, stadium jego rozwoju, a także innymi zmiennymi klinicznymi, dzięki czemu profilowanie miRNA może być wykorzystywane jako narzędzie do diagnozowania i prognozowania rozwoju nowotworu [159].

Nieprawidłową ekspresję niektórych miRNA zaangażowanych w procesy obejmujące odpowiedź na hipoksję, EMT i przebudowę chromatyny zaobserwowano także w jasnokomórkowym raku nerki [160,161]. miRNA istotne w jasnokomórkowym raku nerki, które można zaliczyć do supresorowych miRNA nakierowanych na mRNA onkogenów lub genów kodujących białka pośredniczące w progresji nowotworu nerek to, między innymi: miRNA-34a [162-164], miRNA-133b [165], miRNA-138 [166]. Genami docelowymi dla miRNA-34a są *c-MET* [164], *c-MYC* [162] i *NOTCH1* [163]. Docelowym mRNA dla miRNA-133b jest transkrypt *MMP-9* [165]. Z kolei miRNA-138 reguluje geny: *VIM*, *EZH2*, *ZEB2* [166] oraz *HIF1a* [167]. Każdy z tych genów odpowiada za odrębne procesy, takie jak proliferacja, aktywacja cyklu komórkowego, inwazja, migracja i morfologia.

Celem onkogennych miRNA w patogenezie jasnokomórkowego raka nerki są geny supresorowe guza, takie jak *PTEN* [168] i *TIMP3* [169]. Onkomirami są m.in. miRNA-7 [170], miRNA-21 [168,169,171], miRNA-155 [172] i inne. Pomimo tego, że komórki nowotworowe wykazują podobne cechy, jednak ekspresja miRNA, szlaki regulacyjne oraz cele miRNA mogą być odmienne dla różnych nowotworów [159].

Jednym z regulatorów poziomu miRNA w komórce jest białko MCPIP1, które dzięki aktywności RNazowej hamuje syntezę miRNA doprowadzając do degradacji tych cząsteczek [120]. Badania dowiodły, że MCPIP1 konkuruje z DICER, centralną rybonukleazą w przetwarzaniu miRNA (Ryc. 7). MCPIP1 rozpoznaje pre-miRNA i preferencyjnie rozplata niesparowany region pre-miRNA w pobliżu pętli końcowej (Ryc. 7) [120,129,173]. Natomiast w trakcie biogenezy miRNA w cytoplazmie endonukleaza DICER usuwa pętlę końcową pre-miRNA, w wyniku czego powstaje dojrzały dupleks miRNA składający się z nici wiodącej i pasażerskiej [174-176].

Dotychczas dowiedziono, że MCPIP1 hamuje biogenezę kilku cząsteczek miRNA: let-7g, miRNA-16-1, miRNA-135b, miRNA-146a, miRNA-21, miRNA-155, miRNA-143 oraz miRNA-145 [120]. MCPIP1 hamuje także powstawanie antyangiogennych miRNA-20b i miRNA-34a, co skutkuje zahamowaniem translacji HIF1 α i SIRT-1 [177]. MCPIP1 może także degradować prekursorową formę miRNA-125 [130]. Dowiedziono, że MCPIP1 zwiększa ekspresję miRNA-223 i miRNA-146 związaną z polaryzacją makrofagów do fenotypu aktywowanego alternatywnie - M2 [129]. Obserwacje nad regulacją miRNA-200 wykazały, że wysoki



Rycina 7. Udział MCPIP1 w hamowaniu biogenezy miRNA.

poziom MCPIP1 może być odpowiedzialny za utratę miRNA-200, a w konsekwencji może odpowiadać za progresję i chemiooporność nowotworów trzustki [178]. W toczniu rumieniowatym układowym poziom MCPIP1 pod wpływem interferonu typu I wzrasta powodując zahamowanie biosyntezy miRNA-146a, co prowadzi do aktywacji TRAF-6, IRAK-1, IFN-5, STAT-1 i rozwoju chorób autoimmunologicznych [179,180].

Wyniki naszej grupy natomiast wskazały, że MCPIP1 w komórkach ccRCC może hamować poziom miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p i miRNA-520c-3p, co skutkuje zwiększeniem poziomu genów *SFRP4*, *ZNRF3*, *KREMEN1*, *CXXC4* i *CSNK1A1*, które działają jako negatywne regulatory sygnalizacji Wnt i obniżają poziom aktywnej β -kateniny [146].

miRNA-519A-3P, miRNA-519B-3P, miRNA-520C-3P

Do tej pory niewiele jest prac, które pokazują jaki mechanizm działania mogą mieć miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p oraz miRNA-520c-3p w procesie nowotworzenia. Udział miRNA-519a-3p wykazano w patogenezie kilku chorób, takich jak rak jajnika [181], glejak [182,183], rak piersi [184], neuroblastoma [185], kostniakomięsak [186], jasnokomórkowy rak nerki [146], a także w chorobie Par-

kinsona [187,188], a efekty działania tego miRNA mogą być zarówno supresorowe, jak i onkogenne. Pierwsze doniesienia o miRNA-519 pojawiły się w 2008 roku, gdy wykazano, że wiąże się z regionem kodującym mRNA dla białka HuR, co skutkuje zmniejszeniem proliferacji komórek HeLa [189]. Zaobserwowano także, że poziom miRNA-519 w tkankach raka jajnika, płuc i nerek był obniżony, a poziom białka HuR znacząco wyższy, z niezmiennym stężeniem mRNA HuR w porównaniu ze zdrowymi tkankami [190]. Inne badania wskazały, że nadekspresja miRNA-519a-3p związana była z agresywnym fenotypem komórek raka piersi, zwiększała żywotność komórek nowotworowych i wiązała się z gorszym całkowitym przeżyciem u chorych na raka piersi [184,191]. miRNA-519a-3p promował także migrację i inwazję w raku jajnika poprzez regulowanie genu *PARP1* [181]. Z kolei w raku krtani, płuca, a także w glejaku i raku nerki miRNA-519a-3p jak i miRNA-519b-3p działają jako supresory nowotworowe obniżając proliferację i wzrost guza [182, 189, 190, 192]. W raku jelita grubego zahamowanie proliferacji i inwazji komórek było natomiast zależne od miRNA-519b-3p [193].

Pierwsze wzmianki o miRNA-519b-3p pojawiły się w 2014 roku, kiedy wykazano, że w tkankach raka krtani poziom miRNA był istotnie niższy niż w sąsiadujących tkankach nienowotworowych [194]. Co więcej wykazano, że

miRNA-519b-3p promowało odpowiedź na przedoperacyjną chemioterapię i radioterapię poprzez celowanie w gen *ARID4B* u pacjentów z rakiem odbytnicy [195]. Zauważono również, że rozwój i progresja raka jelita grubego postępują po zablokowaniu miRNA-519b-3p [196]. Ostatnie badania pokazują, że miRNA-519 hamuje proliferację komórek raka nosogardzieli poprzez celowanie w onkogen *URG4/URGCP* [197], reguluje proliferację komórek raka piersi poprzez celowanie w *HuR* [198] i hamuje proces nowotworowy wywołany hipoksją w raku trzustki poprzez regulację immunologicznego punktu kontrolnego *PD-L1* [199].

Rola miRNA-520c-3p w patogenezie wielu chorób nie jest jeszcze dobrze zbadana. Dotychczasowe badania wykazały, że miRNA-520c-3p odgrywa ważną rolę w chłoniaku [200], raku piersi [201,202], włókniakomięsaku [203], raku wątrobowokomórkowym [204–206], raku jelita grubego [207], glejaku [208], raku prostaty [209] i raku żołądka [210]. Spośród tych badań niektóre wskazują, że miRNA-520c-3p promuje wzrost guza [202,203,209,210]. Natomiast w niektórych chorobach nowotworowych miRNA-520c-3p działa jako supresor nowotworzenia [200,201,204,206–208]. Ponadto, miRNA-520c-3p pośredniczy w progresji kostniakomięsaka [211], dysfunkcji śródbłonna naczyniowego [212] progresji raka dróg żółciowych [213] i chorobie zwyrodnieniowej stawów [214].

Wyniki naszej grupy natomiast wskazały, że MCPIP1 może hamować poziom miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p i miRNA-520c-3p, co skutkuje zwiększeniem poziomu genów *SFRP4*, *ZNRF3*, *KREMEN1*, *CXXC4* i *CSNK1A1*, które działają jako negatywne regulatory sygnalizacji Wnt i obniżają poziom aktywnej β -kateniny [146]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że regulacja procesu EMT w jasnokomórkowym raku nerki zachodzi bezpośrednio, dzięki aktywności RNazowej białka MCPIP1, ale również pośrednio, przez działanie MCPIP1 na mikrośrodowisko [142,146]. Bezpośrednio MCPIP1 hamuje biogenezę miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p i miRNA-520c-3p, tym samym aktywnie wpływając na poziomy *SFRP4*, *KREMEN1*, *ZNRF3*, *CXXC4* i *CSNK1A1* oraz hamując szlak Wnt poprzez inaktywację β -kateniny, a w konsekwencji hamując proces EMT [146]. Pośredni wpływ MCPIP1 na proces EMT, wynika z regulacji poziomu transkryptów cytokin i chemokin oddziałujących na otaczające komórki, które w odpowiedzi mogą wchodzić w interakcje z komórkami nowotworowymi.

PODSUMOWANIE

Wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej wskazują na istotną rolę białka MCPIP1 w procesie przejścia epitelialno – mezenchymalnego podczas rozwoju i progresji jasnokomórkowego raka nerki. Na podstawie opisanych wyników wskazaliśmy możliwy mechanizm, dzięki któremu białko MCPIP1 reguluje proces EMT zapobiegając nabywaniu przez komórki fenotypu mezenchymalnego. MCPIP1 dzięki aktywności endorybonukleazy degraduje miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p i miRNA-520c-3p, tym samym aktywnie wpływając na poziomy inhibitorów *SFRP4*, *KREMEN1*, *ZNRF3*, *CXXC4* i *CSNK1A1* oraz hamowanie szlaku Wnt przez dezaktywację β -kateniny i w konsekwencji hamowanie procesu EMT [146]. Co więcej, MCPIP1 może regulować

progresję jasnokomórkowego raka nerki wpływając na poziomy czynników proangiogennych i prometastatycznych [139]. Wykazaliśmy także, że aktywność RNazy MCPIP1 jest kluczowa w procesie migracji komórek jasnokomórkowego raka nerki. MCPIP1 reguluje poziom białek Rho, fosforylację kinaz FAK i Src, a w konsekwencji przebudowę aktywny. Uzyskane wyniki wskazują, że brak aktywności RNazowej MCPIP1 aktywuje geny i procesy związane z aktywnością migracyjną komórek nowotworowych ważne w procesie przerzutowania [152]. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że MCPIP1 jest istotnym regulatorem procesu EMT oraz rozwoju i progresji jasnokomórkowego raka nerki.

PIŚMIENNICTWO

1. Ng CS, Wood CG, Silverman PM, Tannir NM, Tamboli P, Sandler CM (2008) Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging, and Surveillance. *Am J Roentgenol* 191: 1220–1232
2. Rini BI, Campbell SC, Escudier B (2009) Renal cell carcinoma. *Lancet* 373: 1119–1132
3. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, Grünwald V, Gillessen S, Horwich A (2019) Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 30: 706–720
4. Casuscelli J, Vano Y-A, Fridman WH, Hsieh JJ (2017) Molecular Classification of Renal Cell Carcinoma and Its Implication in Future Clinical Practice. *Kidney Cancer* 1: 3–13
5. Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C (2008) Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): A literature review. *Cancer Treat Rev* 34: 193–205
6. Cancer Genome Atlas Research Network T (2013) ARTICLE Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma.
7. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S (2013) Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genetics* 2013 45:8 45: 860–867
8. Mitchell TJ, Turajlic S, Rowan A, Nicol D, Farmery JHR, O'Brien T, Martincorena I, Tarpey P, Angelopoulos N, Yates LR, Butler AP, Raine K, Stewart GD, Challacombe B, Fernando A, Lopez JI, Hazell S, Chandra A, Chowdhury S, Rudman S, Soultati A, Stamp G, Fotiadis N, Pickering L, Au L, Spain L, Lynch J, Stares M, Teague J, Maura F, Wedge DC, Horswell S, Chambers T, Litchfield K, Xu H, Stewart A, Elaidi R, Oudard S, McGranahan N, Csabai I, Gore M, Futreal PA, Larkin J, Lynch AG, Szallasi Z, Swanton C, Campbell PJ (2018) Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell* 173: 611–623.e17
9. Jonasch E, Walker CL, Rathmell WK (2021) Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality. *Nat Rev Nephrol* 17: 245–261
10. Richards FM, Payne SJ, Zbar B, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Maher ER (1995) Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum Mol Genet* 4: 2139–2143
11. Maher ER, Yates JRW, Harries R, Benjamien C, Harris R, Moore AT, Ferguson-Smith MA (1990) Clinical Features and Natural History of von Hippel-Lindau Disease. *QJM* 77: 1151–1163
12. Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 178–196
13. Pasti G, Labouesse M (2014) Epithelial junctions, cytoskeleton, and polarity. *WormBook* 1–35
14. Gros J, Tabin CJ (2014) Vertebrate Limb Bud Formation Is Initiated by Localized Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Science* (1979) 343: 1253–1256
15. Grandé MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, de Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, Rowe RG, Weiss SJ, López-Novoa JM, Nieto MA (2015)

- Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* 21: 989–997
16. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, Wu C-C, Hagos Y, Burkhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21: 998–1009
 17. Banerjee P, Venkatachalam S, Mamidi MK, Bhonde R, Shankar K, Pal R (2015) Vitiligo patient-derived keratinocytes exhibit characteristics of normal wound healing via epithelial to mesenchymal transition. *Exp Dermatol* 24: 391–393
 18. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A, Sarkar S (2015) EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med* 4: 156
 19. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009) Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139: 871–890
 20. Nistico P, Bissell MJ, Radisky DC (2012) Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011908–a011908
 21. Tania M, Khan MdA, Fu J (2014) Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumor Biology* 35: 7335–7342
 22. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J (2014) Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 16: 488–494
 23. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK (2016) Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer* 15: 18
 24. Pearson GW (2019) Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis. *J Clin Med* 8: 646
 25. Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED (2007) Mesenchymal to Epithelial Transition in Development and Disease. *Cells Tissues Organs* 185: 7–19
 26. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646–674
 27. Lim J, Thiery JP (2012) Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 139: 3471–3486
 28. Vincent T, Neve EPA, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL, Crystal RG, de Herreros AG, Moustakas A, Pettersson RF, Fuxe J (2009) A SNAI1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 11: 943–950
 29. Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T (2003) Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of β -catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4: 499–515
 30. Farrell J, Kelly C, Rauch J, Kida K, García-Muñoz A, Monsefi N, Turriziani B, Doherty C, Mehta JP, Matallanas D, Simpson JC, Kolch W, von Kriegsheim A (2014) HGF Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Modulating the Mammalian Hippo/MST2 and ISG15 Pathways. *J Proteome Res* 13: 2874–2886
 31. Ciruna B, Rossant J (2001) FGF Signaling Regulates Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak. *Dev Cell* 1: 37–49
 32. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ (2008) Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 10: 295–305
 33. Nawshad A, LaGamba D, Polad A, Hay ED (2005) Transforming Growth Factor- β Signaling during Epithelial-Mesenchymal Transformation: Implications for Embryogenesis and Tumor Metastasis. *Cells Tissues Organs* 179: 11–23
 34. Kim H-J, Litzenburger BC, Cui X, Delgado DA, Grabiner BC, Lin X, Lewis MT, Gottardis MM, Wong TW, Attar RM, Carboni JM, Lee A v. (2007) Constitutively Active Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Causes Transformation and Xenograft Growth of Immortalized Mammary Epithelial Cells and Is Accompanied by an Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediated by NF- κ B and Snail. *Mol Cell Biol* 27: 3165–3175
 35. Lyons JG, Patel V, Roue NC, Fok SY, Soon LL, Halliday GM, Gutkind JS (2008) Snail Up-regulates Proinflammatory Mediators and Inhibits Differentiation in Oral Keratinocytes. *Cancer Res* 68: 4525–4530
 36. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, Obeyerszyn TM, Hall BM (2009) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28: 2940–2947
 37. Wanami L, Chen H, Peiro S, Garcia de Herreros A, Bachelder R (2008) Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: Implications for tumor progression. *Exp Cell Res* 314: 2448–2453
 38. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Bauer TW, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM (2006) Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Activation Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Res* 66: 46–51
 39. Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown-Longo PJ, Hung M-C, Zhao J (2007) Krüppel-Like Factor 8 Induces Epithelial to Mesenchymal Transition and Epithelial Cell Invasion. *Cancer Res* 67: 7184–7193
 40. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM (2011) mTORC1 and mTORC2 Regulate EMT, Motility, and Metastasis of Colorectal Cancer via RhoA and Rac1 Signaling Pathways. *Cancer Res* 71: 3246–3256
 41. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425: 577–584
 42. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM, Derynck R (2007) TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 26: 3957–3967
 43. Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, Karsan A (2007) Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* 204: 2935–2948
 44. Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L (2007) Activation of NF- κ B by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene* 26: 7445–7456
 45. Strippoli R, Benedicto I, Foronda M, Perez-Lozano ML, Sánchez-Perales S, López-Cabrera M, del Pozo MÁ (2010) p38 maintains E-cadherin expression by modulating TAK1-NF- κ B during epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 123: 4321–4331
 46. Kachroo P, Lee M-H, Zhang L, Baratelli F, Lee G, Srivastava MK, Wang G, Walser TC, Kryan K, Sharma S, Dubinett SM, Lee JM (2013) IL-27 inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenic factor production in a STAT1-dominant pathway in human non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 32: 97
 47. Luo D, Wang J, Li J, Post M (2011) Mouse Snail Is a Target Gene for HIF. *Mol Cancer Res* 9: 234–245
 48. Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, vande Woude GF (1994) Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 91: 4731–4735
 49. Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G (1997) Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci* 94: 701–706
 50. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, vande Woude GF (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 915–925
 51. Kim KH, Seol HJ, Kim EH, Rhee Y, Jin HJ, Lee Y, Joo KM, Lee J, Nam D-H (2013) Wnt/ β -catenin signaling is a key downstream mediator of MET signaling in glioblastoma stem cells. *Neuro Oncol* 15: 161–171
 52. Mantovani A (2009) Inflammation and metastasis. *Nature* 457: 36–37
 53. López-Novoa JM, Nieto MA (2009) Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 1: 303–314

54. Fan J-M, Huang X-R, Ng Y-Y, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY (2001) Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor- β -1-dependent mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis* 37: 820-831
55. Lee SO, Yang X, Duan S, Tsai Y, Strojny LR, Keng P, Chen Y (2016) IL-6 promotes growth and epithelial-mesenchymal transition of CD133+ cells of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7: 6626-6638
56. Wingender E, Schoeps T, Haubrock M, Dönitz J (2015) TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic Acids Res* 43: D97-D102
57. Alidadiani N, Ghaderi S, Dilaver N, Bakhshamin S, Bayat M (2018) Epithelial mesenchymal transition Transcription Factor (TF): The structure, function and microRNA feedback loop. *Gene* 674: 115-120
58. Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G, Raschella G (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 3: 17071
59. Skrypek N, Goossens S, de Smedt E, Vandamme N, Bex G (2017) Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends In Genetics* 33: 943-959
60. Postigo AA (2003) Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* 22: 2453-2462
61. Chiang C, Ayyanathan K (2013) Snail/Gfi-1 (SNAG) family zinc finger proteins in transcription regulation, chromatin dynamics, cell signaling, development, and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 24: 123-131
62. Nieto MA (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 155-166
63. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83
64. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García de Herreros A (2000) The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-89
65. Herranz N, Pasini D, Díaz VM, Francí C, Gutierrez A, Dave N, Escrivà M, Hernandez-Muñoz I, di Croce L, Helin K, García de Herreros A, Peiró S (2008) Polycomb Complex 2 Is Required for *E-cadherin* Repression by the Snail1 Transcription Factor. *Mol Cell Biol* 28: 4772-4781
66. Stemmer V, de Craene B, Bex G, Behrens J (2008) Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with β -catenin. *Oncogene* 27: 5075-5080
67. Grottegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F (2006) Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J* 25: 3534-3545
68. Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw ML, Pettersson S, Poellinger L (1995) Constitutive Function of the Basic Helix-Loop-Helix/PAS Factor Arnt. *J Biol Chem* 270: 13968-13972
69. Thiery JP, Morgan M (2004) Breast cancer progression with a Twist. *Nat Med* 10: 777-778
70. Mironchik Y, Winnard PT, Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwalla Z, van Diest P, Burger H, Glackin C, Raman V (2005) Twist Overexpression Induces *In vivo* Angiogenesis and Correlates with Chromosomal Instability in Breast Cancer. *Cancer Res* 65: 10801-10809
71. van Ooyen A, Nusse R (1984) Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* 39: 233-240
72. Sharma RP, Chopra VL (1976) Effect of the wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 48: 461-465
73. Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810
74. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A (2009) Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* 19: 119-129
75. Polakis P (2012) Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a008052-a008052
76. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36: 1461-1473
77. Sethi JK, Vidal-Puig A (2010) Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J* 427: 1-17
78. Komiya Y, Habas R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4: 68-75
79. Chen C, Luo L, Xu C, Yang X, Liu T, Luo J, Shi W, Yang L, Zheng Y, Yang J (2022) Tumor specificity of WNT ligands and receptors reveals universal squamous cell carcinoma oncogenes. *BMC Cancer* 22: 790
80. Nusse R, Clevers H (2017) Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169: 985-999
81. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149: 1192-1205
82. Xu W, Kimelman D (2007) Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 120: 3337-3344
83. Städeli R, Hoffmans R, Basler K (2006) Transcription under the Control of Nuclear Arm/ β -Catenin. *Cur Biol* 16: R378-R385
84. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* 17: 9-26
85. Stamos JL, Weis WI (2013) The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a007898-a007898
86. Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A (2005) Phosphorylation of β -Catenin by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Stabilizes β -Catenin through Inhibition of Its Ubiquitination. *Mol Cell Biol* 25: 9063-9072
87. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z (2007) Phosphorylation of β -Catenin by AKT Promotes β -Catenin Transcriptional Activity. *J Biol Chem* 282: 11221-11229
88. Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F (2008) Rac1 Activation Controls Nuclear Localization of β -catenin during Canonical Wnt Signaling. *Cell* 133: 340-353
89. Takemaru K-I, Moon RT (2000) The Transcriptional Coactivator Cbp Interacts with β -Catenin to Activate Gene Expression. *J Cell Biol* 149: 249-254
90. Hecht A (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* 19: 1839-1850
91. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, Murone M, Züllig S, Basler K (2002) Wnt/Wingless Signaling Requires BCL9/Legless-Mediated Recruitment of Pygopus to the Nuclear β -Catenin-TCF Complex. *Cell* 109: 47-60
92. Takemaru K-I, Yamaguchi S, Lee YS, Zhang Y, Carthew RW, Moon RT (2003) Chibby, a nuclear β -catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* 422: 905-909
93. Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, Akiyama T (2000) Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* 14: 1741-9
94. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K (1999) The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399: 798-802
95. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2003) Regulation of Lymphoid Enhancer Factor 1/T-Cell Factor by Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Nemo-Like Kinase-Dependent Phosphorylation in Wnt/ β -Catenin Signaling. *Mol Cell Biol* 23: 1379-1389
96. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10: 1443-1454
97. Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X (1999) β -Trcp couples β -catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci* 96: 6273-6278

98. Dao K-HT, Rotelli MD, Petersen CL, Kaech S, Nelson WD, Yates JE, Hanlon Newell AE, Olson SB, Druker BJ, Bagby GC (2012) FANCL ubiquitinates β -catenin and enhances its nuclear function. *Blood* 120: 323–334
99. Hay-Koren A, Caspi M, Zilberberg A, Rosin-Arbesfeld R (2011) The EDD E3 ubiquitin ligase ubiquitinates and up-regulates β -catenin. *Mol Biol Cell* 22: 399–411
100. Gerard B, Sanders MA, Visscher DW, Tait L, Shekhar MPV (2012) Lysine 394 is a novel Rad6B-induced ubiquitination site on beta-catenin. *BBA Mol Cell Res* 1823: 1686–1696
101. Wolf D, Rodova M, Miska EA, Calvet JP, Kouzarides T (2002) Acetylation of β -Catenin by CREB-binding Protein (CBP). *J Biol Chem* 277: 25562–25567
102. Lévy L, Wei Y, Labalette C, Wu Y, Renard C-A, Buendia MA, Neuveut C (2004) Acetylation of β -Catenin by p300 Regulates β -Catenin-Tcf4 Interaction. *Mol Cell Biol* 24: 3404–3414
103. Ge X, Jin Q, Zhang F, Yan T, Zhai Q (2009) PCAF Acetylates β -Catenin and Improves Its Stability. *Mol Biol Cell* 20: 419–427
104. Sánchez-Tilló E, Lázaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Engel P, Postigo A (2010) ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 29: 3490–3500
105. Hoang B, Moos M, Vukicevic S, Luyten FP (1996) Primary Structure and Tissue Distribution of FRZB, a Novel Protein Related to Drosophila Frizzled, Suggest a Role in Skeletal Morphogenesis. *J Biol Chem* 271: 26131–26137
106. Ahn VE, Chu ML-H, Choi H-J, Tran D, Abo A, Weis WI (2011) Structural Basis of Wnt Signaling Inhibition by Dickkopf Binding to LRP5/6. *Dev Cell* 21: 862–873
107. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stanek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Nature* 417: 664–667
108. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002) Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108: 837–847
109. Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S, Joraku A, Oikawa T, Kawai K, Horie R, Suzuki H, Nagashima R, Yoshikawa K, Michiue T, Asashima M, Akaza H, Uchida K (2009) Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene* 28: 297–305
110. Elyada E, Pribluda A, Goldstein RE, Morgenstern Y, Brachya G, Cojocar G, Snir-Alkalay I, Burstain I, Haffner-Krausz R, Jung S, Wiener Z, Alitalo K, Oren M, Pikarsky E, Ben-Neriah Y (2011) CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature* 470: 409–413
111. Uehata T, Akira S (2013) mRNA degradation by the endoribonuclease Regnase-1/ZC3H12a/MCPIP-1. *BBA Gene Reg Mech* 1829: 708–713
112. Jura J, Skalniak L, Koj A (2012) Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1 (MCPIP1) is a novel multifunctional modulator of inflammatory reactions. *BBA Mol Cell Res* 1823: 1905–1913
113. Liang J, Song W, Tromp G, Kolattukudy PE, Fu M (2008) Genome-Wide Survey and Expression Profiling of CCCH-Zinc Finger Family Reveals a Functional Module in Macrophage Activation. *PLoS One* 3: e2880
114. Liang J, Wang J, Azfer A, Song W, Tromp G, Kolattukudy PE, Fu M (2008) A Novel CCCH-Zinc Finger Protein Family Regulates Proinflammatory Activation of Macrophages. *J Biol Chem* 283: 6337–6346
115. Fu M, Blackshear PJ (2017) RNA-binding proteins in immune regulation: a focus on CCCH zinc finger proteins. *Nat Rev Immunol* 17: 130–143
116. Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S (2009) Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* 458: 1185–1190
117. Wilamowski M, Gorecki A, Dziedzicka-Wasylewska M, Jura J (2018) Substrate specificity of human MCPIP1 endoribonuclease. *Sci Rep* 8: 7381
118. Xu J, Peng W, Sun Y, Wang X, Xu Y, Li X, Gao G, Rao Z (2012) Structural study of MCPIP1 N-terminal conserved domain reveals a PIN-like RNase. *Nucleic Acids Res* 40: 6957–6965
119. Lin R-J, Chien H-L, Lin S-Y, Chang B-L, Yu H-P, Tang W-C, Lin Y-L (2013) MCPIP1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation. *Nucleic Acids Res* 41: 3314–3326
120. Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K (2011) MCPIP1 Ribonuclease Antagonizes Dicer and Terminates MicroRNA Biogenesis through Precursor MicroRNA Degradation. *Mol Cell* 44: 424–436
121. Skalniak L, Mizgalska D, Zarebski A, Wyrzykowska P, Koj A, Jura J (2009) Regulatory feedback loop between NF- κ B and MCP-1-induced protein 1 RNase. *FEBS J* 276: 5892–5905
122. Mizgalska D, Węgrzyn P, Murzyn K, Kasza A, Koj A, Jura J, Jarzab B, Jura J (2009) Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1 β mRNA. *FEBS J* 276: 7386–7399
123. Li M, Cao W, Liu H, Zhang W, Liu X, Cai Z, Guo J, Wang X, Hui Z, Zhang H, Wang J, Wang L (2012) MCPIP1 Down-Regulates IL-2 Expression through an ARE-Independent Pathway. *PLoS One* 7: e49841
124. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, Vandenbon A, Wessels HH, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Ohler U, Standley DM, Landthaler M, Fujiwara T, Takeuchi O (2015) Regnase-1 and roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. *Cell* 161: 1058–1073
125. Dobosz E, Wilamowski M, Lech M, Bugara B, Jura J, Potempa J, Koziel J (2016) MCPIP-1, Alias Regnase-1, Controls Epithelial Inflammation by Posttranscriptional Regulation of IL-8 Production. *J Innate Immun* 8: 564–578
126. Niu J, Wang K, Zhelyabovska O, Saad Y, Kolattukudy PE (2013) MCP-1-Induced Protein Promotes Endothelial-Like and Angiogenic Properties in Human Bone Marrow Monocytic Cells. *J Pharmacol Exp Therap* 347: 288–297
127. Garg AV, Amatya N, Chen K, Cruz JA, Grover P, Whibley N, Conti HR, Hernandez Mir G, Sirakova T, Childs EC, Smithgall TE, Biswas PS, Kolls JK, McGeachy MJ, Kolattukudy PE, Gaffen SL (2015) MCPIP1 Endoribonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation. *Immunity* 43: 475–487
128. Monin L, Gudjonsson JE, Childs EE, Amatya N, Xing X, Verma AH, Coleman BM, Garg A v., Killeen M, Mathers A, Ward NL, Gaffen SL (2017) MCPIP1/Regnase-1 Restricts IL-17A- and IL-17C-Dependent Skin Inflammation. *J Immunol* 198: 767–775
129. Miao R, Huang S, Zhou Z, Quinn T, van Treeck B, Nayyar T, Dim D, Jiang X, Papisian CJ, Eugene Chen Y, Liu G, Fu M (2013) Targeted disruption of MCPIP1/Zc3h12a results in fatal inflammatory disease. *Immunol Cell Biol* 91: 368–376
130. Kapoor N, Niu J, Saad Y, Kumar S, Sirakova T, Becerra E, Li X, Kolattukudy PE (2015) Transcription Factors STAT6 and KLF4 Implement Macrophage Polarization via the Dual Catalytic Powers of MCPIP. *J Immunol* 194: 6011–6023
131. Liang J, Saad Y, Lei T, Wang J, Qi D, Yang Q, Kolattukudy PE, Fu M (2010) MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF- κ B signaling. *J Exp Medicine* 207: 2959–2973
132. Wang W, Huang X, Xin H-B, Fu M, Xue A, Wu Z-H (2015) TRAF Family Member-associated NF- κ B Activator (TANK) Inhibits Genotoxic Nuclear Factor κ B Activation by Facilitating Deubiquitinase USP10-dependent Deubiquitination of TRAF6 Ligase. *J Biol Chem* 290: 13372–13385
133. Xu R, Li Y, Yan H, Zhang E, Huang X, Chen Q, Chen J, Qu J, Liu Y, He J, Yi Q, Cai Z (2019) CCL2 promotes macrophages-associated chemoresistance via MCPIP1 dual catalytic activities in multiple myeloma. *Cell Death Dis* 10: 781

134. Watanabe S, Alexander M, Misharin A v., Budinger GRS (2019) The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 129: 2619–2628
135. Skalniak L, Koj A, Jura J (2013) Proteasome inhibitor MG-132 induces MCPIP1 expression. *FEBS J* 280: 2665–2674
136. Skalniak A, Boratyn E, Tyrkalska SD, Horwacik I, Durbas M, Lastowska M, Jura J, Rokita H (2014) Expression of the monocyte chemotactic protein-1-induced protein 1 decreases human neuroblastoma cell survival. *Oncol Rep* 31: 2385–2392
137. Ligeza J, Marona P, Gach N, Lipert B, Miekus K, Wilk W, Jaszczynski J, Stelmach A, Loboda A, Dulak J, Branicki W, Rys J, Jura J (2017) MCPIP1 contributes to clear cell renal cell carcinomas development. *Angiogenesis* 20: 325–340
138. Lu W, Ning H, Gu L, Peng H, Wang Q, Hou R, Fu M, Hoft DF, Liu J (2016) MCPIP1 Selectively Destabilizes Transcripts Associated with an Antiapoptotic Gene Expression Program in Breast Cancer Cells That Can Elicit Complete Tumor Regression. *Cancer Res* 76: 1429–1440
139. Gorka J, Marona P, Kwapisz O, Rys J, Jura J, Miekus K (2020) The anti-inflammatory protein MCPIP1 inhibits the development of ccRCC by maintaining high levels of tumour suppressors. *Eur J Pharmacol* 888: 165
140. Lichawska-Cieslar A, Pietrzycka R, Ligeza J, Kulecka M, Paziewska A, Kalita A, Dolicka DD, Wilamowski M, Miekus K, Ostrowski J, Mikula M, Jura J (2018) RNA sequencing reveals widespread transcriptome changes in a renal carcinoma cell line. *Oncotarget* 9: 8597–8613
141. Dobosz E, Wadowska M, Kaminska M, Wilamowski M, Honarpi-shah M, Bryzek D, Potempa J, Jura J, Lech M, Koziel J (2021) MCPIP-1 Restricts Inflammation via Promoting Apoptosis of Neutrophils. *Front Immunol* 12: 165
142. Marona P, Gorka J, Mazurek Z, Wilk W, Rys J, Majka M, Jura J, Miekus K (2017) MCPIP1 downregulation in clear cell renal cell carcinoma promotes vascularization and metastatic progression. *Cancer Res* 77: 4905–4920
143. Boratyn E, Nowak I, Karnas E, Ryszawy D, Wnuk D, Polus A, Durbas M, Horwacik I, Rokita H (2020) MCPIP1 overexpression in human neuroblastoma cell lines causes cell cycle arrest by G1/S checkpoint block. *J Cell Biochem* 121: 3406–3425
144. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H (2007) Migration of Endothelial Progenitor Cells Mediated by Stromal Cell-Derived Factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS Signal Transduction Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 50: 274–280
145. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E (2006) VEGF-Induced Adult Neovascularization: Recruitment, Retention, and Role of Accessory Cells. *Cell* 124: 175–189
146. Gorka J, Marona P, Kwapisz O, Waligórska A, Pospiech E, Dobrucki JW, Rys J, Jura J, Miekus K (2021) MCPIP1 inhibits Wnt/ β -catenin signaling pathway activity and modulates epithelial-mesenchymal transition during clear cell renal cell carcinoma progression by targeting miRNAs. *Oncogene* 40: 6720–6735
147. Lu W, Ning H, Gu L, Peng H, Wang Q, Hou R, Fu M, Hoft DF, Liu J (2016) MCPIP1 selectively destabilizes transcripts associated with an antiapoptotic gene expression program in breast cancer cells that can elicit complete tumor regression. *Cancer Res* 76: 1429–1440
148. Zhuang J, Wu Y, Chen L, Liang S, Wu M, Zhou L, Fan C, Zhang Y (2018) Single-Cell Mobility Analysis of Metastatic Breast Cancer Cells. *Adv Sci* 5: 1801158
149. Nowak I, Brożyna AA, Zablocka M, Student S, Durbas M, Bugara B, Rokita H (2021) MCPIP1 expression positively correlates with melanoma-specific survival of patients, and its overexpression affects vital intracellular pathways of human melanoma cells. *Mol Carcinog* 60: 227–241
150. Ren Z, He M, Shen T, Wang K, Meng Q, Chen X, Zhou L, Han Y, Ji C, Liu S, Fu Q (2020) MiR-421 promotes the development of osteosarcoma by regulating MCPIP1 expression. *Cancer Biol Ther* 21: 231–240
151. Marona P, Górka J, Kwapisz O, Jura J, Rys J, Hoffman RM, Miekus K (2022) Resistance to tyrosine kinase inhibitors promotes renal cancer progression through MCPIP1 tumor-suppressor downregulation and c-Met activation. *Cell Death Dis* 13: 814
152. Gorka J, Marona P, Kwapisz O, Rys J, Jura J, Miekus K (2022) MCPIP1 regulates focal adhesion kinase and Rho GTPase-dependent migration in clear cell renal cell carcinoma. *Eur J Pharmacol* 922:
153. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakossavas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z (2020) Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res* 40: 6009–6015
154. Ruan K, Fang X, Ouyang G (2009) MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett* 285: 116–126
155. Wiemer EAC (2007) The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer* 43: 1529–1544
156. Satoh J, Tabunoki H (2011) Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Min* 4: 17
157. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, Tonevitsky AG (2016) Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem* 51: 33–49
158. Huang W (2017) MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics.
159. Peng Y, Croce CM (2016) The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 1: 15004
160. Wang Y, Ding Y, Wang J, Gu M, Wang Z, Qin C, Han C, Li H, Liu X, Wu P, Li G (2018) Clinical features and survival analysis of clear cell papillary renal cell carcinoma: A 10-year retrospective study from two institutions. *Oncol Lett* 16(1):1010-1022
161. Ran L, Liang J, Deng X, Wu J (2017) miRNAs in Prediction of Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* 2017: 1–6
162. Yamamura S, Saini S, Majid S, Hirata H, Ueno K, Chang I, Tanaka Y, Gupta A, Dahiya R (2012) MicroRNA-34a suppresses malignant transformation by targeting c-Myc transcriptional complexes in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 33: 294–300
163. ZHANG C, MOR, YIN B, ZHOU L, LIU Y, FAN J (2014) Tumor suppressor microRNA-34a inhibits cell proliferation by targeting Notch1 in renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 7: 1689–1694
164. Toraih EA, Ibrahim AT, Fawzy MS, Hussein MH, Al-Qahtani SAM, Shaalan AAM (2017) MicroRNA-34a: A Key Regulator in the Hallmarks of Renal Cell Carcinoma. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 1–21
165. Wu D, Pan H, Zhou Y, Zhou J, Fan Y, Qu P (2014) microRNA-133b downregulation and inhibition of cell proliferation, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase-9 in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep* 9: 2491–2498
166. Ding J, Yeh C-R, Sun Y, Lin C, Chou J, Ou Z, Chang C, Qi J, Yeh S (2018) Estrogen receptor β promotes renal cell carcinoma progression via regulating LncRNA HOTAIR-miR-138/200c/204/217 associated CeRNA network. *Oncogene* 37: 5037–5053
167. Song T, Zhang X, Wang C, Wu Y, Cai W, Gao J, Hong B (2011) MiR-138 suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 12: 1307–11
168. Cui M, Liu W, Zhang L, Guo F, Liu Y, Chen F, Liu T, Ma R, Wu R (2017) Over-Expression of miR-21 and Lower PTEN Levels in Wilms' Tumor with Aggressive Behavior. *Tohoku J Exp Med* 242: 43–52
169. Chen J, Gu Y, Shen W (2017) MicroRNA-21 functions as an oncogene and promotes cell proliferation and invasion via TIMP3 in renal cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21: 4566–4576
170. He H, Dai J, Zhuo R, Zhao J, Wang H, Sun F, Zhu Y, Xu D (2018) Study on the mechanism behind lncRNA MEG3 affecting clear cell renal cell carcinoma by regulating miR-7/ RASL11B signaling. *J Cell Physiol* 233: 9503–9515
171. Li X, Xin S, He Z, Che X, Wang J, Xiao X, Chen J, Song X (2014) MicroRNA-21 (miR-21) Post-Transcriptionally Downregulates Tumor Suppressor PDCD4 and Promotes Cell Transformation, Proliferation, and Metastasis in Renal Cell Carcinoma. *Cel Physiol Biochem* 33: 1631–1642

172. Ji H, Tian D, Zhang B, Zhang Y, Yan D, Wu S (2017) Overexpression of miR-155 in clear-cell renal cell carcinoma and its oncogenic effect through targeting FOXO3a. *Exp Ther Med* 13: 2286–2292
173. Song M-S, Rossi JJ (2017) Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochem J* 474: 1603–1618
174. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231–235
175. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T (2009) A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science* (1979) 326: 1275–1279
176. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004) Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* 118: 57–68
177. Roy A, Zhang M, Saad Y, Kolattukudy PE (2013) Antidicer RNase activity of monocyte chemotactic protein-induced protein-1 is critical for inducing angiogenesis. *A J Physiol Cell Physiol* 305: C1021–C1032
178. Boudouresque F, Siret C, Dobric A, Silvy F, Soubeyran P, Iovanna J, Lombardo D, Berthois Y (2018) Ribonuclease MCPiP1 contributes to the loss of micro-RNA-200 family members in pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 9: 35941–35961
179. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D (2006) NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Nat Acad Sci* 103: 12481–12486
180. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, de Vries N, Tak PP, Chen S, Shen N (2009) MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 60: 1065–1075
181. Chang H, Zhang X, Li B, Meng X (2021) PARP1 Is Targeted by miR-519a-3p and Promotes the Migration, Invasion, and Tube Formation of Ovarian Cancer Cells. *Cancer Biother Radiopharm* cbr.2020.4394
182. Lu J, Lou G, Jiang L, Liu X, Jiang J, Wang X (2021) CircNUP98 Suppresses the Maturation of miR-519a-3p in Glioblastoma. *Front Neurol* 12: 165
183. Yuan Z, Yang Z, Li W, Wu A, Su Z, Jiang B (2020) Expression of Concern Issued: Exosome-Mediated Transfer of Long Noncoding RNA HOTAIR Regulates Temozolomide Resistance by miR-519a-3p/RRM1 Axis in Glioblastoma. *Cancer Biother Radiopharm* doi: 10.1089/cbr.2019.3499
184. Breunig C, Pahl J, Küblbeck M, Miller M, Antonelli D, Erdem N, Wirth C, Will R, Bott A, Cerwenka A, Wiemann S (2017) MicroRNA-519a-3p mediates apoptosis resistance in breast cancer cells and their escape from recognition by natural killer cells. *Cell Death Dis* 8: e2973–e2973
185. Wang G, Yu Y, Wang Y (2022) Effects of propofol on neuroblastoma cells via the HOTAIRM1/miR-519a-3p axis. *Transl Neurosci* 13: 57–69
186. Gu Z, Wu S, Wang J, Zhao S (2020) Long non-coding RNA LINC01419 mediates miR-519a-3p/PDRG1 axis to promote cell progression in osteosarcoma. *Cancer Cell Int* 20: 147
187. Tolosa E, Botta-Orfila T, Morató X, Calatayud C, Ferrer-Lorente R, Martí M-J, Fernández M, Gaig C, Raya Á, Consiglio A, Ezquerro M, Fernández-Santiago R (2018) MicroRNA alterations in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson disease patients. *Neurobiol Aging* 69: 283–291
188. Wang S, Wen Q, Xiong B, Zhang L, Yu X, Ouyang X (2021) Long Non-coding RNA NEAT1 Knockdown Ameliorates 1-Methyl-4-Phenylpyridine-Induced Cell Injury Through MicroRNA-519a-3p/SPI Axis in Parkinson Disease. *World Neurosurg* 156: e93–e103
189. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M (2008) miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Nat Acad Sci* 105: 20297–20302
190. Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, Mercken EM, Brennan SE, Wilson GM, de Cabo R, Gorospe M (2010) miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels. *Cell Cycle* 9: 1354–1359
191. Ward A, Shukla K, Balwierz A, Soons Z, König R, Sahin Ö, Wiemann S (2014) MicroRNA-519a is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumour-suppressor genes in ER+ breast cancer. *J Pathol* 233: 368–379
192. Shen Z, Zhan G, Deng H, Ren Y, Ye D, Xiao B, Guo J (2013) MicroRNA-519a demonstrates significant tumour suppressive activity in laryngeal squamous cells by targeting anti-carcinoma HuR gene. *J Laryngol Otol* 127: 1194–1202
193. Zhang Y, Sun M, Chen Y, Li B (2019) MiR-519b-3p Inhibits the Proliferation and Invasion in Colorectal Cancer via Modulating the uMtCK/Wnt Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 10: 741
194. Shen Z, Zhan G, Deng H, Kang C, Guo J (2014) [Growth inhibitory effect of microRNA-519b-3p on larynx squamous Hep-2 cells]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 49: 151–6
195. Luo J, Liu L, Zhou N, Shen J, Sun Q, Zhu Y, Chen M (2018) miR-519b-3p promotes responsiveness to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer patients by targeting ARID4B. *Gene* 655: 84–90
196. Liang H, Wang J, Zhang P, Yang W, Yang Y, Zhi Y, Wu W, Dong X (2021) Long Non-Coding RNA Duxap8 Facilitates Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Colorectal Cancer via miR-519b/ZNF277 Axis. *Onco Targets Ther* Volume 14: 4693–4703
197. Yu G, Zhang T, Jing Y, Bao Q, Tang Q, Zhang Y (2017) miR-519 suppresses nasopharyngeal carcinoma cell proliferation by targeting oncogene URG4/URGCP. *Life Sci* 175: 47–51
198. Ren L, Li Y, Zhao Q, Fan L, Tan B, Zang A, Yang H (2019) miR-519 regulates the proliferation of breast cancer cells via targeting human antigen R. *Oncol Lett* 19(2):1567–1576
199. Nong K, Zhang D, Chen C, Yang Y, Yang Y, Liu S, Cai H (2019) MicroRNA-519 inhibits hypoxia-induced tumorigenesis of pancreatic cancer by regulating immune checkpoint PD-L1. *Oncol Lett* 19(2):1427–1433
200. Mazan-Mamczarz K, Zhao XF, Dai B, Steinhart JJ, Peroutka RJ, Berk KL, Landon AL, Sadowska M, Zhang Y, Lehrmann E, Becker KG, Shakhovich R, Liu Z, Gartenhaus RB (2014) Down-Regulation of eIF4GII by miR-520c-3p Represses Diffuse Large B Cell Lymphoma Development. *PLoS Genet* 10: e1004105
201. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, Allgayer H, Gückel B, Fehm T, Schneeweiss A, Sahin Ö, Wiemann S, Tschulena U (2012) MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene* 31: 4150–4163
202. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R (2008) The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 10: 202–210
203. Liu P, Wilson MJ (2012) miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF- κ B factor in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol* 227: 867–876
204. Lei C-J, Yao C, Li D-K, Long Z-X, Li Y, Tao D, Liou Y-P, Zhang J-Z, Liu N (2016) Effect of co-transfection of miR-520c-3p and miR-132 on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma Huh7. *Asian Pac J Trop Med* 9: 898–902
205. Xu T, Li L, Huang C, Miao CG, Li J (2014) miR-520c-3p with therapeutic potential in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 44: 825–825
206. Miao H-L, Lei C-J, Qiu Z-D, Liu Z-K, Li R, Bao S-T, Li M-Y (2014) MicroRNA-520c-3p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through induction of cell apoptosis by targeting glypican-3. *Hepatol Res* 44: 338–348
207. Mudduluru G, Ilm K, Fuchs S, Stein U (2017) Epigenetic silencing of miR-520c leads to induced S100A4 expression and its mediated colorectal cancer progression. *Oncotarget* 8: 21081–21094

208. Hu S, Chen H, Zhang Y, Wang C, Liu K, Wang H, Luo J (2017) MicroRNA-520c inhibits glioma cell migration and invasion by the suppression of transforming growth factor- β receptor type 2. *Oncol Rep* 37: 1691-1697
209. Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA (2009) MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 2: 361-9
210. Li Y, Wen L, Wang Y, Zhou T, Ma N, Hou Z, Jiang Z (2016) MicroRNA-520c enhances cell proliferation, migration, and invasion by suppressing IRF2 in gastric cancer. *FEBS Open Bio* 6: 1257-1266
211. Sun LZ, Jiang YZ, Luan SX, Shi YL, Wang Q (n.d.) Long non-coding RNA FGD5-AS1 promotes cell viability and metastasis in osteosarcoma by regulating miR-520c-3p. *J Biol Regul Homeost Agents* 35: 323-329
212. Jiao Y, Zhao D, Gao F, Hu X, Hu X, Li M, Cui Y, Wei X, Xie C, Zhao Y, Gao Y (2021) MicroRNA-520c-3p suppresses vascular endothelium dysfunction by targeting RELA and regulating the AKT and NF- κ B signaling pathways. *J Physiol Biochem* 77: 47-61
213. Li J, Jiang X, Li Z, Huang L, Ji D, Yu L, Zhou Y, Cui Y (2020) SP1-induced HOXD-AS1 promotes malignant progression of cholangiocarcinoma by regulating miR-520c-3p/MYCN. *Aging* 12: 16304-16325
214. Peng L, Deng M, Ma Y, Hu W, Liang F (2021) miR-520c-3p regulates IL-1 β -stimulated human chondrocyte apoptosis and cartilage degradation by targeting GAS2. *J Orthop Surg Res* 16: 347

Podziękowania: Badania prezentowane w pracy doktorskiej zrealizowano w ramach projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki: SONATA 5 (2013/09/D/NZ5/00249), OPUS 10 (2015/19/B/NZ5/01405), SONATA BIS 7 (2017/26/E/NZ5/00691) – kierownik projektów: dr hab. Katarzyna Miękus, prof. UJ, PRELUDIUM 20 (2021/41/N/NZ5/01832) – kierownik projektu: dr Judyta Górka; oraz ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanych WBBiB UJ na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich: KNOW BMN 1/2017, BMN 1/2018 i MNS 9/2019 – kierownik projektów: dr Judyta Górka.

The role of MCPIP1 in key elements of the epithelial-mesenchymal transition signaling axis in clear cell renal cell carcinoma

Judyta Górka[✉], Katarzyna Miękus

Department of General Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology of Jagiellonian University, Kraków

[✉]corresponding author: judyta.gorka@uj.edu.pl

Key words: MCPIP1, Wnt pathway, β -catenin, ccRCC, kidney

ABSTRACT

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common renal tumor with a highly aggressive phenotype and poor prognosis. A key process in tumor progression is epithelial-mesenchymal transition (EMT), as a result of which cells acquire the ability to metastasize. An important inducer of the EMT process is inflammation. A negative regulator of inflammation is the Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induced Protein 1 (MCPIP1), which by regulating the immune response may contribute to inhibiting tumor progression. A specific function of the MCPIP1 protein is RNase activity regulating the level of mRNA and miRNA expression. In our studies, we investigated how the MCPIP1 protein affects the EMT process, migratory activity and the level of tumor suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma cell lines, tumor tissues of patients and an *in vivo* xenotransplantation model. We have shown that MCPIP1 regulates the EMT process by preventing cells from acquiring a mesenchymal phenotype. MCPIP1, due to its RNase activity, degrades miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p and miRNA-520c-3p, thereby actively affecting the levels of SFRP4, KREMEN1, ZNRF3, CXXC4 and CSNK1A1 inhibitors and inhibiting the Wnt pathway by inactivating β -catenin and, consequently, inhibiting the EMT process. Furthermore, MCPIP1 regulates the level of Rho proteins, phosphorylation of FAK and Src kinases, and consequently actin remodeling. The obtained results indicate that the lack of MCPIP1 RNase activity activates genes and processes associated with the migratory activity of cancer cells. In summary, the results obtained in this doctoral thesis indicated that MCPIP1 may regulate the progression of clear cell renal cancer at various levels of proangiogenic and prometastatic factors, as well as by influencing the EMT process.

ARTYKUŁ OPUBLIKOWANY W RAMACH

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
i firmy Merck Sp. z o.o.
za najlepszą pracę doktorską z biochemii
im. Witolda Drabikowskiego

Laureat (wyróżnienie): dr Judyta Górka

TYTUŁ ROZPRAWY:

**Rola wpływu białka MCPIP1 na kluczowe elementy osi
sygnalizacyjnej procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego**

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Miękus, prof. UJ