

***A Misexpression supressor of Ras 4 szerepe a Drosophila
ivarsejtképződésben***

A Ph.D. értekezés tézisei

Szarka-Kovács Alexandra Brigitta

Témavezető: Dr. Jankovics Ferenc, Tudományos főmunkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológiai Doktori Iskola

Szeged

2023

Bevezetés

A kifejlett többsejtű élőlények szervezetében az őssejtek szigorúan szabályozott módon osztódva biztosítják a szövetek sejtjeinek utánpótlását. Osztódás után az egyik utódsejt megmarad őssejt állapotban, a másik utódsejt pedig differenciálódik és biztosítja a szövet fennmaradását és funkciójának ellátását. Az őssejtek közös jellemzője, hogy speciális mikrokörnyezetekben, az ún. őssejt niche-ekben helyezkednek el, ahol belső, illetve sejten kívüli faktorok szabályozzák az őssejtek fennmaradását és differenciálódását. Az őssejtbiológiai kutatások alapkérdése, hogy milyen tényezők határozzák meg, hogy a sejtek őssejt állapotukat tartják fent, vagy elindítják a differenciációs programjukat. A *Drosophila melanogaster* petefészkében található ivarvonal-őssejt niche kiváló modell ezen tényezők vizsgálatára.

A felnőtt *Drosophila melanogaster* petefészkében az ivarvonal őssejtek (GSC) a petefészkek apikális végén helyezkednek el. A GSC-ket testi sejtek veszik körül, melyek részt vesznek az őssejt niche kialakításában. A petefészkek őssejt niche-ében az őssejtállapot fenntartása a *bag of marble (bam)* gén expressziójának gátlásán keresztül valósul meg. A *bam* az ivarsejtek differenciálódást szabályozó kulcsgén, ami a GSC-kben nem fejeződik ki, a GSC-k egyik utódsejtjében azonban elindítja a sejtek differenciációját. A GSC-kben a *bam* kifejeződését a niche bizonyos testi sejtjei által termelt Decapentaplegic (Dpp) gátolja. A Dpp jel morfogenetikai grádiensét a niche testi sejtjeiben aktív EGFR/ERK és a JAK/STAT útvonal állítja be, ezzel biztosítva a niche-ben a GSC-k fennmaradását és a niche területéről kikerülő utódsejtek differenciálódását. A külső jeleken kívül az őssejten belüli faktoroknak is fontos szabályozó szerepe van az őssejtállapot fenntartásában és a differenciálódás elindításában. Ilyen belső tényezők többek között a transzkripcót befolyásoló fehérjék. A GSC osztódásával az egyik utódsejt kijut az őssejt niche-ből, ahol a gátló Dpp jel már nem éri el, de még nem indul el a differenciációs programja. Ekkor a sejt egy átmeneti, ún. precisztoblaszt (preCB) állapotba kerül, ahol olyan folyamatok aktiválódnak, amik lehetővé teszik a *bam* kifejeződését. A *bam*-ot kifejező ivarsejtben elindul a differenciációs program és cisztoblasztá, majd ezt követően cisztává fejlődik. A *bam* expresszióját szabályozó cisz-regulátor régió jól jellemzett, (Chen and McKearin, 2003b). A *bam* expressziójának számos transz-regulátorát leírták, azonban ezek a *bam* kifejeződésének a gátlásában vesznek részt, az expressziót aktiváló fehérjék ezzel szemben nem ismertek. A MESR4-ről korábban kimutatták, hogy funkciója szükséges az ivarsejtek differenciálódásának szabályozásához (Wissel et al., 2016), azonban pontos szerepe nem ismert.

Célkitűzések

A *MESR4* génről kimutatták, hogy szerepe van az ivarsejtek képződésében, azonban a folyamatban betöltött pontos szerepe nem ismert. Általános célunk azoknak a *MESR4* által közvetített folyamatoknak a megértése volt, amelyek szükségesek a működőképes ivarsejtek kialakulásához. A *MESR4* szerepének jellemzéséhez a génfunkció vizsgálatához általánosan használt és jól bevált kísérletsorozatot szándékoztunk végrehajtani. Ennek része a *MESR4* expressziós mintázatának és szubcelluláris lokalizációjának leírása fluoreszcensen jelölt fehérje vizsgálatával. A *MESR4* funkciójának feltárásának következő lépése a funkcióvesztéses helyzetben kialakuló fenotípus részletes jellemzése, ami megmutatja, hogy a *MESR4* a niche mely sejtípusában, az ivarsejtek fejlődének melyik stádiumában, és melyik differenciáltsági állapotban szükséges az ivarsejtek képződéshez. A funkcióvesztéses fenotípus ismeretében olyan specifikus kérdések megválaszolására nyílik lehetőségünk, amelyek *MESR4* génszabályozásban játszott szerepének tisztázására illetve a niche-ben működő jelutakban betöltött szerepének feltárására vonatkoznak. Mivel a *MESR4* fehérje többféle fehérje doménnel rendelkezik, célunk volt kideríteni, hogy a *MESR4* melyik doménje szükséges az ivarsejtek differenciálódásához, illetve milyen egyéb fehérjékhez kapcsolódva működik.

Kísérletsorozatunk célja egy gén specifikus funkciójának megismerésével az összejt niche-ekben működő általános génszabályozási mechanizmusok részletesebb megismerése.

Alkalmazott módszerek

- Immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk a vad típusú és a *MESR4* csendesített őssejt niche-ek fenotípusát
- Quantitative PCR-el megvizsgáltuk a *bam* mRNS szintjét a vad és *MESR4* csendesített petefészkekben
- Új funkcióvesztéses *MESR4* mutáns allélt (*MESR4^{Aphd}*) hoztunk létre CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) genomszerkesztési módszerrel
 - A *MESR4* génre specifikus chiRNS-eket terveztünk Crispr Optimal Target Finder programmal
 - A chiRNS-eket expresszáló transzgenikus *Drosophila* törzset vasaCas9-et expresszáló transzgenikus *Drosophila* törzsszel kereszteztük
 - A deléciókat PCR-el azonosítottuk, majd DNS szekvenálással igazoltuk
- EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) analízissel megvizsgáltuk, hogy a *MESR4* zinc fingerei képesek -kötni a *bam* regulátor régióját
 - A *MESR4* zinc fingerei kódoló régiót expressziós vektorba klónoztuk
 - A *MESR4* zinc fingereit bakteriális expressziós rendszerben megtermeltük és tisztítottuk
 - A fehérje-DNS kölcsönhatás kimutatásánál a *bam* regulátor régiójának a germ-cell specific enhancer element szakaszát használtuk
- *MESR4* kölcsönható partnereket azonosítottunk koimmunprecipitációval kapcsolt tömegspektrometriával

Eredmények

1. A MESR4:GFP fúziós fehérje képes menekíteni a *MESR4*⁷⁹ allél letális fenotípusát, ami azt jelzi, hogy a GFP felölt MESR4 fehérje működőképes. A *MESR4:GFP* transzgenikus törzset megvizsgálva megállapítottuk, hogy a MESR4 fehérje kifejeződött a hármas stádiumú lárvák petefészkeiben, és ez az expresszió egészen a felnőtt állapotig fennmaradt. A MESR4:GFP expresszió a petefészkek ivarvonal- és testi sejteiben egyaránt megfigyelhető volt.
2. A MESR4 testisejt-specifikus csendesítése esetén az ivarsejtek differenciációja végbement, azonban ivarvonal-specifikus MESR4 csendesítés esetén a niche-ekben elszaporodtak a differenciálatlan sejtek. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a *MESR4* az ivarsejtekben, sejt-autonóm módon szabályozza az ivarsejtek differenciálódását.
3. A *MESR4* funkciójának részletesebb térképezéséhez stádium-specifikusan csendesítettük az ivarsejtekben a *MESR4*-et. Az ivarsejtek differenciációja kizárólag, akkor maradt el, ha már korai állapotban, a cisztoblaszt állapot előtt csendesítettük a *MESR4*-et. Megállapítottuk, hogy a *MESR4* a GSC-kben vagy a preCB-kban szükséges az ivarsejtek megfelelő differenciációjához.
4. Mivel az ivarsejtek differenciálódását az EGFR/ERK útvonal szabályozza, megvizsgáltuk, hogy a *MESR4*-nek van-e hatása az EGFR/ERK útvonal működésére kifejtett ováriumban az ivarsejt niche-ben. Immunfestéssel megvizsgáltuk az EGFR/ERK útvonal működését *MESR4*-et túltermelő, és csendesített petefészkekben, azonban nem tapasztaltunk eltérést a vad típusú niche-hez képest. Megállapítottuk, hogy a felnőtt ovárium ivarsejt niche-ben a MESR4 nem az EGFR/ERK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza az ivarsejtek differenciálódását.
5. Az ivarsejt differenciálódás másik szabályozó útvonala a TGF β /Dpp útvonal. A differenciálatlan sejtek elszaporodását okozhatja a TGF β /Dpp útvonal kiterjedt működése, ezért immunfestéssel megvizsgáltuk a TGF β /Dpp útvonal működését *MESR4* csendesített niche-ekben. Azt találtuk, hogy MESR4 hiányában a Dpp gradiens kiterjedése megfelelő és a TGF β /Dpp-jelút csak a niche csúcsi részén gátolja a GSC-k

differentiálódását, tehát a *MESR4* a TGF β /Dpp jelúttól függetlenül szabályozza a sejtek differentiálódását, és az elszaporodott sejtek nem GSC-k.

6. Megvizsgáltuk, hogy az elszaporodott sejtek preCB állapotban vannak-e. Ehhez megvizsgáltunk egy preCB-specifikus marker a *polar granule component (pgc)* expresszióját. A Pgc-GFP-t kifejező sejtek elszaporodása *MESR4* csendesített niche-ben azt jelzi, hogy az elszaporodott sejtek preCB állapotban vannak.
7. A differentiació fő szabályozója a *bam* gén. QPCR segítségével kimutattuk, hogy *MESR4* csendesítés hatására a niche-ekben lecsökken a *bam* mRNS mennyisége. A *MESR4* csendesítés fenotípusát Bam túltermeléssel menekíteni tudtuk. A konstitutívan aktív *bamP Δ SE-Bam::GFP* fenotípusát a *MESR4* csendesítés szupresszálta. Ez arra utal, hogy a *MESR4* az elkötelezett GSC leánysejtekben, a preCB-okban a *bam* expressziójának elősegítésével szabályozza a differentiálódást.
8. CISPR/Cas9 genomszerkesztési módszerrel előállítottunk egy PHD finger nélküli, mutáns *MESR4* allélt. Az új allélt *MESR4 Δ phd* allélnak neveztük el. A homozigóta *MESR4 Δ phd* mutáns nőstények vad fenotípusa azt jelzi, hogy a *MESR4* fehérje PHD finger motívuma nem szükséges a *MESR4* ivarvonalon betöltött szerepének ellátásához.
9. EMSA kísérlettel kimutattuk, hogy a *MESR4* zinc fingere doménjei képesek kötni a *bam* regulátor régiójának germ-cell specific enhancer element szakaszát. Ez arra utal, hogy a *MESR4* a zinc fingerein keresztül, a DNS-hez közvetlenül kapcsolódva, transzkripció faktoraként szabályozhatja a *bam* gén expresszióját.
10. Koimmunprecipitációval kapcsolt tömegspektroszkópiás kísérlettel a *MESR4* partnerei között nagy találati értékkel megtaláltuk a *MESR4*-nek korábban azonosított kölcsönható fehérjéjét, a Host cell factor-t (Hcf). Kettős heterozigóta mutáns germáriumokat megvizsgálva azonban nem tudtunk köztük genetikai interakciót kimutatni.

Summary

Our aim was to investigate those *MESR4*-mediated processes that are necessary for proper germ cell development.

We observed that *MESR4* is expressed in all cells of the ovary in late third instar larvae and adult flies, and localizes to the nuclei. Through cell-type specific silencing experiments, we demonstrated that *MESR4* is required in a cell-autonomous manner for proper germ cell differentiation. Furthermore, using stage-specific silencing and stage-specific markers, we determined that *MESR4* is required in the precystoblast stage of germ cell differentiation. In the absence of *MESR4*, we observed a significant reduction in *bam* mRNA levels, indicating that *MESR4* is necessary for proper *bam* expression. We confirmed that the *MESR4* silenced phenotype can be rescued by *bam* overexpression. Using the *bam-PΔSE-Bam:GFP* transgenic allele, which is insensitive to inhibitory Dpp signals, in a *MESR4* silenced background, we demonstrated that *MESR4* is required for proper *bam* transcription. We also found that *MESR4* is not required in the niche for the function of the EGFR/ERK signaling pathway. Silencing of *MESR4* did not affect the TGFβ/Dpp pathway, indicating that *MESR4* regulates *bam* expression independently of this pathway. Using the CRISPR/Cas9 system, we generated a novel *MESR4* allele lacking its PHD finger. The phenotype of the *MESR4^{Δphd}* homozygous flies showed that the PHD finger of *MESR4* is not required for its function in germ cells. Through an EMSA experiment, we demonstrated that the zinc fingers of *MESR4* can bind to the germ-cell specific enhancer element of the *bam* regulatory region, suggesting that *MESR4* may regulate *bam* expression as a transcription factor. Using a co-immunoprecipitation coupled mass spectrometry experiment, we identified *MESR4* interacting partners. While we found a previously identified interacting partner of *MESR4*, Hcf, no dominant genetic interaction was observed between them when examining double heterozygotic germaria.

Our hypothesis is that the transcriptional control of *bam* by *MESR4* is mediated by the direct association of *MESR4* with the *bam* regulatory sequences via its zinc fingers.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10074822

Összesített IF: 13,429

A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

Drosophila MESR4 Gene Ensures Germline Stem Cell Differentiation by Promoting the Transcription of bag of marbles

CELLS 11 : 13 Paper: 2056 , 13 p. (2022)

Szarka-Kovács, Alexandra Brigitta; Takács, Zsanett; Bence, Melinda; Erdélyi, Miklós; Jankovics, Ferenc

Drosophila small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation

DEVELOPMENT 145 : 23 Paper: dev170639 , 13 p. (2018)

Jankovics, Ferenc; Bence, Melinda; Sinka, Rita; Faragó, Anikó; Bodai, László; Pettko-Szandtner, Aladár; Ibrahim, Karam; Takács, Zsanett; **Szarka-Kovács, Alexandra Brigitta**; Erdélyi, Miklós

Referált folyóiratban megjelent közlemények

Drosophila MESR4 Gene Ensures Germline Stem Cell Differentiation by Promoting the Transcription of bag of marbles

CELLS 11 : 13 Paper: 2056 , 13 p. (2022)

Szarka-Kovács, Alexandra Brigitta; Takács, Zsanett; Bence, Melinda; Erdélyi, Miklós; Jankovics, Ferenc

IF: 7,666

Drosophila small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation

DEVELOPMENT 145 : 23 Paper: dev170639 , 13 p. (2018)

Jankovics, Ferenc; Bence, Melinda; Sinka, Rita; Faragó, Anikó; Bodai, László; Pettko-
Szandtner, Aladár; Ibrahim, Karam; Takács, Zsanett; **Szarka-Kovács, Alexandra Brigitta**;
Erdélyi, Miklós

IF: 5,763

Nyilatkozat I.

Alulírott Dr. Jankovics Ferenc hozzájárulok, hogy Szarka-Kovács Alexandra Brigitta fokozatszerzési eljárásához felhasználja a „Jankovics et al, Development, 2018 Dec 4;145(23): Drosophila small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation” című közleményükben lévő eredményeket és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Dr. Jankovics Ferenc

Kelt. 2023.04.17

Nyilatkozat II.

Alulírott, Dr. Jankovics Ferenc, kijelentem, hogy a közleményben („Jankovics et al, Development, 2018 Dec 4;145(23): Drosophila small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation”) megjelent eredmények elérésében a jelölt, Szarka-Kovács Alexandra Brigitta jelentős szerepet vállalt. Kijelentem továbbá azt is, hogy más jelöltnek nem adok ki hasonló tartalmú nyilatkozatot azokról az eredményekről, melyeket a jelölt fokozatszerzésében felhasznált.

Dr. Jankovics Ferenc

Témavezető

Kelt. 2023.04.17