

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

Ph.D. értekezés

Szarka-Kovács Alexandra Brigitta

Témavezető: Dr. Jankovics Ferenc

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Biológiai Kutatóközpont – Genetikai Intézet

SZTE TTIK

2023

Szeged

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések jegyzéke	5
3. Bevezetés	7
3.1 A <i>Drosophila</i> őssejt niche-ek.....	7
3.2 A <i>Drosophila</i> ivarszervek kialakulása.....	8
3.3 A petefészek őssejt niche kialakulása.....	9
3.4 Az ivarsejt-differenciálódás szabályozása a lárvális petefészekben.....	10
3.5 A felnőtt őssejt niche felépítése.....	12
3.6 Az ivarsejt-differenciálódás szabályozása a felnőtt petefészekben	14
3.7 A differenciálódás szabályozása a CB-okban	18
3.8 A differenciálódás epigenetikai szabályozása	19
3.9 <i>Bam</i> szabályozó régió felépítése.....	19
3.10 <i>MESR4</i> – <i>Misexpression suppressor of Ras4</i>	21
4. Célkitűzés	23
5. Anyagok és módszerek.....	24
5.1 A felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek listája.....	24
5.2 Indirekt immufluoreszcens festés <i>Drosophila</i> petefészkeken.....	25
5.3 Quantitatív RT-PCR transzkript szint változásának mérésére.....	26
5.4 ChiRNS-t kifejező plazmid tervezése és előállítása és tesztelése	27
5.5 <i>MESR4</i> mutánsok előállítása CRISPR/Cas9 segítségével.....	27
5.6 Genomi DNS izolálása <i>Drosophila melanogaster</i> ből	28
5.7 Fehérje expresszálo plazmid konstrukciók készítése wheat germ expressziós rendszerhez.....	29
5.8 pDEST15-MESR4 ¹⁷⁸³⁻⁴⁰⁵⁰ plazmid létrehozása bakteriális expresszióhoz	30
5.9 Fehérje tisztítás bakteriális expressziós rendszerből	31

5.10 Fehérje-DNS kölcsönhatás kimutatása Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) módszerrel.....	32
5.11 MESR4 kölcsönható partnerek azonosítása koimmunprecipitációval kapcsolt tömegspektroszkópiával.....	32
6. Eredmények	34
6.1 A <i>MESR4</i> sejtautonóm módon szabályozza a sejtek differenciálódását az ivarsejtképződés korai állapotában	34
6.1.1 A <i>MESR4</i> a petefészkek összes sejtjében kifejeződik.....	34
6.1.2 A <i>MESR4</i> sejtautonóm módon szabályozza az ivarsejtek differenciálódását ..	35
6.1.3 A <i>MESR4</i> -re az ivarsejt-differenciálódás korai szakaszában van szükség.....	37
6.2 A <i>MESR4</i> a preCB állapotban szabályozza a sejtek differenciálódását.....	39
6.2.1 <i>MESR4</i> csendesített petefészkekben az EGFR/ERK útvonal megfelelően működik	39
6.2.2 <i>MESR4</i> csendesített petefészkekben a TGF β /Dpp útvonal megfelelően működik	41
6.2.3 A <i>MESR4</i> gén a preCB – CB sejtállapotok közötti átmenetet szabályozza.....	42
6.3 A <i>MESR4</i> a <i>bam</i> expresszió pozitív regulátora	44
6.3.1 <i>MESR4</i> csendesített petefészkekben lecsökken a Bam mennyisége	44
6.3.2 A <i>MESR4</i> csendesített fenotípus Bam túltermeléssel menekíthető	45
6.3.3 A konstitutívan aktív <i>bam</i> allél expressziójához is szükséges a <i>MESR4</i>	46
6.4 A <i>MESR4</i> a <i>bam</i> transzkripció faktor.....	48
6.4.1 A <i>MESR4</i> PHD doménje nem szükséges az ivarsejtek differenciálódásához ..	49
6.4.2 A <i>MESR4</i> zinc finger-ei kötik a <i>bam</i> promóter szabályozó régióját.....	49
6.5 <i>MESR4</i> fehérje kötőpartnereinek azonosítása	50
7. Diskusszió	53
8. Köszönetnyilvánítás	56
9. Irodalomjegyzék.....	57
10. Összefoglaló.....	66

11. Summary 69

2. Rövidítések jegyzéke

ATAC - Ada2a-containing

Bam - bag of marble

Bgcn - Benign gonial cell neoplasm

CB - cisztoblaszt

CC - sapkasejtek (cap cells)

CycA – ciklin A

CycB - ciklin B

Dad - Daughters against dpp

Dpp - Decapentaplegic

EC - kísérő sejtek (escort cells)

Egf - Epidermal growth faktor

Egfr - Epidermal growth factor receptor

Egg - Eggless

EMSA - Electrophoretic mobility shift assay

Enok - Enoki mushroom

Gbb - Glass bottom boat

GC-specific enhancer element - ivarsejt-specifikus enhanszer elem

GSC - ivarvonal-őssejt (germ line stem cell)

Hcf - Host cell factor-t

HP1a - Heterochromatin protein 1a

Hts - Hu-li tai shao

IC - közbeékelődött sejtekkel (intermingled cells)

ISWI - Imitation switch

Mad - Mother against dpp

Med - Medea

MESR4 - Misexpression suppressor of Ras4

NLS - sejtmagi lokalizációs szignál (nuclear localization signal)

PGC - primordiális ivarsejtek (primordial germ cells)

Pgc - polar granule component

PHD - Plant Homeodomain

preCB - pre-cisztoblaszt

Sax - Saxophone

SE - Silencer Element

SGP - szomatikus gonád prekursor sejtek (somatic gonad precursor)

ShC - hüvely sejtek (sheat cells)

SwC - raj sejtek (swarm cells)

TF - terminális filament (terminal filament cells)

Tkv - Thick veins

Trr - Trithorax-related

Upd - Unpaired

3. Bevezetés

3.1 A *Drosophila* őssejt niche-ek

A többsejtű élőlények szervezetét számos különböző sejtípus építi fel, melyek mindegyike saját, egyedi funkcióval rendelkezik. Az egyik ilyen sejtípus a felnőtt őssejt, ami folyamatos osztódása révén biztosítja a szövetek fennmaradásához és működéséhez szükséges sejtszámot (Lin, 2002). Az őssejtek szimmetrikus vagy aszimmetrikus mitotikus osztódásokon mehetnek keresztül, egyidejűleg lehetővé téve ezáltal az önmegújítást és a differenciált sejtek létrehozását (Morrison és Kimble, 2006). Az őssejtek szimmetrikus osztódása egyes esetekben két újabb őssejtet, míg más osztódásokban csak differenciált utódsejteket hoz létre, ezáltal az őssejtek száma a fejlődés vagy a regeneráció során bővíthet, miközben az őssejtek és a differenciált sejtek közötti egyensúly fennmarad. Az őssejtek aszimmetrikus mitózisakor azonban az egyik utódsejt őssejt állapotban marad, hogy fenntartsa a differenciálatlan őssejtkészletet, míg a másik leánysejt differenciálódni kezd, hogy támogassa a fejlődési folyamatokat vagy biztosítsa a szöveti homeosztázist. Az őssejtbiológiai kutatások egyik legfontosabb célja az őssejt állapot fenntartását és a differenciálódási program beindítását szabályozó mechanizmusok megismerése.

Összetett biológiai jelenségeknek, mint például az őssejtek önmegújító képességének fennmaradását vagy a differenciálódás elkezdését biztosító folyamatoknak a hatékony vizsgálatát széles körben alkalmazott modellszervezeteket teszik lehetővé. A megfelelő modell kiválasztásának fontos szempontja, hogy a vizsgált biológiai jelenség az emberben előforduló folyamathoz hasonló módon történjen meg. A modellszervezetek közös jellemzője továbbá, hogy olcsó fenntarthatóságuk mellett, a vizsgálati módszerek széles választéka áll rendelkezésre a modellezni kívánt biológiai folyamat megismerésére. Az őssejtek biológiájának vizsgálatára legrégebben és legeredményesebben felhasznált modellek a felnőtt ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) működő bél, központi nyirokszerv és ivarsejt őssejtek. A muslica közepbelében elhelyezkedő intesztinális őssejtek a bélhámsejtek, míg a hematopoetikus őssejtek a hemolimfa sejtjes elemeinek utánpótlásáért felelősek. Az ivarszervekben található ivarvonal-őssejtek az ivarsejtek folyamatos termelését biztosítják.

Az őssejtek közös jellemzője, hogy egy sajátos mikro környezetben, az ún. őssejt niche-ben helyezkednek el. A niche, mint az őssejteknek otthont adó mikro környezet fogalmát először

Schofield javasolta közel 40 évvel ezelőtt az emlősök vérképzésével kapcsolatban, de kísérleti bizonyítékot a niche létezésére először az ecetmuslica ivarvonal őssejt modelljei szolgáltattak (Kiger és mtsai., 2000; Schofield, 1978; Xie és Spradling, 2000). Az ecetmuslica ivarszerveiben az ivarvonal őssejtek egy kúpos anatómiai szerkezet csúcsán helyezkednek el, ahol az őssejtek fenntartása a szerkezet végén lévő szomatikus sejtekkel való kölcsönhatásuktól függ.

A leírásuk óta eltelt több mint 20 év alatt a *Drosophila* ivarsejtek őssejt niche-eit részletekbe menően tanulmányozták, ami a herében és a petefészkekben található niche-eket az őssejtkutatás legintenzívebben kutatott és legalaposabban leírt modelljeivé tette. Az elmúlt két évtized kutatásai feltárták a niche felépítését, a niche-ben található sejtípusok funkcióját, a sejtek közötti kommunikációs útvonalakat és az egyedfejlődés során a niche kialakulásához vezető lépéseket (Dansereau és Lasko, 2008; Lehmann, 2012; Pearson és mtsai., 2009; Spradling és mtsai., 2011; Xie és mtsai., 2008). Kiderült, hogy a *Drosophila* here és petefészkek ivarvonal niche-einek közös jellemzője, hogy rendkívül egyszerű anatómiai felépítésük ellenére több típusú őssejt is található bennük. Az ivarszervek őssejt niche-eiben az ivarvonal őssejtjei mellett az ivarsejtek képződését támogató testi sejtek őssejtjei is megtalálhatók, ami egy szerven belül többféle őssejt egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé. Kísérleteinkben a petefészkekben található niche-ek ivarvonal őssejtjeit vizsgáltuk.

3.2 A *Drosophila* ivarszervek kialakulása

A felnőtt egyedek ivarszerveit ivarsejtek és a fennmaradásukat és differenciálódásukat elősegítő testi sejtek alkotják. A kétféle sejtípust eltérő eredetű sejtek alkotják, melyek előalakjai az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban, az embrionális test eltérő helyein differenciálódnak, majd szabályozott módon összekapcsolódva hozzák létre az embrionális ivarszervet, mely a lárva- és bábstádium után adult ivarszervvé fejlődik. Az ivarsejtek előalakjai, a primordiális ivarsejtek (primordial germ cells, PGC) az embrió poszterior pólusán fűződnek le, a megtermékenyített petesejt ivarplazmáját magukba foglalva. A lefűződött sejtek száma 2-3 mitotikus osztódással megközelítőleg negyvenre nő (Sonnenblick, 1950). A PGC-k a gasztruláció során a fejlődő középbélbe jutnak, majd annak falán áttörve a testüregben aktív kemotaktikus vándorlásba kezdenek a későbbi ivarszerv felé (Jaglarz és Howard, 1995; Richardson és Lehmann, 2010; Warrior, 1994).

Az ivarszervek testi sejtjeinek előalakjai, a szomatikus gonád prekursor sejtek (somatic gonad precursor, SGP), heterogén eredetűek, mivel az embrió három különböző abdominális szelvényének mezoderájából származnak (Boyle és mtsai., 1997). A gonádképződés helyének

elérése érdekében a PGC-k az SGP-k felé vándorolnak, majd a két sejttípus az embrionális fejlődés középső szakaszában összekapcsolódik az ötödik abdominális szegment területén a test mindkét oldalán létrehozva az embrionális ivarszervet (Boyle és DiNardo, 1995; Richardson és Lehmann, 2010; Warrior, 1994).

3.3 A petefészek összejt niche kialakulása

A korai lárvastádiumokban mind a gonád szomatikus sejtjei (a niche-sejtek előfutárai), mind PGC-k (az ivarvonal összejték előfutárai) proliferálnak. A PGC-k a testi sejtek egy részével, az úgynevezett közbeékelődött sejtekkel (intermingled cells, ICs) összehangolva osztódnak, miáltal a különböző sejttípusok egymáshoz viszonyított aránya koordinált módon változik a lárvális petefészek növekedése során (Gilboa és Lehmann, 2006). A testi sejtek proliferációja ebben a stádiumban teremti meg a felnőtt ováriumban található 16-20 niche morfogeneziséhez szükséges sejtszámot, míg a PGC-k proliferációja teszi lehetővé, hogy a később kialakuló niche-eket megfelelő számú ivarvonal-öszejt (germ line stem cell, GSC) népesítse be. A első, második és a korai harmadik stádiumú lárvák petefészekében a PGC-k differenciálatlan állapotban maradnak, a testi sejtek diverzifikációja azonban elkezdődik és a lárvaállapot végére számos testi sejttípus építi fel a petefészeket (Banisch és mtsai., 2021). A korai harmadik lárva állapot után, kilencven órával a peterakást követően, hormonális hatásra elindul az ivarvonal összejt niche szomatikus komponensének a morfogenezise. A petefészek testi sejtjei közül az IC-k és a folliculáris összejték prekursorai folytatják a proliferációt. A terminális filament (terminal filament cells, TF) sejtek interkalációval oszlopszerűen elrendeződött sejt sorokat hoznak létre, melynek végén sapkasejtek (cap cells, CC) differenciálódnak (Gancz és mtsai., 2011; Green és Extavour, 2012; Warren és mtsai., 2006). A raj sejtek (swarm cells, SwC) és a hüvely sejtek (sheat cells, ShC) kollektív vándorlásba kezdenek, és a petefészek poszterior részén, illetve a TF-ek között helyezkednek el. A harmadik lárva állapot végére a petefészek ivarsejtekből és hatféle szomatikus sejttípusból áll, amelyek többsége közvetlenül támogatja a csírasejtek fejlődését. A létrejövő differenciált testi sejtek közül a CC-k közvetlen fizikai kapcsolatba kerülnek a PGC-k egy részével, és gátolják a korai differenciálódásukat. A CC-k közvetlen közelében elhelyezkedő PGC-k hozzák majd létre a felnőtt nőtényi ivarvonalának összejtjeit (Gilboa és Lehmann, 2004; Song és mtsai. 2004; Xie és Spradling, 1998) (1. ábra). A pete lerakását követően nagyjából száz órával egy második hormonhatás elindítja azoknak a PGC-k-nek a differenciálódását, amelyek nem kerültek közvetlen fizikai érintkezésbe a sapkasejtekkel. Ezek a sejtek nem a későbbi ivarvonal-öszejt

niche területén helyezkednek el, és nem kerülnek összejt állapotba, hanem már a lárvában differenciálódott cisztoblaszt (CB) állapotba kerülnek (Zhu és Xie, 2003). A késői harmadik lárvállapot végére ezáltal a fejlődő petefészek alapfelépítésében rendkívül hasonlít a felnőtt petefészekre. Ekkorra kialakul a hüvelysejtekkel elválasztott 16-20 darab peteképző egység, a felnőttre jellemző petecső előfutára, melynek anterior csúcsán helyezkednek el a TF sejtek és a CC-khez kapcsolódó GSC-k, létrehozva az összejt niche-eket. Ettől disztálisan/poszterior irányban található a differenciálódni kezdett ivarsejtek (CB-ok), amelyeket ekkor még az IC sejtek fognak körbe. A petefészek poszterior végén helyezkednek el a SwC-ek, és a folliculáris összejtek prekursorai (1. ábra).

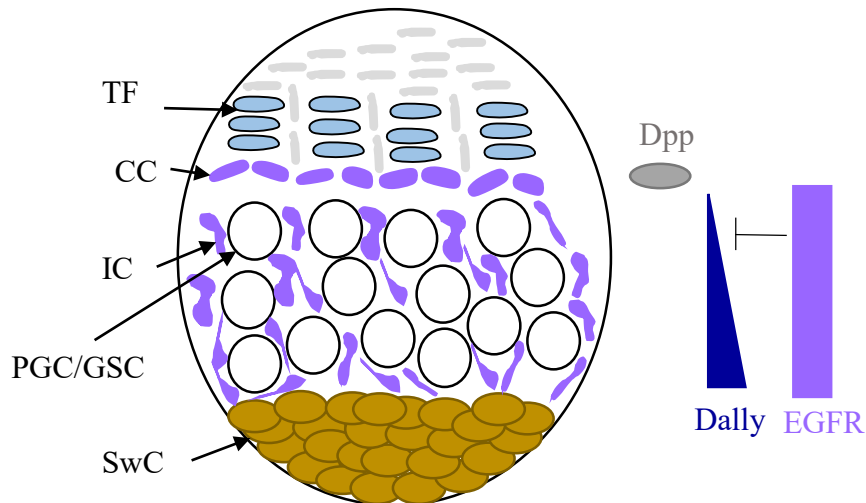
3.4 Az ivarsejt-differenciálódás szabályozása a lárvális petefészekben

Az összejtek osztódása és az utódsejtek differenciálódása szigorúan szabályozott folyamat, amit sejten kívüli és sejten belüli tényezők határoznak meg. A sejten kívüli faktorok az összejtek körülvevő, az összejt niche-t létrehozó sejtektől származó jelmolekulák (Morrison és Spradling, 2008; Shi és mtsai., 2021; Tu és mtsai., 2021). A sejten belüli faktorok a sejtosztódások során aszimmetrikusan fejeződnek ki vagy működnek a két utódsejtben, és ezáltal szabályozzák a sejtek differenciálódását (Chen és McKearin, 2005; Li és mtsai., 2012).

A PGC-k önfenntartásában és differenciálódásában fontos szerepük van a testi sejtek felől érkező jeleknek, így a niche szomatikus komponensének megfelelő kialakulása és szabályos működése elengedhetetlen az összejt niche fennmaradásához. A harmadik lárvállapotban differenciálódó TF sejtek a Notch útvonal ligandját, a Delta jelmolekulát expresszálják, ami a közeli testi sejtekhez kötődve elindítja bennük a Notch jelutat, aminek következtében ezek a testi sejtek sapka sejtjé differenciálódnak. A Notch szignalizációs útvonal nemcsak a lárvális niche kialakulásában, hanem a adult niche fenntartásában is elengedhetetlen, mivel hiányában a sapkasejtek elpusztulnak, ami a GSC-k differenciálódását és az összejt niche kiürülését eredményezi (Song és mtsai., 2007).

A lárvában kialakuló összejt niche területére kerülő PGC-k összejtként történő fennmaradását a TGF β /Dpp és az EGFR/ERK jelutak szabályozzák. A lárvális PGC-k az Epidermal growth faktor (Egf) homológját, a Spitz jelmolekulát szekretálják, ami az IC-k felszínén képes kötődni az Epidermal growth factor receptorhoz (Egfr) és elindítja bennük az EGFR/ERK jelátviteli útvonalat. Az EGFR/ERK útvonal az IC sejtekben gátolja egy heparán szulfát-proteoglikán fehérje, a Dally expresszóját. A Dally az extracelluláris térben kötődik a többi szomatikus sejt által szekretált Decapentaplegic (Dpp) fehérjéhez (Akiyama és mtsai.,

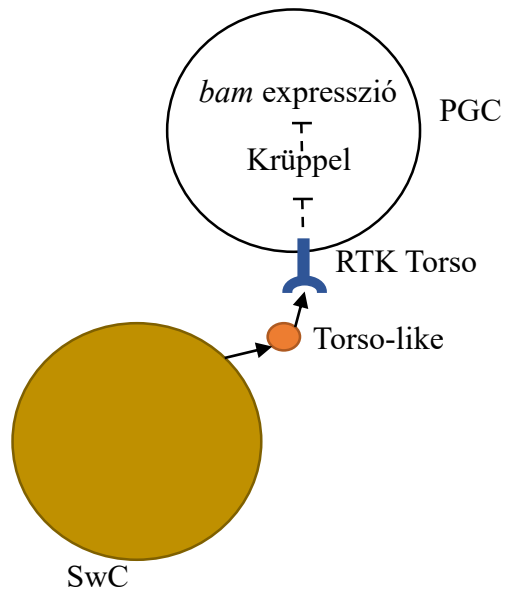
2008). A Dally a kötődés által stabilizálja és lokalizálja a Dpp-t, és beállítja a Dpp-jel hatásának a kiterjedését. Az EGFR útvonal által kialakított Dally-grádiens által egy meredek Dpp-grádiens jön létre, amit a kialakuló niche-ekbe került PGC-k érzékelnek a felszínükön található Thick veins (Tkv) receptorfehérjén keresztül. A PGC-kben aktiválódott TGF β /Dpp útvonal meggátolja a differenciálódást és fenntartja a PGC-ket őssejt állapotban (Akiyama és mtsai., 2008; Matsuoka és mtsai., 2013) (1. ábra).



1. ábra. Az EGFR/ERK útvonal működése hármastádiú lárvalis petefészekben. A lárvalis petefészekben az IC sejtekben az EGFR útvonal (lila) gátolja a *Dally* expresszióját (kék) azokban a sejtekben amik a képződő őssejt niche területén vannak. A disztális irányba kiterjedt *Dally* expresszióknak egy Dpp grádiens kialakításában van szerepe.

Azoknak a lárvalis PGC-knek a differenciálódását, amik nem a képződő őssejt-niche területére kerültek, a SwC sejtek szabályozzák. A SwC-ek által szekretált Torso-like jelmolekula aktiválja a niche-eken kívül rekedt PGC-kben a Torso jelátviteli útvonalat. A jelút a Tailles fehérjén keresztül gátolja a Krüppel fehérje expresszióját, ami a differenciációt elindító *bag of marble* (*bam*) expressziójának gátlásáért felel, így a SwC-ekből induló jel hatására a niche-en kívüli PGC-k differenciálódni kezdenek (2. ábra).

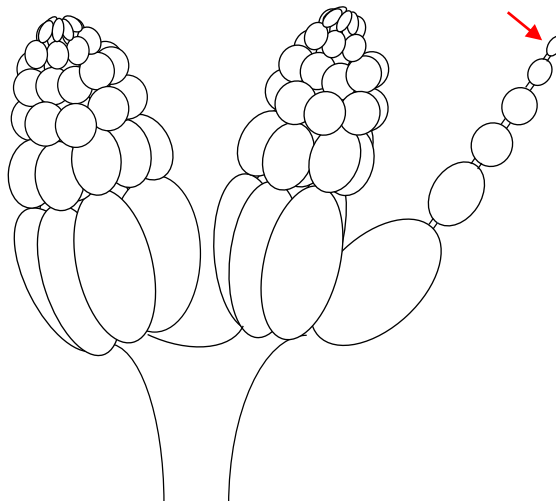
A Torso, a TGF β /Dpp és az EGFR/ERK jelutak összehangolt működésének eredményeként tehát a lárvalis petefészekben létrejött niche-ekbe jutott PGC-k őssejtként fennmaradva a felnőtt niche-ek GSC-iként működnek tovább. A niche-ből kiszorult PGC-k már a lárvalis petefészekben differenciálódni kezdenek, ami lehetővé teszi, hogy az adult kor elejére a petefészek már előrehaladott differenciáltsági állapotú ivarsejteket tartalmazzanak. (Banisch és mtsai., 2021).



2. ábra. A Torso útvonal működése hármas stádiumú lárvalis petefészkekben. A Swarm sejtek a Torso jelátviteli útvonalon keresztül szabályozzák az ivarsejtek differenciálódását. Az SwC-kből származó Torso jel a PGC sejtekben szabályozza a Krüppel expresszióját

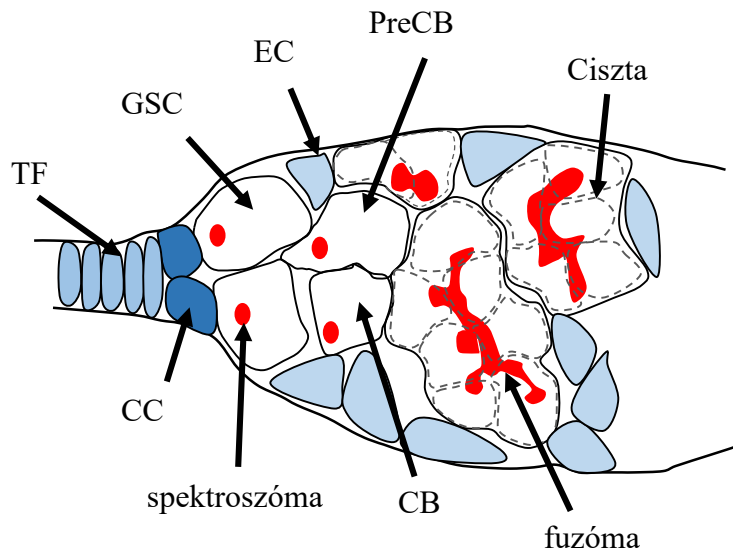
3.5 A felnőtt őssejt niche felépítése

Az felnőtt *Drosophila* nőstény petefészke 16-20 funkcionális peteképző egységből, az ún. petecsőből (ovariolumból) áll (3. ábra).



3. ábra. Az adult *Drosophila* petefészek felépítése. A *Drosophila* petefészke 16 petecsőből áll. Mindegyik petecső anterior végén található az őssejt niche-t tartalmazó germarium (piros nyíl).

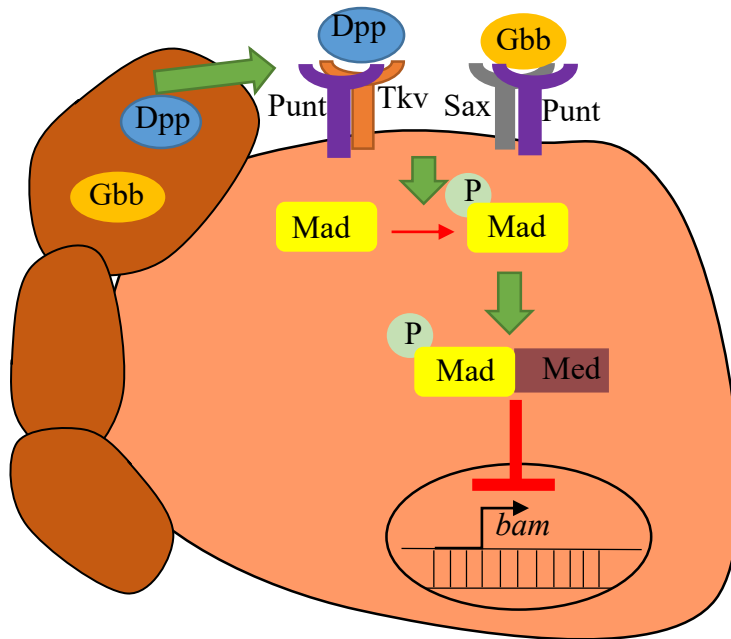
A petecsövek apikális végeit germáriumnak nevezzük, melynek egyetlen őssejt niche-ében két-három felnőtt GSC helyezkedik el. A petecsőben disztális irányban haladva a peteérés egyre előrehaladottabb állapotában lévő petekezdemények találhatóak (Lin és Spradling, 1993) (4. ábra). A felnőtt őssejt niche-ben az ivarvonal sejtjei mellett az ivarsejtek fennmaradását és fejlődését támogató testi sejtek találhatóak. A niche-t alkotó testi sejtek az oszlopszerűen sorbarendezett TF sejtek, a hozzájuk poszterior irányból kapcsolódó sapkasejtek és az adult stádium elérésekor megjelenő kísérő sejtek (escort cells, EC). A niche testi sejtjei veszik körül a GSC-eket és a közvetlen utódsejtjeiket, melyeknek fizikai támogatást és megfelelő szignalizációs környezetet nyújtanak. A niche két-három GSC-t tartalmaz, melyek közvetlenül érintkeznek a sapkasejtekkel és kapcsolatban állnak az anterior elhelyezkedő EC-kkel is (5. ábra). A GSC-k osztódásukkal két utódsejtet hoznak létre, melyekből az egyik utódsejt továbbra is kapcsolatban marad a CC-kkel és megmarad őssejt állapotban, a másik sejt pedig egy sejt távolságra kerül az őssejt niche-től, ahol nem érik el az őssejt fenntartásért felelős faktorok (Song és mtsai., 2002). Ez az utódsejt elindítja a differenciálódási programját és egy átmeneti pre-cisztoblaszt (preCB) állapoton keresztül tovább differenciálódva CB-á alakul (Ohlstein és McKearin, 1997). A CB ezt követően négy nem teljes mitotikus sejtosztódással egy 16 sejtből álló szinciciális cisztává differenciálódik. A differenciálódott 16-sejtes ciszta egyik sejtje ezt követően petesejtté alakul, a többi 15-ből pedig a petesejtet tápláló dajkasejt lesz (Huynh és St Johnston, 2000; Iida és Lilly, 2004). A differenciálatlan GSC-k és a kevésbé differenciált preCB-ok és CB-ok egy pontszerű, spektroszómának nevezett sejtalkotóval rendelkeznek, ami α -spectrin-t, és az adducin-szerű Hu-li tai shao (Hts) fehérjét tartalmaz (de Cuevas és mtsai., 1996). A differenciált ciszták ezzel szemben egy elágazó struktúrát fejlesztenek, amit fuzómának hívnak (de Cuevas és Spradling, 1998). A spektroszómák és fuzómák jelenlétéből következtetni tudunk az adott sejt differenciáltsági állapotára, ami ideális modellé teszi a *Drosophila* GSC-t az őssejtbiológiai vizsgálatokra (4. ábra).



4. ábra. A *Drosophila melanogaster* germáriumának felépítése. A testi sejtek – TF, CC és EC – kék színnel jelölve. Az ivarvonal sejtjei – GSC, preCB, CB, ciszta – fehér színűek. A spektroszóma és fuzóma piros színűek

3.6 Az ivarsejt-differenciálódás szabályozása a felnőtt petefészekben

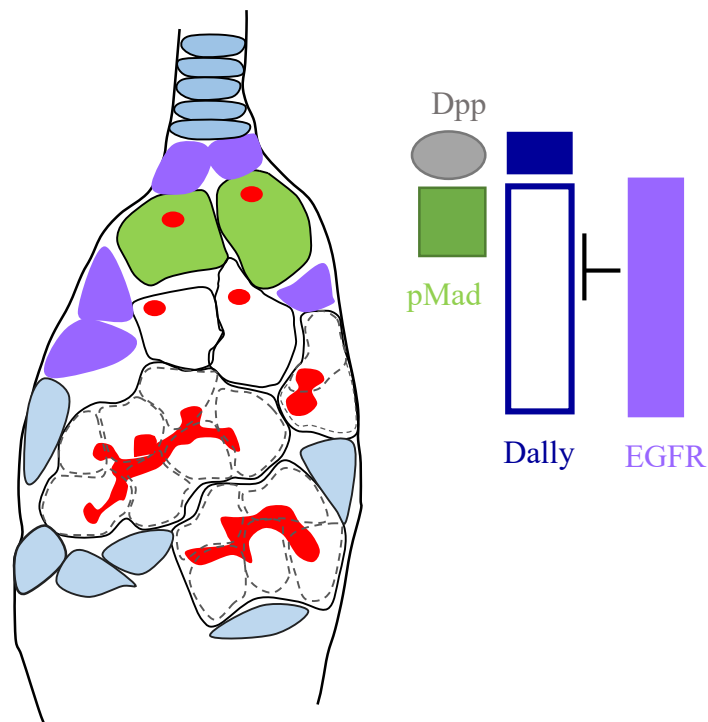
A felnőtt *Drosophila* petefészek niche-eiben a GSC-k fennmaradását illetve differenciálódásuk beindulását, a lárvális PGC-khez hasonlóan, a TGF β /Dpp útvonala szabályozza. A TGF β /Dpp jelút jelmolekuláit, a Dpp, és Glass bottom boat (Gbb) fehérjéket a CC-k szekretálják (Song és mtsai., 2004). A Dpp termelődését a CC-kben a JAK/STAT útvonala szabályozza. A JAK/STAT jelút jelmolekulája az EC-kből érkező Unpaired (Upd) a CC-kben aktiválja a STAT92E transzkripciós faktort, ami a sejtmagba vándorolva elindítja a célgének, például a Dpp és a Gbb expresszióját (Brown és mtsai., 2001; Harrison és mtsai., 1998; López-Onieva és mtsai., 2008). A Dpp és a Gbb a sapkasejtekből szekretálódva a Tkv, Saxophone (Sax) és Punt receptorokon keresztül a GSC-kben aktiválják a TGF β /Dpp szignalizációs útvonalt (Xie és Spradling, 1998). A receptor foszforilálja a Mother against dpp (Mad) fehérjét, ami a Medea (Med) fehérjével komplexes mtsaikotva a GSC-k sejtmagjába transzlokálódik és megakadályozza a differenciációhoz szükséges gének expresszióját, ezáltal a GSC-t összejt állapotban tartja (Chen és McKearin, 2003a; Inoue és mtsai., 1998) (5. ábra).



5. ábra. A differenciálódás gátlása az adult *Drosophila* nőstény ivarvonal őssejtékben. A testi sejtekből származó Dpp és Gbb jel kötődik a Tkv, Sax és Punt receptorokhoz a GSC-k felszínén. Ezt követően a Mad foszforilálódik és a Med-del komplexes mtsaikotva a sejtmagban gátolja a *bam* expresszióját

Az adult petefészkek niche-eiben a lárvális állapothoz hasonlóan egy meredek, egysejtnyi távolságra ható Dpp morfogén grádiens alakul ki. A Dpp grádiens kiterjedését az EGFR/ERK útvonal által szabályozott Dally fehérje határozza meg. Az adult germáriumokban az EC-kben működő EGFR/ERK útvonal működése a Dally fehérje kifejeződését a sapka sejtekre korlátozza. A szekretált Dally fehérje emiatt csak az őssejt niche extracelluláris mátrixában található meg, így csak itt köti és stabilizálja a Dpp-t, ami a sapkasejtektől csupán egy sejtnyi távolságban hatva a GSC-kben aktiválja a TGF β /Dpp útvonalat (Matsuoka és mtsai., 2013) (6. ábra).

A Dpp jel megfelelő helyen történő expresszióján és lokalizációján kívül az őssejt állapot fentmaradásához elengedhetetlen, hogy a GSC-k ne tudjanak kijutni az őssejt niche-ből. A niche-en kívül ugyanis a megfelelően lokalizált Dpp jel nem éri el őket, és elkezdik a differenciálódási programjukat. Az őssejt niche-ből való kijutást sejtközötti adhéziós kapcsolatok gátolják. A GSC-k a sapkasejtekhez egy erős, DE-cadherin-alapú, közvetlen adherens kapcsolaton keresztül kötődnek (Song és mtsai., 2002).

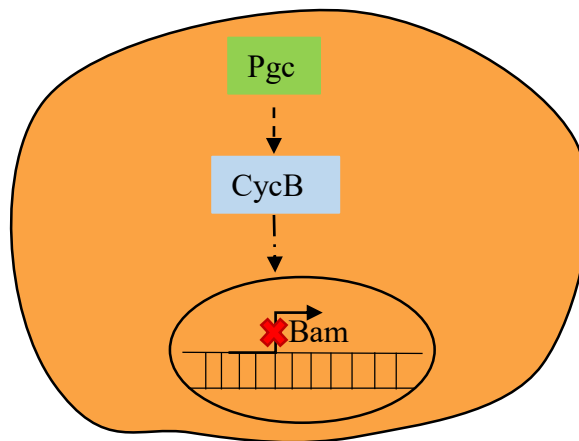


6. ábra. Az EGFR/ERK útvonal működése adult germáriumban. Az adult petefészekben az őssejt niche területén található kísérő sejtekben az EGFR útvonal működésének (lila) következtében a *dally* expressziója (kék) gátolt. A *dally* csak a sapkasejtekben tud kifejeződni. A Dally ezt követően kötődik a szekretált Dpp (szürke) ligandhoz az őssejtnek felszínén. A Dpp a kötődés következtében elindítja az őssejtben a TGF β szignalizációs útvonalat.

A GSC differenciálódást szabályozó kulcsgén a *bam* (5. ábra). Azok a sejtek, amelyekben a TGF β /Dpp-útvonal megakadályozza a *bam* kifejeződését, őssejt állapotban maradnak, míg a *bam*-ot kifejező sejtek differenciálódni kezdenek. A GSC osztódásakor az egyik utódsejt a sapkasejtekhez DE-cadherinen keresztül kapcsolódva az őssejt niche-ben marad, és az aktív TGF β /Dpp-útvonal a *bam* expressziójának gátlásával megakadályozza a differenciációt és fenntartja a GSC utódsejt őssejt állapotát. A sapkasejthez kötött utódsejt így a niche-ben maradván őssejtként működik tovább. A GSC másik utódsejtje azonban egysejtnyi

távolságra kerül a Dpp forrásától és a kísérő sejtek nyúlványaikkal még inkább elzárják a niche-ből kijutott utódsejtet a Dpp jeltől. (Tu és mtsai., 2021). A jelmolekulától elzárt sejtben a TGF β /Dpp-út vonal leáll, a sejtekben még megtalálható foszforilált Mad gyorsan defoszforilálódik és a sejt egy átmeneti differenciáltsági állapotba, az ún. preCB állapotba kerül (Sardi és mtsai., 2021).

A mitózist követően a GSC és az újonnan kialakult preCB citoplazmája az inkomplett citokinézis miatt fizikailag összekapcsolva marad, és a két sejt szincíciumként kezdi el a következő sejtciklust, aminek fázisaival szorosan összehangolva zajlanak a differenciálódó sejtben a preCB-CB átmenet lépései. A preCB-kban specifikusan kifejeződő *polar granule component* (*pgc*) transzkripció represszor egy pillanatszerű transzkripció csendesítésén keresztül átprogramozza az utódsejtet az összejtállapot fenntartásáról a differenciálódási folyamatok elindítására. A *pgc* hatására a sejtekben a sejtciklus kései G2 fázisában felhalmozódik a Ciklin B (CycB) és aktiválódnak a *bam* expressziójához és a CB szakaszba történő átmenethez vezető mechanizmusok (Flora és mtsai., 2018) (4. ábra). Ezt követően befejeződik a citokinézis, a CB-ban kifejeződik a *bam* és a sejt CB állapotba kerül (McKearin és Spradling, 1990) (7. ábra).

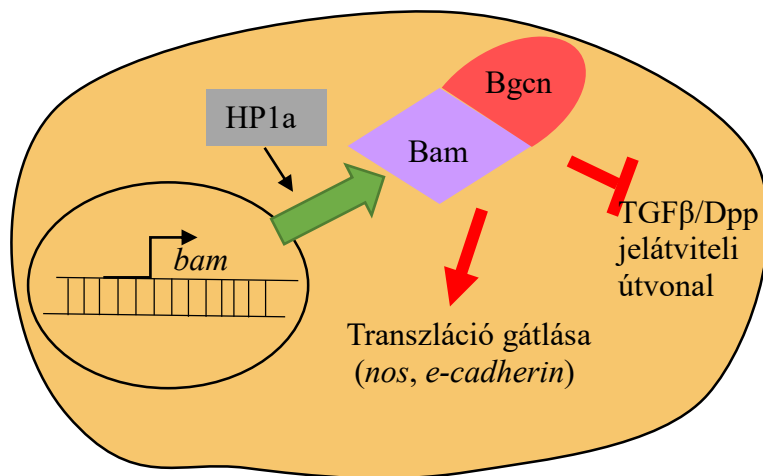


7. ábra. A differenciálódás előkészítése a preCB állapotban. A preCB-okban a sejtciklus G2 fázisában a Pgc általi transzkripció csendesítés hatására a CycB akkumulálódik, ami nélkülözhetetlen lesz a *bam* expressziójához.

3.7 A differenciálódás szabályozása a CB-okban

A Bam a Benign gonial cell neoplasm (BgcN) fehérjével komplexes mtsaikotva számos biológiai folyamat befolyásolásával szabályozza a CB-ok differenciálódását. A Bam többek között gátolja az összejtfenntartásért felelős faktorok, például a *nanos* mRNS transzlációját, a TGF β /Dpp szignalizációs útvonal elindításáért felelős Tkv receptor degradációját idézi elő és bizonyos összejtfenntartásért felelős fehérje-komplexből fehérjéket von el, így megváltozik a funkciója és a továbbiakban a differenciálódást segíti elő (Ji és mtsai., 2017; Mukai és mtsai., 2015; Perinthottathil és Kim, 2011; Sgromo és mtsai., 2018) (9. ábra).

A *bam* expresszió negatív szabályozásának folyamata nagyon jól ismert, azonban a pozitív szabályozó faktorokról nagyon keveset tudunk. Az egész genomra hatással bíró epigenetikai regulátorok, mint például a Heterochromatin protein 1 (HP1a) fontosak lehetnek bizonyos gének expressziójának pozitív szabályozásában. A HP1a poszt-transzkripcionálisan úgy szabályozza a Bam fehérje expresszióját, hogy a *bam* mRNS-éhez kötődve képes stabilizálni azt (Casale és mtsai., 2019), így a *bam* expresszió pozitív elemének tekinthető (8. ábra). A *bam* transzkripcióját direkt módon pozitívan szabályozó faktorok azonban még nem ismertek.



8. ábra. A differenciálódás elindulása a CB-okban. A CB-okban a gátló jel hiányában a *bam* képes expresszálni. A *bam* mRNS-éhez kötődik a HP1a fehérje és stabilizálja. A Bam fehérje a BgcN-nel kölcsönhatva több útvonalon is gátolja az összejtfenntartásért felelős faktorokat, illetve elindítja azokat a folyamatokat, amik a sejtek differenciálódásához vezetnek.

3.8 A differenciálódás epigenetikai szabályozása

Az őssejt állapot fenntartásában és a differenciálódás elindításában a jelátviteli útvonalakon kívül sejten belüli epigenetikai faktorok is részt vesznek, melyek a kromatinszerkezet szabályozásán keresztül határozzák meg a sejtek génkifejeződési mintázatát és a sejtek identitását. A kromatinregulátorok egyik népes csoportját a hisztonmódosító fehérjék alkotják, melyek a hisztonok kovalens módosításával változtatják meg a kromatin szerkezetét. Az Enoki mushroom (Enok) egy hiszton acetil transzferáz, ami a célgének transzkripciójának fokozásával pozitívan befolyásolja a génexpressziót (Huang és mtsai., 2014). Az Enok szabályozza a *bruno* gén kifejeződését, ami elindítja a CB-á és cisztává történő differenciálódást (Wang és Lin, 2007). A serkentő epigenetikai módosítások mellett gátló hatású folyamatok is hatnak a differenciálódás szabályozásában. A génkifejeződést negatívan befolyásoló hisztonmetilációt létrehozó Eggless (Egg) fehérje a represszív kromatinkörnyezet kialakításával specifikusan szabályozza bizonyos gének hatását (Clough és mtsai., 2007). Az Egg fehérje szabályozza a TGF β /Dpp útvonal gátló elemének, a *Daughters against dpp* (*dad*)-nak a kifejeződését, de a *bam* és a *bgn* expressziójára közvetlenül nincs hatással, ami arra utal, hogy az Egg a differenciálódást *bam*-tól független útvonalon szabályozza (Clough és mtsai., 2014; Wang és mtsai., 2011).

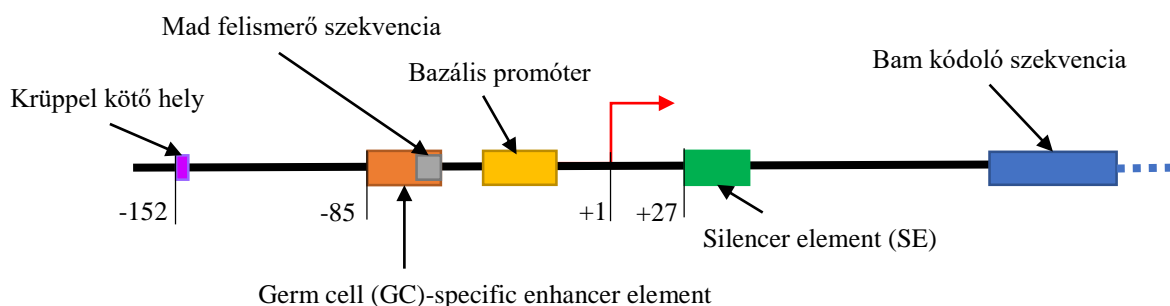
Az epigenetikai faktorok egy másik csoportját a kromatin remodeling fehérjék alkotják, amik a nukleoszómákat mozdítják el a DNS mentén, miközben ATP-t hidrolizálnak. A hiszton fehérjék mozgásával egy DNS régiót hozzáférhetővé tehetnek más fehérjék számára, így lehetővé teszik az adott szakasz transzkripcióját vagy ellenkezőleg, gátolhatják más fehérjék DNS-hez való hozzáférését, ezzel gátolva az adott régió kifejeződését. A kromatin remodellereknek három típusáról, a Switch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF), az Imitation switch (ISWI) és az INO80 komplexről mutatták ki, hogy funkciójuk a GSC-kben elengedhetetlen az őssejtállapot fenntartásához (Ables és Drummond-Barbosa, 2010; He és mtsai., 2014; Yan és mtsai., 2014).

3.9 Bam szabályozó régió felépítése

Az ivarsejtek differenciálódásának helye és ideje pontosan meghatározott, amit a *bam* expressziójának pontos szabályozása tesz lehetővé. A megfelelő térbeli és időbeli kifejeződésért a *bam* szabályozó régiójában elhelyezkedő serkentő és gátló hatású *cisz*-elemek felelősek (Chen és McKearin, 2003b). A *bam* szabályozó régiója a transzkripciós starthelyet

megelőző -152 – -149-es pozícióban tartalmaz egy Krüppel-kötő helyet (-GGAT-), ami a harmadik lárvastádiumban, a petefészekben aktív. A Krüppel transzkripciós faktor ehhez a szakaszhoz kötődve gátolja a PGC-kben a *bam* túl korai expresszióját, ezáltal a sejtek idő előtti differenciálódását (10. ábra) (Banisch és mtsai., 2021). A *bam* expresszió gátlásáért felelős másik *cis*-regulátor a *bam* gén 5' nem transzlálódó régiójában, a +27 – +44 pozícióban található Silencer Element (SE) szakasz, ami a felnőtt ősvarsejt niche-ekben működik. A TGFβ/Dpp jelút által aktivált pMad ehhez a szakaszhoz képes kötődni és megakadályozni a *bam* expresszióját a GSC-kben (10. ábra). Az SE szakasz hiányában a TGFβ/Dpp-út vonal nem képes a *bam* expresszióját gátolni a GSC-kben, így a *bam* ektopikusan kifejeződve a GSC-eket CB-tá differenciáltatja és ezáltal kiüríti a germáriumot (Chen és McKearin, 2003b).

A *bam* gén szabályozó régiójában az expresszióhoz szükséges pozitív regulátor szakaszokat is azonosítottak. A -45 – -21-es pozícióban található rövid szakasz egy bazális promóter, ami kontextusfüggetlen módon teszi lehetővé a *bam* kifejeződését, és bármilyen más bazális promóterrel helyettesíthető. A szabályozó régió -85 – -60-as pozíciójában helyezkedik el az ivarsejt-specifikus enhanszer elem (GC-specific enhancer element), ami a *bam* gén expresszióját az ivarsejtekben teszi lehetővé. Ez az elem tartalmaz egy GC-gazdag rövid szakaszt a -67 – -60-es pozícióban, ami nélkülözhetetlen a *bam* expressziójához. Ez a rövid szakasz megegyezik a pMad fehérje konszenzus kötőhelyével (Chen és McKearin, 2003b) (9. ábra). Az a feltételezés, hogy ehhez a szekvenciához egy olyan transzkripciós faktor képes kötődni, amely olyan szekvenciát képes felismerni, mint a Mad fehérje.

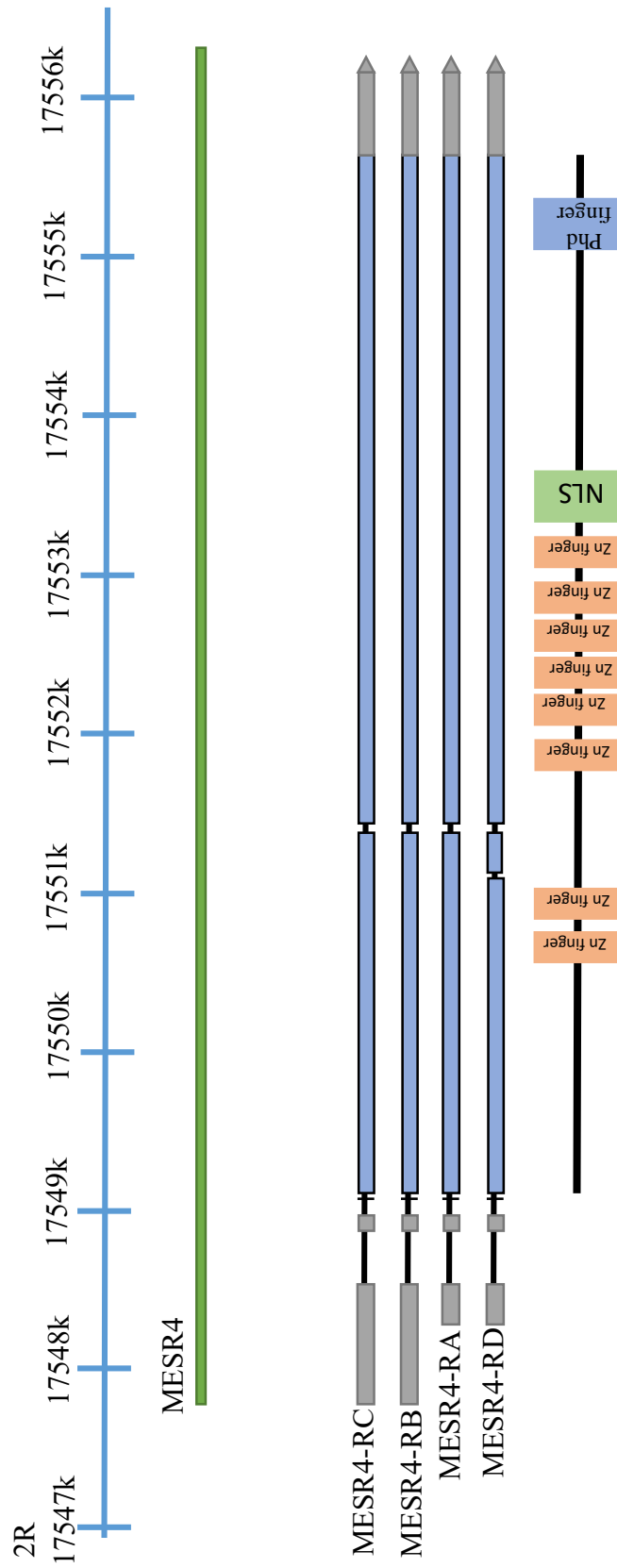


9. ábra. A *bam* gén szabályozó régiójának felépítése. Transzkripciós start +1-es pozícióban (piros nyíl). Bam kódoló régió (kék). Krüppel kötő hely (-152 – -149-es pozícióban) (lila). (GC)-specific enhancer element (-85 – -60-as pozícióban) (narancssárga, benne a *bam* expresszióhoz nélkülözhetetlen, Mad fehérje felismerő szekvencia (szürke). A bazális promóter (-45 – -21-es pozícióban) (sárga). Az 5' nem transzlálódó régióban található SE (+27 – +44 pozícióban) (zöld).

3.10 *MESR4 – Misexpression suppressor of Ras4*

A *Misexpression suppressor of Ras4* (*MESR4*) gént két évtizede azonosították ektopikus expressziójával okozott funkciónyeréses fenotípusa alapján (A. Huang és Rubin, 2000). A *MESR4* különböző fejlődési folyamatokban a jelátviteli útvonalak downstream effektoraként hat. Kimutatták, hogy a fejlődő szemben túlexpresszálva befolyásolja a Ras-MAPK jelutat és az FGF szignalizációs útvonalat (A. Huang és Rubin, 2000; Zhu és mtsai., 2005). A *MESR4* működése szükséges az EGFR/ERK jelátvitel megfelelő szabályozásához az embrionális fejlődés és a szárnyképződés során (Seong és mtsai., 2015). A *MESR4*-ről szövetspecifikus géncsendesítés segítségével kimutatták, hogy az ivarsejtek megfelelő differenciációhoz is szükséges. *MESR4* hiányában nem jelennek meg a differenciálódott ciszták, és a germáriumban elszaporodnak a spektroszómát tartalmazó, differenciálatlan GSC-szerű sejtek (Wissel és mtsai., 2016; Yan és mtsai., 2014). A *MESR4* funkcióvesztéses fenotípusa azt jelzi, hogy funkciója elengedhetetlen a GSC-k differenciálódásához, ám szerepének pontos részletei nem ismertek.

A *MESR4* génről átíródó fehérje a Plant Homeodomain (PHD) fehérjék közé tartozik. A PHD finger olyan sejtmagi fehérjék alkotóeleme, amelyek részt vesznek a kromatin vagy a transzkripció szabályozásában. A PHD finger fehérje-fehérje kölcsönhatásért felelős doménként működve felismerik a partnerfehérjék metilált lizin oldalláncát. A *MESR4* PHD fingerje a hármas hiszton kilencedik lizinjének (H3K9) metilált formájához kötődik. A PHD fingeren kívül a *MESR4* fehérje nyolc C2H2 típusú zinc finger-t tartalmaz, ami gyakori alkotóeleme DNS kötő fehérjéknek és transzkripciós faktoroknak. A *MESR4* rendelkezik továbbá egy sejtmagi lokalizációs szignállal is (nuclear localization signal – NLS). A *MESR4* felépítése alapján egy nukleáris fehérje, ami képes kromatinhoz vagy DNS-hez kötődni (10. ábra).



10. ábra. A *MESR4* gén és a róla átíródó fehérje szerkezete. A *MESR4* fehérje nyolc C2H2 típusú DNS kötő zinc fingert (narancssárga), egy PHD fingert (kék), egy sejtmagi lokalizációs szignált (zöld) tartalmaz.

4. Célkitűzés

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.

5. Anyagok és módszerek

A *Drosophila melanogaster* törzseket hagyományos kukorica-keményítő alapú táptalajon tartottuk 25°C-on.

5.1 A felhasznált *Drosophila* törzsek listája

Gal4 meghajtó elemek	
w ¹¹¹⁸ ; <i>nosGal4VP16</i>	(Van Doren és mtsai., 1998)
bamGal4VP16	(White-Cooper, 2012)
w ¹¹¹⁸ ; <i>oskGal4VP16/TM3, Sb¹</i>	Bloomington #44242
w*; <i>Pmatalpha4Gal4VP16</i>	Bloomington # 7063
<i>c587Gal4, w*</i>	Bloomington # 67747
RNAi törzsek	
MESR4-shRNA (TRiP. HMC04881) (1)	Bloomington # 57564
MESR4-shRNA (TRiP. GL00462) (2)	Bloomington # 35618
Bam-shRNA (TRiP. HMS00029)	Bloomington # 33631
Mutáns és túltermelő törzsek	
hs-bam	(Ohlstein és McKearin, 1997)
bgn ^{EY00974} (UASbgn)	Bloomington # 20106
UASp-MESR4	(Wissel és mtsai., 2016)
y ¹ M{RFP[3xP3.PB]GFP[E.3xP3]=vas-Cas9}ZH-2A w ¹¹¹⁸ /FM7c	Bloomington # 51323
bamp-GFP	(Chen és McKearin, 2003b)
bam-PΔSE-Bam:GFP	
w ¹¹¹⁸ ;PBac{y[+mDint2] w[+mC]=MESR4-GFP.FPTB}VK00033	Bloomington #67731
MESR4 ⁷⁹	(Wissel és mtsai., 2016)
V5-miGFPi-MESR4	(Wissel és mtsai., 2016)
bgn ¹ /Cyo	Bloomington # 6054

w ¹¹¹⁸ ; Df(2R)BSC136/SM6a	Bloomington # 9424
pgcGFP	(Flora és mtsai., 2018)
MESR4 ^{Δphd}	
y ¹ ,sc ¹ ,v ¹ ,P{y[+t7.7]=nos- phiC31\int.NLS}X; P{y[+t7.7]=CaryP}attP2	Bloomington #25710

5.2 Indirekt immufluoreszcens festés *Drosophila* petefészkeken

Indirekt immunfluoreszcens festést 3. lárvaállapotú és kifejlett állatok petefészkein végeztünk. A petefészkeket PBS-ben (137mM NaCl; 2,68mM KCl; 10,14mM Na₂HPO₄; 1,76mM KH₂PO₄) boncoltuk, majd 4%-os formaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk 20 percig. Ezután háromszor mostuk PBT-vel (PBS; 0,1% Triton-X). A mintákat PBT-N (PBT; 2% BSA; 5% FCS) oldatban telítettük, majd egy éjszakan át 4°C-on elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk. A nem kötődött ellenanyagot háromszor 20 perces PBT-vel történő mosással távolítottuk el. Ezt követően egy órán át PBT-N-ben a megfelelő, fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagokkal és egyéb festékekkel inkubáltuk a mintákat. Ezt követően a petefészkeket háromszor mostuk a PBT-vel, végül Fluoromount-G médiumba ágyaztuk be a mintákat. A preparátumokat Leica SP5 AOBS és Zeiss LSM 800 konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk.

Ellenanyagok:

Elsődleges ellenanyagok és az alkalmazott hígítások:

patkány anti-vasa – DSHB 1:300

egér anti-1B1(hu li tai shao – HTS) – DSHB 1:20

nyúl anti-GFP – Invitrogen #A-11122 1:500

nyúl anti-Smad3 – abcam #ab52903 1:100

egér anti-A12 (CycA) – DSHB 1:10

egér anti-F2F4 (CycB) – DSHB 1:3

egér anti-V5 – Invitrogen #R960 1:5000

nyúl anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (pERK) – Cell signaling #9101 1:500

Másodlagos ellenanyagok és az alkalmazott hígítások:

kecske anti-patkány Alexa 647 – Invitrogen 1:600

kecske anti-egér Alexa 488, 546 – Invitrogen 1:600

kecske anti-nyúl Alexa 488, 546 – Invitrogen 1:600

Egyéb festék

DAPI – Sigma D9542 1:500

5.3 Quantitatív RT-PCR transzkript szint változásának mérésére

Tíz darab OregonR, illetve harminc darab nosGal4>*MESR4*-shRNA, nosGal4>*bam*-shRNA és *bgn¹/Df(2R)BSC136* genotípusú *Drosophila* petefészket dietil pirokarbonát (DEPC) kezeléssel RNáz mentesített PBS-ben boncoltuk ki. Ezt követően ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System kittel (Promega Cat. No: Z6111) RNS-t izoláltunk. A tisztított RNS mintán a mRNS-ek átírását cDNS-sé oligodT primerrel, RevertAid Premium first strand cDNA synthesis kit C.-vel végeztük (Fermentas Cat. No: K1651). Az elkészült cDNS mintákon SensiFAST SYBR Hi-ROX Kittel (Bioline Cat. No: BIO-92005) mértük meg a *bam* cDNS szintet. A qPCR során használt primerek a *bam* gén két exonjára voltak specifikusak, amik között a genomon, illetve az éretlen mRNS-ekben egy intron található (1. táblázat).

Forward	CTGCACGGCGATTGCTTAGA
Reverse	GTGATCATGCAGGGATCTGAAC

1. táblázat. A *bam* mRNS méréséhez használt primerek szekvenciája

qPCR program:

95°C 30 perc, 95°C 30 másodperc, 60°C 30 másodperc, 72°C 30 másodperc 35 ciklus

Denaturáció (Melt): 60-95°C 1°C minden lépésnél

5.4 ChiRNS-t kifejező plazmid tervezése és előállítása és tesztelése

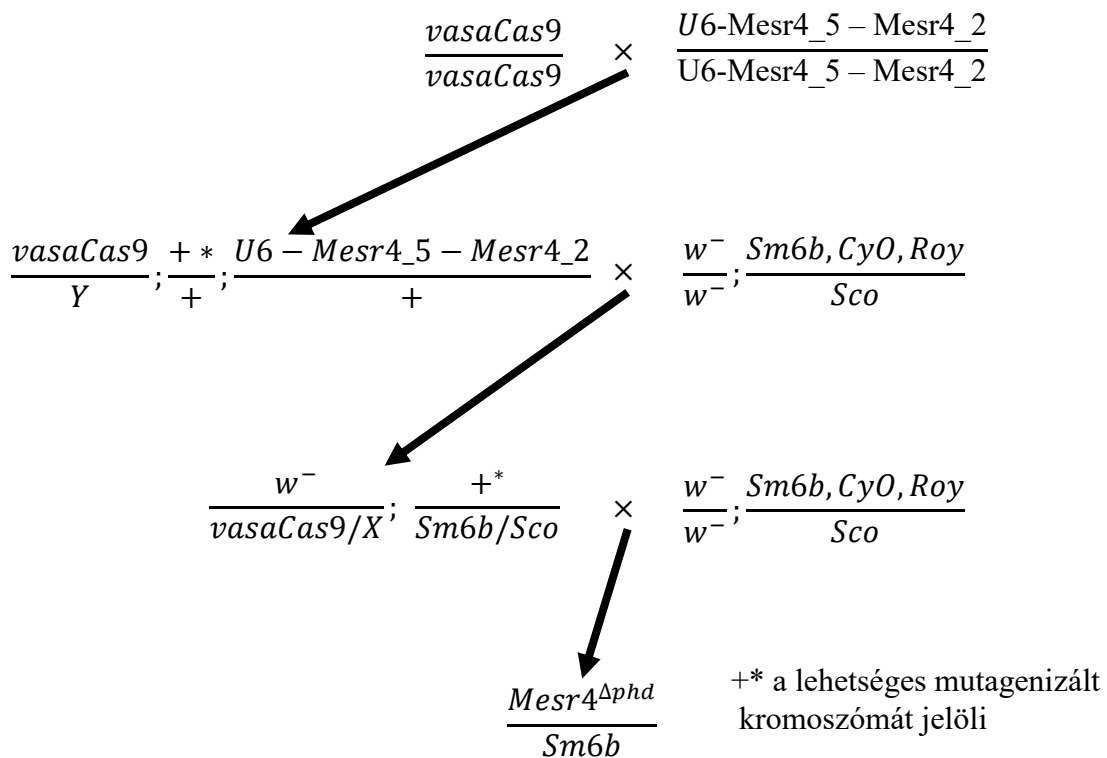
A molekuláris munkához szükséges DNS oligokat a Thermo Fisher, illetve az Eurofins állította elő. A szekvenálásokat az Eurofins végezte el számunkra. A *MESR4* gén PHD doménjét kódoló genomi szakaszra szekvencia-specifikus oligokat terveztünk clustered regularly interspaced short palindromic repeat (Crispr) Optimal Target Finder programmal. Az oligok *MESR4*-re specifikus szakaszának specifikitását BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) segítségével ellenőriztük le. A PHD domén eltávolítására a Mesr4_5 – Mesr4_2 gRNS-kombinációt használtuk fel (2. táblázat). Ezt a primer kombinációt felhasználva PCR reakciókat végeztünk el a pCFD4-et templátként használva. Ezt követően a pCFD4 plazmidot emésztettük Bbs1 restrikciós endonukleázzal. A PCR terméket a BbsI-el linearizált pCFD4 plazmidba SLIC reakcióval építettük be (Li és Elledge, 2012). Az elkészült konstruktokat szekvenálással ellenőriztük.

		Primerek szekvenciái
Forward primer	Mesr4_5	tatataggaaagatatccgggtgaacttcgtagcagcgcgtggtggtatgttttagagctagaaatagcaag
Reverse primer	Mesr4_2	attttaacttgctatttctagctctaaaactggcgatcgtctaaggataacgacgttaaattgaaataggtc

2. táblázat. A *Mesr4* doménspecifikus alléljének előállításához használt primerek szekvenciái. Piros színnel jelölve a *Mesr4*-re specifikus szakaszok szekvenciája

5.5 *MESR4* mutánsok előállítása CRISPR/Cas9 segítségével

A deléciók előállításához a gRNS-t hordozó plazmidokat $y^1,sc^1,v^1,P\{y[+7.7]=nos-phiC31\int.NLS\}X; P\{y[+7.7]=CaryP\}attP2$ genotípusú embriókba injektáltuk majd a *vermilion* szelekciós markert felhasználva transzgenikus törzseket hoztunk létre. Ezt követően a gRNS-eket hordozó hímeket $y^1 M\{RFP[3xP3.PB] GFP[E.3xP3]=vas-Cas9\}ZH-2A w^{118}$ nőtényekkel kereszteztük. A keresztezésből kikelő hím utódokat *Sm6b/Sco* nőtényekkel kereszteztük. A keresztezés 5. napján a hímek genomi DNS-én PCR-t végeztünk, és csak azokat a keresztezéseket tartottuk meg, ahol ki tudtuk mutatni a deléciós allél jelenlétét. A létrejövő *MESR4^{Δphd}* legyeket törzsbe állítottuk (11. ábra). Ezt követően megszekvenáltuk a létrejött mutáns allélokot.



11. ábra. A *MESR4^{Aphd}* allél létrehozásához használt keresztezési séma

5.6 Genomi DNS izolálása *Drosophila melanogaster*ből

Harminc felnőtt állatot -80°C -on fagyasztva altattunk. Ezt követően $400\ \mu\text{l}$ homogenizáló pufferben (100 mM Tris-HCl pH7,5; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5% SDS) homogenizáltuk és 30 percig inkubáltuk a mintát 65°C -on. $800\ \mu\text{l}$ feltáró puffert (1:2,5 5M KO-acetát: 6M LiCl) mértünk hozzá és egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd centrifugáltuk 15 percig 16000 g-n szobahőmérsékleten. A felülúszóból egy ml-t átmértünk másik mikrocentrifuga-csőbe és hozzáadtunk $600\ \mu\text{l}$ propanolt. A mintát 15 percig 16000 g-n szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A kicsapódott DNS-t 70%-os etanollal mostuk, majd bezárítottuk és steril TE pufferben (10mM Tris; 1mM EDTA; pH8) feloldottuk. A DNS oldatot $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$ koncentrációjú RNáz A-val kezeltük. Ezt követően két térfogatnyi fenolt adtunk hozzá és centrifugáltuk egy percig 24446 g-n szobahőmérsékleten. A felülúszó fázishoz két térfogatnyi 25:24:1 arányú fenol:kloroform:izoamil-alkohol elegyét adtunk, majd centrifugáltuk egy percig 24446 g-n szobahőmérsékleten. A felülúszóhoz 24:1 arányi kloroform:izoamil-alkohol elegyet mértünk és centrifugáltuk a mintát 24446 g-n 1 percig

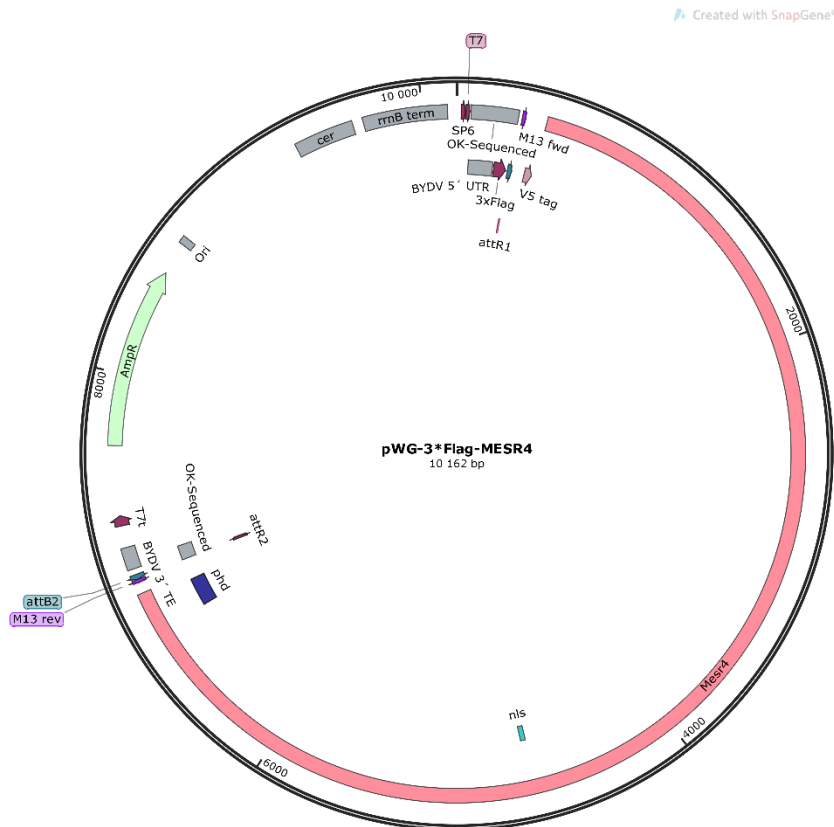
szobahőmérsékleten. A DNS-t 0,1 térfogatnyi 3M Na-acetáttal és -20°C-os 90%-os etanollal csaptuk ki -80°C-on egy órán át. Ezután a DNS-t 70% és 90%-os etanollal mostuk, beszárítottuk, végül steril TE pufferben feloldottuk.

5.7 Fehérje expresszáló plazmid konstrukciók készítése wheat germ expressziós rendszerhez

A pWG-3*Flag-MESR4 transzgén kódoló plazmid konstrukciók előállításához a vad típusú, OregonR *Drosophila* törzsből izolált genomi DNS-t használtuk PCR templátként. A teljes hosszúságú MESR4 szekvenciát két, részben átfedő fragmensként amplifikáltuk a genomról. A gén 5' végét a M4expelejeFW forward, illetve a M4elejerev reverse primer segítségével amplifikáltuk. A gén 3' végét a M4végeFW forward, illetve a M4végeRev reverse primerrel amplifikáltuk (3. táblázat). Ezt követően a két elkészült DNS fragmentet SLIC reakcióval építettük be pOTB7 vektorba. Az elkészült plazmidokon mutagén PCR segítségével eltávolítottuk a MESR4 intronját a mutpcrfw és mutpcrrev primerek segítségével. Ezt követően a kész plazmidot NotI restrikciós enzimmel emésztettük, és a MESR4 fragmentet Gateway BP Clonase II Enzyme Mixet (Invitrogen Cat. No: 11789-020) használva pDONR221 vektorba építettük be. Innen a Gateway LR Clonase II Enzyme Mixel (Invitrogen Cat. No: 11791-020) építettük be a MESR4 gént a pF3A-WG-3xFlag-DEST expressziós vektorba (12. ábra).

Forward primerek	M4elejeFW	5'GAGGCCTGGGTGGCGAATTCGCCATGGAAGGT AAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATT CTACGAAAGGGATGATGGAAGCATTGGATCAG – 3'
	M4végeFw	5'-CGGTCGTTGGTCACTAACGC- 3'
Reverse primerek	M4elejeRev	5'- CGATCCTTCGAGCGTGATTG – 3'
	M4végeRev	5'-GCACCCGACATAGATGCCTCGAGTCATTGGG GCTTTGCGCCCTG- 3'
Mutagén primerek	mutpcrfw	5'-CCTTTCCCTGCAGAAAACATTCCAGCGCCAGA-3'
	mutpcrrev	5'-TCTGGCGCTGGAATGTTTTCTGCAGGGAAAGG-3'

3. táblázat. Teljes hosszúságú MESR4 fehérjét kódoló plazmidok előállításához felhasznált primerek



12. ábra. MESR4 fehérjét expresszáló plazmid térképe wheat germ expressziós rendszerhez

5.8 pDEST15-MESR4¹⁷⁸³⁻⁴⁰⁵⁰ plazmid létrehozása bakteriális expresszióhoz

A MESR4¹⁷⁸³⁻⁴⁰⁵⁰ kódoló plazmid előállításához a pF3A-WG-3xFlag-DEST plazmidot használtuk templátként. A MESR4 zinc fingereit a *MESR4* 1783-tól 4050 bázispárig tartó génszakasza kódolja. A zinc fingereket kódoló génszakaszt a Zf fv és Zf rev primerekkel amplifikáltuk (4. táblázat), majd BP reakcióval a pDONR221 plazmidba klónoztuk. Ezt követően LR reakcióval pDEST15 GST jelölő vektorba klónoztuk (13. ábra).

Zf fv	5'-CTGGATCCGGTACCGAATTC AAGCAGGAGCGATTCTTTCGT-3'
Zf rev	5'-TCGAGTGC GGCCGCGAATTC CAGTTCTTTCGCCACATGACTGC-3'

4. táblázat. MESR4 zinc fingereket kódoló szakaszát tartalmazó plazmid előállításához használt primerek szekvenciái



13. ábra. MESR4 zinc finger-eit expresszáló plazmid bakteriális expressziós rendszerhez

5.9 Fehérje tisztítás bakteriális expressziós rendszerből

A pDEST15-zf plazmidot *E.coli* ArcticExpress DE3 sejtekbe transzformáltuk. Ezt követően a sejtenyészetet ~ 0.6 OD₆₀₀ érték eléréséig növesztettük. Ezt követően 0,4 mM IPTG-vel indukáltuk a fehérje termelést 12°C-on 16 órán át. A sejteket ezt követően puffer P-hez (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM dithiotreitol (DTT), 0.01% v/v Nonidet P-40, 10% v/v glycerol) adott 1 M NaCl, 5 mM EDTA és protease inhibitor mixture (*Roche Applied Science*) oldatban felfuszpenzáltuk és szonikáltuk. Ezt követően centrifugáltuk és a felülúszót glutathione-Sepharose (GE healthcare) oszlopra mértük. Az oszlopot először puffer P-hez adott 1 M NaCl-al, majd puffer P-hez adott 500 mM KCl-al mostuk. A GST-zf fehérjét 20 mM redukált glutationt tartalmazó 500 mM KCl-al kiegészített puffer P-vel eluáltuk. A tisztított fehérjemintát felhasználásig -80°C-on tároltuk.

5.10 Fehérje-DNS kölcsönhatás kimutatása Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) módszerrel

A tisztított GST-zf fehérjét növekvő koncentrációban alkalmazva 50 nM fluoreszcensen jelölt szintetikus DNS-el inkubáltuk (5. táblázat) R pufferben (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTT) 5 percig 25 °C-on. A mintákat 4%-os nem denaturáló polyacrylamide gélen 0,5X TB pufferben (45 mM Tris-borát, 1 mM EDTA) futtattuk meg. A fluoreszcens jelet Typhoon Trio Imager-el detektáltuk.

Név	szekvencia	jelölés
Bam-01	aggtgaccataaattgaaacttatttgtgcgacggcaaccctgttctgg	5' FITC or -
Bam-01RC	ccagaacaggggtgccgacacaaataagttcaatttatggtcacct	5' FITC

5. táblázat. EMSA-hoz használt DNS szekvencák

5.11 MESR4 kölcsönható partnerek azonosítása koimmunprecipitációval kapcsolt tömegspektroszkópiával

Két napos V5-miGFPi-MESR4 legyek petefészkeit PBS-ben kiboncoltuk, majd jégen tartottuk. A petefészkeket (50 db) 500 µl lízis pufferben (50mM Tris, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1 mM DTT, 3mM pNPP és Sigma proteáz inhibitor koktél) tártuk föl TissueLyser segítségével. Az immunprecipitációt 2 µl V5 ProteinA-val (Miltenyi nano beads) keresztkötött ellenanyaggal végeztük. A negatív kontrollban az immunprecipitációt ellenanyag nélkül, az üres gyöngyökkel végeztük. Ezt követően a mintákat mostuk egyszer lízis pufferrel, majd ötször 2 ml PBS-ben és egyszer 2 ml 25mM-os ammónium bikarbonát oldattal.

A fehérje minta emésztését tripszinnel végeztük redukálást (DTT) és alkilálást (jódiacetamid) követően. A minta sótalanítását követően az emésztményeket Thermo Orbitrap Fusion készülékkel analizáltuk. Peptidfragmentációt HCD aktiválással váltottunk ki. Az adatokat a Proteome Discoverer (v 1.4) programmal dolgoztuk fel, majd az adatbázisszűrést a ProteinProspector programcsomaggal (5.22.0 verzió) végeztük, előbb a teljes Swissprot 2019.6.12-i adatbázison (560292 szekvencia), majd ezt követően az UniProtKB.2017.9.19 adatbázison csak *Drosophila* fehérjékre, figyelembe véve a szennyező fehérjét (42557 szekvencia). A szűrések során 5 ppm pontosságot használtunk a prekursorra, 20 ppm

pontosságot az orbitrap-ben mért HCD fragmensekre. 2 kihagyott triptikus hasítóhelyet engedélyeztünk. Állandó módosítás: karbamidometil-Cys, lehetséges módosítás: Met oxidáció, acetilezett fehérje N-terminus, peptid N-terminus Gln gyűrűzárása piroglutaminná. Elfogadási paraméterek: fehérje pontszám > 22, peptid pontszám > 15, fehérje $E < 0.01$, peptid $E < 0.05$, fehérje $FDR < 1\%$, peptid $FDR < 1\%$.

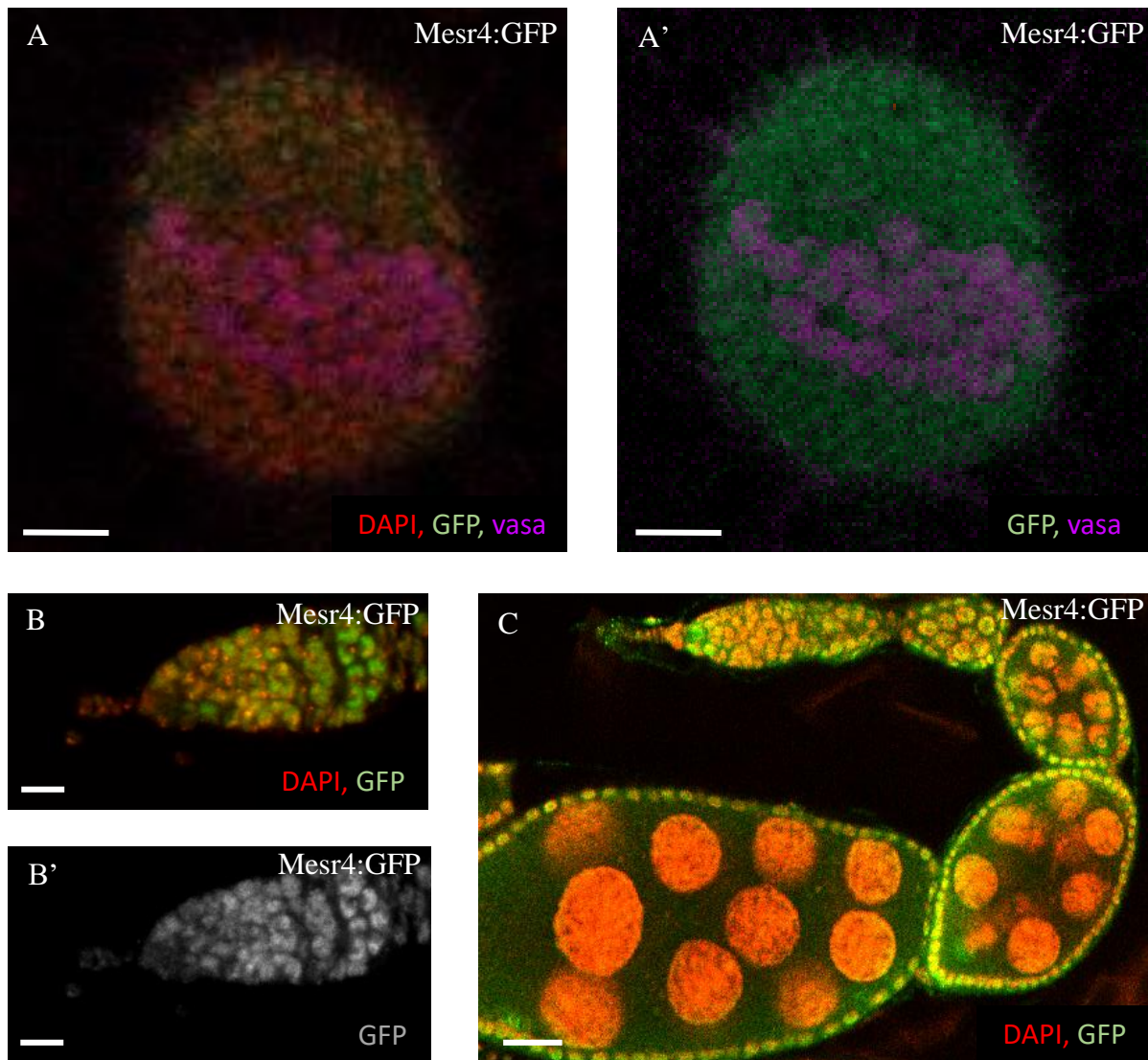
Az adatokat spektrumszámlálással értékeltük ki a negatív kontrollok felhasználásával.

6. Eredmények

6.1 A *MESR4* sejtautonóm módon szabályozza a sejtek differenciálódását az ivarsejtképződés korai állapotában

6.1.1 A *MESR4* a petefészek összes sejtjében kifejeződik

A *MESR4* ivarvonalba betöltött szerepének vizsgálatát a *MESR4* expressziós és lokalizációs mintázatának vizsgálatával kezdtük, amihez *MESR4*:GFP genotípusú nőstények petefészkeit használtuk. Ezekben a petefészkekben a GFP-vel jelölt *MESR4* egy olyan transzgenikus bacmid konstruktról fejeződik ki, ami tartalmazza a *MESR4* gén endogén szabályozó régióit, ezáltal a transzgenikus *MESR4*:GFP expressziós mintázata és kifejeződési szintje megegyezik a endogén *MESR4* fehérjével (Kudron és mtsai., 2018). A GFP jelölt *MESR4* képes menekíteni a *Mesr4*⁷⁹ mutáns allél letális fenotípusát, ami azt jelzi, hogy a *MESR4*:GFP fúziós fehérje funkcionális. Vizsgálatunkhoz kései L3 fejlődési stádiumú lárvális petefészket és felnőtt állatok petefészket használtuk fel, amikben a *MESR4*:GFP fehérje kifejeződési mintázatát indirekt immunfluoreszcenciával határoztuk meg. A *MESR4* fehérje kifejeződött a hármask fejlődési stádiumú lárvák petefészkeiben, és ez az expresszió egészen a felnőtt állapotig fennmaradt (15. ábra). A *MESR4*:GFP expresszió a petefészkek ivarvonali- és testi sejtjeiben egyaránt megfigyelhető volt. A *MESR4* az adult petefészkekben már az őssejtben kifejeződik és az expressziója fennmarad a cisztákban és az ivarsejtképződés kései fázisaiban a petekamrákban is. A *MESR4* minden sejtben sejtmagi lokalizációt mutatott (14. ábra).

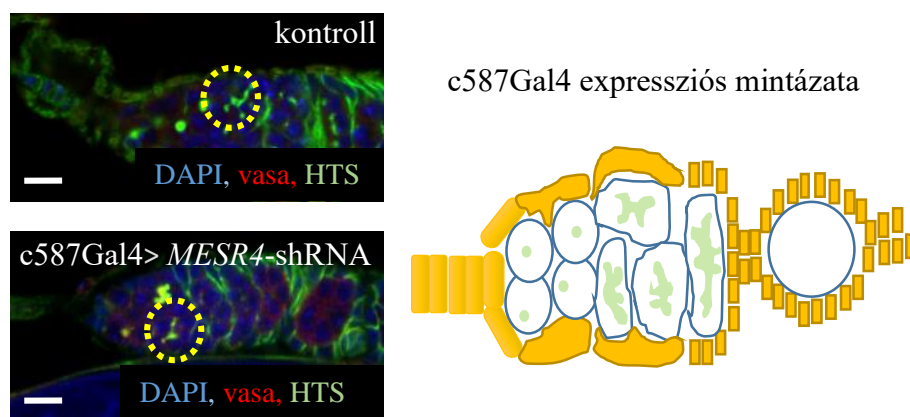


14. ábra. *MESR4* expressziója és sejten belüli lokalizációja *Drosophila* *MESR4:GFP* lárvális (A és A') és adult petefészkekben (B, B' és C). A *MESR4* a petefészkek összes sejtjében kifejeződik. A *MESR4* expressziója már a kései hármask fejlődési fokozatú lárvális petefészkekben kimutatható és az expresszió egészen az adult állapotig fentmarad. Scale bar az A és A' képen 20 μm a B és B' képen 10 μm , a C képen 20 μm

6.1.2 A *MESR4* sejtautonóm módon szabályozza az ivarsejtek differenciálódását

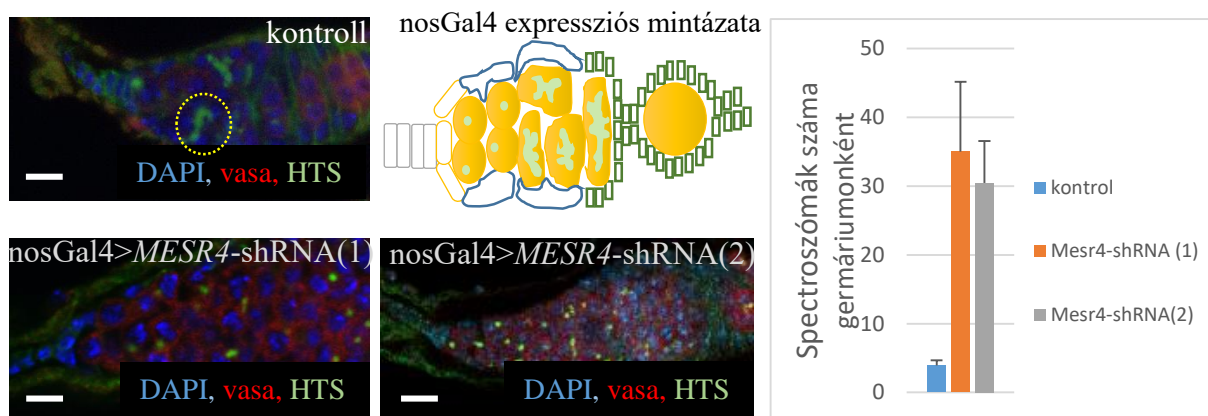
Mivel a *MESR4* az ivarsejtek differenciálódását szabályozza, de a petefészkek összes sejtjében, így a testi eredetű sejtekben is kifejeződik, szövet és fejlődési stádium-specifikus csendesítéssel határoztuk meg, hogy *MESR4* funkciójára milyen sejt típusban van szükség (Wissel és mtsai., 2016). A petefészkek ivarvonal sejtjeit VASA festéssel, a spektroszómákat illetve a fuzómákat pedig HTS festéssel tettük láthatóvá. A differenciálódott ciszták elágazó fuzómákat, a differenciálatlan GSC-k, preCB-ok és a CB-k pontszerű spektroszómákat tartalmaznak, így azok jelenlétéből illetve hiányából következtetni lehet az ivarsejtek differenciáltsági állapotára.

Mivel a testi sejtekből származó jelek fontos szabályozói az ivarsejtek differenciálódásának, először a testi sejtekben kifejeződő *MESR4* szerepét vizsgáltuk meg. A petefészek összes testi sejtjében expresszálandó *c587Gal4* meghajtó elemmel csendesítettük a *MESR4* gént (15. ábra). Testisejt-specifikus *MESR4*-csendesítés esetén a germáriumokban az ivarsejtek differenciálódása végbement, megjelentek a fuzómákat tartalmazó differenciálódott ciszták. (15. ábra). A sejtek képesek voltak érett petesejtté fejlődni és a nőstények fertilisek voltak, ami azt jelzi, hogy a *MESR4* nem a petefészek testi sejtjeiben hatva szabályozza az ivarsejtek differenciálódását.

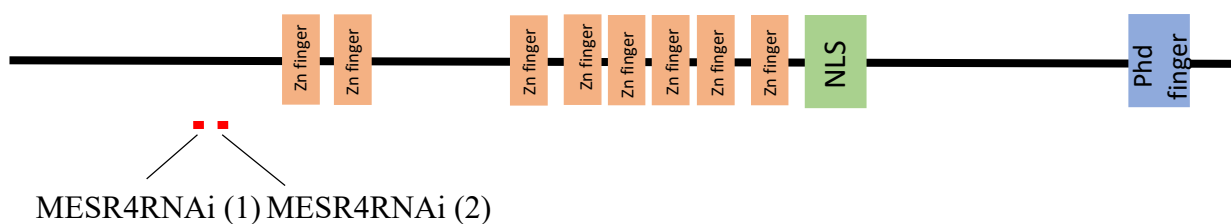


15. ábra. A *MESR4*-re nincs szükség az ovárium testi sejtjeiben az ivarsejtek differenciálódásához. Testisejt-specifikus *MESR4* gén csendesítése esetén a germáriumok fenotípusa megegyezik a vad típusú kontrolléval, megjelennek a fuzómákat tartalmazó differenciálódott ciszták (sárga pontozott kör). Scale bar 10 μ m

Ezt követően megvizsgáltuk a *MESR4* ivarvonal-specifikus csendesítésének hatását az ivarsejtek differenciációjára, amihez a teljes ivarvonalban expresszálandó *nosGal4* meghajtó elemmel csendesítettük a *MESR4* gént (16. ábra). A csendesítéshez két független *MESR4*-shRNS-t használtunk (17. ábra). Az ivarvonal-specifikus *MESR4* csendesítés mindkét csendesítő konstrukció esetén a germáriumokban a spektroszómát tartalmazó differenciálatlan sejtek elszaporodását okozta ($35 \pm 10,2$ $n=24$ a *MESR4*RNAi(1) esetén és $30,5 \pm 6,1$ $n=24$ *MESR4*RNAi(2) esetén és $3,9 \pm 0,8$ $n=24$ a *w¹¹¹⁸* kontrollban), és egy összejt-szerű sejtekből álló tumoros fenotípus alakul ki. A germáriumban nem alakultak ki differenciálódott ciszták, és a peteérés leállása miatt a *nosGAL4 > MESR4-shRNA* nőstények sterilek voltak (16. ábra). A független csendesítő elemek által okozott megegyező fenotípus alapján elmondható, hogy a csendesítés hatására kialakult tumoros fenotípus a *MESR4*-re specifikus.



16. ábra. A *Mesr4* sejt autonóm módon fejt ki hatását a sejtek differenciálódására. Ivarvonal-specifikus *Mesr4* csendesítés esetén a sejtek differenciálódása elmarad, a differenciálatlan, spektroszómákat tartalmazó sejtek elszaporodnak a germáriumban. Scale bar 10µm



17. ábra. *MESR4* RNS interferenciára használt két független *MESR4*-shRNS vonal. *Mesr4* RNS interferenciára két különböző, egy második (*MESR4*-shRNAi(1)) és egy harmadik (*MESR4*-shRNA(2)) kromoszómára beépült konstrukció érhető el. Ezek a *MESR4* kódoló szekvencia különböző szakaszaira specifikusak (pirossal jelölve)

Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a *MESR4* az ivarsejtekben, sejt-autonóm módon szabályozza az ivarsejtek differenciálódását.

6.1.3 A *MESR4*-re az ivarsejt-differenciálódás korai szakaszában van szükség

Az ivarvonal-specifikus *nosGal4* meghajtó elem már az ivarsejt differenciálódás legelején, a lárvális PGC-kben kifejeződik és az ivarsejtek differenciálódásának végéig expresszálódik. A *MESR4* funkciójának részletesebb térképezéséhez különböző mintázatban csendesítettük az ivarsejtekben a *MESR4*-et, és megvizsgáltuk a funkció kiesésének a hatását az ivarsejtek differenciálódására (6. táblázat). A csendesítéshez olyan ismert kifejeződési

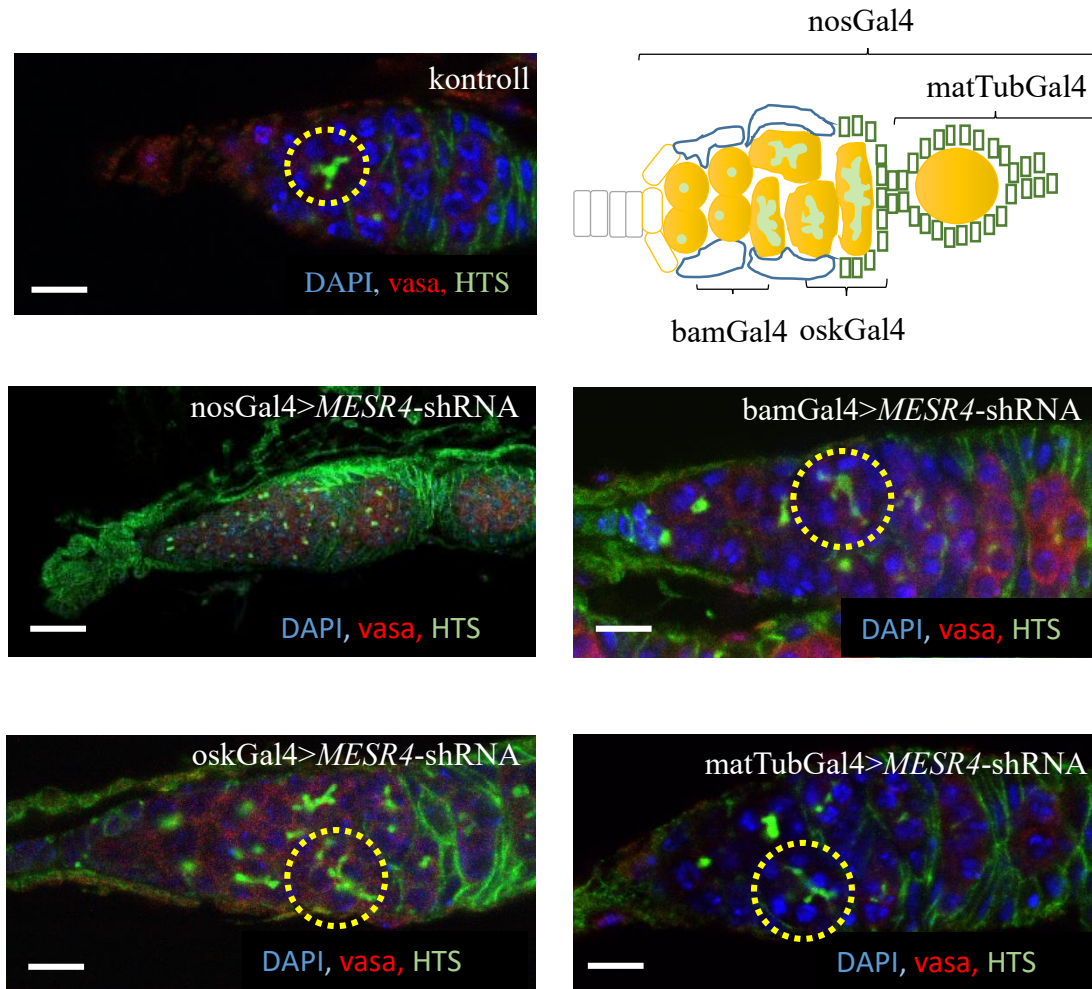
mintázatu Gal4 forrásokot használtunk fel, amik az ivarvonal differenciálódása során térben és időben eltérően expresszálódnak az ivarsejtekben.

	Őssejt	PreCB	CB	Ciszta	Petekamra
nosGal4	X	X	X	X	X
bamGal4			X		
oskGal4				X	X
matTubGal4					X

6. táblázat. A csendesítéshez használt driverek sejtípus-specifitása. X-el jelöltük azokat a sejtípusokat ahol a driver működik.

A bamGal4 driver nem működik a GSC és a preCB állapotban, hanem csak a CB állapotban kapcsol be, és kizárólag ebben a stádiumban expresszálódik (6. táblázat, 18. ábra). A bamGal4 driverrel történő *MESR4* csendesítés esetén a germáriumokban végbemegy az ivarsejtek differenciálódása. A bamGal4>*MESR4*-shRNA germáriumokban megjelennek az elágazó fuzómákat tartalmazó differenciálódott ciszták, és a nőstények fertilisek, ami azt jelenti, hogy a *MESR4*-re nem a CB állapotban van szükség a sejtek differenciálódásához (18. ábra). Az oskGal4 driver nem működik a GSC-kben és a korai differenciáltsági állapotú preCB-okban és a CB-okkban, hanem csak később, a germárium végén lévő 16 sejtes cisztákban kezd el expresszálódni (6. táblázat, 18. ábra). Az oskGal4 driverrel történő *MESR4* csendesítés hatására nem kaptunk fenotípus eltérést a vad típusú kontrolltól. A germáriumokban megjelentek a fuzómákat tartalmazó differenciálódott ciszták, a nőstények fertilisek voltak, ami azt jelzi, hogy a *MESR4*-re nincs szükség a ciszta állapot kialakulása után a petesejt megfelelő differenciálódásához (18. ábra). A matTubGal4 a germáriumon kívül, az ivarsejtképződés még későbbi szakaszában, a petekamrában kapcsol be, és működik végig az ivarsejtképződés során (6. táblázat, 18. ábra). A matTubGal4-el történő *MESR4* csendesítés sem okozott fenotípus változást a vad típusú kontrollhoz képest. Az ivarsejtek differenciálódása hiba nélkül végbement, ami azt jelenti, hogy a *MESR4*-re nincs szükség a differenciálódás késői szakaszában sem (18. ábra).

A különböző fejlődési állapotban történő csendesítések fenotípusai azt jelzik, hogy a *MESR4*-re a niche-ben kizárólag a korai állapotban, a GSC-kben vagy a preCB-okban van szükség a ivarsejtek megfelelő differenciációjához.



18. ábra. A *MESR4* működésére az ivarsejt-differenciálódás korai szakaszában van szükség. CB (bamGal4) vagy későbbi differenciáltsági állapotban (oskGal4, matTubGal4) csendesítve a *MESR4*-et megjelennek a fuzómát tartalmazó differenciálódott ciszták (sárga pontozott kor). A sejtek differenciálódása kizárólag akkor marad el, ha már a korai, CB előtti állapotban csendesítjük a *MESR4*-et. Scale bar 10 μ m

6.2 A *MESR4* a preCB állapotban szabályozza a sejtek differenciálódását

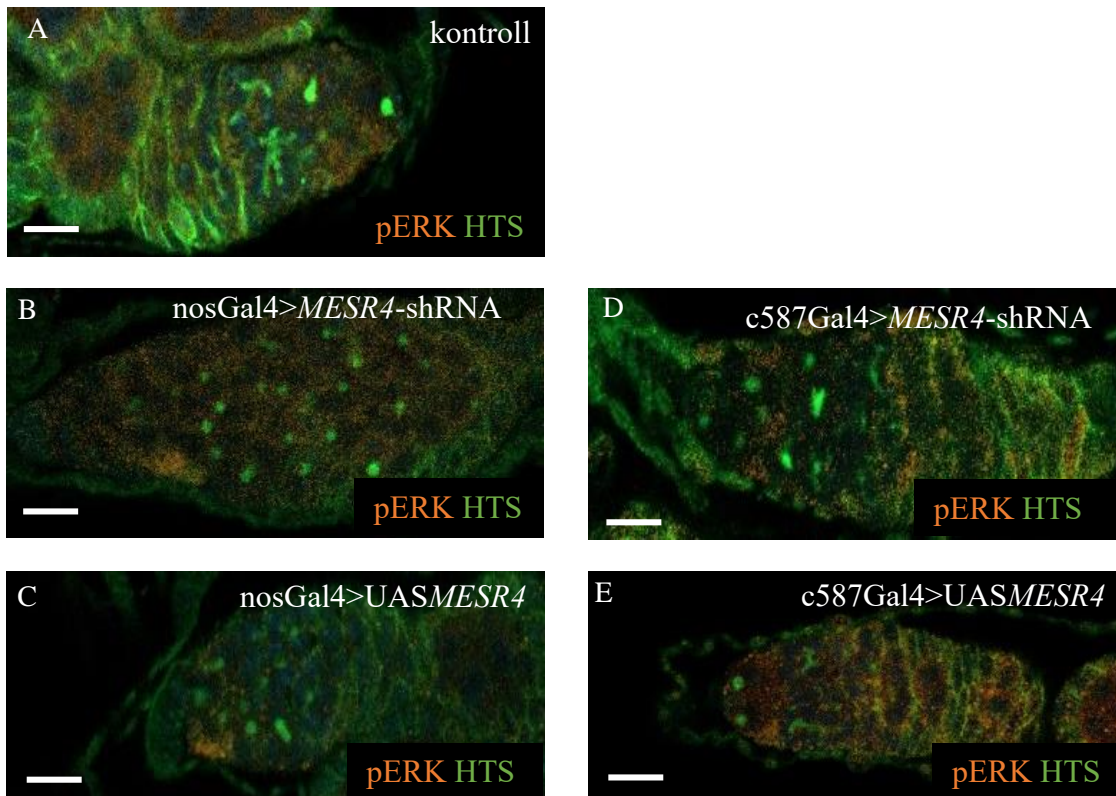
6.2.1 *MESR4* csendesített petefészekben az EGFR/ERK útvonal megfelelően működik

Mivel a *MESR4* negatívan szabályozza az EGFR/ERK útvonalat az embriogenezis során, megvizsgáltuk, hogy a *MESR4*-nek van-e hatása az EGFR/ERK útvonal működésére kifejtett ováriumban az ivarsejt niche-ben (Seong és mtsai., 2015). A GSC-kben termelődő

Spitz jelmolekula aktiválja az EC sejtekben az EGFR/ERK útvonalat, ami befolyásolja a Dpp jel kiterjedését, és ezáltal hatással van az ivarsejtek differenciálódására. Az EGFR/ERK útvonal hibás működése a niche-ben a Dpp jel hatásának túlzott kiterjedéséhez és a GSC-k elszaporodásához vezet (Matsuoka és mtsai., 2013). Mivel az EGFR/ERK útvonal elindításért az ivarvonal sejtjei felelősek, a szignalizációs útvonal viszont a testi sejtekben működik, kísérleteinkben mindkét sejttypusban megvizsgáltuk az EGFR/ERK útvonal és a *MESR4* kapcsolatát. NosGal4 meghajtó elemmel az ivarsejtekben, c587GAL4 driverrel pedig a testi sejtekben csendesítettük, illetve ektopikusan túltermeltük a *MESR4*-et, és az EGFR/ERK útvonal aktivitását a pERK kimutatásával tettük láthatóvá.

A c587GAL4>*MESR4*-shRNA és a c587GAL4>UAS*MESR4* genotípusú niche-ekben a vad típusra jellemző pERK kifejeződést észleltünk, ami azt jelzi, hogy se a *MESR4* testisejt-specifikus csendesítése, se a túltermelése nem okoz változást a jelátviteli útvonal működésében az EC-kben. Mivel az EGFR/ERK útvonalat az ivarsejtekben termelődő Spitz ligand szabályozza, megvizsgáltuk, a *MESR4* ivarsejt-specifikus csendesítésének, illetve túltermelésének a hatását az EGFR/ERK szignalizációs útvonal működésére. A nosGAL4>*MESR4*-shRNA és a nosGAL4>UAS*MESR4* niche-ekben a pERK kifejeződése szintén vad típusú volt, ami azt jelzi, hogy az ivarvonalban csendesített vagy túltermelt *MESR4* az EGFR/ERK jelút működését nem befolyásolja (19.ábra).

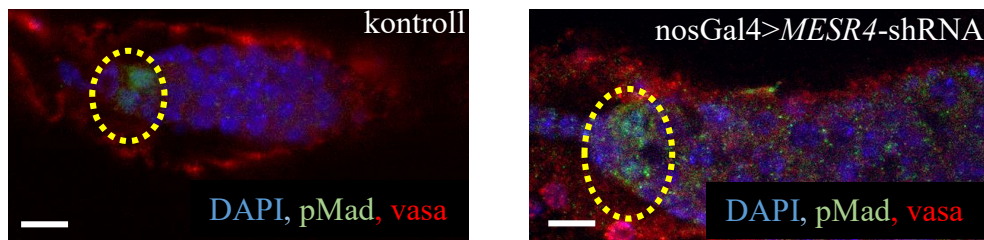
A fenti eredmények alapján elmondható, hogy a felnőtt ovárium ivarsejt niche-ben a *MESR4* nem az EGFR/ERK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza az ivarsejtek differenciálódását.



19. ábra. A felnőtt ovárium ivarsejt niche-ben a *MESR4* nincs hatással az EGFR/ERK útvonal működésére. Az ivarvonalon a *MESR4* csendesítése (B) vagy túltermelése (C), illetve a testisejtekben a *MESR4* csendesítése (D) vagy túltermelése (E) nincs hatással a pERK kifejeződésre, tehát a *MESR4* nem az EGFR/ERK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza az ivarsejtek differenciálódását. Scale bar 10 μ m

6.2.2 *MESR4* csendesített petefészkekben a TGF β /Dpp útvonal megfelelően működik

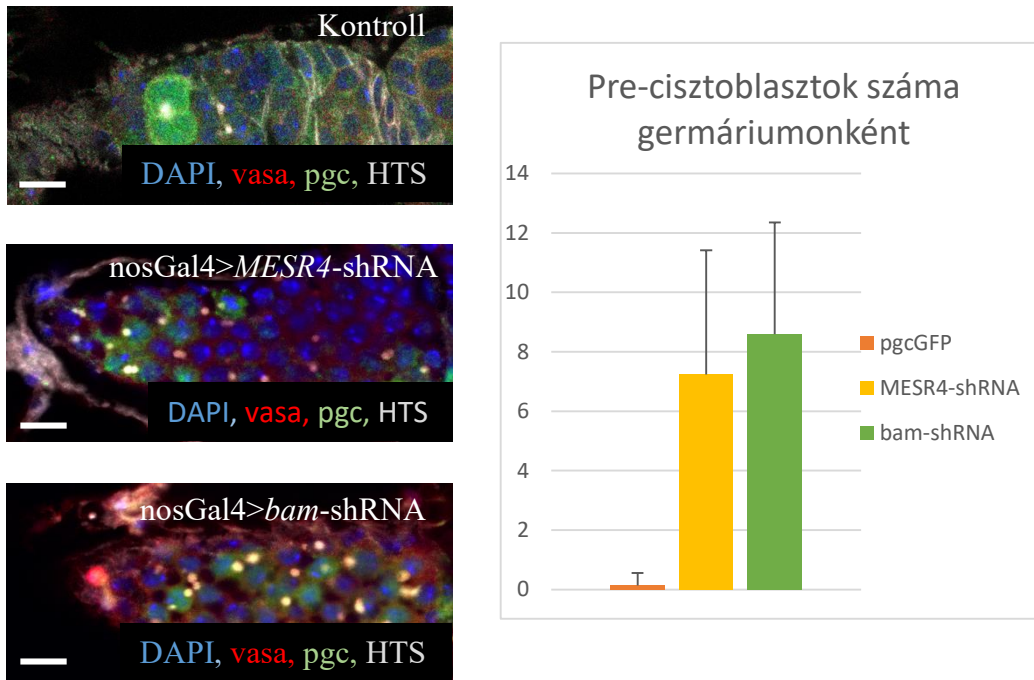
Mivel a *nosGal4>MESR4-shRNA* germáriumokban a differenciálatlan sejtek elszaporodásának oka a TGF β útvonal aktivitásának kiterjedése is lehet, megvizsgáltuk a TGF β /Dpp útvonal működését a felnőtt ovárium ivarsejt niche-ben. A jelút aktivitását a MAD foszforilációja jelzi, amit a pMAD indirekt immunofluoreszcens jelölésével tettük láthatóvá. A *nosGal4>MESR4-shRNA* niche-ekben a vad típussal megegyezően, csak a GSC-kben található pMAD. A pMAD vad típusú kifejeződése a *nosGal4>MESR4-shRNA* niche-ekben arra utal, hogy a tumort kialakító differenciálatlan sejtek nem GSC állapotban vannak (20. ábra). A *nosGal4>MESR4-shRNA* niche-ekben a Dpp grádiens kiterjedése megfelelő és a TGF β /Dpp-jelút csak a niche csúcsi részén gátolja a GSC-k differenciálódását.



20. ábra. A TGF β /Dpp útvonala *MESR4* csendesített germáriumban niche-ekben a vad típusúval megegyezően működik. A TGF β /Dpp útvonala által foszforilációval aktivált pMAD transzkripciófaktor lokalizációja megegyezik a vad típusú kontrollban és a *MESR4* csendesített germáriumban, tehát az ivarsejtek differenciálódásának elmaradása nem a TGF β /Dpp útvonala kiterjedt működésének következménye. Scale bar 10 μ m

6.2.3 A *MESR4* gén a preCB – CB sejttállapotok közötti átmenetet szabályozza

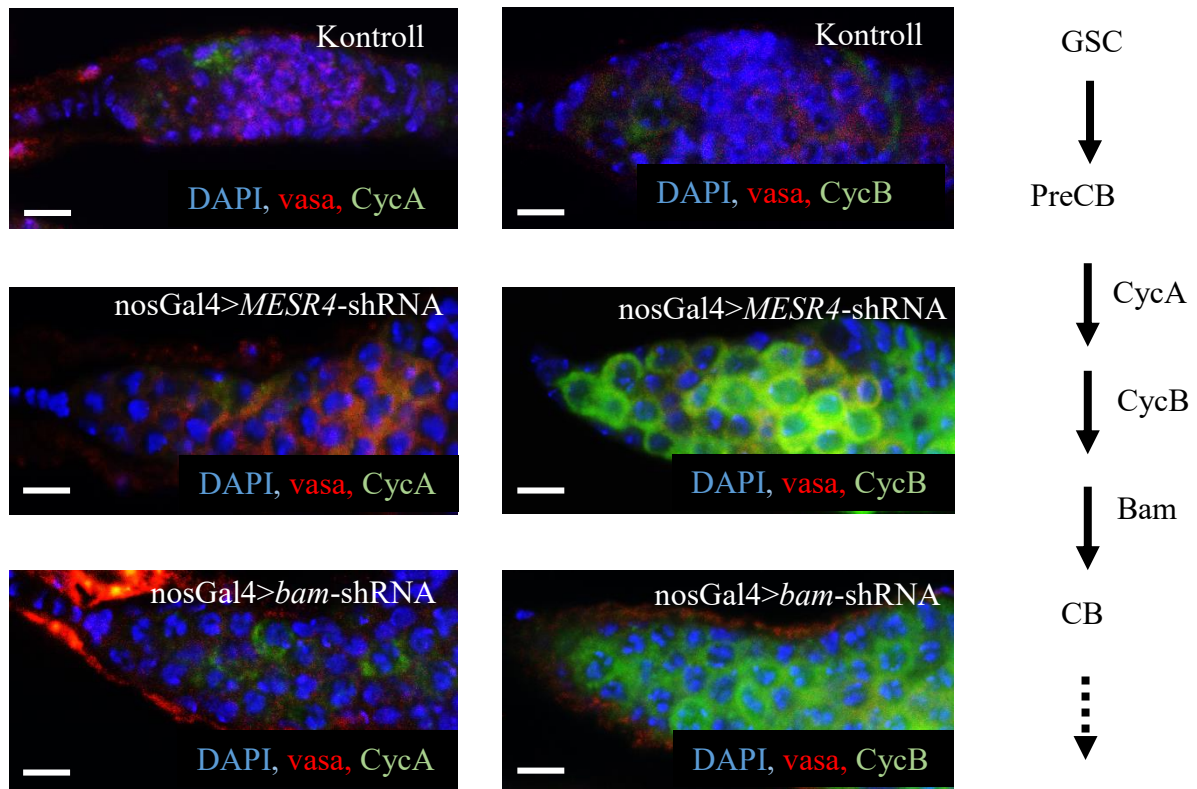
A *nosGal4>MESR4-shRNA* felnőtt ovárium őssejt niche-ekben az elszaporodott, spektroszómát tartalmazó ivarsejtek nem GSC-k, így preCB vagy CB állapotban lehetnek. A tumort alkotó ivarsejtek differenciáltsági állapotát egy preCB-specifikus marker, a *pgc* gén kifejeződésének a vizsgálatával állapítottuk meg, amihez az endogén expressziós szabályozás alatt álló *pgc:GFP* transzgént használtuk (Flora és mtsai., 2018). Az ivarsejtek preCB állapotban nagyon rövid ideig tartózkodnak, és a *pgc* expressziója is átmeneti, ezért a vad típusú niche-ekben ritkán figyelhető meg a *pgc* kifejeződését tükröző GFP jel. A *pgc* expresszióját megvizsgálva *nosGal4>MESR4-shRNA* és a *nosGal4>-bam-shRNA* niche-ekben a GFP pozitív sejtek számának drámai növekedését tapasztaltuk (kontroll (0,14 \pm 0,42 n=123), *MESR4* csendesített (7,2 \pm 4,18 n=46) és *bam* csendesített (8,59 \pm 3,76 n=42)). A *Pgc-GFP*-t kifejező sejtek elszaporodása *MESR4* csendesített niche-ben azt jelzi, hogy az elszaporodott sejtek preCB állapotban vannak (21. ábra). Az ivarsejtek érésének megakadása a preCB állapotban azt jelzi, hogy a *MESR4* a preCB-től a CB-ig tartó differenciációs folyamatban játszik nélkülözhetetlen szerepet.



21. ábra. A *MESR4* a preCB-CB átmenetet szabályozza. *Mesr4* vagy *bam* csendesített germáriumokban megemelkedik a Pgc pozitív sejtek száma a kontrollhoz képest, ami azt jelenti, hogy az akkumulálódott sejtek preCB állapotban álltak meg a differenciálódásban. Scale bar 10 μ m

A preCB – CB átmenetet számos, egymásra épülő lépésre bontható. A GSC-vel citoplazmahíddal összekapcsolt preCB állapotú ivarsejtek sejtciklusa a differenciálódással összehangolva zajlik, melynek végeredménye az inkomplett citokinézis befejezése és a *bam* expresszió beindulása, mellyel a preCB CB-tá alakul. A differenciálódás előrehaladtát a sejtciklus markereinek vizsgálatával lehet nyomon követni. A *pgc* gén a sejtciklus G2 fázisának elején expresszálódik, és elindítja azokat a folyamatokat, amik a korai G2 stádiumra jellemző Ciklin A (CycA), majd a késői G2-re jellemző *cycB* kifejeződéséhez szükségesek. A *bam* expressziója a G2 fázist követően az M fázisban történik, ami a preCB CB-tá történő átalakulás utolsó lépése. A korai G2 fázist jelző CycA expressziót ellenanyag festéssel megvizsgálva *nosGal4>MESR4-shRNA* illetve *nosGal4>bam-shRNA* niche-ekben nem tapasztaltunk erősebb CycA jelet a csendesített germáriumokban a kontroll germáriumhoz képest. A vad típussal megegyező CycA kifejeződés azt jelzi, hogy a niche-ben elszaporodott preCB sejtek differenciálódása nem a korai G2 fázisban állt meg (22. ábra).

A *nosGal4>MESR4-shRNA* illetve *nosGal4>bam-shRNA* niche-ekben felhalmozódott preCB sejtek azonban mind CycB pozitívak voltak, ami arra utal, hogy a *MESR4* hiányában a preCB-ok elérték a kései G2 fázist és differenciálódásuk a kései G2 fázisban állt le.



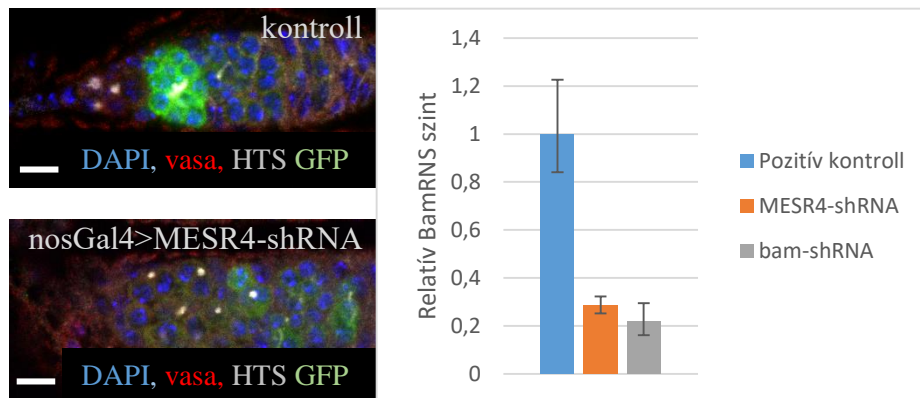
22. ábra. A *MESR4*-re a preCB-CB átmenet utolsó lépésénél van szükség. A preCB-CB átmenet több lépésre osztható. Ezek markerei a CycA és CycB. *MESR4* vagy *bam* csendesítés esetén a CycA expresszióban nem történik változás, azonban a CycB pozitív sejtek száma megnő, ami azt jelenti, hogy a *MESR4*-re közvetlenül a *bam* expressziója előtt van szükség a megfelelő differenciálódáshoz. Scale bar 10 μ m

6.3 A *MESR4* a *bam* expresszió pozitív regulátora

6.3.1 *MESR4* csendesített petefészkekben lecsökken a Bam mennyisége

A *bam* gén a preCB-okban kezd el kifejeződni, és ezáltal a preCB-ok differenciált CB-okká alakulnak. A *bam*-expresszió nyomon követésére a bamP-GFP transzkripciós riporter vonalat használtuk, amely a *bam* promóter régióval vezérelt GFP kódoló szekvenciát tartalmaz. A vad genotípusú bamP-GFP riportert hordozó nőstények niche-eiben erős GFP-expressziót észleltünk. A differenciálatlan *nosGal4>MESR4-shRNA* ivarsejtekben azonban a *bam* gén kifejeződését bamP-GFP riporter vonallal monitorozva gyenge promóteraktivitást detektáltunk, ami arra utal, hogy a *MESR4* szükséges a *bam* promóter megfelelő működéséhez, és ezáltal a

bam megfelelő expressziójához (23. ábra). Ezzel a megfigyeléssel összhangban a *nosGal4>MESR4-shRNS* petefészkekben qRT-PCR segítségével a *bam* mRNS szintjének jelentős csökkenését találtuk (*MESR4* csendesített: $0,284 \pm 0,03$, kontroll: $1 \pm 0,2$). A *MESR4*-csendesített ivarsejtek *bam* mRNS-szintje hasonló volt a *nosGal4>bam-shRNS* nőstények tumoros petefészkeiben mért értékhez, ami azt jelzi, hogy a *bam* mRNS-szint ilyen mértékű csökkenése elegendő a differenciálódás megakadályozásához ($0,211 \pm 0,06$) (23. ábra).



23. ábra. *MESR4* szükséges a megfelelő *bam* transzkripcióhoz. *MESR4* csendesítés hatására a *bamGFP* petefészkekben, csökken a GFP expresszió a kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy a *MESR4* szükséges a *bam* promóter megfelelő működéséhez. A csendesített petefészkekben lecsökken a *bam* mRNS szintje a kontrolléhoz képest, tehát a *MESR4* szükséges a *bam* megfelelő expressziójához. Scale bar 10 μ m

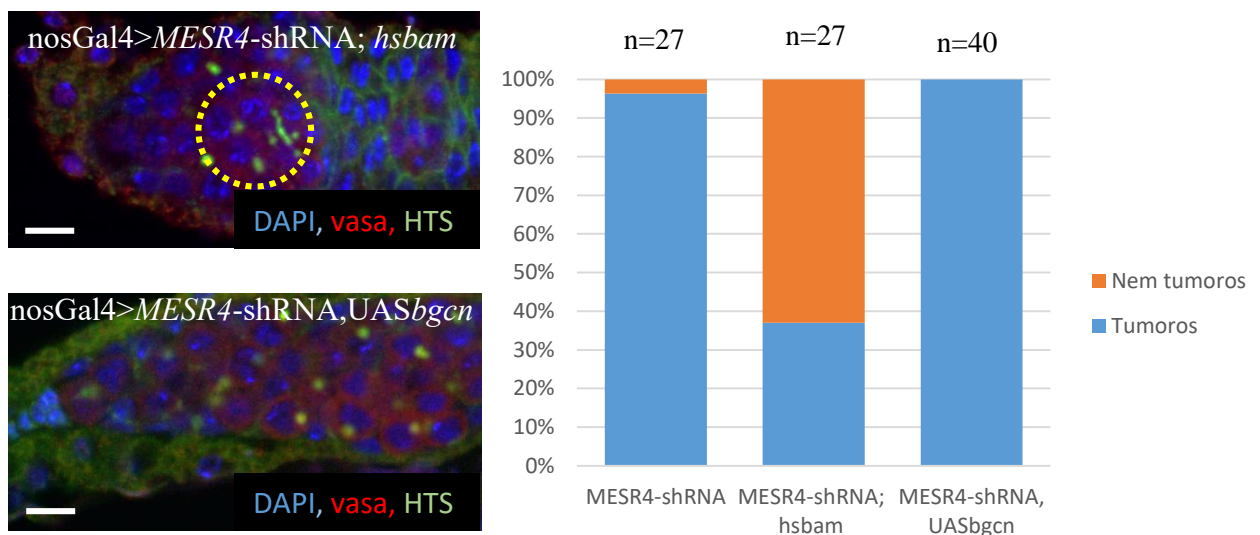
6.3.2 A *MESR4* csendesített fenotípus Bam túlermeléssel menekíthető

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a *MESR4* a *bam* expressziója előtt hat a GSC differenciálódás elősegítésében. Mivel a *MESR4* csendesített petefészkekben csökkent a *bam* mRNS mennyisége, ezért ektópikus kifejeztetése beindíthatja a preCB-k differenciálódását és visszaállíthatja a vad fenotípust. Genetikai menekítéssel vizsgáltuk meg, hogy a *MESR4* hiányában a *bam* kifejtje-e differenciálódást elősegítő hatását. A menekítési kísérlethez *hs-bam* transzgenikus vonalat használtunk, amiben hőshock hatására a *bam* a nőstény összes sejtjében, így a GSC-kben és a preCB-okban is kifejeződik. A hőshock-kal indukálható transzgenről a *bam* ektópikus expressziója a vad típusú niche-ekben a GSC-k CB-tá történő differenciálódását indukálta, melyek fuzómát tartalmazó cisztává alakulva elhagyták a germáriumot az ún. „üres niche” fenotípust eredményezve. A *nosGal4>MESR4-shRNA*; *hs-bam* niche-ekben a hőshockot követően fuzómákat tartalmazó ciszták képződtek. A *bam* ektópikus expressziója a GSC-szerű tumorok számának csökkenését eredményezte (37,0% a *nosGal4>MESR4-shRNA*; *hs-bam*,

n=27 vs. 96,3% a nosGal4>*MESR4*-shRNA, n=27), ami azt bizonyítja, hogy a *MESR4* a *bam* kifejeződését elősegítve szabályozza a GSC-k differenciálódását (24. ábra).

Mivel a nosGal4>*MESR4*-shRNA nichekre jellemző csökkent *bam* mRNS mennyiség nem feltétlenül jelent csökkent Bam fehérje mennyiséget. Bgcn hiányában lecsökken a sejtekben a Bam mennyisége, és a sejtek ezért nem képesek differenciálódni (McCarthy és mtsai., 2018). Tehát a sejtekben a Bam jelenléte nem csak transzkripciós szinten szabályozódik, hanem fehérje szinten is. Megvizsgáltuk, hogy a Bam fehérje stabilizálásáért felelős Bgcn túltermelésével menekíthető-e a *MESR4* funkcióvesztéses fenotípus. A Bam kötőpartnerét, a Bgcn-t túlexpresszáló niche-ekben (100%, n=40) az erőltetett *bgcn* expresszió nem menekítette a tumoros ivarvonalvonal fenotípust (24. ábra).

Összefoglalva, a *MESR4* az elkötelezett GSC leánysejtekben, a preCB-okban a *bam* expressziójának elősegítésével szabályozza a differenciálódást.



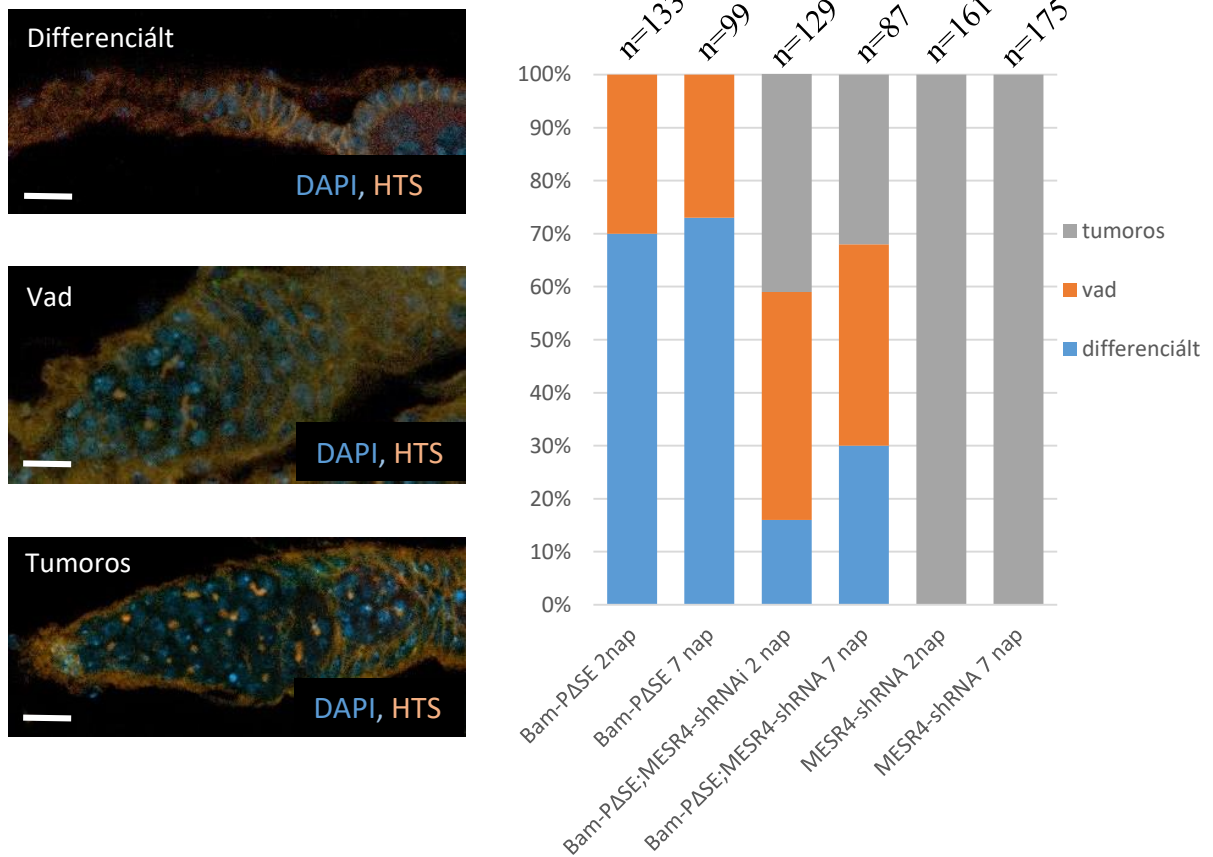
24. ábra. A *MESR4* csendesített differenciálatlan, tumoros fenotípus csak Bam túltermeléssel menekíthető. A *MESR4* csendesített fenotípus nem menekíthető Bgcn túltermeltetéssel. Bam túltermeltetés azonban menekíti a mutáns fenotípust és megjelennek a germáriumban a differenciálódott sejtek. Scale bar 10 μ m

6.3.3 A konstitutívan aktív *bam* allél expressziójához is szükséges a *MESR4*

Mivel eddigi eredményeink arra utaltak, hogy a *MESR4* a *bam* gén kifejeződését a transzkripció szabályozásával befolyásolja, megvizsgáltuk a *MESR4* és a TGF β /Dpp útviszonyát.

Ehhez a *MESR4* funkcióvesztés hatását egy olyan *bam* transzkripciós riporter konstrukt felhasználásával vizsgáltuk meg, ami érzéketlen a TGF β /Dpp jelút gátló hatására. A *bam* transzkripcióját a TGF β /Dpp jelátviteli útvonal negatívan szabályozza a *bam* génszabályozó régió SE elemén keresztül. A *bam-P Δ SE-Bam:GFP* allél nem tartalmazza a *bam* 5' nem transzlálódó régiójában lévő SE elemet. A *bam-P Δ SE-Bam:GFP* transzgenikus nőstényekben így a GSC-k nem reagálnak a gátló pMad-mediált Dpp jelre, és elindítják a *bam* expressziót a transzgénről. Az ektopikus *bam* kifejeződés ezután a GSC-k CB-okká és cisztákká történő differenciálódásához vezet, ami GSC-eket nem tartalmazó "üres" niche-eket eredményez. Megvizsgáltuk, a bábból való kikelés után 2 és 7 nappal, hogy a *bam* derepresszált kifejeződése által okozott GSC-differenciálódás szuppresszálnak-e a *MESR4* elvesztésével. Ehhez *bamP Δ SE-Bam:GFP*; nosGal4>*MESR4*-shRNA transzgenikus nőstényeket használtunk, amelyek ektopikusan expresszálták a *bam*-ot a GSC-kben ám a *MESR4*-et nem fejezték ki az ivarsejtekben.

A *bamP Δ SE-Bam:GFP*; nosGal4>*MESR4*-shRNA petefészkekben az üres niche-ek száma a *bamP Δ SE-Bam:GFP* kontroll legyekhez képest nagymértékben csökkent (30%, n=87 vs. 73%, n=99). A *bamP Δ SE-Bam:GFP*; nosGal4>*MESR4*-shRNA niche-ekben felhalmozódtak a spektroszómát tartalmazó differenciálatlan ivarsejtek (32%, n=87 vs. 0,0%, n=99) (25. ábra). Összességében a GSC-vesztéses fenotípus szuppressziója a *MESR4* csendesítésével azt jelzi, hogy a *MESR4* antagonisztikusan hat a Dpp által közvetített *bam*-gátlással szemben. A preCB-okban a *bam* expresszió elindulásához a Dpp által közvetített gátlás hiánya nem elegendő, hanem ehhez a *MESR4* által közvetített pozitív szabályozás is szükséges.



25. ábra. A *MESR4* szükséges a *bamPΔSE-Bam:GFP* konstitutívan aktív forma expressziójához. Vad háttérén a *bam-PΔSE* allél képes idő függvényében differenciáltatni az ivarsejteket. *MESR4* csendesített háttérén ez a differenciálódott fenotípus visszazorul, megnő a vad fenotípusú germáriumok aránya és megjelennek a *MESR4* csendesítésre jellemző tumoros germáriumok. Scale bar 10 μ m

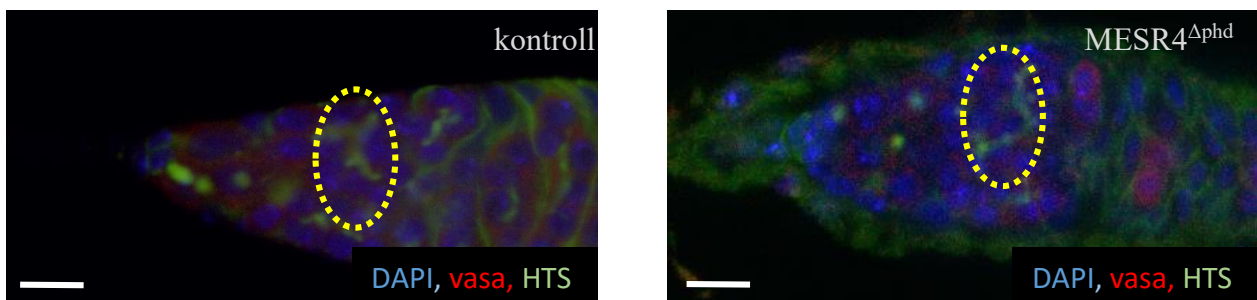
6.4 A *MESR4* a *bam* transzkripciós faktora

Eddigi kísérleteink bizonyították, hogy a *MESR4* a *bam* expresszióját pozitívan szabályozza. A *MESR4* fehérje szerkezete alapján feltételezhető, hogy a PHD finger doménjén keresztül a kromatinhoz kapcsolódva vagy a zinc finger doménjeivel közvetlenül a DNS-t specifikusan kötve fokozza a *bam* expresszióját. Ennek vizsgálatára olyan domén-specifikus mutáns *MESR4* allélt hozunk létre a CRISPR/Cas9 genomszerkesztő rendszer segítségével, amelyben a PHD domén hiányzott, illetve *in vitro* megvizsgáltuk a zinc finger domének kötődését a *bam* szabályozó régiójához.

6.4.1 A MESR4 PHD doménje nem szükséges az ivarsejtek differenciálódásához

A PHD finger egy sajátos zinc finger, ami fehérje-fehérje kölcsönhatásért felelős és a kromatin remodelling faktorok egyik gyakori fehérje motívuma. A MESR4 fehérje egy olyan PHD fingert tartalmaz, ami általában a trimerilált H3K4-et képes felismerni. Ez a típusú hisztonmódosítás a gének promóter régiójában a transzkripció starthelyéhez közel helyezkedik el, és lehetővé teszi a gén átírását (Liu és mtsai., 2016).

PHD domént nem tartalmazó MESR4 mutáns vizsgálatával határoztuk meg a PHD finger domén *bam* expresszió szabályozásában játszott szerepét. Kísérletünkben a Crispr/Cas9 genomszerkesztő módszerrel *MESR4^{Δphd}* mutáns allélt hoztunk létre és megvizsgáltuk a homozigóta mutáns nőtényeket fenotípusát. A homozigóta *MESR4^{Δphd}* mutáns nőtények életképesek és fertilisek voltak és a petefészek niche-eiben a vad típussal megegyező módon megjelentek a differenciálódott, fuzómákat tartalmazó ciszták (26. ábra). A homozigóta *MESR4^{Δphd}* mutáns nőtények vad fenotípusa azt jelzi, hogy a MESR4 fehérje PHD finger motívuma nem szükséges a MESR4 ivarvonalon betöltött szerepének ellátásához.

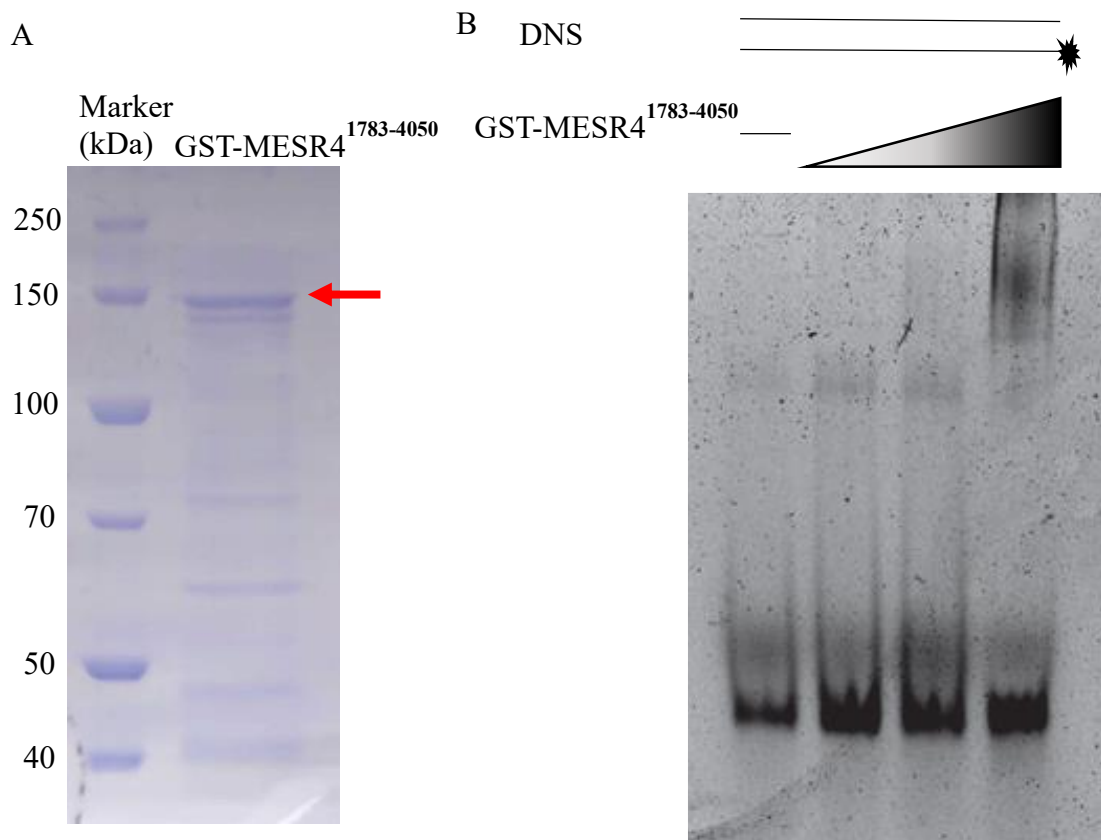


26. ábra. A MESR4 fehérje PHD finger motívuma nem szükséges a MESR4 germáriumon belüli funkciójához. A PHD domén mutáns *MESR4* legyek germáriumában az ivarsejtek differenciálódnak, megjelennek a differenciálódott ciszták. Scale bar 10 μ m

6.4.2 A MESR4 zinc finger-ei kötik a *bam* promóter szabályozó régióját

A MESR4 a PHD finger-én kívül rendelkezik nyolc DNS kötési képességgel ismert C2H2 típusú zinc finger doménnel is. A MESR4 C2H2 típusú zinc fingerjeit tartalmazó fehérje fragmentumot GST-vel jelölve bakteriális expressziós rendszerben termeltettük meg és tisztítottuk ki (27. ábra). A kitisztított fehérje kötődését a *bam* pozitív szabályozó régiójához EMSA kísérlettel határoztuk meg. A kísérletben a *bam* szabályozó régiójának a transzkripció starthelyéhez viszonyított -95 pozíciótól a -47 pozícióig terjedő rövid szakaszát használtuk, ami

a GC-specific enhancer elemet tartalmazta. A „GC-specifikus enhancer elem” az a régió, ami ahhoz szükséges, hogy a *bam* ivarsejtspecifikus módon expresszáldni tudjon (Chen és McKearin, 2003b). A kötési kísérletben duplaszálú DNS-t használtunk, melynek egyik szála az 5' végen fluoreszcensen volt jelölve. A tisztított MESR4 zinc finger fehérje fragmentumot emelkedő koncentrációban alkalmazva a jelölt DNS elektroforetikus mobilitása megváltozott, ami azt jelzi, hogy a MESR4 Zinc fingerjei képesek kötni ezt a rövid DNS szakaszt (27. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a MESR4 a zinc fingerein keresztül, a DNS-hez közvetlenül kapcsolódva, transzkripciósz faktorként szabályozhatja a *bam* gén expresszióját.



27. ábra. A MESR4 zinc fingerjei képesek kötni a *bam* pozitív regulátor régióját. (A) A kitisztított GST-MESR4¹⁷⁸³⁻⁴⁰⁵⁰ fehérje gélképe. A kitisztított GST-MESR4¹⁷⁸³⁻⁴⁰⁵⁰ fehérje piros nyíllal jelölve (B) A MESR4 C2H2 típusú zinc fingerjei kötik a *bam* GC-specific enhancer elemet szekvenciáját

6.5 MESR4 fehérje kötőpartnereinek azonosítása

A MESR4 az ivarsejtekben betöltött szerepét egyéb fehérjékhez kapcsolódva láthatja el, ezért koimmunprecipitációval kapcsolt tömegspektroszkópiás kísérlettel olyan lehetséges fehérje kötőpartnereket kerestünk, amelyek hozzájárulnak a MESR4 funkciójának ellátásához.

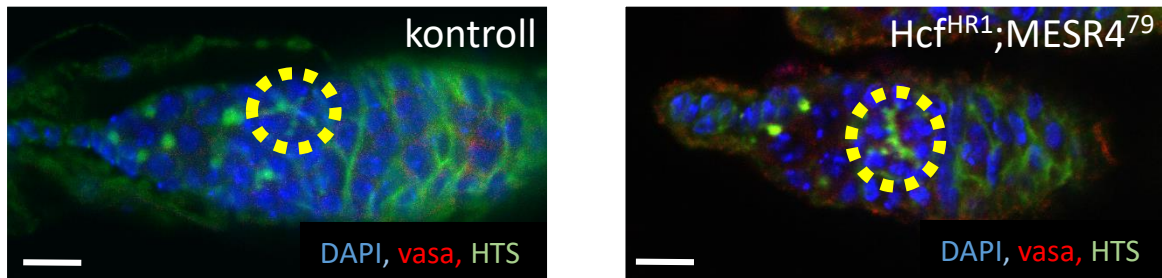
A koimmunprecipitációhoz V5-MESR4-et kifejező nőstények petefészket használtuk fel (Wissel és mtsai., 2016). A koimmunprecipitált fehérjék tömegspektroszkópos analízise során a MESR4 partnerei között nagy találati értékkel megtaláltuk a MESR4-nek White és munkatársai által 2011-ben azonosított kölcsönható fehérjéjét, a Host cell factor-t (Hcf), ami a kísérleti megközelítésünk sikerességét bizonyítja (7. táblázat) (White és mtsai., 2011). A Hcf az Ada2a-containing (ATAC) hiszton aciltranszferáz komplex tagja, és kapcsolódik a hiszton H3 lysin-4 metiltransferáz Trithorax-related (Trr) fehérjéhez (Guelman és mtsai., 2006; Nan és mtsai., 2019; Suganuma és mtsai., 2008). Mivel a MESR4 a PHD fingere által működhet egy kromatin remodelling faktorként, ezért további módszerekkel próbáltunk kimutatni a Hcf és a MESR4 közötti funkcionális kapcsolatot. A *MESR4* és a *hcf* közötti domináns genetikai interakció kimutatásához *hcf* és *MESR4* kettős heterozigóta mutáns germáriumokat vizsgáltunk meg. A *MESR4⁷⁹/hcf^f* genotípusú nőstények életképesek és fertilisek voltak, és a petefészkek niche-eiben nem tapasztaltunk hibát az ivarsejtek differenciációjában (28. ábra), tehát nem tudtuk a két fehérje között interakciót kimutatni.

A találati értékek alapján a MESR4-nek egy másik lehetséges kölcsönható partnere a CG2247. A CG2247 egy sejtmagi fehérje, amelynek a molekuláris funkciója ismeretlen, és szerepet játszik a baktériumok elleni immunreakcióban (Ayres és mtsai., 2008). Mivel ez a fehérje rendelkezett a legnagyobb találati értékkel a kísérletünkben, így megvizsgáltuk, hogy szükséges-e az ivarsejtek differenciációjához. Ehhez ivarvonal-specifikusan csendesítettük a CG2247-et, azonban a csendesített germáriumok fenotípusa megegyezett a kontroll germáriumokéval, tehát a sejtek képesek voltak differenciálódni és megjelentek a fuzómát tartalmazó ciszták. Mivel a CG2247 csendesítésével nem tapasztaltunk mutáns ivarsejt fenotípust, így ezzel a génnel nem végeztünk további kísérleteket.

Fehérje neve	1.minta relative peptid count /10 ⁻⁵	2.minta relative peptid count/10 ⁻⁵	Összesen
CG2247, isoform A	2032,520325	1788,908766	3821,42909
Misexpression suppressor of ras 4, isoform D	1548,586914	1192,605844	2741,19276
Host cell factor	967,8668215	766,6751853	1734,54201
Dipeptidyl peptidase 3	580,7200929	1022,23358	1602,95367
Malic enzyme	774,2934572	681,4890536	1455,78251
Ig gamma-2A chain C region, A allele / V5 antibody	774,2934572	511,1167902	1285,41025

Fehérje neve	1.minta relative peptid count /10 ⁻⁵	2.minta relative peptid count/10 ⁻⁵	Összesen
CG1648, isoform A	483,9334108	681,4890536	1165,42246
Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase 1	483,9334108	425,9306585	909,864069
CG10103	774,2934572	255,5583951	1029,85185
Protein NASP homolog	290,3600465	596,3029219	886,662968
pzg	290,3600465	511,1167902	801,476837

7.táblázat. A MESR4 koimmunprecipitációt követő MS analízis legjobb eredményei. Az 1. és 2. minta biológiai ismétlések



28. ábra. A *MESR4* és *hcf* kettős heterozigóta mutáns germáriumokban fenotípusa megegyezik a kontrolléval, megjelennek a differenciálódott, fuzómát tartalmazó ciszták. Scale bar 10 μ m

7. Diszkusszió

Az őssejtek önmegújulása és differenciálódásuk elindulása közötti döntés mögött meghúzódó mechanizmusok a génszabályozás több szintjén hatnak. Az őssejtek fenntartásának és differenciálódásának megfelelő időbeli és térbeli mintázatát a transzkripció, az RNS-stabilitás és a fehérjék képződésének és lebomlásának szabályozása együttesen határozzák meg (Flora és mtsai., 2017).

A transzkripció szintjén az őssejtek differenciálódása elméletileg indukálható az önmegújító faktorok vagy a differenciálódást gátló faktorok expressziójának megakadályozásával, illetve a differenciálódási faktorok kifejeződésének a serkentésével. Ezekben az esetekben olyan epigenetikai mechanizmusok játszanak kulcsszerepet, melyek a niche sejteji közötti kölcsönhatások által meghatározott módon, a kromatinszerkezet befolyásolására révén irányítják a transzkripciót. A *Drosophila* GSC-kben és leánysejtjeikben egyetlen „mestergén”, a *bam*, transzkripciójának a repressziója, illetve derepressziója gátolja meg, illetve teszi lehetővé a differenciálódást. A GSC-kben a TGF β /Dpp-út vonal következtében gátló fehérjék kötődnek a *bam* szabályozó régiójának egy specifikus szakaszához, és ezáltal elnyomják a *bam* transzkripcióját, és ezzel megakadályozzák a differenciálódást. A preCB-okban azonban a *bam* kromatinfüggő transzkripció szuppressziója felszabadul, és kiváltja a preCB-ok átalakulását a differenciált CB állapotba. (Buszczak és mtsai., 2009; Sun és mtsai., 2015; Wang és mtsai., 2011; Xi és Xie, 2005; Xin és mtsai., 2013; Xuan és mtsai., 2013). Míg a *bam* transzkripció szuppresszióját a GSC-kben elősegítő mechanizmusok jól ismertek, eddig nem írtak még le olyan pozitív transzkripció szabályozó faktorokat, amelyek a *bam* kifejeződését a CB-okban serkentik. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a *MESR4* az első olyan pozitív regulátor, amely a preCB-okban a *bam* transzkripcióját fokozza.

A *MESR4*-ről kimutatták, hogy különböző fejlődési folyamatokban a sejtek közötti kommunikációs útvonalak effektoraként hat. Képes elnyomni a konstitutívan aktivált Ras-MAPK- és az FGF-jelátvitelt a fejlődő szemben, illetve a szükséges az EGFR/ERK jelút megfelelő szabályozásához az embrionális fejlődés és a szárnyképződés során (A. M. Huang és Rubin, 2000; Seong és mtsai., 2015; Zhu és mtsai., 2005). A kifejlett nőtény GSC niche-ben ezek közül a jelátviteli mechanizmusok közül EGFR/ERK út vonal aktív, és a kísérő sejtekben a Dpp grádiens GSC-k közvetlen környezetére korlátozza (Matsuoka és mtsai., 2013). Számos megfigyelésünk azonban arra utal, hogy ebben a sejtes kontextusban a *MESR4* nem az EGFR/ERK út vonal komponenseként működik. Az EGFR jelátvitel károsodása a niche-ben a

kiterjedt Dpp-aktivitás miatt a GSC-szerű sejtek elszaporodását eredményezi, míg a *MESR4* csendesítése a csírasejtekben a preCB-ok felhalmozódását indukálja. Ezen kívül a *MESR4* működésére nincs szükség a megfelelő differenciálódáshoz a kísérősejtekben, ahol az EGFR útvonal aktív.

Bár a *MESR4* kifejeződik a csírasejtekben és a GSC niche minden szomatikus sejttypusában, funkciója kizárólag a preCB stádiumban lévő csírasejtekben elengedhetetlen. A *MESR4* csírasejtspecifikus csendesítésével kimutattuk, hogy sejt-autonóm módon, egy nagyon szűk fejlődési ablakban szabályozza a nőstény ivarvonal őssejtjeinek sorsát azáltal, hogy elősegíti a preCB állapotból a CB állapotba való átmenetet. A *MESR4* aktivitásának térbeli és időbeli szabályozása illetve hatásának pontos mechanizmusa továbbra se tisztázott teljes mértékben. A *MESR4* sejttypusfüggő aktivitásának szabályozására két, egymással összeegyeztethető elméletet dolgoztunk ki. Az első elmélet szerint elképzelhető, hogy a konstitutívan expresszálandó *MESR4* egy specifikusan a preCB-okban felépülő fehérjekomplex tagjaként működik, vagy egy olyan fehérjéhez kötődik ami kizárólag a preCB állapotban fejeződik ki. A *MESR4*-el koimmunprecipitált proteóm vizsgálata megmutatta, hogy a *MESR4* kölcsönhat a Hcf kromatin regulátorral. A Hcf DNS-szekvencia-specifikus transzkripciós faktorokhoz kapcsolódva képes kötődni meghatározott kromoszómaregiókhoz, és maga köré gyűjt különböző kromatinmódosító aktivitással rendelkező fehérjéket. A Hcf ezáltal képes integrálni a szekvensspecifikus transzkripciós faktorokat a kromatinmódosító aktivitások specifikus kombinációival és meghatározni az adott régióban a gének kifejeződését (Kristie és mtsai., 2010). Bár a *hcf* kifejeződik a petefészekben és funkciója szükséges az ivarsejtek kialakulásához, se a kifejeződési mintázata, se funkcióvesztéses mutáns fenotípusa nem utal arra, hogy a *MESR4*-hez hasonló szerepet játszana a GSC differenciálódásban (Rodriguez-Jato és mtsai., 2011). A domináns genetikai kölcsönhatás elmaradása a két gén között szintén azt erősíti, hogy a *MESR4* a preCB-okban a *hcf*-től függetlenül hat a differenciálódásra. A *MESR4*-el koimmunprecipitált további fehérjék vizsgálata a jövőben fényt deríthet azokra a folyamatokra, amelyek a *MESR4* aktivitását a preCB-CB átmenetre korlátozzák.

A sejttypus-specifikus aktivitást magyarázó másik elméletünk szerint, a *MESR4*-et a specifikusan a preCB-okban zajló upstream folyamatok aktiválják. Az egyetlen ilyen ismert folyamat a preCB-okban a Pgc transzkripciós represszor által tranziens módon kiváltott globális transzkripciós csendesítő impulzus, ami megakadályozza a őssejt fennmaradásáért felelős faktorok transzkripcióját (Flora és mtsai., 2018). Ezt a transzkripciós csendesítést olyan kromatinmódosulások kísérik, amely képessé teszik a sejtet egy másik sejtorsra jellemző

gének kifejezésére. Ez a megváltozott kromatinkörnyezet lehetővé teheti a MESR4 számára, hogy közvetlenül vagy közvetve irányítsa a *bam* expresszióját.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a *bam* transzkripciót kontrollja az a molekuláris mechanizmus, amellyel a MESR4 szabályozza a csírasejtek fejlődését. A MESR4 fehérje doménösszetétele alapján elképzelhető, hogy a PHD-fingerjén keresztül segíti elő a *bam* transzkripcióját (Morra és mtsai., 2012; Watson és mtsai., 2012). A PHD-fingerek számos olyan a nukleoszóma-kötő fehérjében megtalálhatók, ahol a PHD-fingerek kölcsönhatásba lépnek a kovalensen módosított hisztonokkal és kromatin-remodelling faktorként hatva befolyásolják a célgének kifejeződését (Bienz, 2006; Mansfield és mtsai., 2011; Peña és mtsai., 2006; Shi és mtsai., 2007). A MESR4 doménspecifikus deléciós alléljének fenotípusos vizsgálata azonban azt mutatta, hogy a PHD-finger domén nélkülözhető a MESR4 GSC differenciációban betöltött funkciójához. Megfigyelésünkkel összhangban korábbi vizsgálatok nem mutatták ki a MESR4 közvetlen kapcsolódását a módosított hisztonokhoz (Seong és mtsai. 2015).

Bár nem zárhatjuk ki teljesen, hogy a MESR4 részt vesz a kromatin közvetlen átalakításában, a MESR4 funkciójára vonatkozóan mi egy alternatív hipotézist részesítünk előnyben. Elméletünk szerint a MESR4 a zinc finger-ein keresztül közvetlenül és szekvenciaspecifikus módon köti a DNS-t, és specifikusan szabályozza a kulcsfontosságú differenciálódási regulátorok transzkripcióját. A MESR4-szabályozás közvetlen célpontjának nyilvánvaló jelöltje a *bam* differenciációs mestergén. A MESR4 szerepét a *bam* transzkripciójának közvetlen szabályozásában számos megfigyelésünk támasztja alá. *MESR4* csendesítés hatására az ivarsejtekben a *bam* mRNS-szintje csökkent, ami arra utal, hogy a MESR4 a differenciálódást a *bam* transzkripciót kontrollja révén segíti elő. Másik érv a MESR4-nek a *bam* transzkripció szabályozásában játszott szerepe mellett, hogy a *bam-PΔSE-Bam:GFP* transzgénből származó szabályozatlan Bam expresszió által okozott fenotípus elnyomható a *MESR4* csendesítésével. Ebben az esetben a pozitív regulátor hiánya megakadályozza a szuppresszió alól mesterségesen felszabadított *bam* kifejeződését. Ezzel összhangban kimutattuk, hogy a MESR4 *in vitro* képes kötődni a *bam* cisz-regulátor régiójához, ami megerősíti azt az elképzelésünket, hogy a MESR4 elősegíti a *bam* expressziót.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok Dr. Jankovics Ferenc témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönöm segítőkész támogatását és dolgozatom alapos és kritikus átnézését. Továbbá köszönöm Ugrainé Szathmári Margitnak, a laboratóriumi munkában való segítségét, Dr. Bence Melindának, Dr. Földi Istvánnak és Dr. Lipinszki Zoltánnak hasznos tanácsait. Dr. Sipos Lászlónak, Velkeyné Krausz Ildikónak, Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak és Dr. Burkovics Péternek a kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy munkámhoz keretet biztosított.

9. Irodalomjegyzék

- Ables, E.T., Drummond-Barbosa, D., 2010. The Steroid Hormone Ecdysone Functions with Intrinsic Chromatin Remodeling Factors to Control Female Germline Stem Cells in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 7, 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.10.001>
- Akiyama, T., Kamimura, K., Firkus, C., Takeo, S., Shimmi, O., Nakato, H., 2008. Dally Regulates Dpp Morphogen Gradient Formation by Stabilizing Dpp on the Cell Surface. *Dev Biol* 313, 408–419. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.035>
- Ayres, J.S., Freitag, N., Schneider, D.S., 2008. Identification of *Drosophila* Mutants Altering Defense of and Endurance to *Listeria monocytogenes* Infection. *Genetics* 178, 1807–1815. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.083782>
- Bienz, M., 2006. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends in Biochemical Sciences*, SPECIAL ISSUE: CELEBRATING 30 YEARS OF *TiBS* 31, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.11.001>
- Boyle, M., Bonini, N., DiNardo, S., 1997. Expression and function of *clift* in the development of somatic gonadal precursors within the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124, 971–982. <https://doi.org/10.1242/dev.124.5.971>
- Boyle, M., DiNardo, S., 1995. Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad. *Development* 121, 1815–1825. <https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1815>
- Brown, S., Hu, N., Hombria, J.C., 2001. Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* 11, 1700–1705. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00524-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00524-3)
- Buszczak, M., Paterno, S., Spradling, A.C., 2009. *Drosophila* stem cells share a common requirement for the histone H2B ubiquitin protease *scrawny*. *Science* 323, 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.1165678>
- Casale, A.M., Cappucci, U., Fanti, L., Piacentini, L., 2019. Heterochromatin protein 1 (HP1) is intrinsically required for post-transcriptional regulation of *Drosophila* Germline Stem Cell (GSC) maintenance. *Sci Rep* 9, 4372. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40152-1>
- Chen, D., McKearin, D., 2005. Gene Circuitry Controlling a Stem Cell Niche. *Current Biology* 15, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.004>

- Chen, D., McKearin, D., 2003a. Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Curr Biol* 13, 1786–1791. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.09.033>
- Chen, D., McKearin, D.M., 2003b. A discrete transcriptional silencer in the bam gene determines asymmetric division of the Drosophila germline stem cell. *Development* 130, 1159–1170. <https://doi.org/10.1242/dev.00325>
- Clough, E., Moon, W., Wang, S., Smith, K., Hazelrigg, T., 2007. Histone methylation is required for oogenesis in Drosophila. *Development* 134, 157–165. <https://doi.org/10.1242/dev.02698>
- Clough, E., Tedeschi, T., Hazelrigg, T., 2014. Epigenetic Regulation of Oogenesis and Germ Stem Cell Maintenance by the Drosophila Histone Methyltransferase Eggless/dSetDB1. *Dev Biol* 388, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.014>
- Dansereau, D.A., Lasko, P., 2008. The Development of Germline Stem Cells in Drosophila. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 450, 3. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-214-8_1
- de Cuevas, M., Lee, J.K., Spradling, A.C., 1996. alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the Drosophila ovary. *Development* 122, 3959–3968. <https://doi.org/10.1242/dev.122.12.3959>
- de Cuevas, M., Spradling, A.C., 1998. Morphogenesis of the Drosophila fusome and its implications for oocyte specification. *Development* 125, 2781–2789.
- Flora, P., McCarthy, A., Upadhyay, M., Rangan, P., 2017. Role of Chromatin Modifications in Drosophila Germline Stem Cell Differentiation, in: Arur, S. (Ed.), *Signaling-Mediated Control of Cell Division : From Oogenesis to Oocyte-to-Embryo Development, Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44820-6_1
- Flora, P., Schowalter, S., Wong-Deyrup, S., DeGennaro, M., Nasrallah, M.A., Rangan, P., 2018. Transient transcriptional silencing alters the cell cycle to promote germline stem cell differentiation in Drosophila. *Dev Biol* 434, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.11.014>
- Gancz, D., Lengil, T., Gilboa, L., 2011. Coordinated Regulation of Niche and Stem Cell Precursors by Hormonal Signaling. *PLOS Biology* 9, e1001202. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001202>
- Gilboa, L., Lehmann, R., 2006. Soma-germline interactions coordinate homeostasis and growth in the Drosophila gonad. *Nature* 443, 97–100. <https://doi.org/10.1038/nature05068>

- Gilboa, L., Lehmann, R., 2004. Repression of Primordial Germ Cell Differentiation Parallels Germ Line Stem Cell Maintenance. *Current Biology* 14, 981–986. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.05.049>
- Green, D.A., Extavour, C.G., 2012. Convergent evolution of a reproductive trait through distinct developmental mechanisms in *Drosophila*. *Dev Biol* 372, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.09.014>
- Guelman, S., Suganuma, T., Florens, L., Swanson, S.K., Kiesecker, C.L., Kusch, T., Anderson, S., Yates, J.R., Washburn, M.P., Abmayr, S.M., Workman, J.L., 2006. Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 26, 871–882. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.871-882.2006>
- Harrison, D.A., McCoon, P.E., Binari, R., Gilman, M., Perrimon, N., 1998. *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev* 12, 3252–3263. <https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3252>
- Huang, A., Rubin, G., 2000. A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in. *Genetics* 156, 1219–30.
- Huang, F., Paulson, A., Dutta, A., Venkatesh, S., Smolle, M., Abmayr, S.M., Workman, J.L., 2014. Histone acetyltransferase Enok regulates oocyte polarization by promoting expression of the actin nucleation factor spire. *Genes Dev* 28, 2750–2763. <https://doi.org/10.1101/gad.249730.114>
- Huynh, J.R., St Johnston, D., 2000. The role of BicD, Egl, Orb and the microtubules in the restriction of meiosis to the *Drosophila* oocyte. *Development* 127, 2785–2794.
- Iida, T., Lilly, M.A., 2004. missing oocyte encodes a highly conserved nuclear protein required for the maintenance of the meiotic cycle and oocyte identity in *Drosophila*. *Development* 131, 1029–1039. <https://doi.org/10.1242/dev.01001>
- Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Oka, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K., Kawabata, M., 1998. Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Mol Biol Cell* 9, 2145–2156. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.8.2145>
- Jaglarz, M.K., Howard, K.R., 1995. The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* 121, 3495–3503. <https://doi.org/10.1242/dev.121.11.3495>
- Ji, S., Li, C., Hu, L., Liu, K., Mei, J., Luo, Y., Tao, Y., Xia, Z., Sun, Q., Chen, D., 2017. Bam-dependent deubiquitinase complex can disrupt germ-line stem cell maintenance by

- targeting cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 6316–6321.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1619188114>
- Kiger, A.A., White-Cooper, H., Fuller, M.T., 2000. Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature* 407, 750–754.
<https://doi.org/10.1038/35037606>
- Kristie, T.M., Liang, Y., Vogel, J.L., 2010. Control of α -herpesvirus IE gene expression by HCF-1 coupled chromatin modification activities. *Biochim Biophys Acta* 1799, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.08.003>
- Kudron, M.M., Victorsen, A., Gevirtzman, L., Hillier, L.W., Fisher, W.W., Vafeados, D., Kirkey, M., Hammonds, A.S., Gersch, J., Ammouri, H., Wall, M.L., Moran, J., Steffen, D., Szynek, M., Seabrook-Sturgis, S., Jameel, N., Kadaba, M., Patton, J., Terrell, R., Corson, M., Durham, T.J., Park, S., Samanta, S., Han, M., Xu, J., Yan, K.-K., Celniker, S.E., White, K.P., Ma, L., Gerstein, M., Reinke, V., Waterston, R.H., 2018. The ModERN Resource: Genome-Wide Binding Profiles for Hundreds of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* Transcription Factors. *Genetics* 208, 937–949.
<https://doi.org/10.1534/genetics.117.300657>
- Lehmann, R., 2012. Germline Stem Cells: Origin and Destiny. *Cell Stem Cell* 10, 729–739.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.016>
- Li, M.Z., Elledge, S.J., 2012. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods Mol Biol* 852, 51–59. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0_5
- Li, Y., Maines, J.Z., Tastan, O.Y., McKearin, D.M., Buszczak, M., 2012. Mei-P26 regulates the maintenance of ovarian germline stem cells by promoting BMP signaling. *Development* 139, 1547–1556. <https://doi.org/10.1242/dev.077412>
- Lin, H., 2002. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat Rev Genet* 3, 931–940.
<https://doi.org/10.1038/nrg952>
- Lin, H., Spradling, A.C., 1993. Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted *Drosophila* germaria. *Dev Biol* 159, 140–152.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1228>
- Liu, X., Wang, C., Liu, W., Li, J., Li, C., Kou, X., Chen, J., Zhao, Y., Gao, H., Wang, H., Zhang, Y., Gao, Y., Gao, S., 2016. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* 537, 558–562.
<https://doi.org/10.1038/nature19362>
- López-Onieva, L., Fernández-Miñán, A., González-Reyes, A., 2008. Jak/Stat signalling in niche support cells regulates dpp transcription to control germline stem cell maintenance

- in the *Drosophila* ovary. *Development* 135, 533–540.
<https://doi.org/10.1242/dev.016121>
- Mansfield, R.E., Musselman, C.A., Kwan, A.H., Oliver, S.S., Garske, A.L., Davrazou, F., Denu, J.M., Kutateladze, T.G., Mackay, J.P., 2011. Plant Homeodomain (PHD) Fingers of CHD4 Are Histone H3-binding Modules with Preference for Unmodified H3K4 and Methylated H3K9. *J Biol Chem* 286, 11779–11791.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208207>
- Matsuoka, S., Hiromi, Y., Asaoka, M., 2013. Egfr signaling controls the size of the stem cell precursor pool in the *Drosophila* ovary. *Mech Dev* 130, 241–253.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.01.002>
- McCarthy, A., Deiulio, A., Martin, E.T., Upadhyay, M., Rangan, P., 2018. Tip60 complex promotes expression of a differentiation factor to regulate germline differentiation in female *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 29, 2933–2945. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-06-0385>
- McKearin, D.M., Spradling, A.C., 1990. bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis. *Genes Dev* 4, 2242–2251.
<https://doi.org/10.1101/gad.4.12b.2242>
- Morra, R., Lee, B.M., Shaw, H., Tuma, R., Mancini, E.J., 2012. Concerted action of the PHD, chromo and motor domains regulates the human chromatin remodelling ATPase CHD4. *FEBS Lett* 586, 2513–2521. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.017>
- Morrison, S.J., Kimble, J., 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068–1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Morrison, S.J., Spradling, A.C., 2008. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* 132, 598–611.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>
- Mukai, M., Hira, S., Nakamura, K., Nakamura, S., Kimura, H., Sato, M., Kobayashi, S., 2015. H3K36 Trimethylation-Mediated Epigenetic Regulation is Activated by Bam and Promotes Germ Cell Differentiation During Early Oogenesis in *Drosophila*. *Biol Open* 4, 119–124. <https://doi.org/10.1242/bio.201410850>
- Nan, Z., Yang, W., Lyu, J., Wang, F., Deng, Q., Xi, Y., Yang, X., Ge, W., 2019. *Drosophila* Hcf regulates the Hippo signaling pathway via association with the histone H3K4 methyltransferase Trr. *Biochem J* 476, 759–768. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180717>
- Ohlstein, B., McKearin, D., 1997. Ectopic expression of the *Drosophila* Bam protein eliminates oogenic germline stem cells. *Development* 124, 3651–3662.

- Pearson, J., López-Onieva, L., Rojas-Ríos, P., González-Reyes, A., 2009. Recent advances in *Drosophila* stem cell biology. *Int J Dev Biol* 53, 1329–1339. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072431jp>
- Peña, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusha, V.V., Gozani, O., Zhao, R., Kutateladze, T.G., 2006. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 442, 100–103. <https://doi.org/10.1038/nature04814>
- Perinthottathil, S., Kim, C., 2011. Bam and Bgcn in *Drosophila* germline stem cell differentiation. *Vitam Horm* 87, 399–416. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386015-6.00038-X>
- Rodriguez-Jato, S., Busturia, A., Herr, W., 2011. *Drosophila melanogaster* dHCF interacts with both PcG and TrxG epigenetic regulators. *PLoS One* 6, e27479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027479>
- Sardi, J., Bener, M.B., Simao, T., Descoteaux, A.E., Slepchenko, B.M., Inaba, M., 2021. Mad dephosphorylation at the nuclear pore is essential for asymmetric stem cell division. *PNAS* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006786118>
- Schofield, R., 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Seong, K.-H., Tsuda, M., Tsuda-Sakurai, K., Aigaki, T., 2015. The plant homeodomain finger protein MESR4 is essential for embryonic development in *Drosophila*. *Genesis* 53, 701–708. <https://doi.org/10.1002/dvg.22906>
- Sgromo, A., Raisch, T., Backhaus, C., Keskeny, C., Alva, V., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., 2018. *Drosophila* Bag-of-marbles directly interacts with the CAF40 subunit of the CCR4-NOT complex to elicit repression of mRNA targets. *RNA* 24, 381–395. <https://doi.org/10.1261/rna.064584.117>
- Shi, J., Jin, Z., Yu, Y., Zhang, Y., Yang, F., Huang, H., Cai, T., Xi, R., 2021. A Progressive Somatic Cell Niche Regulates Germline Cyst Differentiation in the *Drosophila* Ovary. *Curr Biol* 31, 840-852.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.053>
- Shi, X., Kachirskaia, I., Walter, K.L., Kuo, J.-H.A., Lake, A., Davrazou, F., Chan, S.M., Martin, D.G.E., Fingerman, I.M., Briggs, S.D., Howe, L., Utz, P.J., Kutateladze, T.G., Lugovskoy, A.A., Bedford, M.T., Gozani, O., 2007. Proteome-wide Analysis in *Saccharomyces cerevisiae* Identifies Several PHD Fingers as Novel Direct and Selective Binding Modules of Histone H3 Methylated at Either Lysine 4 or Lysine 36. *J Biol Chem* 282, 2450–2455. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600286200>

- Song, X., Call, G.B., Kirilly, D., Xie, T., 2007. Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the *Drosophila* ovary. *Development* 134, 1071–1080. <https://doi.org/10.1242/dev.003392>
- Song, X., Wong, M.D., Kawase, E., Xi, R., Ding, B.C., McCarthy, J.J., Xie, T., 2004. Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 131, 1353–1364. <https://doi.org/10.1242/dev.01026>
- Song, X., Zhu, C.-H., Doan, C., Xie, T., 2002. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science* 296, 1855–1857. <https://doi.org/10.1126/science.1069871>
- Sonnenblick, B.P., 1950. The early embryology of *Drosophila melanogaster* In *Biology of Drosophila* (ed. M. Demerec), 62–167.
- Spradling, A., Fuller, M.T., Braun, R.E., Yoshida, S., 2011. Germline stem cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a002642. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002642>
- Suganuma, T., Gutiérrez, J.L., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Abmayr, S.M., Workman, J.L., 2008. ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat Struct Mol Biol* 15, 364–372. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1397>
- Sun, J., Wei, H.-M., Xu, J., Chang, J.-F., Yang, Z., Ren, X., Lv, W.-W., Liu, L.-P., Pan, L.-X., Wang, X., Qiao, H.-H., Zhu, B., Ji, J.-Y., Yan, D., Xie, T., Sun, F.-L., Ni, J.-Q., 2015. Histone H1-mediated epigenetic regulation controls germline stem cell self-renewal by modulating H4K16 acetylation. *Nat Commun* 6, 8856. <https://doi.org/10.1038/ncomms9856>
- Tu, R., Duan, B., Song, X., Chen, S., Scott, A., Hall, K., Blanck, J., DeGraffenreid, D., Li, H., Perera, A., Haug, J., Xie, T., 2021. Multiple Niche Compartments Orchestrate Stepwise Germline Stem Cell Progeny Differentiation. *Curr Biol* 31, 827-839.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.12.024>
- Van Doren, M., Williamson, A.L., Lehmann, R., 1998. Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr Biol* 8, 243–246. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70091-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70091-0)
- Wang, X., Pan, L., Wang, S., Zhou, J., McDowell, W., Park, J., Haug, J., Staehling, K., Tang, H., Xie, T., 2011. Histone H3K9 Trimethylase Eggless Controls Germline Stem Cell Maintenance and Differentiation. *PLoS Genet* 7, e1002426. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002426>

- Wang, Z., Lin, H., 2007. Sex-lethal is a target of Bruno-mediated translational repression in promoting the differentiation of stem cell progeny during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* 302, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.016>
- Warren, J.T., Yerushalmi, Y., Shimell, M.J., O'Connor, M.B., Restifo, L.L., Gilbert, L.I., 2006. Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of *Drosophila melanogaster*: Correlations with changes in gene activity. *Developmental Dynamics* 235, 315–326. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20626>
- Warrior, R., 1994. Primordial germ cell migration and the assembly of the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev Biol* 166, 180–194. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1306>
- Watson, A.A., Mahajan, P., Mertens, H.D.T., Deery, M.J., Zhang, Wenchao, Pham, P., Du, X., Bartke, T., Zhang, Wei, Edlich, C., Berridge, G., Chen, Y., Burgess-Brown, N.A., Kouzarides, T., Wiechens, N., Owen-Hughes, T., Svergun, D.I., Gileadi, O., Laue, E.D., 2012. The PHD and Chromo Domains Regulate the ATPase Activity of the Human Chromatin Remodeler CHD4. *Journal of Molecular Biology* 422, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.04.031>
- White, A.E., Burch, B.D., Yang, X., Gasdaska, P.Y., Dominski, Z., Marzluff, W.F., Duronio, R.J., 2011. *Drosophila* histone locus bodies form by hierarchical recruitment of components. *J Cell Biol* 193, 677–694. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012077>
- White-Cooper, H., 2012. Tissue, cell type and stage-specific ectopic gene expression and RNAi induction in the *Drosophila* testis. *Spermatogenesis* 2, 11–22. <https://doi.org/10.4161/spmg.19088>
- Wissel, S., Kieser, A., Yasugi, T., Duchek, P., Roitinger, E., Gokcezade, J., Steinmann, V., Gaul, U., Mechtler, K., Förstemann, K., Knoblich, J.A., Neumüller, R.A., 2016. A Combination of CRISPR/Cas9 and Standardized RNAi as a Versatile Platform for the Characterization of Gene Function. *G3 (Bethesda)* 6, 2467–2478. <https://doi.org/10.1534/g3.116.028571>
- Xi, R., Xie, T., 2005. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. *Science* 310, 1487–1489. <https://doi.org/10.1126/science.1120140>
- Xie, T., Song, X., Jin, Z., Pan, L., Weng, C., Chen, S., Zhang, N., 2008. Interactions between stem cells and their niche in the *Drosophila* ovary. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 39–47. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.014>
- Xie, T., Spradling, A.C., 2000. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 290, 328–330. <https://doi.org/10.1126/science.290.5490.328>

- Xie, T., Spradling, A.C., 1998. decapentaplegic Is Essential for the Maintenance and Division of Germline Stem Cells in the Drosophila Ovary. *Cell* 94, 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81424-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81424-5)
- Xin, T., Xuan, T., Tan, J., Li, Mengjie, Zhao, G., Li, Mingfa, 2013. The Drosophila putative histone acetyltransferase Enok maintains female germline stem cells through regulating Bruno and the niche. *Dev Biol* 384, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.001>
- Xuan, T., Xin, T., He, J., Tan, J., Gao, Y., Feng, S., He, L., Zhao, G., Li, M., 2013. dBre1/dSet1-dependent pathway for histone H3K4 trimethylation has essential roles in controlling germline stem cell maintenance and germ cell differentiation in the Drosophila ovary. *Dev Biol* 379, 167–181. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.015>
- Yan, D., Neumüller, R.A., Buckner, M., Ayers, K., Li, H., Hu, Y., Yang-Zhou, D., Pan, L., Wang, X., Kelley, C., Vinayagam, A., Binari, R., Randklev, S., Perkins, L.A., Xie, T., Cooley, L., Perrimon, N., 2014. A regulatory network of Drosophila germline stem cell self-renewal. *Dev Cell* 28, 459–473. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.020>
- Zhu, C.-H., Xie, T., 2003. Clonal expansion of ovarian germline stem cells during niche formation in Drosophila. *Development* 130, 2579–2588. <https://doi.org/10.1242/dev.00499>
- Zhu, M.Y., Wilson, R., Leptin, M., 2005. A Screen for Genes That Influence Fibroblast Growth Factor Signal Transduction in Drosophila. *Genetics* 170, 767–777. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.039750>

10. Összefoglaló

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 őssejtállapot fenntartását és a differenciálódás elindulását belső és külső faktorok együttesen irányítják. Az őssejtbiológiai kutatások alapkérdése, hogy milyen tényezők határozzák meg, hogy a sejtek őssejt állapotukat tartják fent, vagy elindítják a differenciációs programjukat.

Az őssejtek közös jellemzője, hogy speciális sejt mikrokozmoszokban, az ún. őssejt niche-ekben helyezkednek el, ahol az őssejtek belső fejlődési programja illetve sejt külső faktorok jelátviteli útvonalakon keresztül szabályozzák az őssejtek fennmaradását és differenciálódását. A *Drosophila melanogaster* petefészkeiben található ivarvonal-őssejt niche kiváló modell az őssejtek önmegújító képességének fenntartását és a differenciálódás elkezdését biztosító folyamatok vizsgálatára.

A felnőtt *Drosophila* petefészkeiben az ivarvonal őssejt nichei a petefészkek apikális végén található germáriumokban helyezkednek el. A nichekben az ivarvonal őssejtet testis sejtek veszik körül, amelyek az őssejtek és utódsejtjeik fejlődését támogató sajátos anatómiai szerkezetet és szignalizációs környezetet biztosítanak ki. A petefészkek őssejt niche-ében az őssejtállapot fenntartása a *bam* gén expressziójának gátlásán keresztül valósul meg. A *bam* az ivarsejtek differenciálódást szabályozó kulcsgén, ami az őssejtben nem fejeződik ki, az őssejt egyik utódsejtjében azonban képes gátolni az őssejtfenntartó faktorok működését, és olyan folyamatokat indít el, amelyek a sejt differenciálódásához vezetnek. Az őssejtben a *bam* kifejeződését a niche bizonyos testis sejtjei által termelt Dpp gátolja. A Dpp jel morfogenetikai gradiensét a niche testis sejtjeiben aktív EGFR/ERK és a JAK/STAT útvonal állítja be, ezzel biztosítva a nicheben az őssejt fennmaradását és a niche területéről kikerülő utódsejt differenciálódását. A niche testis sejtjeiből származó külső jeleken kívül az őssejten belüli belső faktoroknak is fontos szabályozó szerepe van az őssejtállapot fenntartásában és a differenciálódás elindításában. Ilyen belső tényezők többek között a transzkripciót befolyásoló fehérjék, melyek főképp a kromatinszerkezet szabályozásán keresztül határozzák meg a sejt genkifejeződési mintázatát és a sejt identitását.

Az őssejt osztódásával az egyik utódsejt kijut az őssejt niche-ből, ahol a *bam* kifejeződését gátló Dpp jel már nem éri el, de még nem indul el a differenciációs programja. Ekkor a sejt egy átmeneti, ún. preCB állapotba kerül, ahol olyan folyamatok aktiválódnak, amelyek

lehetővé teszik a *bam* kifejeződését. A *bam*-ot kifejező ivarsejtben elindul a differenciációs program és CB-á, majd ezt követően cisztává fejlődik. Az őssejt-differenciálódott sejt közötti váltás kulcsa tehát a *bam* gén kifejeződésében bekövetkező változás. A *bam* expresszióját szabályozó cisz-regulátor régió jól jellemzett, (Chen és McKearin, 2003b). Ismertek a *bam* kifejeződését gátló illetve az ivarsejt-specifikus expressziót biztosító enhancer szakaszok. (Chen és McKearin, 2003b). A *bam* expressziójának számos transz-regulátorát leírták már, 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 és mtsai., 2016). A *MESR4* a *Drosophilában* számos jelút effektoraként részt vesz a különböző fejlődési folyamatok szabályozásában, azonban az ivarvonalban betöltött pontos szerepe nem ismert (A. Huang és Rubin, 2000; Zhu és mtsai., 2005). Célunk azoknak a *MESR4* által közvetített folyamatok megértése volt, amelyek szükségesek a megfelelő ivarsejtképződéshez.

Kísérleteinkben indirekt immunfluoreszcens módszerrel kimutattuk, hogy a *MESR4* a kései hármas stádiumú lárva és a felnőtt állat petefészkeinek összes sejtjében kifejeződik és a sejtekben a fehérje a sejtmagban helyezkedik el. Sejttípus-specifikus csendesítésekkel bebizonyítottuk, hogy a *MESR4* az ivarsejtekben szükséges a sejtek differenciálódásához. Stádiumspecifikus csendesítésekkel és a differenciálódás lépéseinek markereit megvizsgálva megállapítottuk, hogy a *MESR4* a preCB állapotban hatva szabályozza az ivarsejtek differenciálódását. *MESR4* hiányában csökkent *bam* mRNS szintet találtunk, ami azt mutatja, hogy a *MESR4* a *bam* megfelelő kifejeződéséhez szükséges. Kimutattuk, hogy a *MESR4* csendesített fenotípusa menekíthető a *bam* túlexpresszállásával, megerősítve, hogy a *MESR4* a *bam* expresszióján keresztül szabályozza az ivarsejtek differenciálódását. A gátló Dpp jelre érzékenyen *bam-P1SE-Bam:GFP* transzgenikus *bam* allél által okozott mutáns fenotípust *MESR4* hiányában vizsgálva bebizonyítottuk, hogy a *MESR4* a *bam* kifejeződésének pozitív szabályozó eleme.

Mivel a *MESR4* különböző jelutak effektoraként ismert, megvizsgáltuk a szerepét a niche sejtjei közötti kommunikációt biztosító szignalizációs utak működésében. A jelutak működését jelző molekuláris markerek *MESR4* háttéren történő vizsgálatával kimutattuk, hogy a *MESR4* a petefészkek niche-ben nem szabályozza az EGFR/ERK útvonal működését. *MESR4* csendesítés esetén a TGF β /Dpp útvonal is megfelelően működik, tehát a *MESR4* a TGF β /Dpp útvonaltól függetlenül szabályozza a *bam* expresszióját.

A *MESR4* molekuláris szerepének feltárásához megvizsgáltuk a fehérje strukturális elemei és funkciója közötti összefüggéseket. A *MESR4* fehérje nyolc C2H2 típusú DNS-kötő zinc fingert, egy C2CH3 típusú PHD-fingert és egy sejtmagi lokalizációs szignált tartalmaz. A *MESR4* fehérjeszerkezete alapján a zinc-fingereivel képes lehet közvetlenül a DNS-t kötni vagy a PHD-finger doménjével kovalens hiszton-módosításokat felismerni és a kromatinhoz kötődve szabályozni a génkifejeződést. A *MESR4* PHD doménje és a *bam* expresszója közötti kapcsolat vizsgálatához a CRISPR/Cas9 módszerrel létrehoztunk egy PHD finger hiányos *MESR4* allélt. A homozigóta *MESR4^{Aphd}* mutáns nőstények fenotípusának vizsgálata megmutatta, hogy a *MESR4* PHD fingerje nem szükséges a *MESR4* ivarvonalba betöltött szerepének ellátásához. EMSA kísérlettel kimutattuk, hogy *MESR4* C2H2 típusú zinc fingerjei képesek kötni a *bam* expressziójának pozitív szabályozásban szerepet játszó ivarsejt-specifikus enhanszer elemet, tehát a *MESR4* transzkripciós faktorként szabályozhatja a *bam* expresszióját.

Koimmunprecipitációval kapcsolt tömegspektográfias vizsgálattal azonosítottunk *MESR4*-el kölcsönható fehérjéket. A *MESR4* partnerei között nagy találati értékkel megtaláltuk a *MESR4* már korábban azonosított kölcsönható fehérjéjét, a Host cell factor-t (White és mtsai., 2011). Kettős heterozigóta mutáns germáriumokat megvizsgálva azonban nem tudtunk köztük genetikai interakciót kimutatni.

A *MESR4* a petefészek összes sejtjében kifejeződik, ennek ellenére csak a preCB állapotban fejt ki hatását az ivarsejtképződésre. A stádiumspecifikus hatás magyarázatára két elméletet dolgoztunk ki. A *MESR4* preCB-specifikus működésének lehetséges magyarázata, hogy a *MESR4*-et egy kizárólag a preCB-okban található faktor aktiválja, vagy ezekben a sejtekben alakul ki egy olyan kromatin környezet, amiben a *MESR4* képes elindítani a *bam* expresszióját. Elképzelhető, hogy a *MESR4* egy olyan fehérje komplexnek a tagja, ami kizárólag a preCB-okban szerelődik össze.

A *MESR4* működését magyarázó elméletünk szerint a *MESR4* a zinc finger-ein keresztül közvetlenül és szekvenciaspecifikus módon köti a DNS-t és ezáltal szabályozza a *bam* kifejeződését.

11. Summary

Stem cells are undifferentiated cells possessing the unique ability of unlimited cell division capacity. Upon mitosis of a stem cell, one of its daughters remains in stem cell state to maintain the undifferentiated stem cell pool, while the other daughter cell starts to differentiate to support developmental processes or to ensure tissue homeostasis. The maintenance of the stem cell state and initiation of differentiation are directed by both internal and external factors. The better understanding of mechanisms behind the decision between self-renewal and differentiation is the key question in stem cell biology. The regulation of the *Drosophila* female germ line stem cells (GSCs) provides an excellent model for studying stem cell maintenance and differentiation processes.

Stem cells reside in a specific microenvironment, called stem cell niche, where the extrinsic and intrinsic factors regulate their self-renewal and differentiation. In the adult *Drosophila* ovary, the germline stem cell niches are located in the germaria at the apical tip of the ovary. In the niches, germline stem cells are surrounded by somatic cells that create a unique anatomical structure and signalling environment to support the development of stem cells and their progeny. In the ovarian stem cell niche, maintenance of stem cell status is achieved through inhibition of the expression of *bag of marble (bam)*, a key gene promoting stem cell differentiation. Bam expression is initiated in one of the stem cells progenies where it promotes processes that lead to cell differentiation. In stem cells, the expression of *bam* is inhibited by Dpp produced by certain somatic cells of the niche. The morphogenetic gradient of the Decapentaplegic (Dpp) signal is set by the niche cells through the EGFR/ERK and JAK/STAT pathways. Thus, Dpp forms a short range morphogen gradient and activates the *dpp* signalling pathway exclusively in the GSCs.

Following mitosis of the GSCs, one of the daughter cells is displaced from the stem cell niche losing the physical contact with the somatic niche cells, the source of the inhibitory Dpp signal. At this position, the stem cell daughter receives less Dpp, which leads to its transformation into a so called pre-cystoblast (pre-CB), a germ cell committed to differentiate. At this transient state, the *dpp*-pathway is not active, but *bam* is still not expressed. When *bam* expression starts, the preCB becomes a differentiated cystoblast (CB) which undergoes four synchronous, incomplete divisions, and gives rise to a sixteen-cell cyst and later to an oocyte.

In addition to the external signals from the somatic cells of the niche, intrinsic factors within the stem cell also play an important regulatory role in maintaining stem cell status and

initiating differentiation. These internal factors include proteins that influence transcription and determine the gene expression pattern and cell identity, mainly through the regulation of chromatin structure. The cis-regulatory region of the *bam* gene is well characterised (Chen and McKearin, 2003b). The *bam* cis-regulator contains a suppressor element, located upstream of the transcription start site and maintains the repressed state of *bam* in the larval germ cells. Another silencer element (SE) located in the 5'UTR of the *bam* gene mediates the dpp-dependent suppression of *bam* transcription in the GSCs. The *bam* transcriptional regulator contains an enhancer element responsible for germ cell specific *bam* expression. In the GSCs, the Dpp-signal maintains the silencer in an active state and *bam* transcription is suppressed. At the pre-CB stage, the SE becomes inactive and the *bam* transcription commences under the control of the active enhancer elements, which switches the state of the pre-CB to the CB fate.

Several trans-regulators of *bam* expression have been described, but these are involved in inhibiting *bam* expression, whereas the proteins that activate its expression are not known. *MESR4* has previously been shown to be required for the regulation of proper germ cell development (Wissel és mtsai., 2016). *Misexpression suppressor of Ras4 (MESR4)* is involved in the regulation of various developmental processes in *Drosophila* as an effector of several signalling pathways but its exact function in germ cell development is unknown (A. M. Huang and Rubin, 2000; Zhu és mtsai., 2005). Our aim was to understand the MESR4-mediated processes that are required for the proper germ cell development.

We have shown by indirect immunofluorescence that *MESR4* is expressed in all cells of the ovaries and that the protein is located in the nucleus of the cells. Using cell-type-specific silencing, we demonstrated that *MESR4* is required for the differentiation of germ cells. Developmental stage-specific gene silencing and cell biological analysis of the differentiation markers revealed that *MESR4* regulates germ cell differentiation by acting in the preCB state. In the absence of MESR4, we found decreased *bam* mRNA levels, indicating that MESR4 is required for proper expression of *bam*. We show that the silenced phenotype of *MESR4* can be rescued by *bam* overexpression, confirming that MESR4 regulates gamete differentiation by promoting *bam* expression. By examining the mutant phenotype caused by the Dpp-insensitive *bam-PΔSE-Bam:GFP* transgenic *bam* allele, we further confirmed that MESR4 is a positive regulator of *bam* expression.

Since MESR4 is known to be an effector of various signalling pathways, we investigated its function in communication events between niche cells. By examining molecular markers of signalling pathways, we show that *MESR4* function is not required for the EGFR/ERK pathway in the ovarian niche. In addition, the TGFβ/Dpp pathway also functions properly in *MESR4*

silenced cells, indicating that *MESR4* regulates *bam* expression independently of the TGF β /Dpp pathway.

To explore the molecular role of MESR4, we investigated the relationship between the structural elements of the protein and its function. The MESR4 protein contains eight C2H2-type DNA-binding zinc fingers, a C2CH3-type Plant Homeodomain (PHD) finger and a nuclear localization signal. The protein structure of MESR4 suggests that it can bind DNA directly with its zinc fingers or recognize covalent histone modifications with its PHD finger domain and regulate gene expression by binding to chromatin. To investigate the association between the PHD domain of MESR4 and the expression of *bam*, we generated a PHD finger-deficient *MESR4* allele using the CRISPR/Cas9 method. Phenotypic analysis of homozygous *MESR4*^{*Aphd*} mutant females revealed that the PHD finger is not required for the role of MESR4 in the germ line. By electrophoretic mobility shift assay, we have shown that the C2H2-type zinc fingers of MESR4 are able to bind the germ cell-specific enhancer element of the *bam* cis-regulator region, suggesting that MESR4 regulates *bam* expression as a transcription factor.

We identified MESR4-interacting proteins by co-immunoprecipitation coupled mass spectrometry assay. Among the MESR4 partners, we found a previously identified interacting protein of MESR4, Host cell factor, with a high hit rate (White és mtsai., 2011). However, we could not detect any genetic interaction between them when examining double heterozygous mutant germaria.

MESR4 is expressed in all cells of the ovary, but only in the preCB state does it affect gamete formation. Two theories have been developed to explain the stage-specific effect of *MESR4*. A possible explanation for the preCB-specific function of *MESR4* is that MESR4 is activated by a factor exclusively found in preCBs, or that a chromatin environment is formed in these cells in which MESR4 is able to trigger *bam* expression. It is also conceivable that MESR4 is a member of a protein complex that assembles exclusively in preCBs. Our theory explaining the function of MESR4 is that MESR4 binds DNA directly and in a sequence-specific manner through its zinc fingers and thereby promotes *bam* expression to trigger the preCB-to-CB transition.