

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA ANIMAL



**The role of co-activator transcriptional complex Mediator in the
proliferation of neural stem cell-derived tumors in *D.*
*melanogaster***

Daniela Filipa Freitas Lopes

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Versão Pública

Dissertação orientada por:
Catarina Homem
Élio Sucena

2022

Acknowledgements

First, I would like to thank my mentor and supervisor Dr. Catarina Homem, who gave me opportunity to work in a great group. Her guidance, patience and knowledge has helped me build up my critical thinking and contributed to making me grow as a young scientist.

I also want to express my thanks to my supervisor Dr. Tiago Baptista for his advice and assistance throughout my project. He was never too busy to help, and his moral support was greatly appreciated.

To my lab colleagues, I am very grateful for their suggestions and advice, and for creating such an open and safe space. That makes all the difference.

Lastly but not least, I want to thank my family and friends for their continued support.

Resumo

O complexo Mediador (Med) é um co-ativador de transcrição mediada pela enzima RNA Polimerase II (PolII). Este complexo está envolvido em mediar a conexão entre fatores de transcrição/ativadores, ligados a enhancers, e a PolIII, sendo composto por múltiplas subunidades. Possui quatro domínios – cabeça, centro, cauda e cinase – que estão estrutura- e funcionalmente conservados nos eucariotas ainda que o número de subunidades varie de acordo com a complexidade dos organismos. Os módulos referentes à cabeça e centro são principalmente responsáveis por ligações com a PolIII. A cauda está envolvida em contactos com fatores de transcrição/ativadores ligados a sequências específicas do DNA. O módulo da cinase está envolvido na regulação do complexo podendo ter um papel regulador positivo ou negativo na expressão génica, conseguindo associar-se de modo reversível a Med. A elevada quantidade deste complexo proteico está associada à presença de super-enhancers (SEs) que emergiram recentemente como reguladores críticos de crescimento e também de tumorigénese. Este subgrupo de *enhancers* é composto por extensos domínios de *enhancers* (em comparação com *enhancers* típicos), por estar associado a fatores de transcrição chave (e outros reguladores como Med) e por conduzir à elevada expressão de genes essenciais para a manutenção da identidade celular. Os SEs são altamente sensíveis a alterações na expressão de reguladores transcricionais associados como Med. Por esta razão, perturbação na regulação de SEs pode levar a transformação maligna. A formação de tumores assenta em grande parte na desregulação de transcrição, afetando a expressão de diversos genes e vias de sinalização. Devido ao seu papel essencial em regular vários processos biológicos como identidade celular, proliferação e crescimento, subunidades de Med têm vindo a emergir como estando associadas a diversos tipos de cancro. Além disso, a função de certas subunidades deste complexo parece variar de acordo com o tipo de célula e contexto (tipo de tumor, por exemplo) em que estão inseridas. Apesar de se saber que Med está envolvido em vários tipos de cancro, não se conhece completamente os mecanismos através dos quais age para influenciar o desenvolvimento/formação de tumores, nomeadamente tumores cerebrais, predominantes na infância. Tumores pediátricos são caracterizados por necessitarem de menor quantidade de mutações, em comparação com tumores em adultos, para serem formados. Vários estudos têm conectado a formação deste tipo de tumores com células precursoras neurais (do sistema nervoso em desenvolvimento) enquanto células originadoras de tumor, o que se deve provavelmente à elevada susceptibilidade destas células a transformação maligna. O papel de Med neste tipo de tumores não é conhecido ainda. A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é um bom sistema para estudar tumores derivados de células estaminais neurais, ou neuroblastos (NBs) devido à presença de linhagens de NBs tipo I e tipo II, que se assemelham às existentes em mamíferos. NBs tipo I dividem-se assimetricamente produzindo outro NB e uma GMC (“*ganglion mother cell*”) que se divide simetricamente originando neurónios/glia. NBs tipo II dividem-se assimetricamente para formar outro NB e uma célula progenitora neural intermédia. Esta célula é capaz de se autorrenovar e ao mesmo tempo produzir uma GMC que por sua vez produz dois neurónios/glia. Um dos mecanismos que contribui para a divisão assimétrica de NBs provém da segregação desigual de determinantes do NB para a célula-filha que se comete ao processo de diferenciação. Dois destes determinantes – *Brat* e *Numb* – são segregados para a célula precursora em ambas as linhagens de NBs. A linhagem tipo I segrega adicionalmente *Prospero* (*Pros*). Inativação de *Brat* ou *Numb* leva à formação de tumores derivados de NBs tipo II enquanto inativação de *Pros* leva à formação de tumores provenientes de proliferação descontrolada de NBs tipo I. Após inativação destes genes, as células precursoras são incapazes de se cometerem a uma identidade mais diferenciada, desdiferenciando-se em células semelhantes a NBs. O papel de Med na formação deste tipo de tumores (provenientes de NBs) não é conhecido. Assim, o primeiro objetivo deste estudo foi avaliar se Med (ou as suas subunidades) é necessário para o desenvolvimento de tumores derivados de neuroblastos tipo II. Para isso, o *knockdown* (KD) individual de subunidades pertencentes aos quatro módulos foi feito, usando o sistema UAS-Gal4, e o volume de

tumores *Brat*^{RNAi} foi quantificado. Esta análise permite perceber (1) se Med é necessário para o desenvolvimento tumoral derivado de NBs (2) se existe um requerimento diferencial das subunidades testadas e (3) se os diferentes módulos têm a mesma relevância em contribuir para o desenvolvimento tumoral. KD da maioria das subunidades resultou em tumores *Brat*^{RNAi} significativamente mais pequenos que o controlo (*Brat*^{RNAi}*mcherry*^{RNAi}). Além disso, ao contrário dos outros módulos, foi demonstrado que a depleção da maioria das subunidades testadas do módulo cauda não alteraram o tamanho dos tumores o que indica que este módulo não é tão crítico como os outros módulos para este tipo de tumor. Ainda assim algumas subunidades deste módulo parecem ser essenciais para tumores *Brat*^{RNAi} indicando um requerimento diferencial das diferentes subunidades do complexo. Outra questão pertinente prende-se com a relevância de subunidades específicas em diferentes contextos, especificamente em diferentes tipos de tumor. Assim, o segundo objetivo foi testar o KD de um pequeno grupo de subunidades cuja depleção originou diferentes resultados em tumores *Brat*^{RNAi}, noutro tipo de tumor derivado de NBs, nomeadamente, tumores *Pros*^{RNAi}. Estes tumores, como descrito anteriormente, formam-se a partir de neuroblastos tipo I após inativação de *Pros*. KD de várias subunidades foi feito neste tipo de tumor. A depleção de algumas subunidades do módulo da cabeça resultou em tumores *Brat*^{RNAi} mais pequenos, mas não alterou o tamanho dos tumores *Pros*^{RNAi} indicando que a função deste módulo é específica consoante o tipo de célula/tumor em que se insere. Por outro lado, a depleção de uma subunidade do centro do complexo resultou em tumores *Brat*^{RNAi} e *Pros*^{RNAi} mais pequenos em comparação com os tumores controlo, refletindo a importância deste módulo para o crescimento tumoral proveniente de NBs. A sua relevância vital pode dever-se ao facto de conferir estabilidade/integridade a Med e a sua depleção pode perturbar essa estabilidade afetando a transcrição de vários genes vitais à homeostasia celular. No caso das subunidades da cauda do complexo, os diferentes tumores responderam de forma distinta à sua depleção sugerindo um requerimento muito diferente destas subunidades nos dois tipos de tumor. No geral, estes resultados indicam funções específicas para as subunidades de Med que parecem atuar de forma diferente consoante o contexto em que se inserem. Ao todo, estes resultados demonstram a importância de Med no desenvolvimento tumoral provenientes de células estaminais neurais. Em adição, estes resultados também sugerem que o contexto transcricional de *Brat*^{RNAi} e *Pros*^{RNAi} é distinto.

O objetivo seguinte foi perceber como é que Med atua para promover o crescimento tumoral. Dada a disponibilidade de uma análise transcriptómica de NBs depletados de Med (*versus* neuroblastos *wild-type*), análise transcriptómica de tumores *Brat*^{RNAi} (*versus* neuroblastos tipo II *wild-type*) e análise de um *dataset* de Targeted DamID para algumas subunidades de Med, foi possível identificar alguns genes que são diferencialmente expressos. Mais especificamente, estes genes são considerados como potenciais genes que são ativados pelo Med para promover o crescimento de tumores *Brat*^{RNAi}. Experiências subsequentes de KD de uma seleção destes genes candidatos em tumores *Brat*^{RNAi} permitiu, de facto, identificar dois genes cuja depleção afeta negativamente o crescimento destes tumores. No entanto, continua a ser necessário confirmar que de facto a depleção de certas subunidades de Med em tumores *Brat*^{RNAi} leva a uma diminuição na ativação destes dois genes.

Este estudo contribui para a compreensão da relevância e mecanismos por trás do papel de Med em suportar o desenvolvimento tumoral em tumores derivados de células estaminais neurais.

Palavras-chave: neuroblastos; desenvolvimento tumoral; Complexo Mediador, tumores *Brat*^{RNAi}, regulação temporal

Abstract

The developing central nervous system (CNS) is particularly vulnerable to malignant transformation, but the underlying mechanisms remain unresolved. Transcriptional deregulation is a driving force behind

tumorigenesis. Because of this, there is a growing interest in elucidating the transcriptional mechanisms underlying tumor development. The Mediator complex is a multisubunit transcriptional co-activator responsible for mediating the communication between enhancer-bound transcription factors (TFs) and the basal transcription machinery to modulate gene expression. Mediator (specifically some of its subunits) has been increasingly found to influence cell identity determination as well as having a role in the transcriptional rewiring underlying tumorigenesis. However, it is unclear if Mediator is essential in driving neural stem cell (NSC)-derived tumorigenesis. *Drosophila*'s type I and type II NSCs, also named neuroblasts (NBs) are a good model to study this issue due to their resemblance to mammalian NSCs. Type I NBs divide asymmetrically to self-renew and generate a ganglion mother cell (GMC) which symmetrically divides into neurons or glia. Type II NBs divide asymmetrically to self-renew and produce intermediate neural progenitors (INPs) that divide asymmetrically to a GMC which in turn generates neurons/glia. Upon *Pros* and *Brat* inactivation, type I and type II progeny, respectively, dedifferentiate back into NB-like cells and lead to the formation of NB-derived tumors. Here, by knockdown of individual Mediator subunits in type II NB-derived tumors, it was found that Mediator, through the action of specific subunits, plays an important role in supporting tumor development/progression. Loss of specific Mediator subunits resulted in significantly smaller tumors than in the control conditions. Furthermore, distinct NB-derived tumors were shown to differentially require specific Mediator subunits for tumor growth indicating that Mediator functions in a cell-type specific manner. Additionally, through bioinformatic analysis and knockdown experiments in NB-derived tumors, this study identified some candidate genes as Mediator target genes through which it exerts its tumor growth supporting role. In the future, follow-up experiments are required to understand if indeed these candidate genes act downstream of Mediator complex to promote NSC-derived tumor growth. This study contributes to uncover the mechanisms through which the Mediator complex acts to support NSC-derived tumor development.

Keywords: neuroblasts, tumor development, Mediator complex, *Brat*^{RNAi} tumors, temporal regulation