

Ets21c – A Novel Regulator of Epithelial Homeostasis Downstream of JNK

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Vorgelegt von: **Juliane Mundorf** aus Bonn, Köln 2017

Gutachter: Prof. Dr. Mirka Uhlirova, Prof. Dr. Linda Partridge

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2017

Abstract

In multicellular organisms, development and continued maintenance of tissues require tightly controlled activities of cell replenishment and defense programs that coordinately respond to extrinsic and intrinsic stimuli. Signaling mechanisms that orchestrate stress responses are critical determinants of tissue homeostasis and longevity, while their misregulation underlies various pathologies and organismal aging. The Jun-N-terminal Kinase (JNK) signaling pathway plays a central role in managing stress response, primarily by regulating the activity of transcription factors (TF) and gene expression. The outcomes of JNK pathway activation in response to systemic or local cues are multitude ranging from cell death and proliferation to survival, depending on the specific context.

In this study, we applied an unbiased genomic approach to characterize the gene expression program and TF network underlying malignancy of tumors that are induced in the developing *Drosophila* epithelium. We show that in clones expressing an oncogenic Ras^{V12} and deficient for the tumor suppressor Scribble (*scrib*¹) the activation of JNK signaling is the major driver of aberrant gene expression. We identified the stress-responsive ETS-domain TF Ets21c as a direct target of JNK signaling and Fos TF activity. Ets21c contributes to JNK-mediated transcriptional changes and specific tumor phenotypes. We demonstrate that knockdown of Ets21c in *ras*^{V12}*scrib*¹ clones improves the viability of tumor-bearing animals, partly through downregulation of the metamorphosis regulator *insulin-like peptide 8*. Despite moderate consequences of Ets21c suppression on *ras*^{V12}*scrib*¹ tumor phenotypes, clonal co-expression of Ets21c with oncogenic Ras^{V12} was sufficient to promote tumorigenesis. Similar to malignant *ras*^{V12}*scrib*¹ tumors, *ras*^{V12}*ets21c*^{WT} clones showed important tumor hallmarks including growth advantage,

differentiation defects, and expression of Matrix metalloprotease 1 resulting in tumor invasiveness while compromising host survival. Our study delineates both unique and overlapping functions of distinct TFs that cooperatively promote aberrant expression of target genes, leading to malignant tumor phenotypes. The transcriptome profiling of blood cells circulating in tumor-bearing hosts provides the first snapshot of how tumor progression shapes the gene expression signature of the innate immune cells.

Furthermore, we determined an essential role for Ets21c in the regulation of epithelial homeostasis and stress responses in the *Drosophila* adult midgut, where mitotically active intestinal stem cells (ISCs) give rise to polarized absorptive enterocytes (ECs) and hormone secreting enteroendocrine cells (EEs). We show that ISC-specific Ets21c inhibition blocks aging-associated gut dysplasia caused by an aberrant JNK activity, while its suppression in ECs prevents epithelial turnover leading to gut thinning. Strikingly, a complete loss of *ets21c* extended lifespan, whereas its chronic activation in the midgut triggered ISC overproliferation and epithelial dysplasia and increased mortality. In conclusion, Ets21c emerges as a critical determinant of lifespan and a key transcriptional effector of the JNK stress signaling network in the adult gut with pivotal role in the maintenance of epithelial integrity and function. Our study further highlights the requirement for a tight regulation of TF levels and activity as their misregulation impacts tissue function, animal physiology, and disease development.

Zusammenfassung

Bei mehrzelligen Organismen erfordert die Entwicklung und Erhaltung von Geweben eine kontrollierte Aktivität von Zellnachschub- und Verteidigungsprogrammen, die koordinativ auf unterschiedliche Reize reagieren. Signalisierungsmechanismen, die Stressreaktionen aufeinander abstimmen, bestimmen die Homöostase und Langlebigkeit eines Gewebes. Die Fehlregulation dieser Signalisierungsmechanismen liegt dementsprechend verschiedenen Pathologien und Alterungserscheinungen zugrunde. Der Jun-N-terminale Kinase (JNK) Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Stressreaktionen, vor allem durch die Regulierung von Transkriptionsfaktoren und Genexpression. Die Ergebnisse der JNK-Signalwegaktivierung als Reaktion auf systemische oder lokale Einflüsse sind vielfältig und reichen, entsprechend dem spezifischen Kontext, von Zelltod über Zellproliferation zu Überlebensmechanismen.

In dieser Studie wählten wir einen umfangreichen Untersuchungsansatz in Form der Transkriptomanalyse aus, um die Genexpressionprogramme und Transkriptionsfaktor-Netzwerke zu charakterisieren, die der Malignität von Tumoren zugrunde liegen. Im Modelorganismus *Drosophila* induzierten wir Tumore in Klonen von sich entwickelnden Epithelien durch die Expression eines onkogenen Ras^{V12} Faktors kombiniert mit einer Mutation im Tumorsuppressorgen *scribble* (*scrib*¹). Wir zeigen, dass die

Aktivierung des JNK-Signalweges der Hauptantrieb für eine abweichende Genexpression in den invasiven Tumoren ist. Wir identifizierten den stressempfindlichen ETS-Domain Transkriptionsfaktor Ets21c als ein direktes Ziel der JNK-Signalisierung ausgeführt durch den Transkriptionsfaktor Fos. Der TF Ets21c trägt zu den JNK-vermittelten Transkriptionsveränderungen und spezifischen Tumor-Phänotypen bei. Der Knockdown von Ets21c in *ras^{V12}scrib¹* Klonen verbesserte die Lebensfähigkeit von tumortragenden Tieren, teils durch die Abwärtsregulation des Insulin-ähnlichen Peptids Dilp8, das zur Regulation der Metamorphose beiträgt. Trotz der moderaten Konsequenzen einer Unterdrückung von Ets21c auf die *ras^{V12}scrib¹*-Tumore, förderte die Überexpression von Ets21c mit Ras^{V12} in Klonen zur Bildung von Tumoren. Ähnlich wie bei bösartigen *ras^{V12}scrib¹*-Tumoren zeigten *ras^{V12}ets21c^{WT}*-Klone wichtige Tumormerkmale auf, einschließlich Wachstumsvorteilen, Differenzierungsdefekten und einem Anstieg der Matrix Metalloprotease 1, die die Böswilligkeit eines Tumors erhöht und die Überlebenschancen des Wirts gefährdet. Unsere Studie beschreibt sowohl einzigartige als auch überlappende Funktionen von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die kooperativ die abweichende Expression von Zielgenen fördern und dadurch zur Böswilligkeit des Tumors beitragen. Die Profilerstellung von Transkriptomen von zirkulierende Blutzellen liefert zudem den ersten Einblick in die Signatur von Genexpressionsänderungen der Immunzellen, die auf die Tumorentstehung in Fruchtfliegen reagieren.

Darüber hinaus haben wir eine wesentliche Rolle für den Transkriptionsfaktor Ets21c in der Regulation von Stressreaktionen und der Homöostase von Epithelien im adulten Mitteldarm von *Drosophila* herausgearbeitet. Im Mitteldarm führt die Zellteilung von aktiven Darmstammzellen zur Bildung von polarisierten und absorptionsfähigen Enterozyten. Wir zeigen, dass die spezifische Inhibierung von Ets21c in den Stammzellen, hervorgerufen durch eine abweichende JNK Signalaktivität, die Bildung einer Dysplasie im Darm blockiert. Die Unterdrückung von Ets21c in den Enterozyten führte jedoch zu einer folgenschweren Darmverdünnung auf Grund einer fehlenden Erneuerung von ausfallenden Zellen. Der vollständige Verlust von Ets21c verlängerte die Lebensdauer, während seine chronische Aktivierung im Mitteldarm zu einer erhöhten Stammzellteilung, einer Dysplasie des Darmgewebes und einer ansteigenden Sterberate führte. Abschließend stellen wir eine entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktors Ets21c für die Lebensdauer fest, sowie für die Ausführung des stressempfindlichen JNK-Signalweges im erwachsenen Darm mit kritischer Auswirkung auf die Integrität und Funktion des Organs. Unsere Studie unterstreicht die Wichtigkeit der kontrollierten Aktivität von Transkriptionsfaktoren, da ihre Fehlregulation zu einer eingeschränkten Gewebefunktion und der Entwicklung von Krankheiten führen kann.