

## Acknowledgements

The last year has been essential for my professional and personal life. There are several people that have been really important to me and that I would like to thank:

First and foremost, I would like to thank my supervisor, Florence Janody, for giving me the opportunity to be part of the Actin Dynamics Group. Throughout my thesis-writing period, she provided encouragement, good teaching, good company and lots of good ideas. She advised me and supported me. I would have been lost without her.

To Actin Dynamics Group: Sofia, the funniest person in the world who was always there when I needed her. Beatriz, the person who advised me and supported me; she showed me how to work in a lab and gave me a huge help in my thesis-writing. Basia, the polish girl; she makes the lab work more fun. And Gaspar, for helping me with the lab work.

To the Drosophila community at the IGC, especially to Ana Rita, who helped me with my Westerns problems.

To all the people that I am not mentioning but that have contributed in any way to my work and to my life.

My final words go to my family, thanks for being always there.

Thanks!

## List of abbreviations

ABP	Actin binding proteins
AJ	Adherens junctions
A/P	Anterior/Posterior
Ap	Apterous
aPKC	Atypical protein kinase C
Arm	Armadillo
Baz	Bazooka
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
CP	Capping protein
Cpa	Capping protein $\alpha$
Cpb	Capping protein $\beta$
Crb	Crumbs
DIG	Digoxigenin
Dlg	Discs large
DPP	Decapentaplegic
D/V	Dorsal/Ventral
EGF	Epidermal growth factor
FA	Formaldehyde
F-actin	Filamentous actin
G-actin	Globular actin
GFP	Green fluorescent protein
JNK	Jun N-terminal Kinase
Lgl	Lethal giant larvae
ON	Overnight
PCR	Polimerase chain reaction
Patj	Protein associated to tight junctions
RT	Room temperature
Sd	Scalloped
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviolet
Vg	Vestigial
Wg	Wingless
X-Gal	Galactosidase
ZA	Zonula adherens

## Abstract

The actin cytoskeleton plays an important role in numerous cellular processes. Like in mammals, *Drosophila* encodes six actins protein isoforms that differ in only a few amino acids, but whose expression is highly regulated during development. Actin filament growth, stability, disassembly and organization are controlled by a plethora of actin-binding proteins (ABPs). Interestingly, depletion of either subunits of the *capping protein*  $\alpha\beta$  heterodimer (*CP*), which bind to the actin filament (+) end and inhibit the addition of actin monomers, leads to different outcomes depending of the epithelium context. This suggests that the actin cytoskeleton is not equivalent between epithelia.

Since some ABPs regulate actin dynamics in an actin isoform specific fashion, I investigate whether *CP* might prevent polymerization of specific actin isoforms in a tissue specific manner, I analysed the developmental consequences of overexpressing each of the six actin genes fused to GFP during wing epithelial morphogenesis. Although I found that the six actin-GFP isoforms are overexpressed at similar levels and promotes excessive actin filament accumulation, each incorporate in specific subpopulation of filaments and gives rise to various developmental consequences that seems to be region and time specific. In addition, similar to loss of *CP*, overexpression of Actin-GFP 5C, 42A and 57B promote hinge overgrowth associated to Wingless upregulation, while in the wing blade, only Actin-GFP 42A overexpression recapitulates loss of *CP*. This suggests that *CP* prevent polymerization of Actin 5C, 42A and 57B in the wing hinge region to regulate the Hippo pathway and restrict hinge growth. While, in the wing blade region, *CP* prevent specifically polymerization of Actin 42A to restrict Src activity.

Altogether, my results strongly argue that, although it is not clear why multiple actin genes have been retained through evolution, each actin gene seems to have specific functions during wing epithelium morphogenesis.

**Keywords:** Capping protein, actin isoforms, *Drosophila* wing epithelium.

## Resumo

O citosqueleto da actina é constituído por um enorme número de proteínas e mecanismos regulatórios que estão envolvidos na polimerização, depolimerização e organização dos filamentos de actina. Por esta razão, este sistema é vulnerável a alterações genéticas que podem vir a causar determinadas doenças, tais como o cancro. Nas células cancerígenas, as perturbações estruturais e funcionais do citosqueleto de actina estão relacionadas com elevadas taxas de proliferação e movimentos não controlados das células.

Os discos imaginais de *Drosophila* são considerados um modelo de estudo bastante interessante para estudar a morfogénese epitelial, uma vez que estes são considerados verdadeiro tecido epitelial, o qual é diferenciado e fácil de dissecar. Ainda assim, as vantagens deste modelo de estudo baseia-se principalmente no enorme sucesso de *Drosophila* como organismo modelo genético. Os discos imaginais consistem de um epitélio colunar coberto por uma membrana peripodial. As células colunares compreendem uma camada de células lateralmente coerentes que são polarizadas ao longo do eixo apical-basal. Estas células epiteliais contêm junções celulares (AJ) compostas principalmente por E-caderina e  $\alpha$ - e  $\beta$ -catenina (em *Drosophila* codificada por *armadillo*). Estas junções celulares localizadas na região apical das células fazem a ligação entre o citosqueleto de actina das células vizinhas. Na região superior das AJ existem dois complexos que estão envolvidos na regulação da polaridade epitelial, que são o complexo Baz/Par-6/aPKC e o complexo Crb/Stardust/Patj. Na parte basal das AJ existe um outro complexo formado por Dlg/Scribble/Lgl. O crescimento e divisão do disco imaginal da asa ocorre durante o desenvolvimento larvar. No terceiro estágio de desenvolvimento da larva, o disco imaginal é extensivamente regulado por complexos padrões de expressão de genes, que dividem o disco em vários territórios ou compartimentos. O disco é ainda dividido em três regiões distintas: a região da *blade*, a qual irá dar origem à asa, a região da *hinge*, que irá dar origem às estruturas que ligam a asa ao tórax da mosca e a região do *notum*, a qual irá dar origem ao tórax.

Em todos os organismos eucariotas, o citosqueleto de actina desempenha um papel fundamental em numerosos processos celulares, tais como, geração e mantimento

da morfologia e polaridade celular, endocitose e tráfego intracelular, contratibilidade, mobilidade e divisão celular. A actina é uma das proteínas mais abundantes e com elevado grau de conservação nos organismos eucariotas. Tal como nos mamíferos, *Drosophila* codifica seis proteínas de actina que diferem em apenas alguns aminoácidos, mas em contrapartida a sua expressão é altamente regulada durante o desenvolvimento. Em *Drosophila*, as isoformas de actina são codificadas por: *actina 5C*, *actina 42A*, *actina 57B*, *actina 79B*, *actina 87E* e *actina 88F*. Os genes de actina podem ser subdivididos em três grupos, com base no estágio de desenvolvimento onde estes se expressam. Dois genes de actina codificam actinas citoplasmáticas (*actina 5C* e *42A*), enquanto quatro genes de actina codificam actinas específicas do músculo. Estas quatro actinas podem ser depois subdivididas em actinas do músculo das asas (*actina 79B* e *88F*) e actinas do músculo da larva (*actina 57B* e *87E*). As seis isoformas de actina são reguladas durante o desenvolvimento ao nível da transcrição e ao nível da pos-tradução. O primeiro nível de regulação ocorre quando, por exemplo, os fragmentos de genes de actina clonados para examinar os níveis individuais de RNA mensageiro em diferentes estádios de desenvolvimento de organismos e partes do corpo dissecadas, foi observado que cada gene de actina é transcrito para RNA mensageiro funcional, o qual se acumula com padrões distintos. Os genes de actina podem ainda ser regulados ao nível proteico. Por exemplo, quando os diferentes genes de actina ligados à proteína GFP são sobreexpressos no epitélio folicular de *Drosophila*, estes são incorporados em diferentes estruturas de filamentos de actina dentro da célula.

A actina existe em dois estados, em monómeros ou em filamentos. Os monómeros de actina têm a habilidade de polimerizar em filamentos, enquanto os filamentos depolimerizam em monómeros através de um mecanismo chamado *treadmilling*. Dada a elevada dinâmica deste ciclo da actina é necessária uma regulação eficaz do mesmo, a qual é desempenhada por proteínas que se ligam à actina (ABPs). Um enorme número de ABPs são responsáveis pelo controlo do crescimento, estabilidade, polimerização/depolimerização e organização dos filamentos de actina. Uma dessas proteínas é o heterodímero *capping protein* (CP), o qual é composto por duas subunidades  $\alpha\beta$  que se ligam à região terminal dos filamentos de actina onde os monómeros são incorporados, impedindo assim a adição ou perda de monómeros de

actina. Portanto, a CP é necessária para a prevenção da polimerização dos filamentos de actina e quando esta proteína não está presente nas células, os filamentos de actina acumulam-se em excesso. Curiosamente, a remoção de qualquer uma das subunidades da CP, *cpa* ou *cpb*, resulta em diferentes fenótipos dependente do contexto epitelial, sugerindo que o citosqueleto da actina não é equivalente entre os tecidos epiteliais.

Uma vez que algumas ABPs regulam a dinâmica da actina de um modo específico para cada isoforma de actina, o objectivo deste trabalho é investigar se a CP poderá prevenir a polimerização de isoformas de actina específicas num tecido específico. Para isso, analisei as consequências de desenvolvimento quando cada um dos seis genes de actina ligados à proteína GFP são sobreexpressos durante a morfogénese do epitélio da asa. Embora tenha observado que as seis isoformas de actina-GFP são sobreexpressas a níveis similares e que estas promovem uma acumulação excessiva de filamentos de actina, cada isoforma é incorporada em subpopulações específicas de filamentos e resultam em várias consequências de desenvolvimento que parecem ser dependentes da região do disco e do tempo (estádio de desenvolvimento).

Assim como na ausência de CP, a sobreexpressão das isoformas de actina 5C, 42A e 57B promove o sobrecrecimento da região da *hinge*, o qual está associado à sobre-regulação do *Wingless*. Enquanto, na região da *blade*, apenas a sobreexpressão da isoforma de actina 42A promove o mesmo fenótipo observado quando há perda de CP. Isto sugere que a CP previne a polimerização das isoformas de actina 5C, 42A e 57B na região da *hinge* para regular o mecanismo Hippo e restringir o crescimento desta região. Enquanto, na região da *blade*, a CP previne especificamente a polimerização da isoforma de actina 42A para restringir a actividade da Src.

Todos os resultados apresentados sugerem que, embora não seja clara a razão da existência das diversas isoformas de actina e a razão pela qual estas foram retidas durante a evolução, cada gene de actina parece possuir uma função específica durante a morfogénese do epitélio da asa.

**Palavras-chave:** *Capping protein*, isoformas de actina, citosqueleto, epitélio da asa de *Drosophila*.

# Table of contents

<b>Acknowledgements</b>	<b>i</b>
<b>List of abbreviations</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo</b>	<b>v</b>
<b>Table of contents</b>	<b>viii</b>
<b>I – Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 – <i>Drosophila</i> as a model system</b>	<b>1</b>
1.1 – Advantage of using <i>Drosophila</i> genetics	1
1.2 – The <i>Drosophila</i> life cycle	2
1.3 – <i>Drosophila</i> imaginal discs are typical epithelial structures	3
1.3.1 – Epithelial structure of the wing imaginal disc	3
1.3.2 – Patterning of the wing imaginal disc	5
1.3.3 – Growth control of the wing imaginal disc	7
<b>2 – The actin cytoskeleton</b>	<b>8</b>
2.1 – Like in Vertebrates, <i>Drosophila</i> contains six <i>actin</i> genes	11
2.2 – Actin “isoforms” are highly regulated	14
2.2.1 – Actin genes are regulated at a transcription level	14
2.2.2 – Actin genes might be regulated at a post-translational level	15
<b>3 – The dynamic of the actin cycle is regulated by Actin Binding Proteins</b>	<b>17</b>
3.1 – The Actin Binding Proteins	18
3.2 – Capping protein: a highly conserved heterodimer	18
3.3 – <i>In vivo</i> studies with capping protein	19
<b>II – Aims</b>	<b>23</b>

<b>III – Material and Methods</b>	<b>24</b>
<b>1 – Fly strains and genetics</b>	<b>24</b>
1.1 – Methods of culturing flies	24
1.2 – Genetic tools	24
1.2.1 – Fly stocks	24
1.2.2 – The use of the FLP/FRT system	25
1.2.3 – The use of the UAS-Gal4 system	25
1.2.4 – The use of the MARCM system	26
<b>2 – Western blot</b>	<b>28</b>
2.1 – Embryos extract	28
2.2 – SDS-PAGE/Gel preparation	28
2.3 – Proteins transfer to PVDF membrane	28
2.4 – Membrane staining	29
<b>3 – Immunohistochemistry</b>	<b>30</b>
3.1 – Antibody staining	30
3.2 – Phalloidin staining	30
<b>4 – Molecular biology</b>	<b>31</b>
4.1 – Classical techniques of Molecular Biology used in this study	32
4.1.1 – Preparation of competent cells	32
4.1.2 – DNA extraction (minilysats)	32
4.1.3 – DNA purification (phenol/chloroform method)	32
4.2 – Cloning of the cDNA sequence used to generate a RNA specific probe for each actin gene	33
4.2.1 – Transformation of competent cells with clone containing the cDNA for each actin gene	33
4.2.2 – PCR	34
4.2.3 – PCR product purification	35
4.2.4 – Ligation within the pGEM-T easy vector	35
4.2.5 – Transformation of competent cells with pGEM-T easy vector	36

<b>5 – <i>In situ</i> hybridization</b>	<b>37</b>
5.1 – Probe synthesis	37
5.2 – Fixation of imaginal discs	38
5.3 – Hybridization	38
5.4 – Pre-absorption of anti-digoxigenin (anti-DIG) antibody	38
5.5 – Anti-DIG alkaline phosphatase reaction – Staining reaction	39
<b>IV – Results</b>	<b>40</b>
<b>1 – All fly actin genes are overexpressed at a comparable level</b>	<b>40</b>
<b>2 – Actin isoforms incorporate in filaments at various subcellular locations within the wing disc when overexpressed</b>	<b>42</b>
<b>3 – Although each of the <i>actin-GFP</i> genes is expressed at similar levels, their overexpression in the wing imaginal disc give rise to damaged adult wings of different strength</b>	<b>45</b>
<b>4 – Overexpression of each of the six actin genes gives specific developmental phenotypes that are time and cell-type dependent</b>	<b>46</b>
4.1 – Only actin Actin 5C, 42A and 57B promote hinge overgrowth, associated to ectopic wingless expression, when overexpressed	50
4.1.1 – Overexpression of Actin 5C, 42A and 57B promote hinge overgrowth	50
4.1.2 – Hinge overgrowth is associated to Wg upregulation	53
4.2 – Actin 5C and 57B, when overexpressed at early stages, prevent wing blade growth	55
4.3 – The cellular environment might influence the behaviour of actin-overexpressing cells	58
4.3.1 – Cells apposed to each other, expressing different levels of <i>actin 42A</i> , influence each other behaviour	58
4.3.2 – Groups of cells overexpressing actin genes give specific developmental phenotypes that are cell-type dependent	59
4.4 – Some <i>actin 5C, 42A and 57B</i> -overexpressing cells extrude from the	

wing blade epithelium and might survive	62
4.5 – Actin 5C, 42A, 57B, 87E and 88F overexpressing cells are recovered far away from where they were originated	64
<b>V – Discussion</b>	<b>65</b>
<b>Each actin isoforms might incorporate within specific actin filament structures</b>	<b>65</b>
<b>Epithelia are not equivalent in terms of actin cytoskeleton organization</b>	<b>68</b>
<b>Actin 5C, 42A and 57B might affect Hippo signalling</b>	<b>70</b>
<b>CP might prevent polymerization of Actin 42A to maintain cells within the wing blade epithelium</b>	<b>72</b>
<b>All actin isoforms, excluding Actin 79B, might provide to epithelial cells the ability to migrate</b>	<b>74</b>
<b>VI – References</b>	<b>75</b>
<b>VII – Appendix</b>	<b>82</b>
Appendix I – Overexpression of actin isoforms using the <i>sd</i> -Gal4 and <i>nb</i> -Gal4 drivers	82
Appendix II – Expression of Actin 5C, 42A and 57B mRNA in wing imaginal discs	
<b>84</b>	