

Universidade do Algarve

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais



**Differential requirements of aPKC activity
within different epithelial tissues.**

Pedro António Pereira Prudêncio

Mestrado em Engenharia Biológica

Faro · 2009

Universidade do Algarve

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais



**Differential requirements of aPKC activity
within different epithelial tissues.**

Orientadores: Dr. Rui Gonçalo Martinho PhD.

Prof. Dr. Gustavo Nolasco

Mestrado em Engenharia Biológica

Faro · 2009

This work was performed in Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal, in collaboration and under the supervision of Dr. Rui Martinho PhD

Este trabalho foi realizado no Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal, em colaboração e sob a orientação do Dr. Rui Martinho PhD.

Agradecimentos

“O” grande obrigado ao meu orientador **Rui Martinho**, por todas as conversas “chatas” que tivemos; por todos os conselhos que ele me deu e por tudo o que me ensinou. Obrigado!

Obrigado ao meu orientador interno, professor **Gustavo Nolasco** por ter aceitado mais uma vez o meu convite.

Ao **Instituto Gulbenkian de Ciência** por me acolher já lá vão 3 anos, e à **Fundação para a Ciência e Tecnologia** por me financiar.

Ao Magnifico Grupo das Moscas:

À **Tânia** porque tem que ser! Pronto foste essencial acho que a tese ficou um pouco mais bonita. Obrigado por todo o tempo que gastaste nas correcções, não sei como é que tiveste tanta paciência mas mostraste que és uma grande Amiga. Obrigado!!!

À **Anita** por me ajudar a aliviar o stress naquelas partidas de matrecos, que ela nunca ganha 😊

...e aos queridos e sempre bem-dispostos, embora “Boludos”, pos-docs **Gaston** and **Denisa**.

Ao **Paulo**, que apesar de eu “não ter consideração” por ele, é um grande amigo!!!

À **Beatriz** e à **Catarina** pelo apoio e correcções

À melhor ala do mundo em que nós trabalhamos em especial ao grupo da Florence, da Mónica Dias, do Álvaro e Cláudia e ao restante pessoal técnico do instituto.

Ao Alekos Athanasiadis pelas análises estruturais da aPKC.

Ao meu Pai pelas maravilhosas conversas temos...

À minha Mãe que me tem preparado os almoços todos os dias, e ainda me atura la em casa, mas eu sei que ela gosta😊. Às minhas Avós Júlia e Delfina á minha maninha e ao Juan.

À nova família, Faustino, Jesus e cunhadinha, pelos bolos; pelos almoços e pela cama emprestada😊

A todos os meus amigos que não sabem de mim...!?! (e também aqueles que sabem)

A todos aqueles que se juntaram um dia para me oferecer um portátil que veio a ser essencial para escrever esta tese.

E claro está! à minha mais que tudo por perder noites de sono a ajudar-me, por me apoiar nas horas de exaustão, e por me mandar trabalhar nas alturas que não apetece mas tem que ser e por me aturar faz hoje 2 anos. Obrigado Fofinha! AMO-TE MUITO!!

Abstract

Epithelial tissues are essential during morphogenesis and organogenesis. During development, epithelial tissues undergo several different remodeling processes, from cell intercalation to cell change shape. An epithelial cell has a highly polarized structure, which is important to maintain tissue integrity. The mechanisms that regulate and maintain apicobasal polarity and epithelial integrity are mostly conserved among all species and in different tissues within the same organism. aPKC-PAR complex localizes in the apical domain of polarized cells, and its function is essential for apicobasal polarization and epithelial integrity.

In this work we characterized two novel alleles of aPKC: a temperature sensitive allele (*aPKC^{TS}*), which has a point mutation on a kinase domain, and another allele with a point mutation on a highly conserved amino acid within the PB1 domain of aPKC (*aPKC^{PB1}*). Analysis of the *aPKC^{TS}* mutant phenotypes, lead us to propose that during development different epithelial tissues have differential requirements of aPKC activity. More specifically, our work suggests *de novo* formation of *adherens junctions* (AJs) is particularly sensitive to sub-optimal levels of *apkc* activity. Analysis of the *aPKC^{PB1}* allele, suggests that aPKC is likely to have an apical structural function mostly independent of its kinase activity. Altogether our work suggests that although loss of aPKC function is associated to similar epithelial phenotypes (e.g., loss of apicobasal polarization and epithelial integrity), the requirements of aPKC activity within these tissues are nevertheless likely to vary.

Keywords: aPKC; *Drosophila*; epithelium; cell polarity; adherens junctions; PAR complex

Resumo

As estruturas epiteliais são das mais abundantes num organismo multicelular. Duranteo desenvolvimento, os tecidos epiteliais são remodelados e passam por processos de morfogenese, servindo para compartimentalizar regiões corporais e formar estruturas durante a organogenese. No decurso destes processos, as células epiteliais sofrem rearranjos morfogeneticos, tanto na sua forma como propriedades adesivas. Estas alterações são altamente reguladas em termos espaço-temporais, e alguns exemplos são a constrição da zona apical e a intercalação celular (onde conjuntos de células se reorganizam para promover o alongamento do tecido num determinado eixo. Os mecanismos moleculares que regulam estes processos têm vindo a ser muito estudados, e muitos dos genes e proteínas envolvidos estão conservados desde levedura a humanos. As células epiteliais apresentam uma estrutura altamente polarizada, com um domínio apical e basal bem definidos e aos quais estão associados distintos complexos moleculares. Esta compartimentalização é uma das principais características das células epiteliais. Um dos complexos fundamentais na regulação da polarização celular é o complexo PAR-aPKC. Este complexo é constituído por uma cinase serina/treonina, a aPKC, cuja actividade de cinase é necessária para a localização e estabilização adequada de proteínas no domínio apical. Esta proteína é igualmente necessária para a exclusão, por fosforilação, de proteínas basais do domínio apical. A localização apical e a activação de aPKC são dependentes da interacção com PAR6. *Bazooka* (PAR3) também faz parte deste complexo e é fosforilada por aPKC. Esta fosforilação é importante para regular a localização das junções aderentes, e conseqüentemente a adesão intercelular. Estudos relizados em células MDCK e em *Drosophila*, mostram que a ausência de aPKC resulta na perda de estrutura epitelial em diversos contextos de desenvolvimento.

No presente trabalho foram isolados dois novos alelos de aPKC, em *Drosophila melanogaster*. Um destes alelos apresenta fenotipos sensíveis á temperatura (*aPKC^{TS}*). Clonagem e sequenciação dos mutantes revelam que a mutação se encontra no domínio de cinase. Análise estrutural da proteína sugere que esta mutação, juntamente com o aumento da temperatura, destabiliza a estrutura do domínio de cinase, o que indica que

aPKC^{TS} pode ser uma cinase-TS. O outro alelo isolado, *aPKC^{PBI}*, possui uma mutação num aminoácido bastante conservado do domínio PB1, que se julga afectar a interacção entre esta proteína e PAR6.

A análise de viabilidade dos dois novos mutantes isolados mostrou que o alelo *aPKC^{PBI}* é 100% letal, quer maternal quer zigoticamente, como os alelos já publicados para aPKC. O alelo aPKC^{TS} é maternalmente 100% letal, independentemente da temperatura. Contudo, os fenótipos zigóticos de aPKC^{TS} são dependentes da temperatura. Enquanto que à temperatura permissiva este alelo é 100% viável e os adultos não apresentam defeitos observáveis, à temperatura restritiva (30°C), este o mutante é 100% letal.

Esta observação sugere que diferentes epitélios têm diferentes necessidades em relação à actividade de aPKC. Fenotipicamente, o mutante materno do alelo *aPKC^{TS}* apresenta perda de estrutura epitelial durante a extensão da banda germinal, de acordo com o descrito para os alelos publicados da aPKC. Enquanto que todos os tecidos observados dos mutantes zigóticos (epitélio folicular, asas, abdómen) são fenotipicamente normais a temperaturas permissivas, a temperaturas restritivas são observados defeitos de encapsulamento dos cistoblastos pelo epitélio folicular durante a oogenese. Curiosamente, quando se remove uma cópia de aPKC^{TS}, o epitélio folicular manifesta o mesmo fenotipo. Esta observação reforça a ideia que diferentes estruturas epiteliais poderão ter diferentes necessidades em relação à actividade de aPKC. Esta ideia é reforçada pelo aparecimento de defeitos no fecho dorsal do abdómen adulto a temperaturas semi-restritivas. A análise dos estadios iniciais da oogenese sugere que algumas células precursoras do epitélio folicular falham a transição de mesenquimal para epitelial, enquanto que as que conseguem esta transição inicial, uma vez feita conseguem manter a estrutura epitelial. Todos estes resultados sugerem que há uma actividade intrínseca à aPKC que é particularmente importante durante processos que envolvem a formação *de novo* junções aderentes entre células. Esta actividade não será tão limitante para a manutenção de uma identidade epitelial já estabelecida.

Apesar destas observações, ainda não conseguimos compreender em promenor como é que o sistema está a ser afectado nestes mutantes. Como já mencionamos, alguns tecidos podem requerer mais actividade de aPKC para determinados processos, tais como a formação *de novo* de junções aderentes. Alternativamente, noutras fases do desenvolvimento e/ou noutros tecidos, a sua actividade pode não ser tão limitante,

explicando assim os fenótipos observados. Por outro lado, estes requerimentos de actividade podem ser mais específicos, e o que é mais limitante é a fosforilação de um determinado substrato em diferentes contextos de desenvolvimento.

Em relação ao alelo de *aPKC^{PBI}*, a análise de clones no epitélio folicular, mostrou um fenótipo muito mais penetrante que o *aPKC^{TS}*. Neste caso, nenhuma das células precursoras do epitélio folicular faz a transição de mesenquimal para epitelial, resultando num conjunto de células que envolvem a câmara ovárica sem qualquer organização epitelial. Adicionalmente, a proteína mutante de *aPKC^{PBI}* não se localiza apicalmente nas células da ectoderme embrionária, apesar de os seus níveis de expressão serem normais. Estas observações sugerem a localização apical da aPKC está associada a uma função estrutural, independente da sua função de cinase.

No geral, o nosso trabalho sugere que, embora a perda da função de aPKC esteja associada a fenótipos epiteliais semelhantes (por exemplo, perda de polarização apicobasal e integridade epitelial), as exigências da actividade aPKC nestes tecidos, podem no entanto variar.

Palavras chave: aPKC; *Drosophila*; epitélio; polaridade celular; Junções Aderentes; complexo PAR.

Abbreviations

AJ	A dherens J unctions
AP	A nterior- P osterior
aPKC	atypical P rotein k inase C
Arm	A rmadillo
BSA	B ovine S erum A lbumin
Crb	C rumbs
CRIB	C dc42- and R ac-interactive b inding
CyO	C urly of O yster
Dia	D iaphanous
Dlg	D iscs l arge
Dlt	D iscs l ost
DNA	D eoxyribonucleic A cid
DTT	D itiotreitol
E-Cad	E - C adherin
EGF	E pithelial G rowth F actor
FCSCs	F ollicle C ell S tem C ells
FERM	protein 4.1, E zrin, R adixin M oesin
FRT	F lipase R ecombination T argets
GBE	G erm B and E xtension
GLC	G erm L ine C lones
GUKh	G uanylate-kinase h older
lgl	L ethal g iant l arvae
LRR	L eucine-rich r epeats
MDCK	M adin- D arby C anine K idney
MeOH	M ethanol
µl	M icroliter
µm	M icrometer
ml	M illiliters
MLC	M yosin L ight C hain
mM	m illi M olar
mRNA	m essenger R ibonucleic A cid
nm	n anometers
ON	O vernight
PB1	P rotein B inding 1
PBS	P hosphate B uffer S aline
PBT	P BS with T ween20
PFC	P recursor f ollicle c ells
pH	p ower H ydrogen
RNA	R ibonucleic A cid
RNase	R ibo N uclease
Rok	R ho-kinase
rpm	r otations p er m inute
RT	R oom T emperature
SJs	S eptated j unctions
Std	S tardust
Tris-HCl	T ris (hydroxymethyl) aminomethane with HCl
WT	W ild T ype