

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Identificação e Caracterização dos Mecanismos Envolvidos  
na Formação, Regulação e Morfogénese de um Epitélio  
Polarizado: Uma abordagem *forward genetics*.**

**Tânia Catarina Cidade Costa Silva Ferreira**

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2007

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Identificação e Caracterização dos Mecanismos Envolvidos  
na Formação, Regulação e Morfogénese de um Epitélio  
Polarizado: Uma abordagem *forward genetics*.**

**Tânia Catarina Cidade Costa Silva Ferreira**

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2007

Tese orientada pelo Doutor Rui Martinho e pela Professora Doutora Solveig  
Thorsteindottir

Trabalho foi efectuado no Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal; sob a supervisão do Dr. Rui Martinho Ph.D. e co-supervisão da Professora Solveig Thorsteindottir (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido feito sem a ajuda de várias pessoas.

Antes de mais quero agradecer ao capitão de equipa, o CHEFE Rui Martinho, por me ter dado esta oportunidade ao me ter aceite no laboratório. Quero-lhe agradecer ainda pelo apoio que me tem dado e pelos “puxões de orelha” na altura certa. Lamento as vezes em que estive menos bem... estou a aprender!

Quero igualmente agradecer ainda à Professora Solveig, por ter aceite ser a minha orientadora interna na FCUL.

Obviamente, quero agradecer à SUPER EQUIPA: Ana Rita, André e Rui Tostões. À Ana porque sem ela os dias iam ser muito mais aborrecidos, pelo seu apoio e paciência em me ajudar sempre que preciso, pelo seu sentimento de partilha e integridade excepcionais. Ao André, com quem parte deste trabalho foi feito, pela paciência em me aturar mesmo nos dias em que nem eu própria me aturo! A Malta da Margem Sul é do melhor! Ao Tostões, agora no MIT, pelo bom espírito e amizade... e pelas “*correções de estilo*”!

À Sofia, a nossa menina das moscas! Pelo seu profissionalismo, dedicação e vontade de aprender. A nossa Moscolândia está garantidamente bem entregue!

Não posso deixar de agradecer ao Peter e à Kiki, pela disponibilidade e carinho. Por serem incansáveis, mesmo quando a noite vai longa, sempre com um sorriso (e café). Obrigada aos PACOTES, sem vocês esta dissertação não seria tão colorida!

Quero agradecer à “*maltinha*”, o gangue algarvio, por me ajudarem a manter a sanidade mental, pelas gargalhadas e bons momentos... e tal!

Falta ainda a minha Maria Mena, uma mãe para mim, que apesar de pequena ergue o mundo na palma da mão! Um obrigado muito grande!

E em último, mas talvez mais importante, ao Duarte. Nem sempre é fácil e nem sempre sou fácil... mas estamos juntos neste barco e vamos levá-lo a bom porto! Obrigada pela compreensão e apoio constantes, pelos mimos e por aprenderes comigo.

E aos meus pais, os meus preciosos, por me apoiarem incondicionalmente em todas minhas escolhas e por estarem sempre presentes. Eu sei que merecem mais do que lhes dou, mas dou-lhes tudo o que tenho.



# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
1. RESUMO .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUÇÃO .....	3
3.1. DESENVOLVIMENTO EM <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	3
3.1.1. <i>OÓGENESE</i> .....	3
3.1.2. <i>BLASTODERME SINCICIAL</i> .....	4
3.1.3. <i>BLASTODERME CELULAR</i> .....	5
3.1.3.a. CITOESQUELETO .....	5
3.1.4. <i>GASTRULA</i> .....	7
3.1.5. <i>DESENVOLVIMENTO LARVAR</i> .....	7
3.2. CÉLULAS E ESTRUTURA EPITELIAL .....	8
3.2.1. <i>IMPORTÂNCIA</i> .....	8
3.2.2. <i>FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS EPITELIAIS</i> .....	9
3.2.3. <i>ADESÃO INTERCELULAR</i> .....	9
3.2.4. <i>MORFOGÉNESE EPITELIAL</i> .....	11
3.3. POLARIDADE EM <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	12
3.3.1. <i>POLARIDADE APICAL-BASAL</i> .....	12
3.3.1.a. CADERINAS .....	12
3.3.1.c. COMPLEXO DA <i>ATYPICAL PROTEIN KINASE C</i> .....	14
3.3.1.d. COMPLEXO DO <i>LETHAL GIANT LARVAE</i> .....	16
3.3.1.e. COMPLEXO DE <i>CRUMBS</i> .....	16
3.3.1.f. JUNÇÕES SEPTADAS .....	17
3.3.1.g. ELABORAÇÃO DA POLARIDADE APICAL-BASAL .....	18
3.3.2. <i>POLARIDADE CELULAR PLANAR</i> .....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
5.1. <i>SCREEN MATERNO 2R</i> .....	21
5.4. COLHEITA E FIXAÇÃO DE EMBRIÕES .....	24
5.5. IMUNOHISTOQUÍMICA .....	25
5.6. ANÁLISE DE COMPLEMENTAÇÃO .....	25
5.7. MAPEAMENTO CITOLÓGICO .....	26
6. RESULTADOS .....	27
6.1. GENÉTICA <i>FORWARD</i> .....	27
6.1.1. <i>SCREEN MATERNO 2R</i> .....	27
6.1.2. <i>SCREEN EM EPITÉLIO ADULTO</i> .....	28
6.2. ANÁLISE DE COMPLEMENTAÇÃO DOS MUTANTES <i>SINGLETON</i> .....	30
6.3. CARACTERIZAÇÃO DOS TRÊS NOVOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO .....	32
6.3.1. <i>CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO EMBRIONÁRIO</i> .....	32
6.3.1.a. GRUPO 7 .....	32
6.3.1.b. GRUPO 8 .....	35
6.3.1.c. GRUPO 9 .....	36
6.3.2. <i>MAPEAMENTO CITOLÓGICO</i> .....	39
6.3.2.a. GRUPO 7 .....	40
6.3.2.b. GRUPO 8 .....	40
6.3.2.c. GRUPO 9 .....	41
7. DISCUSSÃO .....	41
7.1. PORQUÊ TRABALHAR COM A COLECÇÃO DE <i>SINGLETONS</i> ? .....	42
7.2. PROBLEMAS ASSOCIADOS AO TRABALHO COM <i>SINGLETONS</i> .....	42
7.3. ABORDAGEM AOS MUTANTES <i>SINGLETONS</i> .....	43
7.4. IDENTIFICAÇÃO DOS MUTANTES CANDIDATOS .....	44
7.4.1. <i>SCREEN EM EPITÉLIO ADULTO</i> .....	44

7.4.2. ANÁLISE DE COMPLEMENTAÇÃO .....	45
7.4.3. SOBREPOSIÇÃO DAS ABORDAGENS .....	45
7.5. CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DOS TRÊS NOVOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO .....	46
7.5.1. GRUPO 7.....	46
7.5.2. GRUPO 8.....	48
7.5.3. GRUPO 9.....	49
7.6. MAPEAMENTO CITOLÓGICO .....	50
7.6.1. GRUPO 7.....	51
7.6.2. GRUPO 8.....	51
7.6.3. GRUPO 9.....	52
7.7. TAREFAS PRESENTES E FUTURAS.....	53
7.8. CONCLUSÕES .....	54
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>I</b>
9.1. ANEXO 1: ABREVIATURAS USADAS NESTE TRABALHO.....	I
9.2.1. GRUPO 7.....	iii
9.2.1.a. MATERNO.....	iii
9.2.1.b. MATERNO/ZIGÓTICO .....	v
9.2.2. GRUPO 8.....	viii
9.2.2.a. MATERNO.....	viii
9.2.2.b. MATERNO/ZIGÓTICO .....	xi
9.2.3. GRUPO 9.....	xiv
9.2.3.a. MATERNO/ZIGÓTICO .....	xiv
9.3. ANEXO 3 – POSTERS EM CONFERÊNCIAS .....	XIX
9.3.1. <i>Ferreira, T., Rosa, A., Marty, T. and Martinho, R. (2007). Isolation and characterization of three new complementation groups defective for Drosophila early embryonic development. Mechanisms of early development: cell fate determination, morphogenesis and patterning, Lisbon, Portugal.....</i>	xix
9.3.1.a. ABSTRACT.....	xix
9.3.1.b. POSTER.....	xx
9.3.2. <i>Rosa, A.; Ferreira, T., Marty, T and Martinho, R (2007). Embryos for rugas are defective for the formation and morphogenesis of an epithelium during Drosophila early embryonic development. DroTUGA, Porto, Portugal.....</i>	xxi
9.3.2.a. ABSTRACT.....	xxi
9.3.2.b. POSTER.....	xxii
9.3.3. <i>Ferreira, T., Rosa, A., Marty, T. and Martinho, R. (2007). Characterization of a new complementation group defective for epithelium integrity during cellularization. DroTUGA. Porto, Portugal.....</i>	xxiii
9.3.3.a. ABSTRACT.....	xxiii
9.3.3.b. POSTER.....	xxiv
9.4.1. LISTA DE TABELAS.....	xxv
9.4.2. LISTA DE FIGURAS .....	xxv

As abreviaturas e acrónimos utilizados neste trabalho encontram-se indicados em Anexo (9.1. Lista de Abreviaturas)

# 1. RESUMO

A integridade epitelial é essencial ao desenvolvimento animal. Nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster* há a formação *de novo* de um epitélio embrionário, através de um processo conhecido como celularização da blastoderme. A partir deste epitélio primário, serão formadas as três camadas germinais através dos movimentos de gastrulação. O principal objectivo do presente trabalho é compreender e caracterizar os mecanismos relacionados com a formação e morfogénese de tecidos epiteliais, usando uma abordagem *forward genetics*. Tirámos partido de um *screen* materno feito no laboratório da Dra. Ruth Lehman (NYU, USA), para o braço direito do segundo cromossoma (2R). Deste *screen* foram isolados seis grupos de complementação e 28 mutantes *singleton*, com defeitos na formação do soma e da cutícula embrionária. Cinco dos seis grupos de complementação foram já identificados, e as funções dos genes associados envolvem ciclo celular (*san*), regulação do citoesqueleto (*scraps*) e adesão intercelular/polaridade (*RhoGEF2*, *DaPKC*). Com o isolamento desta última classe de mutantes ficámos confiantes de que o *screen* materno funcionou, e decidimos focar-nos na nossa colecção de *singletons*. Dado que tínhamos um elevado número de mutantes para analisar, usámos duas abordagens combinadas para facilmente identificarmos os mutantes potencialmente interessantes: 1) *screen* em epitélio adulto, e 2) análise de complementação. Oito *singleton* têm defeitos no olho adulto, e destes foram isolados dois novos grupos de complementação e um novo alelo do gene *scraps*. Um terceiro grupo de complementação foi isolado, sem defeitos óbvios em epitélio adulto. Neste trabalho apresentamos os resultados do *screen* em epitélio adulto, análise fenotípica e mapeamento citológico dos novos grupos de complementação identificados.

## PALAVRAS-CHAVE:

Epitélio, *Drosophila*, celularização, morfogénese, complementação

## 2. ABSTRACT

Proper epithelial integrity is essential throughout animal development. During *Drosophila melanogaster*'s early embryonic development, an epithelium is formed *de novo* through blastoderm cellularization. Later, this epithelium gives rise to a trilaminar embryo through a process known as gastrulation. In our laboratory we are interested in studying epithelium formation and morphogenesis during *Drosophila melanogaster*'s early embryonic development. For this purpose, we took advantage of a maternal *screen* done in the right arm of the second chromosome, in the laboratory of Dr. Ruth Lehmann. From this *screen* were isolated six complementation groups and 28 *singleton* mutants with defects in embryonic soma and cuticle formation. Five of the six groups were already identified, and their functions involve cell cycle (*san*), cytoskeleton regulation (*scraps*) and cell-cell adhesion/polarity (*RhoGEF2*, *DaPKC*). With the isolation of the latter class, we were confident that the maternal *screen* worked and decided to look into our *singleton* collection. Since we had a large number of mutants, we used a combined approach to rapidly identify the mutants of interest: 1) an adult epithelium *screen*, and 2) a complementation analysis. We found that eight *singletons* have defects in the adult eye, and from these we isolated two new complementation groups and another allele of the *scraps* gene. Additionally, we isolated a new complementation group, without defects in the adult epithelium Here, we present data about the adult *screen*, phenotypic analysis and cytological location of the three new complementation groups.

### KEYWORDS:

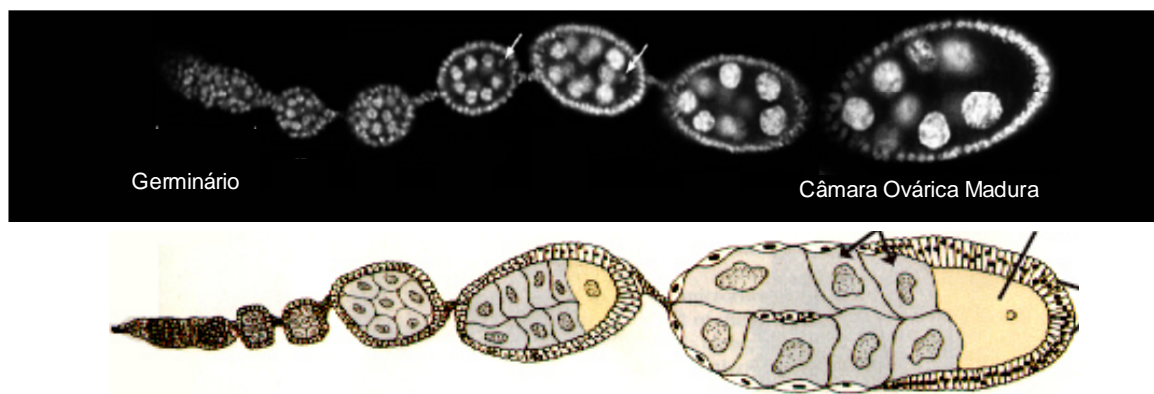
Epithelium, *Drosophila*, cellularization, morphogenesis, complementation

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1. DESENVOLVIMENTO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

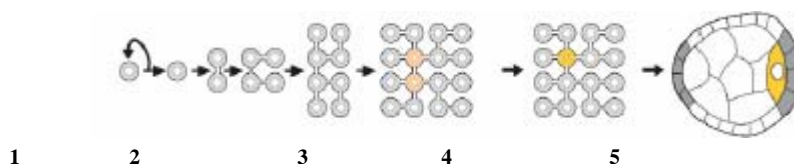
##### 3.1.1. OÓGENESE

O ovário de *Drosophila melanogaster* contém entre 16 a 20 ovaríolos. Cada ovaríolo possui câmaras ováricas progressivamente mais maduras (Figura 1).



**Figura 1: Desenvolvimento da linha germinal em *Drosophila melanogaster*.** Dentro dos ovaríolos, o desenvolvimento germinal é progressivo. Câmaras ováricas em vários estádios de desenvolvimento alinham-se sequencialmente desde a fase mais inicial (especificação do citoblasto) até à produção de uma câmara ovárica madura (adaptado de Gilbert, 1997).

Cada câmara resulta de uma única célula germinal estaminal. Por divisão assimétrica da célula estaminal é gerado o citoblasto, que por sua vez se divide 4 vezes sem haver citocinese. Desta sequência de eventos resulta uma câmara ovárica com 16 células interligadas por pontes citoplasmáticas (Figura 2).



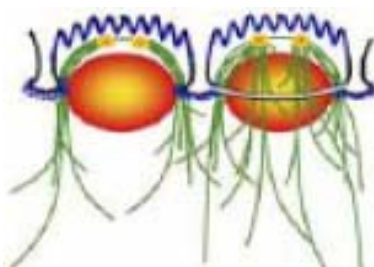
**Figura 2: Formação de uma câmara ovárica a partir de uma única célula germinal estaminal** Pela divisão assimétrica de uma célula germinal estaminal (1) é produzido o citoblasto (2), que se divide 4 vezes sem citocinese. Os pro-oócitos são seleccionados de entre as 16 células formadas (3) mas apenas um se diferencia em oócito (4). Deste processo resulta a formação de uma câmara ovárica madura (5). Adaptado de Gilbert, 1997.

Duas das 16 células possuem 4 pontes citoplasmáticas (pró-oócitos). Um dos pró-oócitos irá diferenciar-se no oócito. Os mecanismos que levam à selecção de uma das duas células são ainda alvo de debate. As restantes células irão tornar-se *nurse cells* e activamente produzir ARNm (ARN mensageiro) e proteínas que depois depositam no oócito (contribuição materna). Estas proteínas são inicialmente depositadas através das pontes citoplasmáticas e posteriormente através do esvaziamento do conteúdo citoplasmático, através de um processo conhecido como *dumping*. Algumas das proteínas e ARNm depositados irão distribuem-se assimétricamente no oócito e estabelecem os gradientes maternais responsáveis pela determinação do eixo antero-posterior e dorso-ventral do embrião (Huynh e Johnston, 2004).

### 3.1.2. BLASTODERME SINCICIAL

Após a fertilização, o embrião inicia uma série de rápidas divisões mitóticas (13) sem citocinese (Pilot e Lecuit, 2005). Durante estas divisões, os núcleos migram progressivamente para o córtex, formando a blastoderme sincicial.

A migração nuclear envolve a expansão axial dos núcleos (ciclos 4 a 6) e a posterior migração para o córtex (ciclos 8 e 9) através dos microtúbulos (Lecuit e Wieschaus, 2000). Quando atingem a região cortical, o citoesqueleto nuclear funde-se com a actina cortical e com os microtúbulos (Figura 3). Associado a esta interacção, os microtúbulos distribuem-se em torno de cada núcleo (Kellog *et al.*, 1991) e a actina organiza-se na região apical de cada um dos núcleos (ciclo 10). No córtex, os núcleos dividem-se mais quatro vezes (Sullivan e Theurkauf, 1995) e param na interfase do ciclo 14. Em cada divisão ocorre um processo de pseudoclivagem entre núcleos adjacentes (Karr e Alberts, 1986). Durante a interfase do ciclo 14, a membrana plasmática inicia então um processo de invaginação, em redor de cada um dos 6000 núcleos produzidos. Este processo é conhecido como celularização da blastoderme.



**Figura 3:** Após atingirem o córtex, os núcleos fundem o seu citoesqueleto com a actina cortical e com os microtúbulos. A actina (azul) localiza-se acima de cada núcleo (laranja) e dos centrossomas (amarelo), a partir dos quais os microtúbulos (verde) se expandem e rodeiam os núcleos. Imagem retirada de (Brandt *et al.*, 2006).

O desenvolvimento sincicial encontra-se sob controlo materno (Gibson e Perrimon, 2003). Até ao ciclo 7 o embrião não transcreve o seu genoma, e todo o desenvolvimento é feito à custa da contribuição materna. Os primeiros genes zigóticos são transcritos no ciclo 8 (Bashirullad *et al.*, 2006) e no início do ciclo 12 a taxa de degradação dos ARNm maternos aumenta (Bashirullah *et al.*, 1999). É na interfase do ciclo 14 que a transcrição zigótica é iniciada em grande escala (transição materna-zigótica, TMZ), coincidindo com o início da celularização.

### 3.1.3. BLASTODERME CELULAR

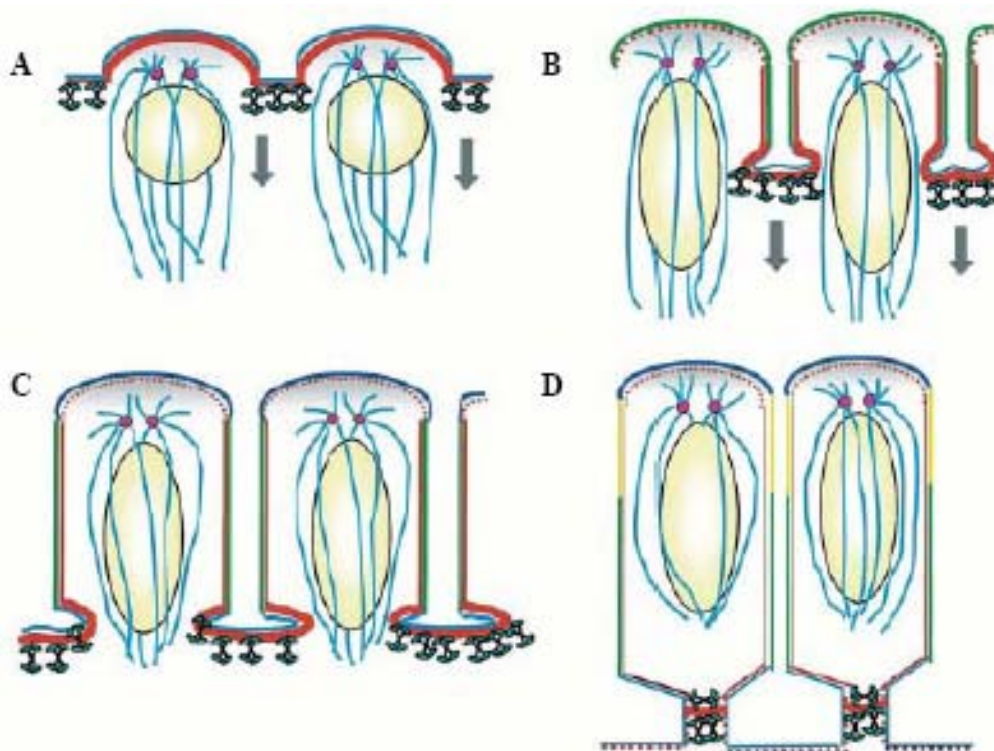
A celularização da blastoderme é o processo através do qual é formado *de novo* um epitélio polarizado (Foe *et al.*, 1993). Em *Drosophila*, inicia-se na interfase do ciclo 14 com a formação das invaginações membranares em redor de cada núcleo (Fullilove e Jacobson, 1971) e leva 65 - 70 minutos a completar. O transporte direccionado, através dos microtúbulos, de vesículas vindas do complexo de Golgi garante o crescimento das invaginações (Lecuit e Wieschaus, 2000). Estas invaginações encontram-se associadas ao complexo de actina-miosina (Warn e Robert-Nicoud, 1990). Quando as invaginações atingem a região basal dos núcleos, os anéis de actina-miosina contraem-se e individualizam as células do epitélio primário da blastoderme (Warn *et al.*, 1980).

A formação do epitélio embrionário é acompanhada pelo estabelecimento de polaridade e contactos celulares (Pilot e Lecuit, 2005; Karr e Alberts, 1986). Na frente de invaginação encontram-se proteínas dos complexos envolvidos em polaridade epitelial (Bhat *et al.*, 1999; Pielage *et al.*, 2003). Existe uma íntima relação entre a celularização e a polarização da blastoderme que, em parte, se reflecte na presença de denominadores comuns em ambos os processos (Lecuit, 2004).

#### 3.1.3.a. CITOESQUELETO

O processo de celularização pode ser dividido em quatro fases (Muzdamar e Muzdamar, 2002) (Figura 4). A fase 1 demora 10 minutos, durante os quais os núcleos esféricos (5µm) começam a alongar e a membrana citoplasmática inicia o processo de invaginação entre os núcleos. A adição do material membranal é feita através dos microtúbulos e proteínas motoras que direccionam a membrana pré-existente para o interior do embrião. Este movimento leva consigo a actina apical a cada um dos núcleos, para a frente de celularização (Warn e Magrath, 1983), onde se associa com a miosina II e forma o aparelho contráctil de actina-miosina (Warn *et al.*, 1980). A segunda fase demora 20 minutos. Nesta fase,

os núcleos atingem o seu alongamento máximo. A invaginação da membrana é lenta, e a frente de celularização pouco varia na sua distância à superfície do embrião. As fases 3 e 4 demoram igualmente 20 minutos. Durante a fase 3 a membrana invagina rapidamente, até atingir a região basal dos núcleos. Inicia-se em seguida a fase 4, onde a velocidade de invaginação duplica e os núcleos são individualizados pela contracção do anel de actina-miosina, em 6000 células epiteliais com 35µm de altura (Lecuit e Wieschaus, 2000).



**Figura 4: A celularização e o papel do citoesqueleto em *Drosophila*.** Na fase 1, os núcleos redondos (amarelo) estão rodeados por microtúbulos (azul claro) associados apicalmente aos centrosossomas (círculo vermelho). A actina (vermelho) concentra-se acima dos núcleos e está menos densa na frente de invaginação, onde colocaliza com a miosina II para formar o aparelho contráctil de actina-miosina (A). Na segunda fase, os núcleos alongam e a actina concentra-se na frente de invaginação, com a nova membrana a ser inserida apicalmente (verde) (B). Na fase 3, a frente de migração atinge a região basal dos núcleos à custa de membrana inserida apicalmente (azul escuro) (C). Na quarta fase, a membrana nova é inserida lateralmente (amarelo) e os aparelhos contrácteis de actina-miosina adjacentes fundem-se para formar uma monocamada de células polarizadas (D). imagem retirada de (Mazumdar, e Muzdamar, 2002). — membrana plasmática — actina — miosina II — microtúbulos • centrosossomas — membrana nova — membrana nova — membrana nova

### 3.1.4. GASTRULA

Após a celularização e estabelecimento do epitélio primário da blastoderme, inicia-se um conjunto de movimentos morfogenéticos designados por gastrulação. Estes movimentos vão levar ao alongamento do eixo antero-posterior (AP) (Bertet *et al.*, 2004; Irvine e Wieschaus, 1994; Zallen e Wieschaus, 2004), culminando com a formação de um embrião trilaminar (Pilot e Lecuit, 2005, Leptin e Grunewald, 1990; Sweeton *et al.*, 1991; Leptin, 1995).

Um dos movimentos de gastrulação do embrião de *Drosophila* é a extensão da banda germinal (EBG). A EBG depende de fenómenos de intercalação celular e remodelação juncional, invaginação epitelial e polarização mitótica. A intercalação celular ocorre na região mais ventro-lateral da EBG e promove o seu alongamento AP. Este alongamento é conseguido por remodelação dos contactos intercelulares e alteração da posição relativa das células no plano do epitélio. As mitoses polarizadas que ocorrem posteriormente na EBG também contribuem para o rápido alongamento AP (Silva e Vincent, 2007). Com o alongamento da EBG ocorre a invaginação da região posterior (*midgut pocket*) para o interior do embrião. Após estes movimentos ocorre a retracção da EBG, e o embrião, agora trilaminar, recupera a sua organização AP.

### 3.1.5. DESENVOLVIMENTO LARVAR

Após o desenvolvimento embrionário há a eclosão de larvas de *Drosophila melanogaster*. As larvas passam por três estádios larvares (instar) antes de empuparem e eclodir a mosca adulta.

No interior das larvas existem estruturas, discos imaginais (Figura 5), que irão originar vários dos apêndices da mosca adulta. Estes discos imaginais são das poucas estruturas que sobrevivem à apoptose generalizada dos tecidos, durante a fase de pupa. Estas estruturas são formadas por camadas epiteliais altamente organizadas e com um sistema juncional bem desenvolvido, comparável à epiderme embrionária da qual derivam.

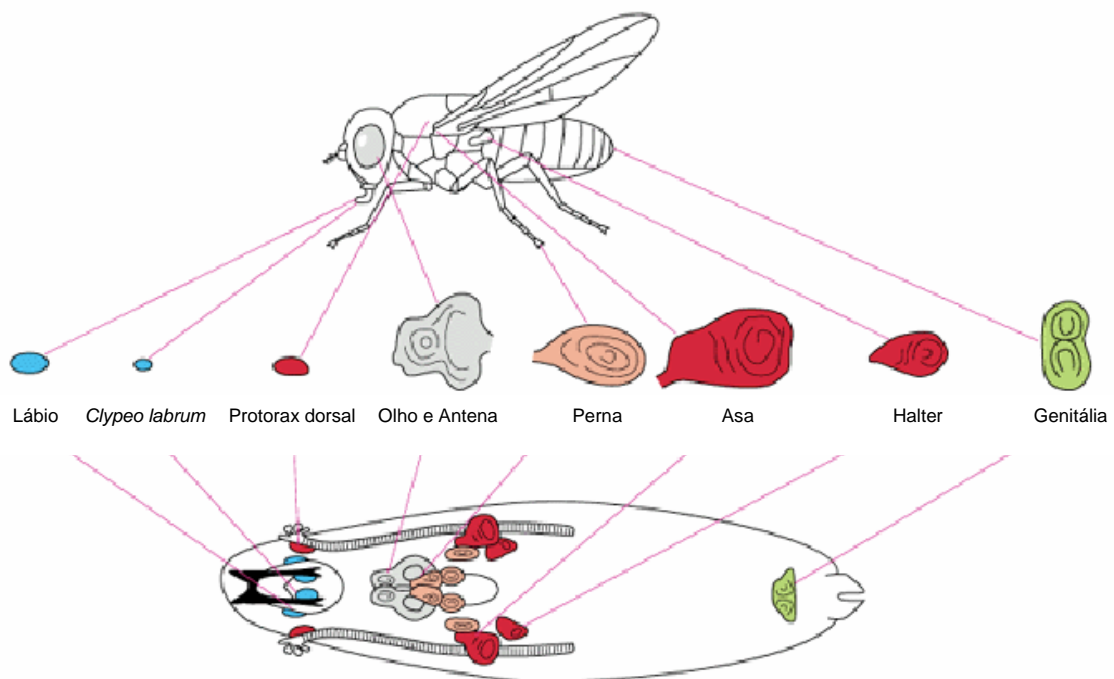
## 3.2. CÉLULAS E ESTRUTURA EPITELIAL

### 3.2.1. IMPORTÂNCIA

O tecido mais comum em animais é o tecido epitelial. Estes tecidos envolvidos na protecção, resistência e regulação da homeostasia do organismo (Schöck e Perrimon, 2002).

As células epiteliais exibem uma acentuada polarização apical-basal reflectida na composição lipídica da membrana (Simons e Ikonen, 1997) e na distribuição assimétrica de proteínas citoplasmáticas.

O domínio apical das células epiteliais pode contactar com o exterior (epiderme) ou lúmen (epitélio interno). Este domínio é formado por uma região apical livre e uma região marginal, envolvida na adesão intercelular (Tepass *et al.*, 2001). A região basolateral contacta com a matriz extracelular e através dos complexos juncionais laterais estabelece contactos com as células adjacentes.



**Figura 5: Esquema representativo da disposição dos discos imaginários larvares, e correspondente (s) órgãos em adulto. Imagem cedida por Florence Janody.**

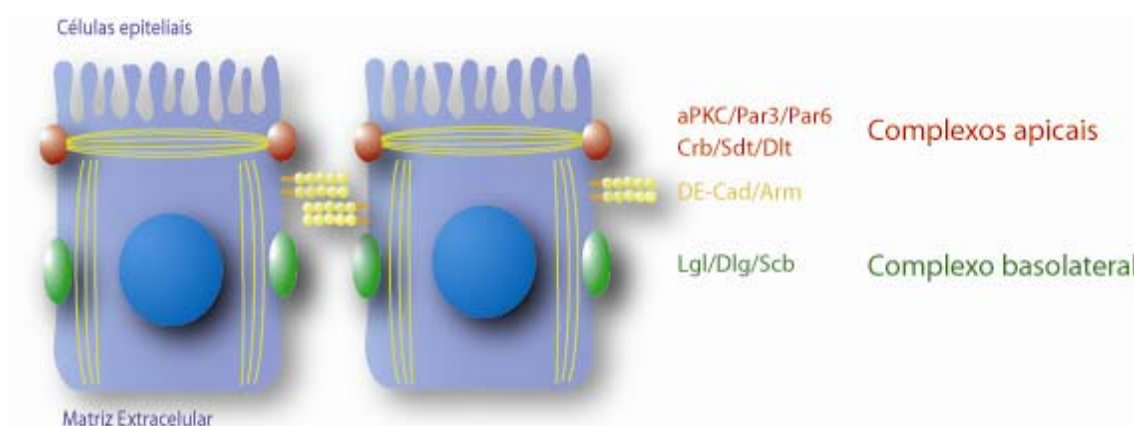
### 3.2.2. FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS EPITELIAIS

A maioria dos tecidos epiteliais é formada pela remodelação de um tecido mesenquimatoso pré-existente (transição mesênquima-epitélio, TME). As estruturas epiteliais formadas pelo processo de TME designam-se de epitélios secundários. Excepcionalmente, como é o caso da celularização da blastoderme, um epitélio pode ser formado *de novo*, sem implicar a remodelação de um tecido pré-existente. As estruturas epiteliais assim formadas designam-se por epitélios primários.

### 3.2.3. ADESÃO INTERCELULAR

A adesão em células epiteliais é regulada por diversos complexos juncionais. Em *Drosophila melanogaster* estes complexos são as junções aderentes pontuais (JAp), a *Zonula adherens* (ZA) e as junções septadas (JS). A ZA resulta da coalescência das JAp, e define a barreira entre o domínio apical e basolateral da membrana. O domínio apical localiza-se apicalmente à ZA. O domínio basolateral tem uma distribuição complementar à região apical.

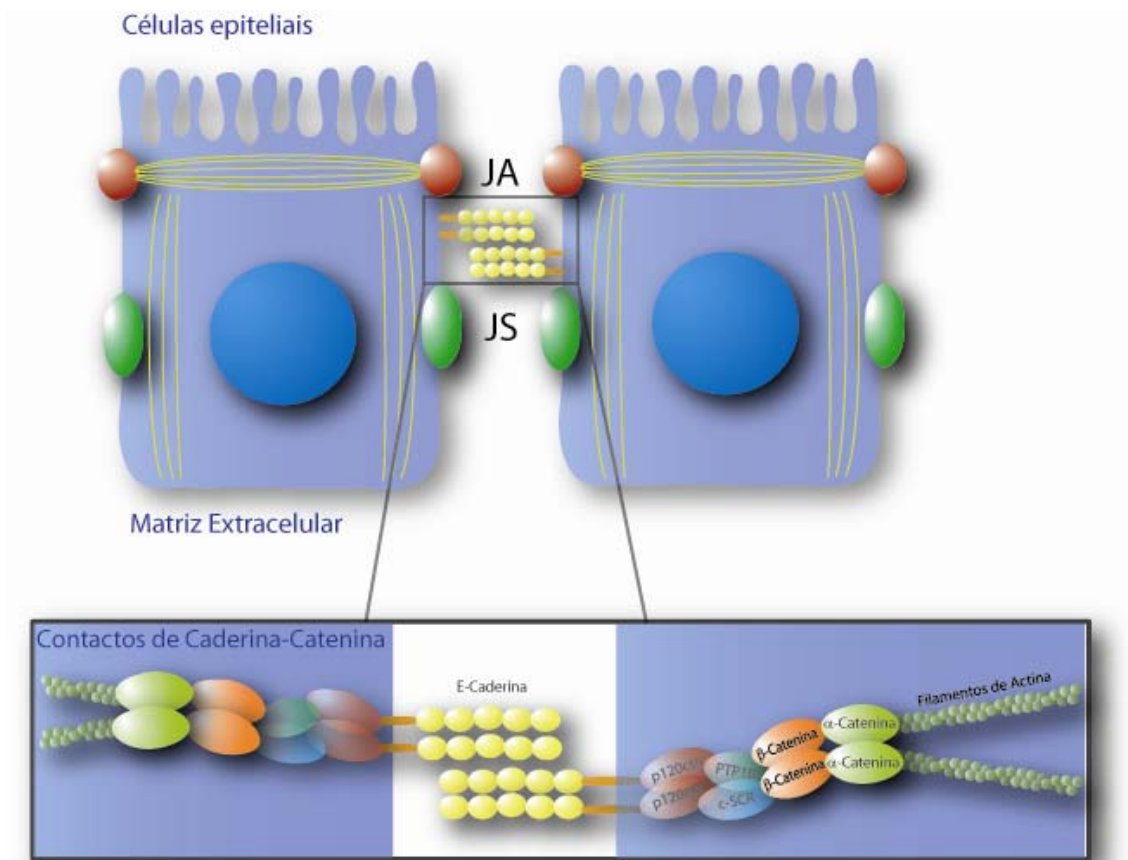
As JSs localizam-se basolateralmente e funcionam como uma barreira transepitelial. O seu correspondente funcional em vertebrados, são as junções apertadas (Arno e Muller, 2003, Lamb *et al.*, 1998; Genova e Fehon, 2003) (Figura 6)..



**Figura. 6: Complexos conservados de polarização apical-basal.** A localização das junções aderentes primárias é indicada pela localização dos complexos de caderina-catenina (amarelo). Os contactos adesivos iniciais são maturados pela acção de dois complexos apicais e um complexo basolateral. Os complexos apicais (vermelho) consistem no complexo da aPKC (*Atypical Protein Kinase C* (aPKC) / Par3 ou *Bazooka* (Baz) / Par6) e no complexo de *Crumbs* (*Crumbs* (Crb) / *Discs lost* (Dlt) / *Stardust* (Adt)). O complexo complexo basolateral (verde) consiste no complexo do Lgl (*Lethal giant larvae* (Lgl) / *Discs large* (Dlg) / *Scribble* (Scrb)) define e localiza-se ao nível das junções septadas (Lecuit e Wieschaus, 2002).

O eixo apical-basal é um dos eixos de polarização que podemos encontrar em células epiteliais. Conhecem-se três complexos conservados (Woods *et al.*, 1996; Lecuit e Wieschaus, 2000) envolvidos na sua regulação (Arno e Muller, 2003) (Figura 6).

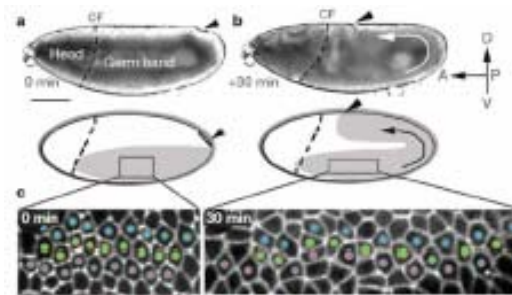
Os locais iniciais de adesão são estabelecidos pela acção da DE-Caderina (DE-Cad) e das cateninas (Cat), mas precisam ser maturados e estabilizados pela acção conjunta dos complexos de polarização (Nelson *et al.*, 2003; Tepass *et al.*, 2001) (Figura 7).



**Figura 7: Complexos de adesão epitelial em *Drosophila melanogaster*.** As junções aderentes iniciais são formadas pelo complexo de caderina-catenina (amarelo), e são posteriormente reforçadas pelo aparecimento de junções aderentes maduras (JA, vermelho). Estes contactos permitem a associação apical com o citoesqueleto de actina que se organiza numa cintura apical em torno das células (em pormenor no painel inferior). As junções septadas (verde) situam-se abaixo das JAs e coincidem em localização com o complexo do *Lgl*, que define a identidade basolateral da membrana.

### 3.2.4. MORFOGÉNESE EPITELIAL

Os movimentos de morfogénese epitelial envolvem a alteração da forma do tecido epitelial. Durante a gastrulação em *Drosophila melanogaster*, o movimento de EBG depende dos processos morfogenéticos de intercalação celular, que permitem o alongamento do eixo antero-posterior (Silva e Vincent, 2007) (Figura 8).

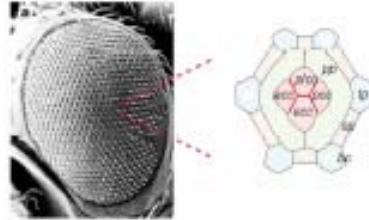


**Figura 8: Durante a EBG ocorrem eventos de intercalação celular que permitem o alongamento do eixo antero-posterior. a)** Início da EBG. **b)** 30 minutos após o início da EBG. Neste processo o epitélio ventral desloca-se dorsalmente (seta) e dobra-se para trás na sua região mais posterior (triângulo). A intercalação celular ocorre ao nível do epitélio ventral-lateral (cinzento). **c)** Imagens de pormenor das regiões indicadas em **a** e **b** que mostram a troca de parceiros entre células adjacentes. IC, invaginação cefálica. Retirado de Bertet *et al.*, 2004.

Para que as células vizinhas, no contexto de um tecido, possam trocar de parceiros (intercalação) sem comprometer a integridade epitelial, é essencial a modelação e o rearranjo dos contactos de caderina / catenina (Gumbiner, 2005; Leptin, 1995; Gumbiner, 1996; Schöck e Perrimon, 2002). O dinamismo das interacções entre os complexos de adesão e o citoesqueleto de actina (Rimm *et al.*, 1995), que se associam e dissociam consecutivamente, desempenham um papel importante na remodelação dos contactos durante a morfogénese epitelial (Drees *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2005; Perez-Moreno *et al.*, 2003; Takeichi, 1995). Adicionalmente, a diferença no tempo de reciclagem das proteínas membranares e citoplasmáticas influencia a modelação destes contactos. A taxa de degradação das proteínas citoplasmáticas é superior à das proteínas membranares, garantindo assim a estabilidade dos contactos de adesão (Braga, 2002; Hinck *et al.*, 1994; Le *et al.*, 1999).

Durante o desenvolvimento larvar, o epitélio dos discos imaginais do olho é percorrido por uma onda morfogenética que leva à formação dos vários tipos celulares que irão constituir o olho adulto. A correcta morfogénese deste epitélio é essencial para que o olho composto adulto seja correctamente organizado. O olho composto é formado por 800 omatídeas (unidades estruturais), cada com oito células

fotorreceptoras rodeadas por quatro células cone (que secretam a lente) e sete células pigmentadas (Hayashi e Carthew, 2004) (Figura 9).



**Figura 9: Olho composto em *Drosophila melanogaster*.** O olho é formado por 800 ommatídeos. No painel direito está representada uma ommatídeo. O olho é formado por células cone: equatoriais (ecc), posteriores (pcc), polares (plcc) e anteriores (acc) que estão rodeadas por duas células pigmentadas primárias (pp), duas células secundárias (sp) e duas células terciárias (tp). As células cone estão ainda rodeadas por pêlos (bc). Imagem retirada de Hayashi e Carthew, 2004.

Existem vários sistemas para estudar os mecanismos de diferenciação, regulação e morfogénese epitelial. Alguns dos modelos usados com maior sucesso são o embrião e os discos imaginários de *Drosophila* (Müller, 2000). O embrião de *Drosophila* é particularmente útil, pois a blastoderme celular (que é basicamente uma camada epitelial) é de fácil acesso, ao contrário dos discos (que implicam a dissecção larvar). Adicionalmente, durante o posterior desenvolvimento embrionário, ocorrem fenómenos de morfogénese epitelial. O embrião de *Drosophila* permite, ao longo do desenvolvimento embrionário, estudar eventos de formação e morfogénese epitelial, num sistema que facilmente pode ser acedido.

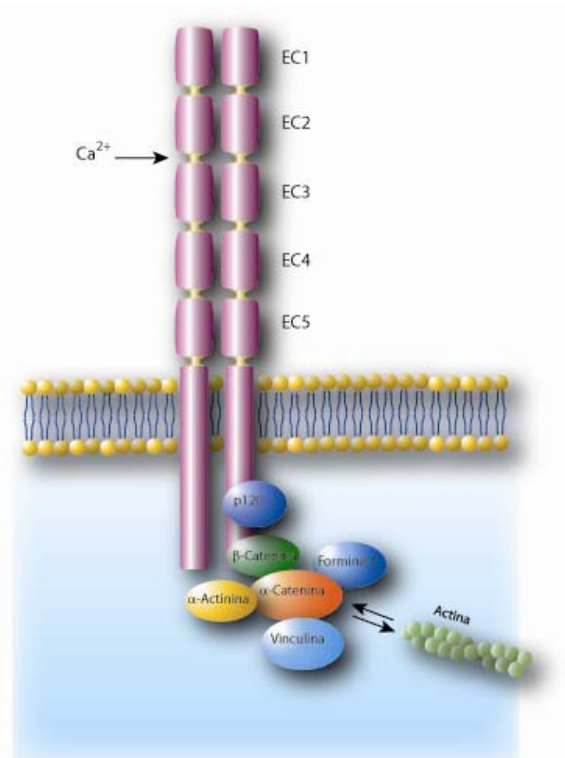
### 3.3. POLARIDADE EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

#### **3.3.1. POLARIDADE APICAL.BASAL**

##### 3.3.1.a. CADERINAS

Como mencionado anteriormente, as caderinas estão envolvidas na localização dos contactos iniciais de adesão.

As caderinas são uma superfamília de moléculas transmembranares envolvidas em adesão celular (Cano *et al.*, 2000; Gumbiner, 1996) cálcio-dependente, através do seu domínio extracelular (Figura 10).



**Figura 10: O complexo de caderinas-cateninas e o estabelecimento inicial dos contactos de adesão.** As caderinas clássicas possuem 5 repetições típicas das caderinas (EC- domínios extracelulares de caderina) na sua região extracelular. Estes domínios ligam-se entre si através de íões cálcio. A  $\beta$ -Cat liga-se na região distal do domínio intracelular da DE-Cad e à  $\alpha$ -Cat. A  $\alpha$ -Cat interage dinamicamente com os filamentos de actina. Retirado de Gumbiner, 2005.

Este grupo engloba várias subfamílias, entre as quais as caderinas clássicas que se localizam primariamente nas JAs. As caderinas epiteliais, como a DE-Cad (designada em *Drosophila* por *shotgun*, *shg*), pertencem a esta subfamília (Oda *et al.*, 1994). As caderinas clássicas possuem módulos extracelulares característicos (EC), ligados por sequências de cargas negativas, onde se ligam 2 a 3 íões cálcio (Boggon *et al.*, 2002; Pokutta *et al.*, 1994). Uma hélice transmembranar liga o domínio extracelular ao intracelular.

As caderinas epiteliais associam-se às cateninas, formando os complexos de caderinas-cateninas, que em *Drosophila* definem os contactos de adesão iniciais (Chen *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Yap *et al.*, 1997; Yap *et al.*, 1998). A adesão baseada em caderinas é fraca, mas a interação entre as caderinas adjacentes e o citoesqueleto de actina confere propriedades adesivas adicionais (Jamora e Fuchs, 2002).

### 3.3.1.b CATENINAS

As cateninas são proteínas citoplasmáticas que interagem com os complexos de polarização, (ex. a  $\beta$ -Cat interage com a DE-Cad) (Chen *et al.*, 1999). Em animais, a  $\alpha$  e  $\beta$ -Cat localizam-se nas JAs, onde servem de proteínas adaptadoras à associação das caderinas ao citoesqueleto de actina (Ozawa *et al.*, 1989). A  $\beta$ -Cat (*Bazooka* em *Drosophila*, Baz) liga-se directamente às caderinas (Aberle *et al.*, 1994), e através da sua região N-terminal liga-se também à  $\alpha$ -Cat (Aberle *et al.*, 1996). Por sua vez, a  $\alpha$ -Cat associa-se ao citoesqueleto de actina (Rimm *et al.*, 1995).

A interacção entre caderinas e cateninas ocorre em dois passos: 1) a  $\beta$ -Cat liga-se às caderinas (Hinck *et al.*, 1994); e 2) a  $\alpha$ -Cat liga-se à  $\beta$ -Cat (Hinck *et al.*, 1994; Näthke *et al.*, 1994). A associação dinâmica do complexo de caderina-cateninas com o citoesqueleto de actina é feita através da  $\alpha$ -Cat, que regula a polimerização da actina através do complexo Arp2/3 (Drees *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2005).

### 3.3.1.c. COMPLEXO DA ATYPICAL PROTEIN KINASE C

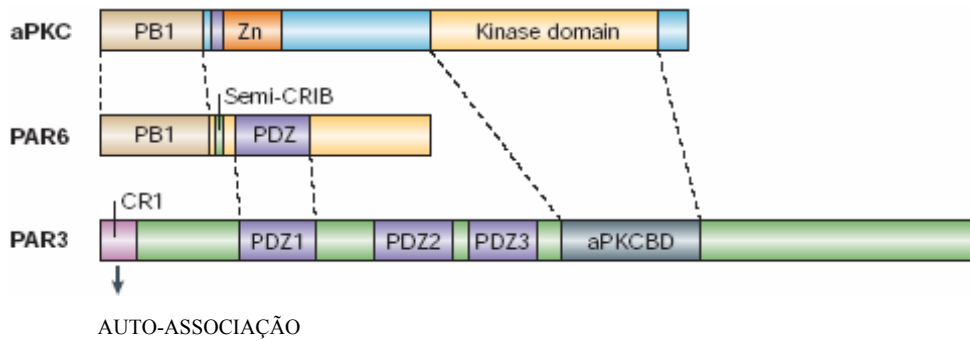
Este complexo desempenha um papel central na regulação da polaridade epitelial (Ohno, 2001). É composto pelas proteínas aPKC, Par3 ou Baz e Par6 (Müller, 2003; Pilot e Lecuit, 2005; Muller e Wieschaus, 1996; Wodarz *et al.*, 2000; Petronczki e Knoblich, 2001) (Figura 11). Este complexo inclui ainda Cdc42, em vertebrados e neuroblastos de *Drosophila melanogaster*.

Baz é o homólogo de Par3 (*C. elegans*) e ASIP (vertebrados) (Kuchinke *et al.*, 1998). Baz interage directamente com aPKC e Par6 (Chen e Macara, 2005) (Figura 12).

Par3 e Par6 são ambas proteínas com domínios PDZ (Petronczki e Knoblich, 2001), pertencentes à família das proteínas PAR (*partitioning defective*) e formam um complexo entre si (Suzuki e Ohno, 2006). Par6 associa-se ainda a proteínas de outros complexos de polaridade, como Pals1 e CRB3 (relacionados com TJs) e Lgl (Yamanaka *et al.*, 2003).

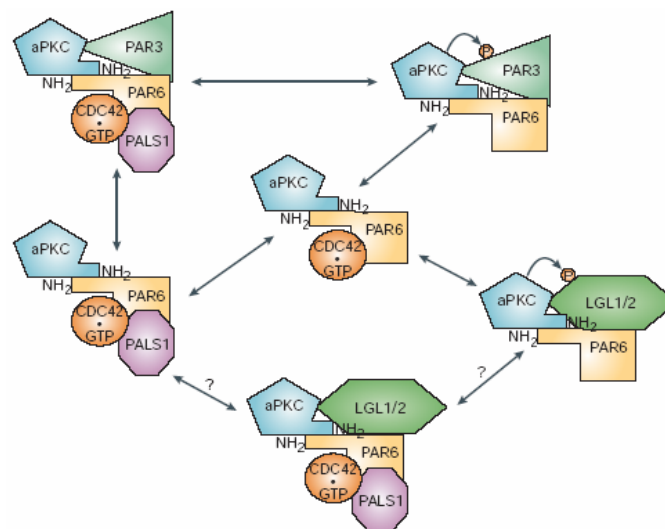
A aPKC (Wodarz *et al.*, 2000) é uma cinase serina/treonina, cuja actividade é essencial para o estabelecimento da identidade apical (Kim, 2000). DaPKC é capaz de fosforilar Lgl, que é assim excluído da membrana do domínio apical e a sua distribuição fica limitada à região basolateral da membrana (Suzuki e Ohno, 2006).

A Cdc42 é uma RhoGTPase, que alterna entre o estado activo (ligado a GTP) e inactivo (ligado a GDP). No seu estado activo interage com Par6, e participa na localização apical deste complexo (Gotta *et al.*, 2001, Joberty *et al.*, 2000, Johansson *et al.*, 2000, Kay e Hunter, 2001, Lin *et al.*, 2000, Qiu *et al.*, 2000).



**Figura 11: Proteínas do complexo da aPKC (Macara, 2004).** Domínios da aPKC, PAR6 e *Bazooka* (PAR3). O domínio CRIB da Par6 tem metade do tamanho normal de um domínio CRIB pelo que é referido como semi-CRIB. A aPKC contém um domínio de zinco (Zn, *zinc-finger*) que funciona como um domínio regulador. O domínio de ligação à aPKC (aPKCBD) de PAR3 é fosforilado pela cinase. A região CR1 (N-terminal) é necessária para a oligomerização de PAR3. As linhas indicam interações entre domínios. CRIB: CDC42/Rac-associação interactiva. PB1: Phagocytic oxidase/Bem1. PDZ: PSD-95, *Discs large* e *Zona occludens-1*.

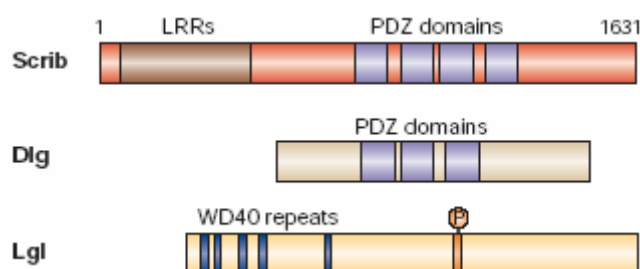
Este complexo é o primeiro a actuar nos contactos de adesão iniciais, e é essencial para a sua estabilização e maturação em ZA. Contudo, a sua localização apical não é afectada em mutantes para os complexos de adesão inicial (Harris e Peifer, 2004).



**Figura 12: Interações conhecidas do dímero aPKC-PAR6 (Macara, 2004).** A região N-terminal de Par6 interage constitutivamente com a aPKC. Outros parceiros de Par6 incluem Cdc42-GTP, Par3, Pals1 (Scrib em *Drosophila*) e Lgl. Todas estas proteínas interagem com a região central de Par6 (domínios CRIB e PDZ). A associação de Pals1 é estimulada pela Cdc42-GTP. A ligação de Par3 e Lgl a Par6 parece ser mutuamente exclusiva, mas Par3 e Pals1 podem ligar-se simultaneamente. P: locais de fosforilação pela aPKC. CRIB: CDC42/Rac-associação interactiva. Lgl: *Lethal giant larvae*. Pals1: proteína associada com LIN7, homólogo, em vertebrados, de Scrib de *Drosophila*. PDZ: PSD-95, *Discs large* e *Zona occludens-1*.

### 3.3.1.d COMPLEXO DO *LETHAL GIANT LARVAE*

Este complexo é formado pelas proteínas *Lethal giant larvae* (Lgl), *Discs large*, (Dlg) e *Scribble* (Scb) (Henrique e Schweisquith, 2003; Nelson, 2003; Zeitler *et al.*, 2004; Tanentzapf e Tepass, 2003; Hurd *et al.*, 2003) (Figura 13).

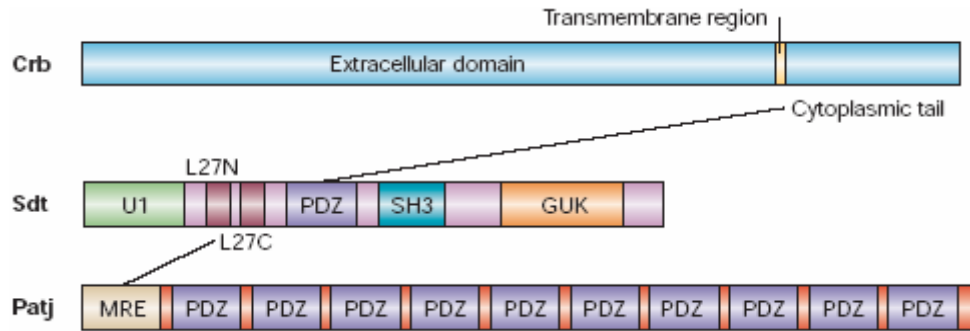


**Figura 13: Proteínas do complexo do Lgl (Macara, 2004).** Domínios de *Scribble* (Scrib), *Discs large* (Dlg) e *Lethal giant larvae* (Lgl). LRR: região rica em leucina. PDZ: PSD-95, *Discs large* e *Zona occludens-1*. WD40: região contendo motivos Trp-Asp. P: local de fosforilação pela aPKC (proteína cinase C atípica).

Dlg e Scrib são proteínas com múltiplos domínios PDZ, mas Dlg é uma proteína MAGUK (Woods e Bryant, 1991) enquanto que Scrib pertence à subfamília LAP (Bilder *et al.*, 2000, Bilder e Perrimon, 2000b). Lgl é uma proteína com repetições WD40 (Mechler *et al.*, 1985), capaz de ligar ao dímero aPKC/Par6 (Yamanaka *et al.*, 2003) de forma mutuamente exclusiva de Par3. Quando associado a Lgl, o complexo da aPKC encontra-se inactivo. É necessário que aPKC fosforile Lgl para que se possa ligar a Par3 e fique funcionalmente activo. É possível que Lgl seja capaz de inibir o complexo da aPKC, ajudando a definir os domínios membranares complementares (Bilder *et al.*, 2003; Tanentzapf e Tepass, 2003). Adicionalmente, Lgl é capaz de se associar à miosina (Mechler *et al.*, 1985), podendo servir de adaptador entre as JSs/contactos de adesão e o citoesqueleto.

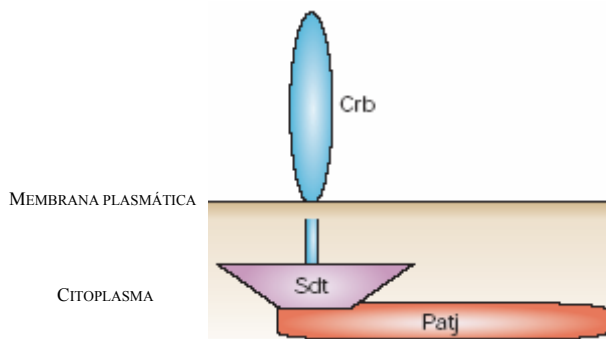
### 3.3.1.e COMPLEXO DE *CRUMBS*

Este complexo ajuda a maturar a identidade apical estabelecida pelo complexo da aPKC, e é importante para a coalescência das JAs (Müller e Wieschaus, 1996, Tepass, 1996). Localiza-se ao nível da ZA e é composto pelas proteínas *Crumbs* (Crb), *Discs lost* (Dlt) e *Stardust* (Sdt) (Müller, 2003; Tepass e Knust, 1993; Tepass *et al.*, 1990) (Figura 14). Patj é o homólogo, em vertebrados, de Dlt.



**Figura 14: Proteínas do complexo de *Crumbs* (Macara, 2004).** Domínios de *Crumbs* (Crb), *Stardust* (Sdt) e Patj (ou Dlt). As linhas mostram interações entre domínios. SH3: homologia com Src – 3. GUK: semelhante à guanilato-cinase. PDZ: PSD-95, *Discs large* e *Zona occludens-1*. A função do domínio U1 é desconhecida, mas necessária para a associação a Par6 (Hurd *et al.*, 2003.) L27: ligação a Lin2/7. MRE: recrutamento de guanilato-cinase associada a membrana. Pals1: proteína associada com Lin7. Patj: proteína das junções apertadas associada a Pals1, homólogo em vertebrados de Dlt.

Crb é uma proteína transmembranar e foi o primeiro elemento a ser identificado, em *Drosophila*, como regulador central de polarização (Tepass e Knust, 1990, Tepass *et al.*, 1990). Esta proteína possui um domínio PDZ responsável pela interação entre Dlt e Sdt (Bachmann *et al.*, 2001, Bhat *et al.*, 1999, Hong *et al.*, 2001, Klebes e Knust, 2000) (Figura 15), para além de interagir com moesina e o citoesqueleto.



**Figura 15: Organização das proteínas do complexo de *Crumbs* na membrana citoplasmática *Crumbs* (Macara, 2004).** *Crumbs* (Crb), *Stardust* (Sdt) e Patj: proteína das junções apertadas associada a Pals1, homólogo em vertebrados de Dlt.

Este complexo interage com o complexo da aPKC, mas não se conhecem interações directas com o complexo do Lgl.

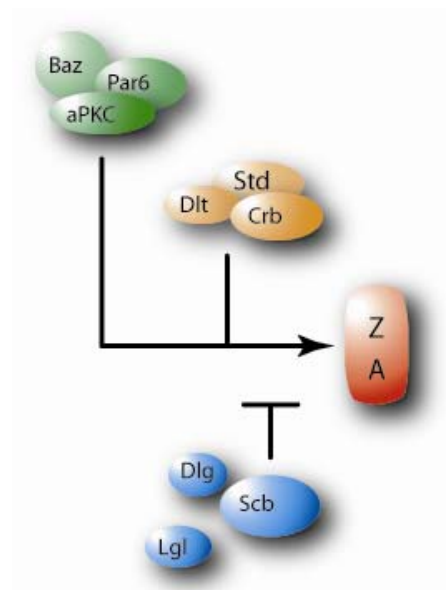
### 3.3.1.f. JUNÇÕES SEPTADAS

As JSs, localizam-se abaixo da ZA e formam uma barreira eficaz na segregação física dos diferentes compartimentos celulares (Carlson *et al.*, 2000).

O complexo do Lgl localiza-se na região correspondente às JSs, mas a localização do complexo de Lgl antecede o estabelecimento das JSs (Matter e Balda, 2003).

### 3.3.1.g. ELABORAÇÃO DA POLARIDADE APICAL-BASAL

Os três complexos de polarização apical basal acima descritos actuam na mesma via para maturar e estabilizar os contactos de adesão iniciados pelos complexos de caderinas-caterinas (Figura 16).



**Figura 16: Modelo de acção dos três complexos de polarização epitelial em *Drosophila*.** Os três complexos aPKC / Par3 (Baz) / Par6, Crb / Dlt / Adt e Lgl / Dlg / Scb) actuam na mesma via para controlar a polaridade apical-basal. O complexo da aPKC regula a definição do domínio apical da membrana, cooperativamente com o complexo de Crb. O complexo do Lgl/Dlg/Scb permite o estabelecimento da identidade basolateral por repressão interactiva do domínio apical. Imagem adaptada de Gibson e Perrimon, 2003.

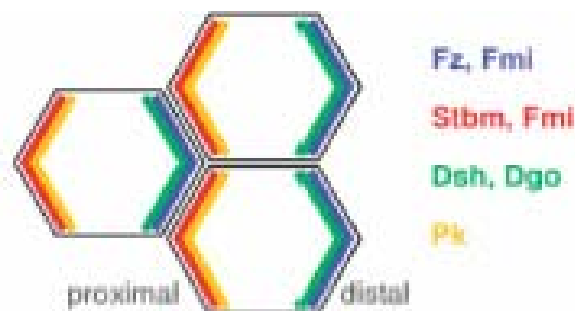
O primeiro complexo de polarização a actuar é o complexo da aPKC. Este associa-se à RSA (região subapical) e promove a estabilização dos locais iniciais de adesão e a definição da identidade apical da membrana (Muller e Wieschaus, 1996; Tepass *et al.*, 2001; Wodarz *et al.*, 2000). Em seguida o complexo do Lgl, localizado basalmente em relação à ZA, interage reprimindo o complexo da aPKC e assim definindo o domínio basolateral da membrana (Bilder *et al.*, 2000; Bilder e Perrimon, 2000; Tepass *et al.*, 2001). Por último, o complexo de Crb, localizado na RSA, reforça a identidade apical da membrana atribuída pelo complexo da aPKC (Bachmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Tepass *et al.*, 2001).

### 3.3.2. POLARIDADE CELULAR PLANAR

A polaridade planar é comum aos organismos multicelulares, coordenando o comportamento celular dentro de um plano (bidimensional) ortogonal em relação ao eixo de polarização apical-basal.

Em *Drosophila*, a Polaridade Celular Planar (PCP) pode ser observada durante a EBG (Keller *et al.*, 2000; Myers *et al.*, 2002a; Wallingford *et al.*, 2002), na organização dos pêlos da asa e na orientação das omatídeas que formam o olho. Mutantes para PCP podem ser facilmente identificados por apresentarem defeitos na orientação padronizada destas estruturas (Gubb e Garcia-Bellido, 1982; Wong e Adler, 1993; Zheng *et al.*, 1995; Wolff e Rubin, 1998).

O estabelecimento e regulação da PCP, ocorre através de uma via canónica altamente conservada, que envolve o receptor transmembranar *frizzled* (Fz) (Axelrod e McNeill, 2002; Mlodzik, 2002). Fz actua na sinalização Wingless (Wnt), mas funciona independentemente na sinalização PCP (Strutt e Strutt, 2005; Lawrence *et al.*, 2002). O núcleo de sinalização PCP é formado pelas proteínas membranares Fz, *Strabismus* (Stbm, ou *Van Gogh*, Van) (Taylor *et al.*, 1998; Wolff e Rubin, 1998) e *Flamingo* (Fmi, ou *Starry night*) (Chae *et al.*, 1999; Usui *et al.*, 1999), e as proteínas citoplasmáticas *Dishevelled* (Dsh), *Prickle* (Pk) e *Diego* (Dgo) (Feiguin *et al.*, 2001; Gubb e Garcia-Bellido, 1982; Wong e Adler, 1993). A localização assimétrica destas proteínas é essencial para a PCP (Figura 17) e é estabelecida pelo transporte direccionado de Fz pelos microtúbulos.



**Figura 17: A localização assimétrica das proteínas centrais em polaridade planar é essencial para a PCP (Strutt e Strutt, 2005).** O exemplo aqui mostrado corresponde ao epitélio da asa, em *Drosophila melanogaster*.

Paralelamente, a actividade conjunta das seis proteínas é necessária para a PCP (Strutt, 2002). Enquanto este núcleo de seis proteínas está relacionado com a elaboração e execução da PCP, o par de proteínas *fat* (Ft) e *dachsous* (Ds) está relacionado com a sinalização global de polarização ao longo do tecido epitelial (Strutt e Strutt, 2005).

## 4. OBJECTIVOS

Neste trabalho pretendemos estudar os mecanismos envolvidos na regulação de estruturas epiteliais, usando uma abordagem genética.

Tirámos partido de um *screen* materno feito no laboratório da Dra. Ruth Lehman (NYU, USA), para o braço direito do segundo cromossoma (2R). Deste *screen* foram inicialmente isolados seis grupos de complementação e 28 mutantes *singleton*, com defeitos na formação do soma e da cutícula embrionária. Já foram identificados cinco dos seis grupos de complementação, e as funções dos genes associados envolvem ciclo celular (*san / atado*), regulação do citoesqueleto (*scraps*) e adesão intercelular/polaridade (*RhoGEF2, DaPKC*). Com o isolamento desta última classe ficámos confiantes de que no *screen* materno foram isolados os nossos mutantes de interesse e decidimo-nos focar na nossa colecção de *singletons*. Dado o elevado número de mutantes disponíveis, analisar individualmente cada um seria extremamente moroso. Para rapidamente identificarmos os melhores candidatos combinámos 1) um *screen* em epitélio adulto, com 2) uma análise de complementação. Os mutantes seleccionados foram fenotipicamente caracterizados e a sua localização associada ao menor intervalo citológico possível.

Esperamos com este trabalho compreender melhor os mecanismos envolvidos na formação, integridade e morfogénese epitelial.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. SCREEN MATERNO 2R

Para identificarmos novos genes, ou novas funções de genes conhecidos, envolvidos na celularização da blastoderme, gerámos quimicamente uma colecção de mutantes no braço direito do segundo cromossoma (*screen 2R*<sup>1</sup>) de *Drosophila melanogaster* (estirpe OregonR, com um elemento-p inserido no braço direito do segundo cromossoma: P[FRT 42B; mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B]). A mutagénese foi induzida utilizando o agente etilmetanosulfonato (EMS).

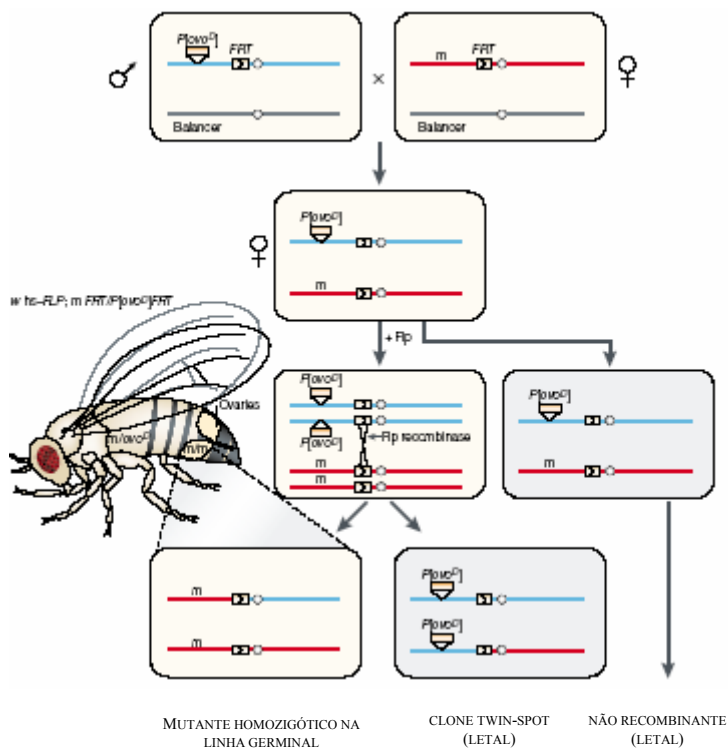
As linhas mutantes obtidas foram balanceadas com *Curly of Oyster* (CyO), que possui o marcador dominante *curly* (Cy), e apenas mantivemos os mutantes que são homozigóticos letais ou estéreis.

Para seleccionarmos as mutações usámos o sistema FRT/ovo<sup>D</sup> (Chou e Perrimon, 1996) (Figura 18). Este método baseia-se na selecção pelo ovo<sup>D</sup>. A mutação ovo<sup>D</sup> é dominante e bloqueia a oogénese. As regiões FRT são locais onde é especificamente induzida a recombinação mitótica. A recombinação mitótica é promovida pela acção de uma recombinase (FLP22) cuja actividade é induzida por choque térmico. Apenas os oócitos capazes de perder a mutação ovo<sup>D</sup>, por recombinação específica nas regiões FRT, serão capazes de se desenvolver normalmente. Estes oócitos serão homozigóticos mutantes. Deste modo, as fêmeas do sistema FRT/ovo<sup>D</sup>, que sofreram recombinação mitótica na linha germinal (CLG, clones na linha germinal) irão apenas colocar embriões que são homozigóticos mutantes.

A estirpe OregonR (OR) foi sempre utilizada como controlo genético e fenotípico no decurso deste trabalho, excepto quando especificamente indicado em contrário.

---

<sup>1</sup> O 2R screen foi efectuado no laboratório da Dra. Ruth Lehman (Skirball Institute, NYU, USA). 2R Screen Team: Alexey Arkov, Vítor Barbosa, Frankie Kimm, Prabhat Kunwar, Thomas Marty, Andrew Renault, Hiroko Sano, Hélène Zinszner e Ruth Lehman.



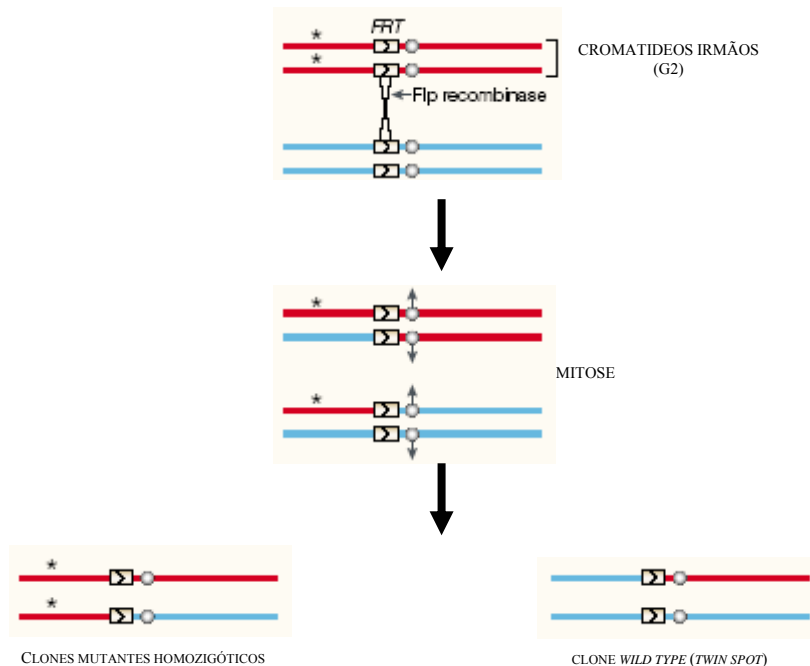
**Figura 18: Recombinação mitótica na linha germinal usando o sistema FRT/ovo<sup>D</sup> (Jonston, 2002).** Os únicos oócitos a se desenvolverem normalmente serão os homozigóticos mutantes (mutantes da linha germinal). Neste esquema ovo<sup>D</sup> está representado como uma mutação dominante, para esterilidade em fêmeas (EF).

No *screen* primário isolámos os embriões mutantes maternos com defeitos na blastoderme celular, mas com linha germinal normal e devidamente localizada no pólo posterior. Destes mutantes, seleccionámos os que apenas os que apresentavam defeitos na secreção de cutícula embrionária.

Ao seleccionarmos mutantes que não apresentam problemas na linha germinal embrionária, esperamos excluir da colecção 2R mutações que levam a problemas de fertilidade ou que induzem graves defeitos nas divisões nucleares. Ao seleccionarmos mutantes com defeitos na cutícula embrionária, esperamos seleccionar mutações relacionadas com a definição do domínio apical da ectoderme (um bom indicador de defeitos na celularização da blastoderme).

## 5.2. SCREEN EM EPITÉLIO ADULTO

Para o *screen* em epitélio adulto utilizámos o sistema de recombinação mitótica FLP/FRT (Golic, 1991), de modo a induzir mosaicos homozigóticos mutantes em moscas heterozigóticas (Figura 19).



**Figura 19: Utilização do sistema FLP/FRT para gerar clones mitóticos.** A recombinação nas regiões FRT ocorre após a replicação do ADN. Os cromatídeos filhos segregam normalmente e as células filhas herdarão duas cópias da região distal ao FRT de um dos pais (adaptado a partir de Golic, 1991).

O princípio deste sistema é semelhante ao acima descrito para gerar CLG, mas neste caso o tecido-alvo da recombinação mitótica não é a linha germinal, mas sim o epitélio larvar em geral.

Nesta análise, cruzámos virgens de cada linha mutante (portadoras das regiões FRT) com machos  $yw$  P[mini- $w^+$ , *hsFLP*]; P[mini- $w^+$ , FRT 42B] [mini- $w^+$ , *ubi-nls-GFP*]/*CyOhshid* (portadores da FLP, no cromossoma X). Os cromossomas P[mini- $w^+$ , *ubi-nls-GFP*]FRT 42B têm um promotor de poliubiquitina, que leva à expressão ubíqua de GFP (*green fluorescent protein*).

A recombinação foi induzida na descendência duas vezes, por choque térmico a 37°C durante uma hora, no segundo e terceiro instar larvar. Observámos à lupa (Leica MZIII, ampliação 10x) as fêmeas adultas recombinantes:  $yw$  Pmini-[mini- $w^+$ , *hsFLP*]; P[mini- $w^+$ , FRT 42B] mini-[ $w^+$ , *ubi-nls-GFP*] /

P[FRT 42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] *mutação*. Como controlo utilizámos os irmãos, por serem geneticamente iguais excepto no facto de não possuírem a recombinase no cromossoma X. Analisámos a frequência e tamanho dos mosaicos em adultos de cada linha mutante. Foram realizados três replicados, cada um com  $n > 100$ .

### 5.3. SCREEN FENÓTIPO EMBRIONÁRIO

Para observarmos embriões homozigóticos mutantes gerámos CLG como descrito anteriormente (ver *screen* materno 2R) (Chou e Perrimon, 1996). Cruzámos moscas heterozigóticas, de cada linha mutante (portadoras das regiões FRT), com machos  $yw$  *hsFLP22*;  $ovo^D$  FRT 42B/*CyO*. Induzimos a recombinação mitótica na descendência por choque térmico, a 37°C durante uma hora, no segundo/terceiro instar larvar. Cruzámos as fêmeas virgens resultantes  $yw$  *hsFLP22*;  $ovo^D$  FRT 42B / P[FRT 42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] *mutação A*, com machos P[FRT 42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] *mutação A/CyO*; e analisámos os embriões resultantes.

### 5.4. COLHEITA E FIXAÇÃO DE EMBRIÕES

Colhemos os embriões homozigóticos mutantes, gerados como acima descritos (colheitas de 4, 5 e 6h). Descorionámos os embriões com lexívia comercial (50%) durante 5 minutos, e em seguida fixámos os embriões usando um de dois processos alternativos: 1) termicamente ou, 2) quimicamente.

1. Fixação Térmica: Submergimos os embriões durante 30 segundos, numa solução salina de Cloreto de Sódio (68nM) em ebulição. Imediatamente a seguir adicionámos o mesmo volume de solução a 4°C; e mantivemos os embriões em gelo durante 5 minutos.

2. Fixação Química: Fixámos os embriões durante 40-60 minutos, em 4 heptano: 0.875 PBS: 0.125 formaldeído a 37%, com ligeira agitação (100rpm).

Após a fixação, e independentemente do processo utilizado, retirámos a membrana vitelina aos embriões. A desvitelinização foi feita por metanol:heptano (1:1), com agitação forte (330rpm) durante 1 minuto. Os embriões foram guardados em metanol e a -20°C até serem analisados.

## 5.5. IMUNOHISTOQUIMICA

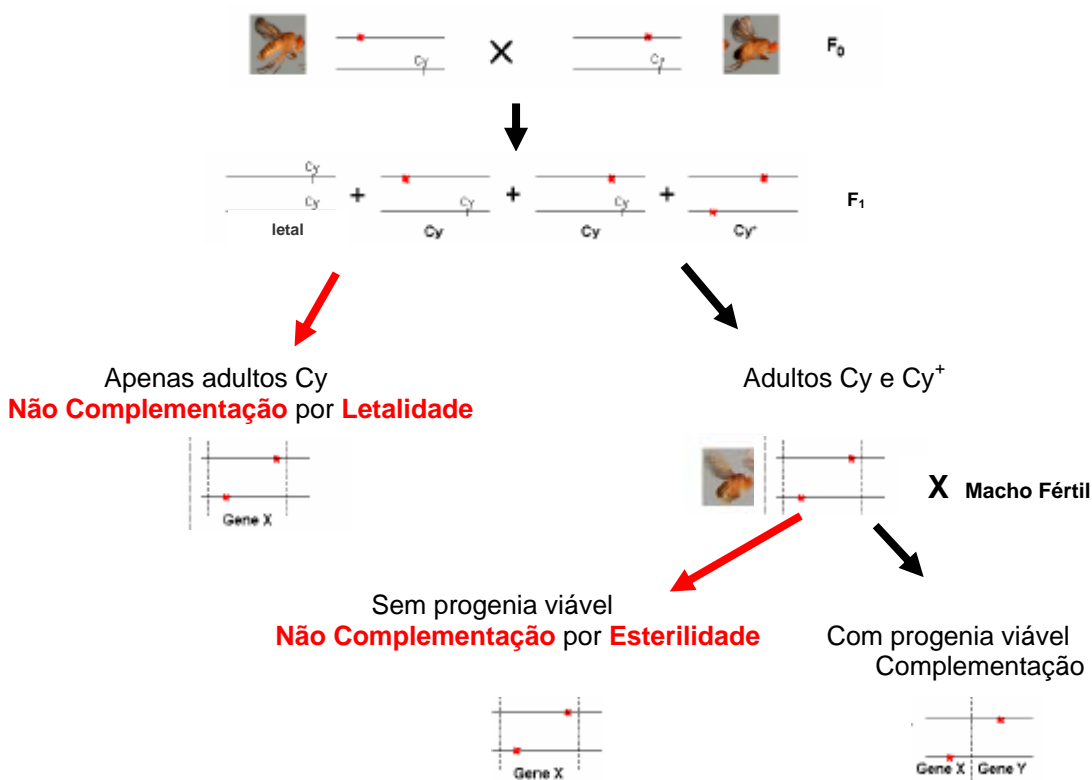
Após rehidratação dos embriões recolhidos como acima descritos, bloqueámo-los durante a noite a 4°C, em BBT (albumina bovina (BSA) 0.1% + soro 1% + Triton X-100 0.1%, em PBS). Em seguida fizemos a incubação com anticorpos (primário e secundário, ambos diluídos em BBT), durante a noite a 4°C. Utilizámos como anticorpos primários anti-*slam* (1:1000) (Stein *et al.*, 2002) e anti-*neurotactin* ( $\alpha$ -NRT) (1:133) (Hibridoma Bank). Como anticorpos secundários utilizámos anticorpos conjugados Cy3 e Cy5 (1:1000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Marcámos o ADN com *OligoGreen* (1:5000 + 5µg/ml de ARNse A) (Molecular Probes, Eugene, OR). Montámos os embriões em Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Inc) e analisámo-los usando o microscópio confocal Leica SP5.

## 5.6. ANÁLISE DE COMPLEMENTAÇÃO

O conceito subjacente a este tipo de análise é, de que uma mutação recessiva de um cromossoma homólogo será compensada (complementada) pelo outro cromossoma homólogo. Contudo, se o outro homólogo tem também ele uma mutação recessiva no mesmo locus, não haverá compensação (não complementação) e observar-se-á o fenótipo mutante.

Os mutantes da coleção 2R podem ter dois fenótipos distintos: letalidade (para além da contribuição materna, a contribuição zigótica do gene mutado também é necessária para a viabilidade) ou esterilidade (apenas a contribuição materna é necessária para a viabilidade).

Para identificarmos possíveis alelos do mesmo gene (grupo de complementação), cruzámos as fêmeas virgens de cada linha mutante com os machos das restantes linhas: P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] *mutação A/CyO* x P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] *mutação B/CyO*. Ao nível da geração F<sub>1</sub> podem: 1) não aparecer descendentes *Cy*<sup>+</sup> (sem *CyO*), possivelmente porque as duas linhas cruzadas são potenciais alelos do mesmo gene – não complementação por letalidade; 2) aparecer moscas *Cy*<sup>+</sup> (n = 10 moscas adultas *Cy*<sup>+</sup>). Caso apareçam adultos *Cy*<sup>+</sup>, estes podem ser: 2a) estéreis, possivelmente porque são potenciais alelos do mesmo gene – não complementação por esterilidade, ou 2b) férteis, indicando que as linha cruzadas não são alélicas para o mesmo gene – complementação genética (Figura 20).



**Figura 20: Esquema representativo da análise de complementação.** Se os  $F_0$  são dois mutantes diferentes, este esquema aplica-se aos testes de complementação. Se o macho *Cy* em  $F_0$  é uma deficiência, este esquema é representativo do mapeamento citológico. \* Representa uma mutação (Imagens de *Drosophila*: retiradas de [http://www.exploratorium.edu/imaging\\_station/creature\\_flies.php](http://www.exploratorium.edu/imaging_station/creature_flies.php)).

Para confirmarmos as linhas mutantes potencialmente alélicas para o mesmo gene, repetimos os cruzamentos mais duas vezes; e fizemos o cruzamento recíproco, repetido três vezes.

## 5.7. MAPEAMENTO CITOLÓGICO

Para mapearmos os mutantes seleccionados a um intervalo citológico 2R utilizámos Kit de Deficiências da *Bloomington* para o braço direito do segundo cromossoma (Df(2R)kit).

Cruzámos as fêmeas virgens das linhas mutantes com os machos do Kit de Deficiências: P[FRT 42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] mutação *A/CyO* x deficiência/*CyO*. Dado que os alelos dos três grupos encontrados não complementaram por letalidade, neste tipo de análise apenas podem ocorrer duas situações na geração  $F_1$ : 1) não aparecem descendentes  $Cy^+$ , possivelmente porque o gene mutado está potencialmente localizado na zona de deleção da deficiência - não complementação por letalidade; 2)

aparecerem descendentes  $Cy^+$  ( $n = 10$  adultos  $Cy^+$ ), porque o gene mutado não se encontra no local de deleção da deficiência – complementação. Confirmámos os resultados de não complementação repetindo os cruzamentos, e o seu recíproco, duas vezes.

Após encontrarmos o menor intervalo citológico possível associado a cada um dos grupos de complementação, cruzámos os mutantes de cada grupo de complementação com alelos dos vários genes contidos nesse intervalo. Com esta abordagem pretendemos identificar o possível gene para o qual cada um dos grupos de complementação é alélico. Para termos a certeza de que identificámos o gene certo teremos que sequenciar ambos os alelos de cada grupo de controlo assim como o alelo do gene candidato com que os grupos foram cruzados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. GENÉTICA FORWARD

#### **6.1.1. SCREEN MATERNO 2R**

**O screen:** Através do *screen* materno 2R identificámos 52 linhas mutantes com defeitos na celularização da blastoderme, mas não na linha germinal embrionária. Das 52 linhas mutantes, 21 não secretam cutícula embrionária e as restantes 31 apresentam cutícula vestigial.

**Grupos de Complementação:** Através de uma análise preliminar das 52 linhas mutantes isoladas obtivemos 6 grupos de complementação (Tabela 1). As linhas de cada grupo de complementação correspondem a mutações diferentes (alelos) no mesmo gene. As restantes 36 linhas, para as quais não foram identificados alelos alternativos, serão doravante designadas por *singleton*.

**Tabela 1: A análise preliminar dos mutantes seleccionados no screen materno permitiu a identificação de 6 grupos de complementação (Ana Rita Marques, Rui Tostões, Tânia Ferreira e Rui Martinho, *informação não publicada*). Quatro dos grupos já foram identificados. Três dos genes estão envolvidos em polaridade/citoesqueleto: RhoGEF2 (grupo 4), DaPKC (grupo 5), Scra (grupo 6). O grupo 2 é alélico de *san*, relacionado com ciclo celular.**

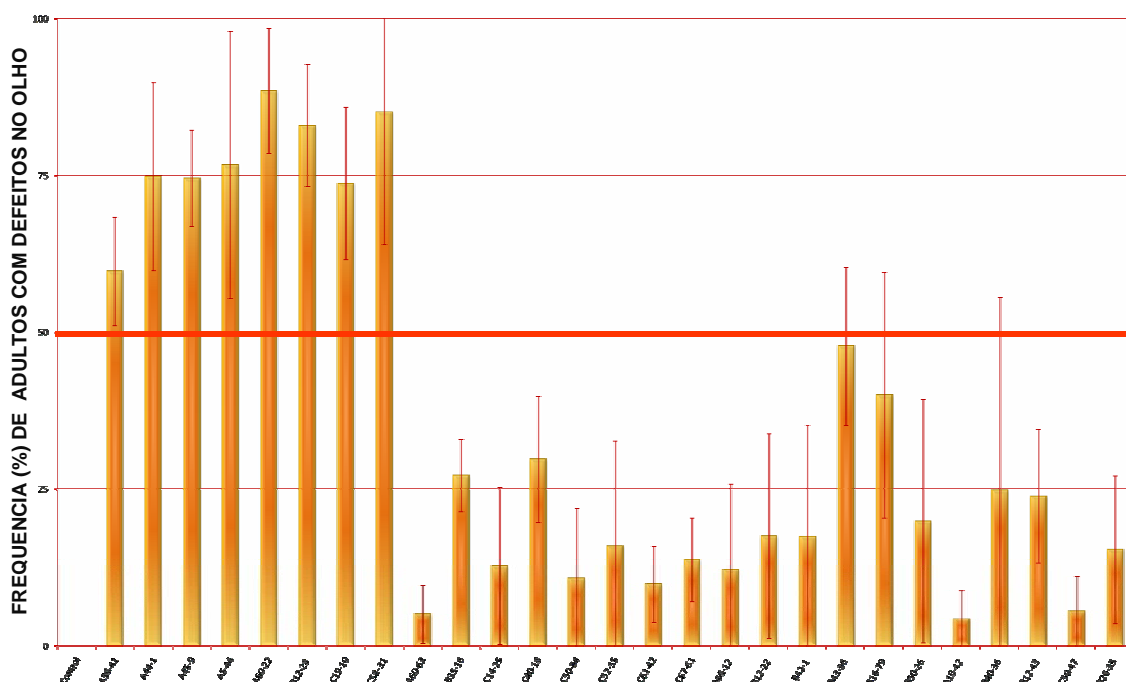
GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO	ALELOS		CUTÍCULA	COMPLEMENTAÇÃO
<b>1</b>	A56-12	1-1	Ausente	Letal
	B12-22	1-2	Ausente	Letal
	B42-1	1-3	Ausente	Letal
	B43-36	1-4	Ausente	Letal
<b>san</b>	B16-79	2-1	Ausente	Letal
	B50-26	2-2	Ausente	Letal
<b>2</b>	A10-42	3-1	Ausente	Estéril
	B16-2	3-2	Ausente	Estéril
	B40-36	3-3	Ausente	Estéril
<b>RhoGEF2</b>	B12-43	4-1	Fragmentada	Letal
	C2-32	4-2	Fragmentada	Letal
	C50-47	4-3	Fragmentada	Letal
<b>DaPKC</b>	C50-20	5-1	Fragmentada	Estéril
	C50-61	5-2	Fragmentada	Estéril
<b>Scraps</b>	B26-35	6-1	Fragmentada	Estéril
	C82-45	6-2	Fragmentada	Estéril

### 6.1.2. SCREEN EM EPITÉLIO ADULTO

O *screen*: Através do sistema de recombinação mitótica FLP / FRT (Golic, 1991), isolámos oito linhas mutantes *singleton* com defeitos na formação do epitélio do olho adulto.

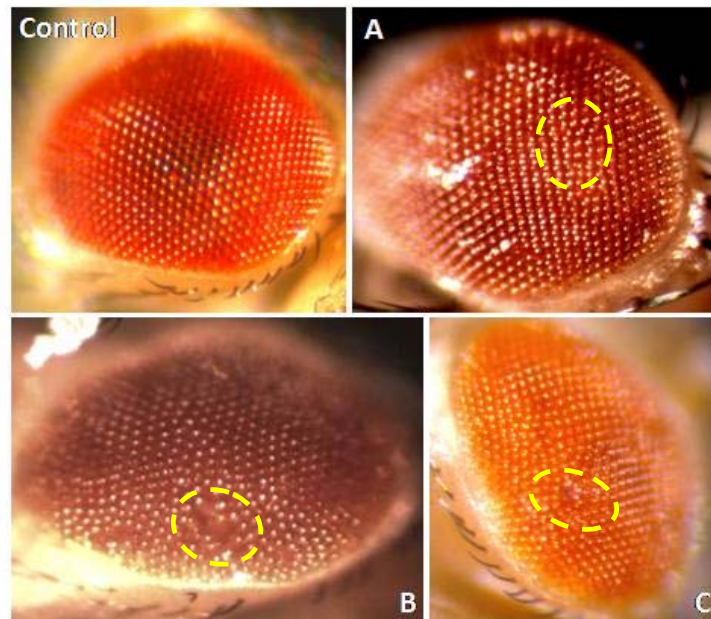
A linha de corte: Definimos como linha de corte defeitos detectáveis no olho adulto em 50% das fêmeas observadas.

O Controlo: Utilizámos como controlo os machos irmãos das fêmeas onde foi induzida a recombinação mitótica por serem geneticamente idênticos excepto o facto de não possuírem recombinase no cromossoma X. No controlo, nunca observámos defeitos no epitélio do olho adulto.



**Figura 21: Screen em epitélio adulto para os mutantes *singleton 2R* – oito linhas apresentam defeitos na formação do epitélio do olho adulto.** Nas ordenadas encontram-se indicados os valores médios obtidos para cada linha mutante (abscissas). Foram realizados menos três replicados para cada linha, cada replicado com  $n > 100$ . As barras verticais indicam o desvio padrão médio. Controlo:  $P[\text{mini-}w^+, \text{FRT } 42\text{B}] [\text{mini-}w^+, \text{ubi-nls-GFP}] / P[\text{FRT } 42\text{B}, \text{mini-}w^+, \text{FRT } 42\text{B}]$  *mutação*. Fêmeas analisadas:  $yw P[\text{mini-}w^+, \text{hsFLP}]; P[\text{mini-}w^+, \text{FRT } 42\text{B}] [\text{mini-}w^+, \text{ubi-nls-GFP}] / P[\text{FRT } 42\text{B}, \text{mini-}w^+, \text{FRT } 42\text{B}]$  *mutação*.

Os fenótipos: Observámos classes variáveis de defeitos no epitélio adulto do olho, quer em frequência quer em intensidade. Considerámos como defeitos a fusão ou perda de omatídeas e a desorganização no seu alinhamento. Estes fenótipos variavam entre mutantes, desde defeitos muito fortes a ligeiros desarranjos.



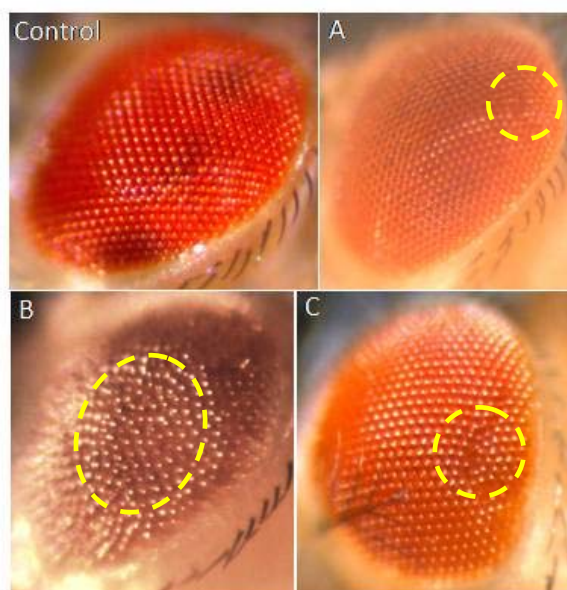
**Figura 22: Oito mutantes *singleton* foram seleccionados com defeitos em epitélio adulto.** Os fenótipos observados variavam entre a falta de omatídeas (B) ou o seu desarranjo (A,C) no contexto do olho adulto. **A)** Fenótipo representativo das linhas A60-22, A45-9, A36-41 e C19-10; **B)** Fenótipo representativo das linhas B12-28 e C58-31; **C)** Fenótipo representativo das linhas A5-44 e A44-1. Controlo: P[mini- $w^+$ , FRT 42B] [mini- $w^+$ , ubi-nls-GFP] / P[FTR42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] *mutação*. **A, B, C:**  $yw$  P[mini- $w^+$ , hsFLP]; P[mini- $w^+$ , FRT 42B] [mini- $w^+$ , ubi-nls-GFP] / P[FRT 42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] *mutação*. Ampliação 10x.

## 6.2. ANÁLISE DE COMPLEMENTAÇÃO DOS MUTANTES *SINGLETON*

**Grupos de Complementação:** A análise mais detalhada das 31 linhas *singletons* permitiu-nos identificar três novos grupos de complementação, cada uma com dois alelos. Todos os grupos não complementaram por letalidade.

**Tabela 2:** Três novos grupos de complementação foram isolados da colecção de *singletons 2R*. Todos os grupos não complementaram por letalidade. Ambos os alelos do grupo 8 (G8) e um dos alelos (B12-28) do grupo 9 (G9) foram seleccionados no *screen* em epitélio adulto. Nenhum dos alelos do grupo 7 (G7) foi seleccionado no *screen* em adulto.

GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO	ALELOS		CUTÍCULA	COMPLEMENTAÇÃO
6	B3-25	1-1	Ausente	Letal
	B35-16	1-2	Fragmentada	Letal
7	A5-44	1-3	Ausente	Letal
	C58-31	1-4	Ausente	Letal
8	A31-11	2-1	Fragmentada	Letal
	B12-28	2-2	Fragmentada	Letal



**Figura 23 :** Dois dos três novos grupos de complementação apresentam defeitos no olho adulto. **A** – Fenótipo representativo do grupo 7. **B** – Fenótipo representativo do grupo 8. **C** – Fenótipo representativo do grupo 9. Controlo: P[mini- $w^+$ , FRT 42B] [mini- $w^+$ , ubi-nls-GFP] / P[FTR42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] *mutação*. **A, B, C:** *yw* P[mini- $w^+$ , hsFLP]; P[mini- $w^+$ , FRT 42B] [mini- $w^+$ , ubi-nls-GFP] / P[FRT 42B, mini- $w^+$ , FRT 42B] *mutação*. Ampliação 10x.

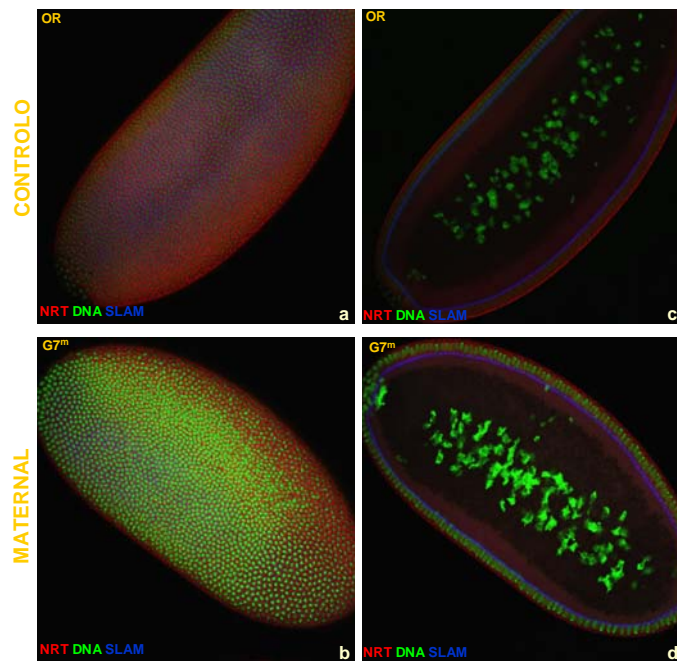
## 6.3. CARACTERIZAÇÃO DOS TRÊS NOVOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO

### 6.3.1. CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO EMBRIONÁRIO

Para caracterizarmos fenotipicamente os embriões homocigóticos mutantes maternos de cada um dos três grupos de complementação utilizamos o sistema de recombinação mitótica FRT / ovo<sup>D</sup> (Chou e Perrimon, 1996). Todas as imagens apresentadas nesta secção podem ser encontradas com maior detalhe no anexo \*\*\*\*\*.

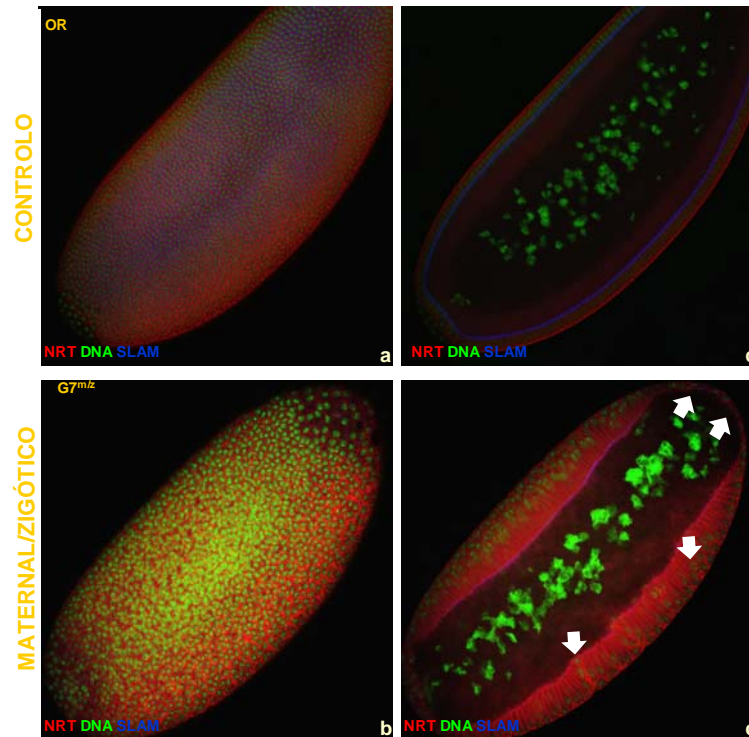
#### 6.3.1.a. GRUPO 7

**Mutantes Maternos:** Os mutantes cuja contribuição materna é homocigótica mutante, mas cuja contribuição paterna não é mutante (mutante materno, G7<sup>m</sup>) estabelecem normalmente o epitélio da blastoderme.



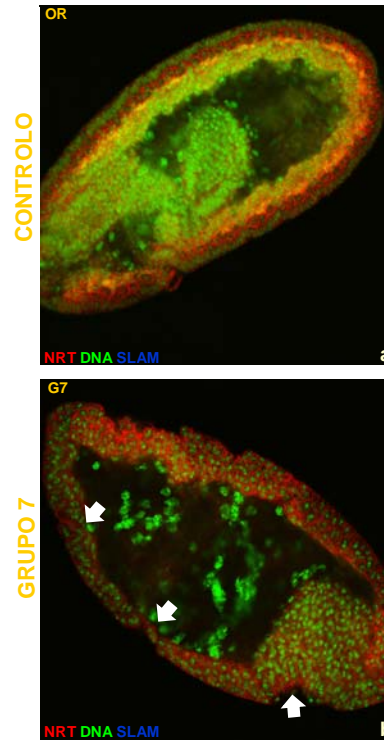
**Figura 24: Embriões mutantes maternos do G7 (G7<sup>m</sup>) formam normalmente o epitélio da blastoderme.** Embriões OregonR (OR) celularizam normalmente (a), e a blastoderme celular resultante está devidamente celularizada (c). Nos mutantes G7<sup>m</sup> (b, d) a formação do epitélio da blastoderme decorre como no controlo. O grupo 7 encontra-se representado aqui pelo alelo B3-25. O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam* (azul). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*.

Mutantes Maternais e Zigóticos: Os embriões cuja contribuição materna é homocigótica mutante e a contribuição zigótica é mutante (mutante materno e zigótico,  $G7^{m/z}$ ) apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos e perdem a organização em monocamada do epitélio da blastoderme.



**Figura 25: Embriões mutantes maternais e zigóticos do G7 ( $G7^{m/z}$ ) apresentam defeitos no epitélio da blastoderme.** Em embriões OR, os núcleos corticais distribuem-se homogeneamente pela superfície do embrião (a) e celularizam normalmente, estabelecendo correctamente a polaridade ao longo do eixo apical-basal (c). Mutantes do  $G7^{m/z}$  apresentam defeitos na distribuição dos núcleos no córtex (b) e no plano do epitélio (d). O grupo 7 encontra-se representado aqui pelo alelo B3-25. O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a frente de celularização por *Slam* (azul) e a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*.

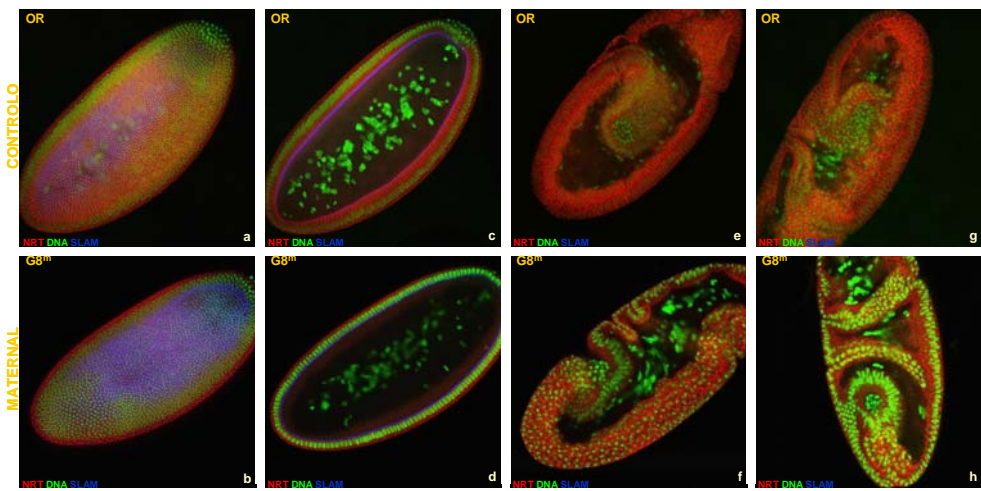
Ambas as classes de embriões deste grupo,  $G7^m$  e  $G7^{m/z}$  não conseguem realizar correctamente o movimento de EBG.



**Figura 26: Embriões mutantes maternos e mutantes maternos - zigóticos do G7 ( $G7^m$  e  $G7^{m/z}$ ) não conseguem realizar o movimento de EBG.** Quando estes embriões tentam fazer os movimentos de EBG, perdem a morfologia epitelial da ectoderme (b), ao contrário dos embriões de controlo (a). O grupo 7 encontra-se representado aqui pelo alelo B3-25. O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a frente de celularização por *Slam* (azul) e a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*.

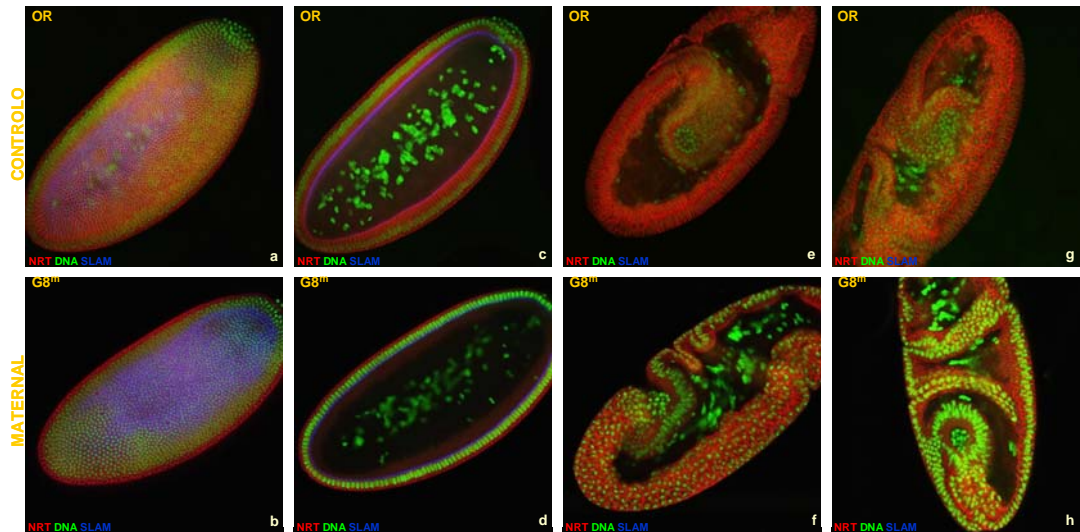
### 6.3.1.b. GRUPO 8

**Mutantes Maternais:** Os mutantes  $G8^m$  desenvolvem-se normalmente, apesar de não eclodirem nem conseguirem secretar a cutícula embrionária.



**Figura 27: Embriões mutantes maternais do G8 ( $G8^m$ ) são fenotipicamente normais ao longo do desenvolvimento embrionário.** Embriões  $G8^m$  celularizam e estabelecem polaridade apical-basal normalmente (**b, d**), como os embriões de controlo (**a, c**). Posteriormente, executam normalmente os movimentos de EBG (**f**) e gastrulam sem defeitos detectáveis (**h**); tal como ocorre nos embriões de controlo (**e, g**). O grupo 8 encontra-se representado aqui pelo alelo C58-31. O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam* (azul). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*.

**Mutantes Maternais e Zigóticos:** Os embriões  $G8^{m/z}$  apresentam defeitos na distribuição cortical dos núcleos da blastoderme. Nestes mutantes o epitélio da blastoderme encontra-se fragmentado e podem ser observadas células multinucleadas, e regiões desprovidas de núcleos. Apesar dos severos defeitos na blastoderme, estes embriões tentam gastrular, sem sucesso, e a estrutura da ectoderme acaba por colapsar. Nestes embriões é frequente encontrar acumulações de *slam*, em fases do desenvolvimento embrionário onde esta proteína já não deveria estar presente.

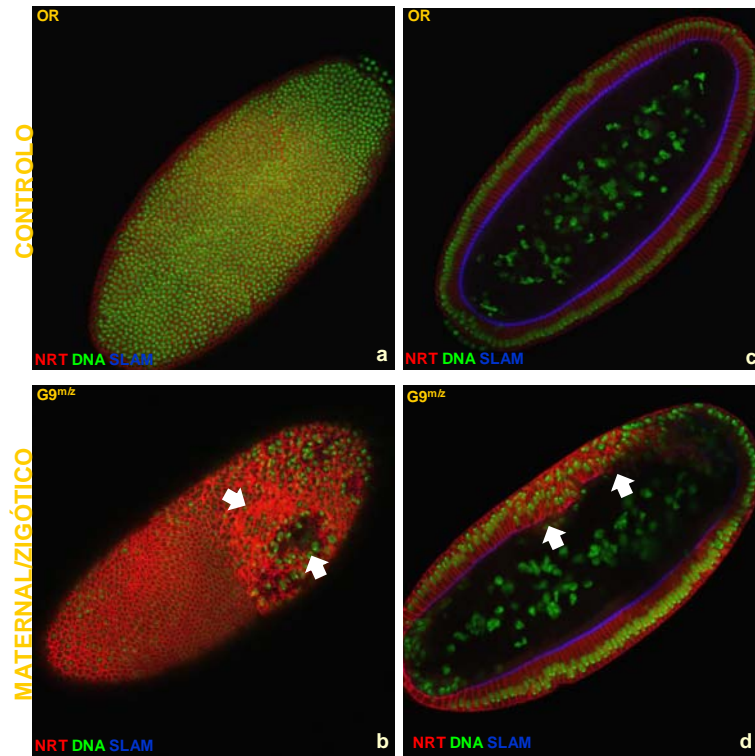


**Figura 28: Embriões mutantes maternais e zigóticos do G8 ( $G8^{m/z}$ ) têm assimetrias na distribuição cortical dos núcleos e o epitélio da blastoderme fragmentado.** Embriões OR iniciam o processo de celularização através de invaginações da membrana (*furrow canals*) que envolvem os núcleos corticais ao mesmo tempo que se estabelece o eixo de polarização apical-basal (**a, c**). Embriões  $G8^{m/z}$  apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos (**b**), e apesar de haver a invaginação das membranas (marcada por NRT) o epitélio resultante é fragmentado (**d**). Mais tarde, estes embriões tentam iniciar os movimentos de EBG, mas ao contrário do controlo (**e, g**) a ectoderme acaba por colapsar e perder integridade (**f, h**). A marcação por *slam* persiste até mais tarde nestes embriões (**h**) em relação ao controlo (**g**). O grupo 8 encontra-se representado aqui pelo alelo C58-31. O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a frente de celularização por *Slam* (azul) e a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*.

### 6.3.1.c. GRUPO 9

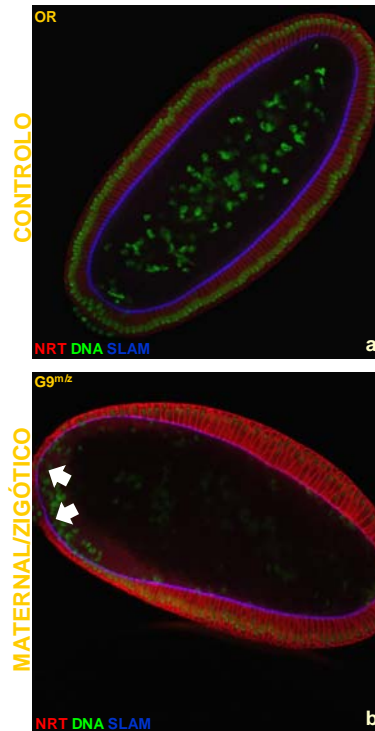
**Mutantes Maternais:** À semelhança dos mutantes maternais do G7, embriões  $G9^m$  conseguem estabelecer normalmente o epitélio da blastoderme (imagens não apresentadas).

**Mutantes Maternais e Zigóticos:** Os embriões  $G9^{m/z}$  apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos, e nos locais onde estes núcleos estão ausentes existe uma excessiva acumulação de *slam*.



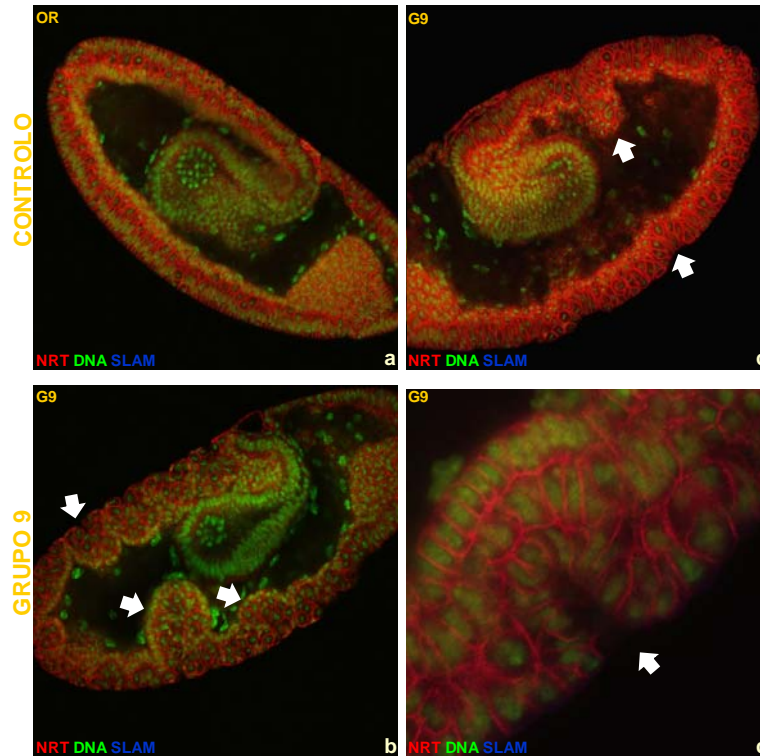
**Figura 29: Embriões mutantes maternos e zigóticos do G9 ( $G9^{m/z}$ ) apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos.** Durante a celularização da blastoderme, existem falhas na distribuição dos núcleos e na formação de nova membrana (falha de NRT, **b**) que nunca acontecem no controlo (**a**). Dentro do plano do epitélio primário, os núcleos distribuem-se a vários níveis dentro das células (**d**) em vez de apicalmente (**c**), e pode haver a perda local da estrutura em monocamada do epitélio (**d**). O grupo 9 está aqui representado pelo alelo A31-11. O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam*. (azul). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] A31-11*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] A31-11*.

Mesmo quando a integridade epitelial não está comprometida nestes embriões, a organização em monocamada pode ser localmente perdida e os núcleos distribuem-se a vários níveis dentro do plano do epitélio.



**Figura 30: Embriões mutantes maternos e zigóticos do G9 ( $G9^{m/z}$ ), conseguem formar o epitélio da blastoderme apesar das assimetrias nucleares.** Apesar dos defeitos na distribuição nuclear, alguns dos mutantes  $G9^m$  conseguem formar um epitélio da blastoderme (b), morfologicamente equivalente ao do controle (a). O grupo 9 encontra-se aqui representado pelo alelo B12-28. O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam*. (azul). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B12-28*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B12-28*.

Ambas as classes de embriões ( $G9^m$  e  $G9^{m/z}$ ) conseguem executar os movimentos de EBG, apesar de se observarem na ectoderme invaginações ao longo de todo o perímetro do embrião.



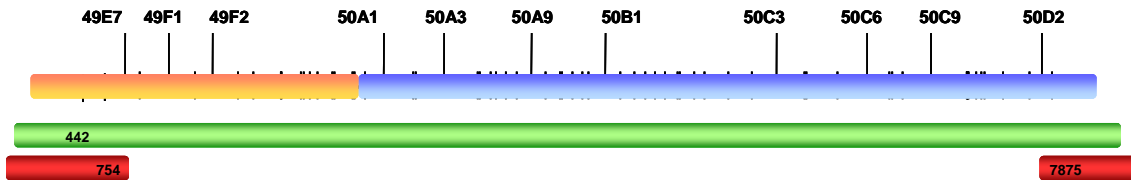
**Figura 31: Embriões mutantes maternos e mutantes maternos zigóticos do G9 ( $G9^m$  e  $G9^{m/z}$ ), conseguem executar normalmente o movimento de EBG, mas apresentam invaginações na ectoderme.** Os movimentos de EBG decorrem nestes embriões normalmente (b, d) tal como nos embriões de controlo (a, c). Contudo, durante o movimento de EBG a ectoderme apresenta invaginações. Pormenor de uma invaginação da ectoderme representada em e. O grupo 9 encontra-se aqui representado pelo alelo A31-11 (b) e B12-28 (d, e). O ADN está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam*. (azul). Ampliação 40x 1x (a-d), e 63x 4x (e). Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B12-28*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B12-28*.

### 6.3.2. MAPEAMENTO CITOLÓGICO

Para associarmos a cada grupo de complementação um intervalo citológico, utilizámos 44 deficiências abrangendo toda a região 2R.

### 6.3.2.a GRUPO 7

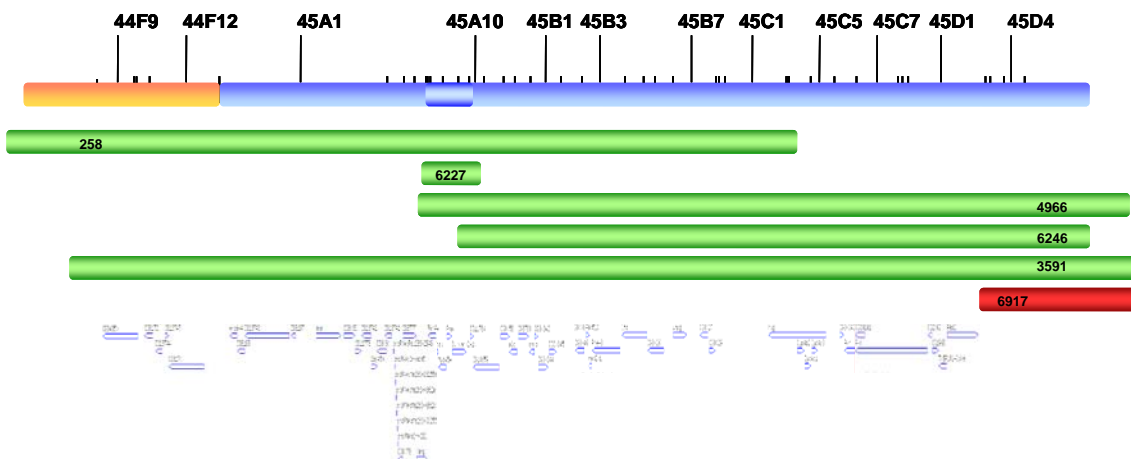
Cruzando ambos os alelos com os machos heterozigóticos das deficiências conseguimos mapear o gene associado ao grupo 7 à região 2R: 49E7 - 50D2.



**Figura 32: Mapeamento citológico do grupo 7.** A deficiência 442 (Df(2R)CX1/CyO) não complementa (verde) ambos os alelos do grupo. As deficiências 754 (Df(2R)vg-C/CyO) e 7875 (Df(2R)Excel7130) complementam (vermelho) ambos os alelos do grupo. A sobreposição destas deficiências determina o intervalo citológico do grupo 7, na região 2R: 49C1-50D2. A amarelo está indicada parte da região 49 e a azul parte da região 50 do braço direito do segundo cromossoma.

### 6.3.2.b. GRUPO 8

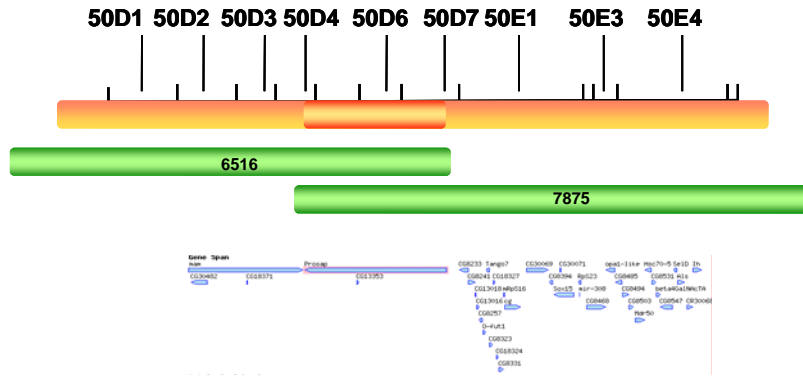
Cruzando ambos os alelos com os machos heterozigóticos das deficiências conseguimos mapear o gene associado ao grupo 8 à região 2R: 45A6 a 45A9.



**Figura 33: Mapeamento citológico do grupo 8.** As deficiências 258 (Df(2R)Np3/CyO), 6246 (Df(2R)w73-1/CyO), 3591 (Df(2R)Np5/CyO), 6227 (Df(2R)G53/CyO) e, 4966 (Df(2R)w45-30n/CyO) não complementam (verde) ambos os alelos do grupo. A deficiência 6917 (Df(2R)BSC29/CyO) complementa (vermelho) ambos os alelos do grupo. A sobreposição destas deficiências determina o intervalo citológico do grupo na região 2R: 45A6-45A9. No painel inferior encontram-se indicados os genes associados ao intervalo determinado, e regiões adjacentes. A amarelo está indicada parte da região 44 e a azul parte da região 45 do braço direito do segundo cromossoma.

### 6.3.2.c. GRUPO 9

Cruzando ambos os alelos com os machos heterozigóticos das deficiências conseguimos mapear o gene associado ao grupo 9 à região 2R: 50D4 a 50D7.



**Figura 34: Mapeamento citológico do grupo 9.** As deficiências 6516 (Df(2R)BSC18/SM6a) e 7875 (Df(2R)Exel7130/CyO) não complementam (verde) ambos os alelos do grupo. A sobreposição destas deficiências determina o intervalo citológico do grupo 9 na região 2R: 50D4-50D79. No painel inferior estão indicados os genes associados ao intervalo determinado, e regiões adjacentes. A amarelo está indicada parte da região 50 do braço direito do segundo cromossoma.

## 7. DISCUSSÃO

Durante o normal desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster* ocorrem eventos de formação, regulação e morfogênese epitelial. Após fertilização do oócito ocorrem 14 divisões nucleares, e o embrião sincicial resultante irá sofrer um processo de celularização onde são formadas *de novo* 6000 células epiteliais, devidamente polarizadas. Este epitélio primário irá posteriormente originar as três camadas germinais do embrião. Mais tarde no desenvolvimento, vários órgãos adultos são formados a partir da diferenciação e morfogênese do epitélio dos discos imaginários larvares.

## 7.1. PORQUÊ TRABALHAR COM A COLECCÃO DE *SINGLETONS*?

Neste trabalho queremos seleccionar de entre os *singletons*, os que pertencem à classe de polaridade/adesão. Para além de genes relacionados com a regulação de polaridade e/ou adesão; os *singletons* podem pertencer a classes de genes cuja função está relacionada com o ciclo celular, migração nuclear ou transcrição. Isto porque, para a formação do epitélio primário, é essencial que ocorram normalmente: 1) as divisões nucleares e a migração dos núcleos para o córtex (migração nuclear), 2) a activação da transcrição zigótica (TMZ, transição materno-zigótica) 3) a celularização e polarização da blastoderme (polaridade/adesão/citoesqueleto). Se algum destes eventos falhar, a formação e morfogénese do epitélio primário será afectada.

Neste trabalho partimos de um *screen* materno 2R onde foram independentemente isolados seis grupos de complementação e 31 mutantes *singleton*, com defeitos na formação do soma embrionário e na segregação de cutícula embrionária. A análise preliminar destes 6 grupos de complementação (Tabela 1) permitiu-nos identificar dois genes cuja função está relacionada com o estabelecimento de polaridade e contactos intercelulares (*RhoGEF2* e *aPKC*) e um gene (*scraps*) cuja função está relacionada com a regulação do citoesqueleto de actina (*anilina*). O isolamento destes genes deu-nos confiança de que no *screen* materno primário foram isolados os nossos mutantes de interesse, envolvidos na formação e morfogénese de células epiteliais.

Com estes resultados preliminares, decidimos analisar os mutantes *singletons* da colecção 2R. Nestes mutantes esperamos mesmo que haja um enriquecimento da classe relacionada com polaridade/adesão e regulação do citoesqueleto. Mutantes de polaridade têm, de forma geral, fenótipos embrionários subtis; pelo que facilmente podemos ter perdido alelos hipomorfos desta classe durante o *screen* materno primário. De entre os 6 grupos de complementação já identificados (Tabela 1), os que têm o fenótipo de cutícula mais fraco (cutícula fragmentada) correspondem a mutantes de polaridade/adesão, em oposição aos mutantes de ciclo celular que não conseguiam sequer secretar a cutícula embrionária.

## 7.2. PROBLEMAS ASSOCIADOS AO TRABALHO COM *SINGLETONS*.

Quando a mutagénese foi induzida, foram provavelmente geradas mutações em mais que um locus, em cada cromossoma. É por isso possível que na nossa colecção 2R existam mutantes com mais que uma mutação letal no cromossoma 2R. Como o mapeamento foi feito através de letalidade zigótica, podemos correr o risco de que a mutação mapeada seja uma mutação secundária, e não a nossa de interesse. A

utilização de grupos de complementação, onde temos disponíveis mais que um alelo para um determinado gene, ajuda-nos a identificar a mutação que é funcionalmente relevante para o fenótipo embrionário; uma vez que a probabilidade de dois alelos independentes do mesmo grupo de complementação (mutações responsáveis pelo fenótipo) terem uma mutação secundária letal (não relacionada com o fenótipo) no mesmo locus é extremamente baixa. A análise através de grupos de complementação permite assim minimizar a possibilidade de ter resultados positivos falsos durante o mapeamento, assim como nos permite ter replicados experimentais com os dois alelos diferentes.

Neste trabalho, assumimos que os grupos de complementação correspondem a alelos para um mesmo gene. Contudo, não podemos excluir o facto de alelos para diferentes genes poderem ser associados no mesmo grupo de complementação. Tal ocorre quando existe uma interacção genética dominante entre as duas mutações de loci diferentes, que seja responsável pela letalidade associada aos transheterozigóticos. Apesar de ser possível agrupar mutantes letais não alélicos no mesmo grupo, este fenómeno de interacção genética dominante é extremamente raro.

Quando trabalhamos com *singletons* não temos disponíveis vários alelos independentes para o mesmo gene, pelo que não conseguimos identificar facilmente as mutações secundárias letais associadas. Contudo, como não observámos mutações secundárias letais durante o mapeamento dos 16 alelos associados aos 6 grupos de complementação já mapeados, estamos confiantes de que na nossa colecção de *singletons* 2R é pouco provável ocorrerem mutações secundárias letais.

### 7.3. ABORDAGEM AOS MUTANTES SINGLETONS

Uma vez que caracterizar todos os 28 *singletons* seria extremamente moroso, combinámos duas abordagens distintas mas complementares, para identificar os melhores mutantes potencialmente relacionados com a integridade epitelial: 1) *screen* para defeitos em epitélio adulto e 2) análise de complementação.

Durante a celularização da blastoderme em *Drosophila melanogaster*, alguns dos genes envolvidos desempenham funções exclusivamente nesta fase do desenvolvimento, e não estão envolvidos em posteriores eventos de remodelação e regulação epitelial. Como estamos interessados em estudar genes cuja função é conservada ao longo do desenvolvimento, decidimos analisar os nossos mutantes para defeitos no epitélio adulto. Mutantes que apresentem fenótipos durante o desenvolvimento embrionário e em epitélio adulto estão possivelmente associados a funções conservadas na formação e morfogénese

epitelial. Os principais complexos envolvidos em polaridade e adesão celular estão altamente conservados nos eucariotas, e a análise dos grupos de complementação já isolados permitiu-nos identificar mutantes para a aPKC e RhoGEF2 (Tabela 1). Esperamos assim, que ao seleccionarmos mutantes cuja função não é específica da celularização da blastoderme mas sim conservada ao longo do desenvolvimento, estar a seleccionar os *singletons* cuja função é conservada não só em *Drosophila melanogaster*, mas sim num grupo mais abrangente de organismos.

Como já discutimos anteriormente, trabalhar com alelos únicos acarreta sempre um grau de incerteza quanto à possibilidade de existirem mutações secundárias letais. Para tentarmos contornar estas dificuldades, iremos testar a nossa colecção de *singletons* para complementação. Adicionalmente, se um gene é isolado múltiplas vezes e de forma independente no mesmo *screen*, isto poderá indicar que a sua função é provavelmente importante para o sistema.

## 7.4. IDENTIFICAÇÃO DOS MUTANTES CANDIDATOS

### **7.4.1. SCREEN EM EPITÉLIO ADULTO**

Através do *screen* em adulto (Figura 21) identificámos oito mutantes com defeitos na formação do olho ( $n > 300$ , para cada uma das 36 linhas). A intensidade dos defeitos observados variava (Figura 22) de acordo com o alelo (desde fusão de omatídeas à desorganização global do olho). Quando existem dois alelos para um mesmo gene, os mutantes com um fenótipo mais forte correspondem provavelmente a alelos fortes. Inversamente, os mutantes com fenótipos mais fracos correspondem provavelmente a alelos hipomorfos. Quando efectuámos esta análise usámos também os alelos fortes dos grupos de complementação alélicos para San (G2, envolvido em ciclo celular); RhoGEF2 (G4), DaPKC (G5) e Scraps (G6), envolvidos em polaridade/adesão celular e regulação do citoesqueleto. Raramente observámos defeitos nos mutantes para San, e quando observávamos eram sempre pequenos. Inversamente, nos restantes mutantes observávamos sempre um grande número de adultos com defeitos ( $> 50\%$ ) e os clones eram sempre grandes (informação não apresentada). Isto é consistente com a hipótese que os mutantes de ciclo celular devem ter um fenótipo mais subtil em contexto clonal, pois existem mecanismos de morte celular e compensação celular que eliminam as células mutantes do epitélio. Contudo, esta relação poderá não ser linear pois alguns mutantes de polarização, quando em contexto

clonal, sofrem igualmente extrusão do domínio epitelial (por exemplo, mutantes de *baz*) não sendo posteriormente detectados defeitos na estrutura epitelial adulta.

Apesar de apenas apresentarmos resultados para o olho adulto, a nossa análise também recaiu sobre outros tecidos epiteliais (tórax, abdómen e asas). Contudo, nestes casos, os grupos de controlo eram fenotipicamente muito variáveis, e não foi possível definir o padrão do controlo de forma objectiva. Por este motivo focámo-nos apenas nos resultados obtidos para o olho, ainda que mais tarde possamos voltar a analisar outros tecidos, caso seja relevante para o mutante em questão.

#### **7.4.2. ANÁLISE DE COMPLEMENTAÇÃO**

Para contornarmos os problemas associados à utilização de *singletons*, decidimos testar para complementação a colecção de *singletons* 2R disponível. Testámos estes mutantes entre si e com os alelos fortes dos seis grupos de complementação isolados.

Com esta abordagem identificámos três novos grupos de complementação (Tabela 2) (G7, G8 e G9), cada com dois alelos. O G7 inclui os alelos B3-25 (7-1) e B35-16 (7-2). O G8 os alelos A5-44 (8-1) e C58-31 (8-2). O G9 os alelos A31-11 (9-1) e B12-28 (9-2). Identificámos ainda o mutante A60-22 como alélico do gene *scraps*. Um dos grupos de previamente identificados (grupo 6) é igualmente alélico deste gene.

#### **7.4.3. SOBREPOSIÇÃO DAS ABORDAGENS**

Surpreendentemente, três dos mutantes seleccionados no *screen* em epitélio adulto correspondem a alelos de dois dos novos grupos de complementação (Tabela 2, Figura 21 e 23): A5-44 (8-1), C58-31 (8-2) e B12-28 (9-2). Adicionalmente, o alelo A60-22, igualmente seleccionado no *screen* em epitélio adulto, corresponde ao terceiro alelo (6-3) do grupo de complementação inicialmente identificado como alélico do gene *scraps*. *Scraps* codifica para a anilina, que interage tanto com a actina como os microtúbulos; e mutantes para este gene têm problemas na celularização e morfogénese epitelial (Field *et al.*, 2005). A selecção deste gene indicou-nos que a nossa estratégia para seleccionar mutantes de polarização/adesão/citoesqueleto, foi bem sucedida.

## 7.5. CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DOS TRÊS NOVOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO

Dois dos novos grupos de complementação (G8 e G9) contêm mutantes seleccionados no *screen* em epitélio adulto. Nenhum dos alelos do G7 foram seleccionados nesta análise.

Como isolámos os mesmos mutantes por complementação e no *screen* adulto, decidimos continuar o nosso estudo focando-nos principalmente nestes mutantes, mas também avançar com a análise do G7 (independentemente do resultado em adulto).

A análise de embriões cuja contribuição materna e zigótica são mutantes permitiu-nos detectar defeitos epiteliais em todos os grupos de complementação. Estes resultados indicaram-nos que a nossa abordagem foi bem sucedida, e que conseguimos isolar genes cuja função no epitélio é conservada.

Todos os embriões que analisámos têm contribuição materna homozigótica mutante. O que é variável é a contribuição paterna. Como cruzámos as virgens recombinantes para a linha germinal com machos heterozigóticos mutantes, metade dos embriões irão ter contribuição zigótica mutante e a outra metade dos embriões irão ter contribuição zigótica selvagem. Metade dos embriões são homozigóticos mutantes maternos e mutantes zigóticos (mutantes maternos e zigóticos), enquanto a outra metade será apenas homozigótica mutante materna (mutantes maternos).

### **7.5.1. GRUPO 7**

Quando analisámos os embriões colhidos para este grupo, observámos que estes se distribuíam equitativamente entre duas classes fenóticas distintas (Figura 24 e 25): classe 1) os embriões que celularizam normalmente como os embriões de controlo; classe 2) os embriões que apresentam assimetrias nos núcleos corticais e cujo epitélio da blastoderme perde localmente a típica estrutura em monocamada. Nenhuma destas classes de embriões consegue executar normalmente os movimentos de EBG (Figura 26). Com base nestes resultados, achamos ser provável que o gene afectado neste grupo também desempenha uma função zigótica, o que explicaria as duas classes observadas. A classe 1 corresponderia aos mutantes maternos, onde a contribuição zigótica pode ser suficiente para complementar o fenótipo da celularização. A classe 2 corresponderia a mutantes maternos e zigóticos.

Apesar dos defeitos observados nos mutantes maternos e zigóticos (Figura 25) ao nível da distribuição cortical dos núcleos, estes parecem conseguir iniciar o processo de invaginação das membranas durante a celularização e adicionar novo material para o prosseguimento da invaginação (como podemos constatar pela presença e distribuição de NRT). Estes embriões conseguem celularizar, ainda que anormalmente, mas quando iniciam os movimentos de EBG perdem a estrutura epitelial da ectoderme (Figura 26).

A nossa hipótese é que, possivelmente, estes embriões não conseguem efectuar a EBG devido aos defeitos observados na blastoderme celular. É necessário que o epitélio primário se forme normalmente para que se possam efectuar os movimentos de intercalação inerentes à EBG. Os problemas que estes mutantes exibem na celularização da blastoderme poderão comprometer os posteriores movimentos de extensão e intercalação.

Como já dissemos anteriormente, é possível que o gene afectado nestes mutantes desempenhe funções zigóticas, apesar de o início do desenvolvimento embrionário e celularização da blastoderme ser maioritariamente controlado por genes maternos. É possível que o gene associado ao G7 seja zigoticamente expresso durante a celularização, tal como acontece com o *slam*, que é um gene cuja contribuição zigótica é essencial durante o decurso da celularização.

Para detectarmos qual o fenótipo embrionário associado aos mutantes deste grupo teremos que usar outros marcadores de membrana e adesão celular. Dado que o fenótipo primário está possivelmente associado ao fenómeno de celularização da blastoderme, teremos igualmente que efectuar colheitas de embriões mais curtas (2-3h) para que estejam enriquecidas em embriões a celularizar.

Paralelamente, apesar de não termos detectado defeitos na blastoderme dos embriões maternos, estes embriões não eclodem nem secretam cutícula embrionária. É possível que estes embriões apresentem fenótipos muito subtis que não conseguimos detectar com as marcações que usámos. Teremos por isso que usar marcadores alternativos para proteínas de membrana/adesão (ex.  $\alpha$ -Lgl,  $\alpha$ -Crb,  $\alpha$ -DE-Cad,  $\alpha$ -laminina) e citoesqueleto (ex.  $\alpha$ -actina,  $\alpha$ -tubulina). Para podermos definir qual o fenótipo estritamente materno associado a estes mutantes, iremos controlar a contribuição zigótica (cruzando as virgens recombinantes na linha germinal com machos OR). A caracterização do fenótipo materno/zigótico irá beneficiar da caracterização do fenótipo estritamente materno. Por comparação poderemos determinar qual o fenótipo derivado da contribuição zigótica.

### 7.5.2. GRUPO 8

Tal como descrito para o grupo 7, encontramos duas classes fenotípicas distintas que consideramos corresponderem a mutantes maternas (classe 1: embriões cujo desenvolvimento é semelhante ao dos embriões de controlo) (Figura 27) e a mutantes maternas e zigóticas (classe 2: embriões que apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos e fragmentação do epitélio da blastoderme) (Figura 28).

À semelhança do G7, os embriões mutantes maternas e zigóticas conseguem iniciar o processo de celularização (Figura 28, como podemos observar pela marcação com NRT) apesar dos defeitos na distribuição dos núcleos. Contudo, o epitélio que se consegue formar é fragmentado, com grandes falhas na membrana (ausência de NRT) e na densidade nuclear (ausência de núcleos/ADN, Figura 29).

Para estes mutantes, assim como para os mutantes do G7, não conseguimos neste momento distinguir ainda se a distribuição assimétrica dos núcleos é causa ou consequência dos defeitos observados na estrutura. É possível que os núcleos atinjam normalmente o córtex, mas posteriormente caiam dos locais onde não há a elaboração de membrana e/ou esta colapso, concentrando-se aleatoriamente noutros locais. Para testarmos esta hipótese teremos que analisar a distribuição de outras proteínas de membrana/adesão e de citoesqueleto.

Devido às anomalias nucleares não podemos descartar a hipótese de o G7 e G8 poderem estar relacionados com ciclo celular, apesar de pouco provável por se tratarem de genes com possível expressão zigótica neste estágio (o ciclo celular é tipicamente controlado maternamente). A nossa hipótese é de que o G8 está envolvido na formação do epitélio, e que os núcleos se dividem e migram normalmente. Após atingirem o córtex, a ausência de membrana em certos locais leva a que os núcleos caiam para o interior do embrião. A ausência de membrana pode ainda levar ao colapso do embrião. As anomalias na morfologia e distribuição nucleares seriam assim uma consequência dos defeitos primários na organização da membrana. A não conclusão da celularização em algumas regiões da membrana explicaria a retenção de *slam*.

Tanto para a caracterização fenotípica dos mutantes do G7 como do G8, teremos que caracterizar detalhadamente os fenótipos maternas e maternas/zigóticas. Uma vez que estes embriões, estritamente maternas, não eclodem e falham na secreção da cutícula embrionária, o seu desenvolvimento embrionário é obviamente anormal. Para melhor compreendermos o fenótipo associado a ambos os grupos, teremos que caracterizar os mutantes deste grupo em maior detalhe, quer em embriões fixos quer

*in vivo*. As linhas recombinantes que estamos actualmente a gerar (*DE-Cad-GFP*, *Arm-GFP*, *Hist-GFP*) permitir-nos-ão a caracterização *in vivo* dos fenótipos. Iremos cruzar as virgens recombinantes na linha germinal com machos *CyO-GFP*, para distinguir embriões maternos (sem expressão de GFP) dos mutantes maternos e zigóticos (com expressão de GFP). A expressão de *CyO-GFP* ocorre desde cedo no embrião (Lee *et al.*, 2003).

### 7.5.3. GRUPO 9

À semelhança dos outros dois grupos de complementação, também os embriões do G9 se dividem em duas classes fenotípicas. Os embriões da classe 1 celularizam normalmente (informação não apresentada), enquanto que os embriões da classe 2 apresentam defeitos na distribuição cortical dos núcleos, apesar de conseguirem celularizar (Figura 29 e 30). Os embriões de ambas as classes conseguem executar o movimento de EBG (Figura 31), apesar de apresentarem invaginações na ectoderme. Com base nestes resultados, consideramos os embriões da classe 1 os mutantes maternos (a contribuição zigótica é suficiente para complementar o fenótipo de celularização) e os embriões da classe 2 os mutantes maternos e zigóticos. À semelhança dos genes afectados nos outros dois grupos, o gene afectado no grupo 9 pode desempenhar funções zigóticas na celularização da blastoderme.

Nos embriões mutantes maternos e zigóticos observamos uma distribuição anormal dos núcleos, mas que não impede o início da celularização e a invaginação das membranas (Figura 29 e 30, como podemos observar pela presença de NRT). Nos locais adjacentes a regiões onde faltam núcleos há uma acumulação excessiva de NRT. Esta acumulação poderá ser devida 1) à queda dos núcleos, que leva ao espessamento das membranas nas regiões adjacentes para compensar localmente a perda de integridade do epitélio; 2) a problemas no transporte das vesículas que transportam a proteína do Golgi para a membrana; 3) a falta de uma barreira física (núcleo) que impeça o crescimento aleatório da membrana. Inversamente, as falhas na distribuição cortical dos núcleos podem ser uma consequência de defeitos associados à invaginação das membranas: 1) as vesículas que transportam a proteína para o córtex podem estar a ser mal direccionadas, levando ao seu enriquecimento em alguns locais e a falhas noutros, onde os núcleos acabam por sair do córtex por não terem sido envolvidos em membrana; 2) alternativamente, os núcleos podem abandonar o córtex como resultado de defeitos no citoesqueleto, que é essencial tanto para o processo de celularização como para a migração e ancoragem dos núcleos no córtex; ou ainda 3) os defeitos no crescimento da membrana podem comprometer a organização dos contactos de adesão e da

cintura de actina prospectiva, que confere rigidez às células e poderá influenciar a estabilização nos núcleos no córtex.

Apesar dos defeitos na blastoderme, os embriões do G9 iniciam os movimentos de gastrulação (Figura 31). Surpreendentemente, estes embriões fazem normalmente o movimento de EBG. Contudo, a ectoderme apresenta invaginações/dobras ao longo de todo o perímetro do embrião. Para que a EBG decorra normalmente é necessário que a adesão e polarização epitelial estejam correctamente estabelecidas e reguladas (Pilot e Lecuit, 2005). Dado que a EBG se processa normalmente, enquanto em mutantes de polaridade/adesão este movimento é anormal, o gene afectado neste grupo não deverá ser necessário para os mecanismos de intercalação celular. A regulação adequada do citoesqueleto é essencial tanto para a distribuição homogénea dos núcleos e celularização, (Karr e Alberts, 1986) como para o estabelecimento e remodelação de contactos e adesão celular (Mazumdar e Mazumdar, 2002). É por isso possível que o G9 esteja envolvido na regulação do citoesqueleto. Para testarmos esta hipótese teremos que analisar a distribuição de vários marcadores de citoesqueleto ( $\alpha$ -actina,  $\alpha$ -tub, etc.) e de polaridade ( $\alpha$ -DE Cad $\alpha$ -aPKC,  $\alpha$ -Baz,  $\alpha$ -Lgl,  $\alpha$ -Crb,  $\alpha$ -ZO1, etc.); assim como fazermos colheitas mais curtas de embriões (2-3h) para detectarmos qual o fenótipo primário associado a este grupo. Paralelamente, e tal como descrito para os G7 e G8, iremos caracterizar o fenótipo destes mutantes *in vivo*. As linhas recombinantes que estamos actualmente a gerar (*DE-Cad-GFP*, *Arm-GFP*, *Hist-GFP*) permitir-nos-ão esta caracterização.

## 7.6. MAPEAMENTO CITOLÓGICO

Para além dos problemas associados a possíveis mutações secundárias letais, durante o mapeamento citológico temos que usar deficiências de diferentes origens genéticas. A origem genética das deficiências varia muito, e estas podem conter alterações que podem funcionar como mutações secundárias letais não associadas à deleção genómica descrita, o que pode levar a erros no mapeamento citológico. Para minimizar este problema, usámos sempre várias deficiências e de diferentes origens. Ao fazermos o mapeamento com os dois alelos de cada grupo de complementação e com múltiplas deficiências iremos minimizar a possibilidade de termos resultados falsos no mapeamento das mutações.

### 7.6.1. GRUPO 7

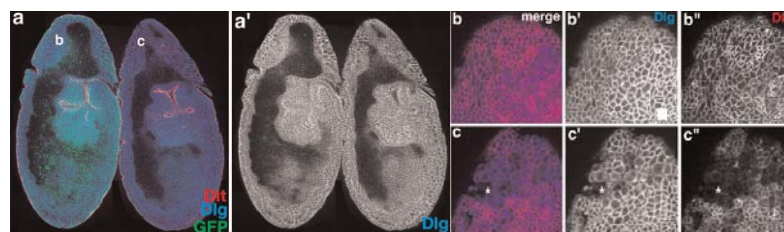
Por mapeamento citológico, determinámos que o gene afectado neste grupo se encontra no intervalo 49E7 - 50D2 (Figura 32). Este intervalo é ainda muito vasto para que possamos encontrar possíveis genes candidatos. Estamos neste momento a cruzar com deficiências mais pequenas, para tentar reduzir a sua dimensão. Esperamos que a caracterização fenotípica mais detalhada e a redução do intervalo citológico associado nos possam indicar genes candidatos para este grupo.

### 7.6.2. GRUPO 8

O gene afectado neste grupo encontra-se no intervalo 49A6 – 45A9 (Figura 33). Este intervalo é relativamente pequeno, e foi obtido por cinco deficiências independentes, que não complementam ambos os alelos. Como é um intervalo suficientemente pequeno, estamos a cruzar o G8 com os alelos dos genes contidos no intervalo, e nas regiões imediatamente adjacentes. Estamos ainda a cruzar os alelos com duas deficiências que não complementam o G8, para confirmar que são os correctos.

Um dos genes associados ao intervalo é o *Strabismus* (*Stb*) ou *Van Gogh* (*Van*) (Taylor *et al.*, 1998). Este gene é particularmente interessante pois está descrito como relacionado no estabelecimento de PCP no olho, pêlos e patas (Wolff e Rubin, 1997, 1998; Rawls e Wolff, 2003; Bastock *et al.*, 2003). Ao contrário do descrito para outros elementos da PCP (Silva e Vincent, 2007), *Van* é essencial para a formação de membrana plasmática durante o desenvolvimento embrionário (Figura 35) e larvar, e para a correcta localização de *Dlg* na membrana plasmática (Lee *et al.* 2003).

O fenótipo que observámos para os embriões  $G8^{m/z}$  (Figura 28) é reminescente do fenótipo descrito por Lee *et al.* (2003) (Figura 35), para embriões com expressão zigótica de *Stbm* mutante ( $stbm^{15z}$ ); pelo que este é um bom gene candidato para o G8.



**Figura 35: A expressão zigótica de *Stbm* é necessária para a formação da membrana plasmática durante a embriogénese (adaptado de Lee *et al.*, 2003).** A e A') embrião  $stbm^{15}/Cyo-GFP$  indicado com a letra b (embrião à esquerda), e  $stbm^{15z}$  indicado com a letra c (à direita). B) Ampliação da região anterior do embrião  $stbm^{15}/Cyo-GFP$ . C) Ampliação da região anterior do embrião  $stbm^{15z}$ . \*) Ausência de *Dlt* e *Dlg* na membrana plasmática de embriões  $stbm^{15z}$ .  $stbm^{15}/Cyo-GFP$  contém expressão materna e zigótica de *Stbm* wild type. Em  $stbm^{15z}$  a expressão zigótica de *Stbm* é mutante.

Adicionalmente, este autor descreve que a expressão zigótica de *Stbm* é essencial para a formação da membrana nas fases mais tardias do desenvolvimento embrionário e durante o desenvolvimento larvar de *Drosophila*. Contudo, Lee *et al.*, não analisou embriões cuja expressão materna de *Stbm* é também homozigótica mutante, o que poderá explicar porque não observou fenótipos durante a blastoderme, como os que identificámos nos mutantes  $G8^{m/z}$ . Apesar das semelhanças fenotípicas entre mutantes para *Stbm* e entre os mutantes  $G8^{m/z}$ ; quando testámos para complementação ambos os alelos do G8 (e duas deficiências que não complementam este grupo) com um alelo *loss of function* de *Van* (*Van*<sup>18755</sup>). Este alelo de *Van* complementou com o G8. Este resultado indicou-nos que provavelmente o G8 não é alélico de *Van*, e permitiu-nos definir geneticamente o limite inferior do intervalo onde se localiza o gene afectado no G8. Adicionalmente, as semelhanças fenotípicas entre o G8 e *Van* indicaram-nos que a classe de genes que poderá estar associada a este grupo poderá estar relacionado com o tráfego de vesículas durante a celularização, uma vez que, os mutantes do grupo 8 apresentam defeitos na distribuição cortical dos núcleos e o epitélio primário que elaboram encontra-se fragmentado.

### 7.6.3. GRUPO 9

Por mapeamento citológico encontrámos como menor intervalo associado ao G9, a região 50D4 – 50D7 (Figura 34). Apenas duas deficiências não complementaram os alelos deste grupo, pelo que encomendámos não só os alelos dos genes associados ao intervalo como incluímos também alelos dos genes que estão nas regiões adjacentes. Para este grupo já conseguimos determinar o mapeamento genético. O gene afectado no G9 encontra-se situado entre os genes *Mastermind* (*mam*) e *Sox15*. Os alelos letais de ambos os genes complementam as deficiências 7875 e 6516 (com as quais tínhamos obtido o mapeamento citológico deste grupo).

Para além dos genes *mam* e *Sox15*, já testámos para complementação os genes CG8233, CG13018, Hsc70-5, CG8589, CG8494, opa1-like, Cg,  $\beta$ 4GalNacTA, CG8485, CG8547, *SeID* e *Ih*. Os alelos destes genes não complementaram o G8, nem as duas deficiências (6516 e 7875).

## 7.7. TAREFAS PRESENTES E FUTURAS

O início do desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster* é mantido através de ARNm e proteínas maternas. Aproximadamente a meio do desenvolvimento da blastoderme, o embrião inicia a transcrição zigótica, e o desenvolvimento passa neste momento a ser regulado tanto por produtos maternos como por produtos zigóticos.

No futuro queremos distinguir os complexos/proteínas envolvidas na formação e estabilização epiteliais durante a blastoderme (controlo materno), das envolvidas na remodelação e morfogénese epitelial durante a gastrulação (controlo materno e zigótico), e das envolvidas na remodelação e morfogénese epitelial larvar (controlo zigótico). Iremos portanto avaliar separadamente cada uma destas fases do desenvolvimento: 1) celularização da blastoderme embrionária, 2) gastrulação e fecho dorsal e, 3) cicatrização de feridas e morfogénese dos discos imaginais larvares.

Estamos de momento a balancear o terceiro cromossoma de ambos os alelos de cada grupo. Simultaneamente, estamos a gerar linhas recombinantes de cada alelo com *DE-Cad-GFP*, *Arm-GFP* e *Hist-GFP*. Estas ferramentas permitir-nos-ão observar e caracterizar *in vivo* o fenótipo dos mutantes.

É neste momento prioritário mapearmos e identificarmos os genes associados a cada um dos grupos de complementação. Na pior das hipóteses todos os alelos que encomendarmos complementarão ambos os alelos de cada grupo. Nesta situação teremos que reduzir o intervalo citológico através de recombinação local-específica em machos. Quando o intervalo citológico for razoável, iremos sequenciar os genes candidatos e/ou tentar complementar os nossos mutantes com fragmentos cosmídeos.

Após identificarmos e clonarmos o gene associado a cada grupo, pode ocorrer uma de duas situações: 1) o gene está já descrito na literatura, ou 2) o gene não se encontra ainda descrito na literatura.

Caso seja um gene já publicado, iremos ver se os fenótipos que observámos são diferentes dos fenótipos descritos. Iremos depois seguir a abordagem mais adequada e que nos permita ter resultados inovadores em relação ao já publicado. Adicionalmente, iremos caracterizar a expressão destes genes por hibridação *in situ* para ARN.

Caso seja um gene ainda não identificado e para o qual não tenhamos informação em *Drosophila melanogaster*, iremos fazer um *blast* para encontrar possíveis homólogos em outros organismos. Se encontrarmos possíveis homólogos, iremos comparar os fenótipos que observámos com os fenótipos descritos para o(s) organismo(s) e verificar se são funcionalmente semelhantes. Caso os genes

desempenhem potencialmente as mesmas funções, iremos testar se a cópia de um consegue reverter o fenótipo do outro; e caracterizar fenotípica e bioquimicamente a função associada ao gene, ao longo do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*.

Para percebermos em que via actua o gene que identificarmos, iremos ainda testar a interacção genética com outros mutantes de fenótipos semelhantes.

## 7.8. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos podemos concluir que fomos bem sucedidos em seleccionar mutantes envolvidos cuja função na formação, regulação e/ou morfogénese epitelial é conservada. A combinação, do *screen epitélio em adulto* com a análise de complementação, revelou-se uma ferramenta eficaz para seleccionar os melhores candidatos de entre uma vasta colecção de mutantes *singletons*, particularmente porque as duas abordagens se sobrepuseram. Os mutantes que seleccionámos combinando as duas técnicas apresentam defeitos quer durante o desenvolvimento embrionário, quer no estabelecimento do epitélio adulto.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R. e Hoschuetzky, H.** (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell Sci.* **107** (Pt 12), 3655-63.

**Aberle, H., Schwartz, H., Hoschuetzky, H. e Kemler, R.** (1996). Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin. *J. Biol. Chem.* **271**, 1520-6.

**Arno, H. e Müller, J.** (2003). Control of cleavage cycles in *Drosophila* embryos by frühstart. *Developmental Cell* **4**: 1 - 9

**Axelrod, J. D., e McNeill, H.** (2002). Coupling planar cell polarity signalling to morphogenesis. *Scientific World Journal* **15**, 434-454.

**Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. e Knust, E.** (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-43.

**Balda, M. S. e Matter, K.** (2003). Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biol.* **13** (6), 310-318.

**Bashirullah, A., Halsell, S. R., Cooperstock, R. L., Kloc, M., Karaiskakis, A., Bosch, J. R., Benavides, J. A. e Cline, T. W.** (2006). The TAGteam DNA motif controls the timing of *Drosophila* pre-blastoderm transcription. *Development* **133**, 1967-1977.

**Bastock, R., Strutt, H., e Strutt, D.** (2003). Strabismus is symmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development* **130**, 3007- 3014.

**Bertet, C., Sulak, L. e Lecuit, T.** (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* **429**, 667-71.

**Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K. O., Choi, K. W. e Bellen, H.** (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 633-45.

**Bilder, D., Birnbaum, D., Borg, J. P., Bryant, P. e Huigbretse, J.** (2000). Collective nomenclature for LAP proteins. *Nat. Cell Biol.* **2**, E114.

**Bilder, D., Li, M. e Perrimon, N.** (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* **289**, 113-6.

**Bilder, D., Perrimon, N.** (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-80.

**Bilder, D., Schober, M. e Perrimon, N.** (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 53-8.

**Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M. e Shapiro, L.** (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**, 1308-13.

**Braga, V. M.** (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 546- 56.

**Brandt, A., Papagiannouli, F., Wagner, N., Wilsch-Braäuning, M., Braun, M., Furlong, E. E., Loserth, S., Wenzl, C., Pilot, F., Vogt, N., Lecuit, T., Krohne, G., e Großhans, J.** (2006). Developmental control of nuclear size and shape by kugelkern and kurz kern. *Current Biology* **16**, 1-10.

**Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. e Nieto, M. A.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**, 76-83.

**Carlson, S. D., Juang, J. L., Hilgers, S. L. e Garment, M. B.** (2000). Blood barriers of the insect. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 151-74.

**Chae, J., Kim, M. J., Goo, J. H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P. N. e Park, W. J.** (1999). The *Drosophila* tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. *Development* **126**, 5421-9.

**Chen, X. e Macara, I.** (2005) Par3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly. *Jour. Cell Biol.* **172** (5), 671-678.

**Chen, Y. T., Stewart, D. B. e Nelson, W. J.** (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/ beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basolateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol.* 1999 Feb 22;144(4):687-99.

**Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J. e Weis, W. I.** (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin filament assembly. *Cell* **123**, 903-15.

**Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M. e Eaton, S.** (2001). The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev. Cell* **1**, 93-101.

**Field, C. M., Coughlin, M., Doberstein, S., Marty, T. e Sullivan, W.** (2005). Characterization of *anillin* mutants reveals essential roles in septin localization and plasma membrane integrity. *Development* **132**, 2849-2860.

**Foe, V. E., Odell, G. M., e Edgar, B. A.** (1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo. In The development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate and A.Martinez Arias, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 149-300.

**Fullilove, S. L. e Jacobson, A. G.** (1971). Nuclear elongation and cytokinesis in *Drosophila Montana*. *Developmental Biology* **26** (4), 560-577.

**Gateff, E.** (1978). Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **200**, 1448–59.

**Genova, J. L. e Fehon, R. G.** (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **161**, 979- 89.

**Gibson, M. C. e Perrimon, N.** (2003). Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 747-52.

**Gilbert, S. F.** (1997). *Developmental Biology*. 5th ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland. **543-77, 867-70**.

**Golic, K. G.** (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-61.

**Gotta, M., Abraham, M. C. e Ahringer, J.** (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **11**, 482–88.

**Grosshans, J., Wenzl, C., Herz, H. M., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H., Müller, H. A.** (2005). RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation. *Development* **132**, 1009 – 1020.

**Gubb, D. e Garcia-Bellido, A.** (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **68**, 37-57.

**Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-57.

**Gumbiner, B. M.** (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 622-34.

**Harris, T. J. e Peifer, M.** (2004). Adherens junction-dependent and –independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **167**, 135-47.

**Hayashi, T. e Carthew, R. W.** (2004). Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature* **431**, 647-52.

**Henrique, D. e Schweisquth, F.** (2003), *Current Opinion in Genetics & Development* **13**, 341 – 350.

**Henrique, D. e Schweisquth, F.** (2003). Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Current Opinion in Genetics & Development* **13**, 341 – 350.

**Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J. e Nelson, W. J.** (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* **125**, 1327-40.

**Hong Y., Stronach B., Perrimon N., Jan L. Y. e Jan Y. N.** (2001). Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but neuroblasts in *Drosophila*. *Nature* 414(6864):634-8

**Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. e Margolis, B.** (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nature Cell Biol.* **5**, 137–142.

**Huynh, J. e Johnston, D.** (2004). The origin of asymmetry: early polarization of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Current Biology* **14**, R438–R449.

**Irvine, K. D. e Wieschaus, E.** (1994). Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* **120**, 827-41.

**Jamora, C. e Fuchs, E.** (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **4**, E101-8.

**Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. e Macara, I., G.** (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol.* **2**, 531–39.

**Johansson, A., Driessens, M. & Aspenstrom, P.** (2002). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J. Cell Sci.* **113**, 3267–3275.

**Johansson, A., Driessens, M. e Aspenstrom, P.** (2000). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the RhoGTPases Cdc42 and Rac1. *J. Cell Sci.* **113**, 3267–75.

**Karr, T. L. e Alberts, B. M.** (1986). Organization of the Cytoskeleton in Early *Drosophila* Embryos. *J. Cell Biol.* **102**, 1494-1509.

**Kay, A. J e Hunter, C. P.** (2001). CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **11**, 474–81.

**Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D., e Skoglund, P.** (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 897–922.

- Kellogg, D. R., Sullivan, W., Theurkauf, W., Oegema, K., Raff, J. W. e Alberts, B. M.** (1991). Studies on the centrosome and cytoplasmic organization in the early *Drosophila* embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **56**, 649-62.
- Kim, S. H., Li, Z. e Sacks, D. B.** (2000). E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J. Biol Chem.* **275**, 36999-7005.
- Klebes, A. e Knust, E.** (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**, 76–85.
- Kuchinke, U., Grawe, F. e Knust, E.** (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr. Biol.* **8**, 1357–65.
- Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L. e Fehon, R. G.** (1998). *Drosophila* coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3505-19.
- Lawrence, P.A., Casal, J., e Struhl, G.** (2002). Towards a model of the organisation of planar polarity and pattern in the *Drosophila* abdomen. *Development* **129**, 2749–2760.
- Le, T. L., Yap, A. S. e Stow, J. L.** (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J. Cell Biol.* **146**, 219-32.
- Lecuit, T.** (2004). Junctions and vesicular trafficking during *Drosophila* cellularization. *Journal of Cell Science* **117**, 3427-3433
- Lecuit, T. e Wieschaus, E.** (2000). Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo. *J. Cell Biol.* **150**, 849-60.
- Lee, L. A., Hoewick, D. V. e Orr-Weaver, T.** (2003). The *Drosophila* cell cycle kinase PAN GU forms an active complex with PLUTONIUM and GNU to regulate embryonic divisions. *Genes Dev.* **17**, 2979-2991.
- Leptin, M.** (1995). *Drosophila* gastrulation: from pattern formation to morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 189-212.
- Leptin, M. e Grunewald, B.** (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* **110**, 73-84.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P, Mbamalu, G., Scott, J. D., Pawson, T.** (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* **2**, 540–47.
- Macara, I. G.** (2004). Parsing the polarity code. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 220-231.

- Mazumdar, A. e Mazumdar, M.** (2002). How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **24**, 1012-1022.
- Mechler, B. M., McGinnis, W., Gehring, W. J.** (1985). Molecular cloning of lethal(2)giant larvae, a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 1985 Jun; **4** (6), 1551-7.
- Mlodzik, M.** (2002). Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet.* **18**, 564–571.
- Müller, H. A., Wieschaus, E.** (1996). *armadillo*, *bazooka*, and *stardust* are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **134**, 149– 63
- Müller, H. A.** (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev. Dyn.* **218**, 52–67.
- Müller, H. A.** (2003). Epithelial polarity in flies: more than just crumbs. *Dev. Cell:* **4**, 1-3.
- Myers, D. C., Sepich, D. S., e Solnica-Krezel, L.** (2002a). Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends Genet.* **18**, 447–455.
- Näthke, I. S., Hinck, L, Swedlow, J. R., Papkoff, J., Nelson, W. J.** (1994). *J. Cell Biol.* **125** (6), 1341-52.
- Nelson, E. J.** (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.
- Oda H, Uemura T, Takeichi M.** (1997). Phenotypic analysis of null mutants for DE-cadherin and Armadillo in *Drosophila* ovaries reveals distinct aspects of their functions in cell adhesion and cytoskeletal organization. *Genes Cells* **2**, 29–40.
- Ohno, A.** (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity.. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 641 – 648.
- Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R.** (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* **8** (6), 1711-7.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C. e Fuchs, E.** (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* **112**, 535-48.
- Petronczki, M. e Knoblich, J. A.** (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **3**, 43–49.
- Pielage, J., Stork, T., Bunse, I. e Klämbt, C.** (2003) The *Drosophila* cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev. Cell* **5** (6), 841-51.

- Pilot, F. e Lecuit, T.** (2005). Compartmentalized morphogenesis in epithelia: from cell to tissue shape. *Dev. Dyn.* **232**, 685-94.
- Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R. e Engel, J.** (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur. J. Biochem.* **223**, 1019-26.
- Qiu, R. G., Abo, A. e Steven-Martin, G.** (2000). A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKC<sup>3</sup> signaling and cell transformation. *Curr. Biol.* **10**, 697-707.
- Rawls, A. S. e Wolff, T.** (2003). Strabismus requires Flamingo and Prickle function to regulate tissue polarity in the *Drosophila* eye. *Development* **130** (9), 1877-87.
- Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. e Morrow, J. S.** (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 8813-7.
- Schock, F e Perrimon, N.** (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 463-93.
- Silva, S. M. e Vincent, J. P.** (2007). Oriented cell divisions in the extending germband of *Drosophila*. *Development* **134**, 3049-3054
- Simons, K. e Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **5** (387), 569-72.
- Stein, J., Broihier, H., Moore, H. e Lehmann, R.** (2002). Slow as Molasses is required for polarized membrane growth and germ cell migration in *Drosophila*. *Development* **129**, 3925-3934.
- Strutt, D.I.** (2002). The asymmetric subcellular localisation of components of the planar polarity pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 225-231.
- Strutt, H. e Strutt, D.** (2005). Long-range coordination of planar polarity in *Drosophila*. *Bioessays* **27**, 1218-27.
- Sullivan, W. e Theurkauf, W. E.** (1995). The cytoskeleton and morphogenesis of the early *Drosophila* embryo. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 18-22.
- Suzuki, A e Ohno, S.** (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci.* **15**, 119(Pt 6) 979-87.
- Sweeton, D., Parks, S., Costa, M. e Wieschaus, E.** (1991). Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development* **112**, 775-89.
- Takeda, H., Shimoyama, Y., Nagafuchi, A. e Hirohashi, S.** (1999). E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 310-2.
- Takeichi, M.** (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 619-27.

**Tanentzapf, G. e Tepass, U.** (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat. Cell Biol.* **5**, 46-52.

**Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J. e Adler, P. N.** (1998). Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* **150**, 199-210.

**Tepass U.** (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **177**, 217–25.

**Tepass, U e Knust, E.** (1990). Phenotypic and developmental analysis of mutations at the *crumbs* locus, a gene required for the development of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **199**, 189–206.

**Tepass, U e Knust, E.** (1993). *crumbs* and *stardust* act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **158**, 311–26.

**Tepass, U, Theres, C e Knust, E.** (1990). *crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **6**, 787–99.

**Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. e Fehon, R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Ver. Genet.* **35**, 747-84.

**Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M. e Uemura, T.** (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* **98**, 585-95.

**Wallingford, J. B., Fraser, S. E., e Harland, R. M.** (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic. **2**(6):695-706

**Warn, R. M, Bullard, B. e Magrath, R.** (1980) Changes in the distribution of cortical myosin during the cellularization of the *Drosophila* embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **57**, 167-76.

**Warn, R. M. e Magrath, R.** (1983). F-actin distribution during the cellularization of the *Drosophila* embryo visualized with FL-phalloidin. *Exp. Cell Res.* **143** (1), 103-14.

**Warn, R. M. e Robert-Nicoud, M.** (1990). F-actin rganization during the cellularization of the *Drosophila* embryo as revealed with a confocal laser scanning microscope. *J. Cell Sci.* **96** ( Pt 1), 35-42.

**Wodarz, A, Ramrath, A, Grimm, A e Knust, E.** (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J. Cell Biol.* **150**, 1361–74.

**Wodarz, A. e Nathke, I.,** (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nature Cell Biology* **9**, 1016 – 1023.

**Wolff, T. e Rubin, G. M.** (1998). Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*. *Development* **125**, 1149-59.

**Wong, L. L. e Adler, P. N.** (1993). Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J. Cell Biol.* **123**, 209- 21.

**Woods, D. F e Bryant, P. J.** (1991). The *discs-large* tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451–64

**Woods, D. F., et al.,** (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J. Cell Biol.* **134**, 1469-82

**Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I. e Nelson, W. J.** (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889-901.

**Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T. Iwamatsu, A., Shinohara, A. e Ohno, S.** (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol.* **13**, 734-43.

**Yap, A. S., Briehner, W. M., Pruschy, M. e Gumbiner, B. M.** (1997). Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.* **7**, 308-15.

**Yap, A. S., Niessen, C. M. e Gumbiner, B. M.** (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J. Cell Biol.* **141**, 779-89.

**Zallen, J. A. e Wieschaus, E.** (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in *Drosophila*. *Dev. Cell* **6**, 343-55.

**Zeitler, J., et al.,** (2004). Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J. Cell Biol.* **167**, 1137-46.

**Zheng, L., Zhang, J. e Carthew, R. W.** (1995). Frizzled regulates mirrorsymmetric pattern formation in the *Drosophila* eye. *Development* **121**, 3045-55.

## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO 1: ABREVIATURAS USADAS NESTE TRABALHO

**2R:** Braço direito do segundo cromossoma.

**a-CAT:** a-catenina.

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico.

**AP:** antero-posterior.

**aPKCBD:** Domínio de ligação à aPKC.

**ARM:** *Armadillo*.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARP2/3:** Complexo estável com sete subunidades, duas proteínas relacionadas com actina (Arp2 e Arp3), e cinco novas proteínas (ARPC1 a 5). A sua função está relacionada com a nucleação de filamentos de actina.

**ASIP:** Homólogo de *Baz* em vertebrados.

**Baz:** *Bazooka*. Homólogo de ASIP em *Drosophila*. Também designado por Par3 (*Partition defective 3*).

**b-CAT:** b-catenina.

**CLG:** Clones na linha germinal.

**CRB:** *Crumbs*.

**CRIB:** Domínio de ligação interactiva a Cdc42/Rac.

**CyO:** Balanceador para o braço direito do segundo cromossoma com *Curly of Oyster* (CyO) que possui o marcador dominante *curly* (Cy).

**DaPKC:** Proteína cinase C atípica.

**DE-CAD:** Caderina epitelial de *Drosophila*.

**DF(2R)KIT:** Kit de deficiências para o braço direito do segundo cromossoma.

**DGO:** *Diego*.

**DLG:** *Discs large*.

**DLT:** *Discs lost*

**DS:** *Daschous*.

**DSH:** *Dishevelled*.

**EF:** Esterilidade em fêmeas.

**EGF:** Factor de crescimento epidermal.

**ELKL:** Cinase com motivo Glu-Leu-Lys-Leu.

**EMK:** Cinase com domínio ELKL.

**FLP:** Recombinase.

**FMI:** *Flamingo*

**FRT:** Região de recombinação induzida pela flipase.

**FT:** *Fat*.

**FZ:** *Frizzled*.

**GBE:** *germband extention*. Extensão da banda germinal.

**GDP:** Guanosina difosfato.

**GFP:** Proteína de fluorescência verde.

**GTP:** Guanosina trifosfato.

**GUK:** Domínio semelhante às guanilato-cinases.

**HIST:** Histona.

**IC:** Invaginação cefálica.

**JA:** Junções aderentes.

**JAp:** Junções aderentes pontuais.

**JS:** Junção septada.

**L27:** Domínio de interacção com LIN2 e LIN7, assim como domínios MRE.

**LAP:** *Leucine aminopeptidase A*.

**LGL:** *Lethal giant larvae*.

**LIN:** *Lineage defective in Caenorhabditis elegans*.

**LKB1:** Produto do gene responsável pela síndrome de Peutz-Jehers.

**LRR:** Domínio com repetições ricas em leucina.

**MAGUK:** Guanilato-cinase associada a membrana.

**MARK:** Cinase reguladora da afinidade para os microtúbulos.

**MRE:** Domínio de recrutamento de MAGUK.

**MUPP1:** Proteína com múltiplos domínios PDZ.

**NRT:** Neurotactina.

**OR:** OregonR.

**PALS1:** Proteína associada com LIN7. Homóloga de Scrib em vertebrados.

**PAR1:** *Partition defective 1*.

**PAR3:** *Partition defective 3*.

**PAR6:** *Partition defective 6*.

**PATJ:** *Pals1-associated tight junction protein*. Homóloga de Dlt em vertebrados.

**PB1:** *Phagocytic oxidase/Bem1*.

**PBS:** *Phosphate Buffer Solution*

**PCP:** Polaridade celular planar

**PDZ:** Domínio de interação cujo nome deriva das proteínas fundadoras desta família de proteínas – PSD95, Dlg e ZO1.

**PK:** *Prickle*

**PSD95:** *Postsynaptic density protein of 95kDa*.

**RHOGEF2:** *Rho guanyl-nucleotide exchange factor 2*.

**RSA:** Região subapical da membrana.

**SAN:** *Separation anxiety*.

**SAP97:** *Synapse-associated protein of 97kDa*. Homóloga de Dlg em vertebrados.

**SCRAPS:** gene que codifica para a anilina.

**SDT:** *Stardust*.

**Semi-CRIB:** Domínio com metade do comprimento normal de um domínio CRIB.

**SH3:** Domínio de homologia a Src-3.

**SLAM:** *Slow as molasses*.

**STB:** ver *Van*.

**STK1:** Cinase Ser/Thr -11.

**TEM:** Transição epitélio-mesênquima.

**TEM:** Transição epitélio-mesênquima.

**TME:** Transição mesênquima-epitélio.

**UBA:** Domínio de associação ubiquitina.

**VAN:** *Van gogh*. Também designado por *Strabismus* (Stb).

**WD40:** Domínio rico em motivos Trp-Asp.

**WNT:** *wingless em Drosophila, é uma das principais vias de sinalização extracelular*. Existem duas vias alternativas possíveis: 1) canónica (via da Wnt/ $\beta$ -catenina) e 2) não canónica (independente da  $\beta$ -catenina).

**ZA:** *Zonula adherens*.

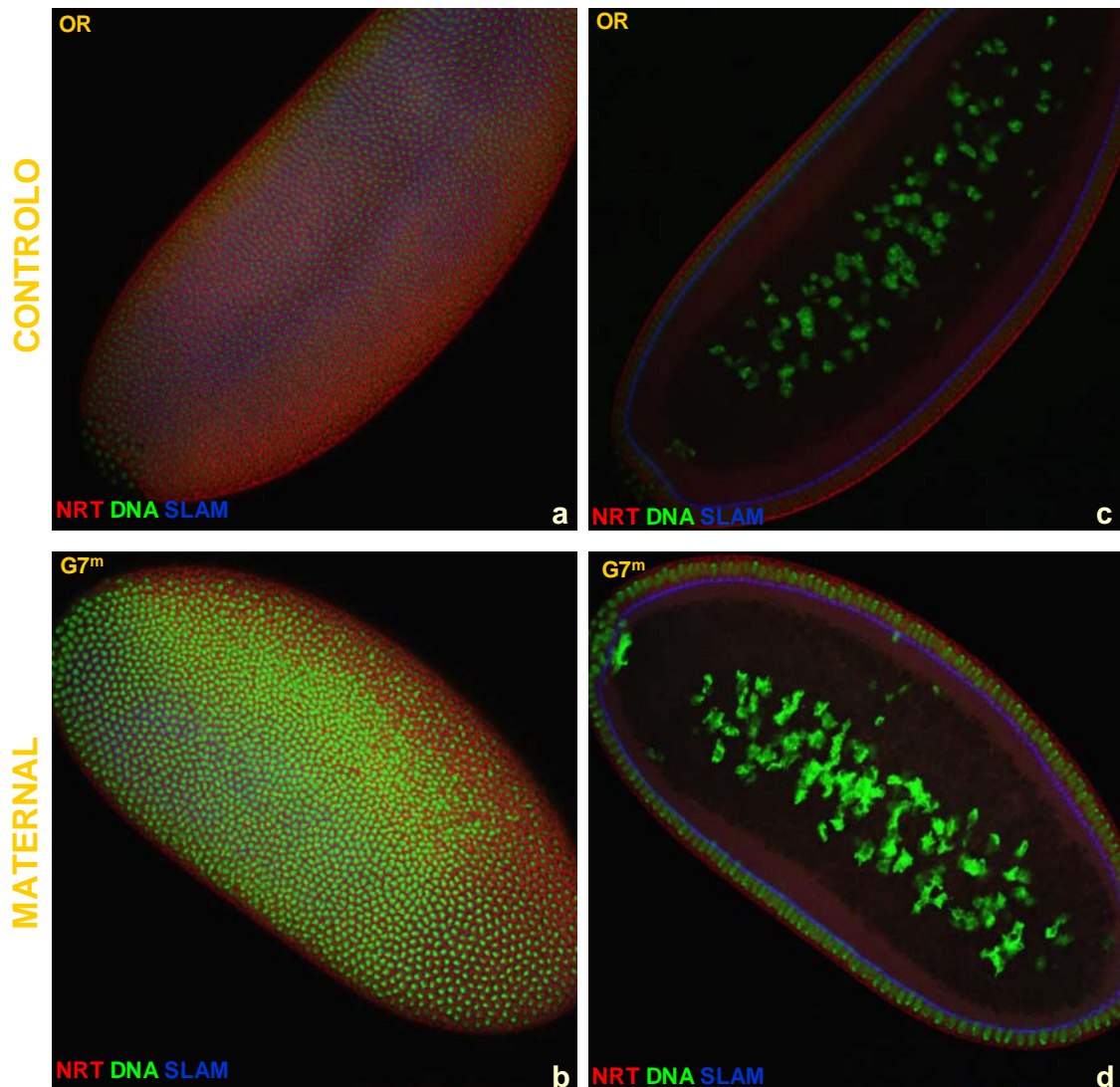
**ZN:** *Zinc-finger*.

**ZO1:** *Zona occludens-1*.

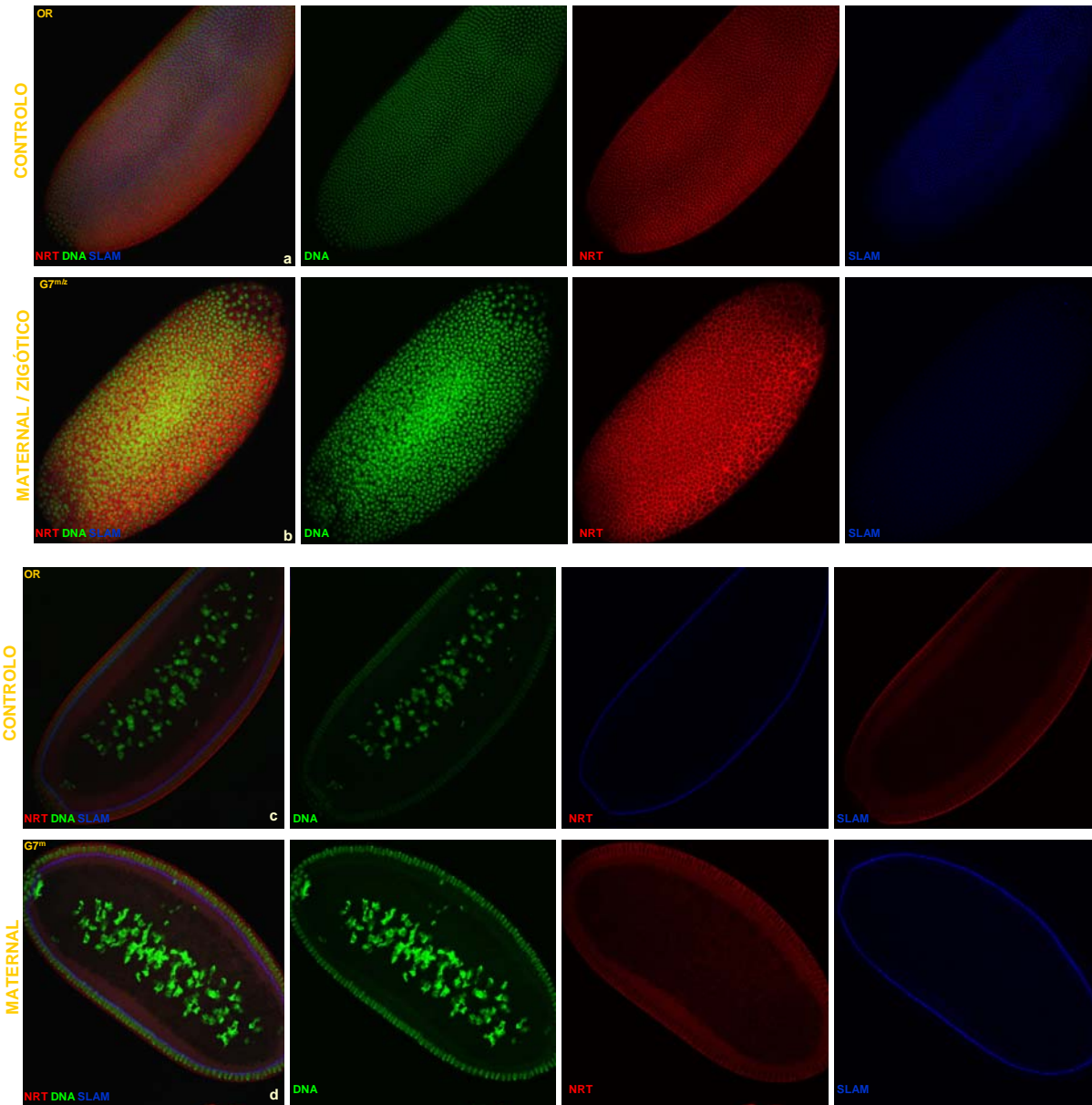
## 9.2. ANEXO 2 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

### 9.2.1. GRUPO 7

#### 9.2.1.a. MATERNO



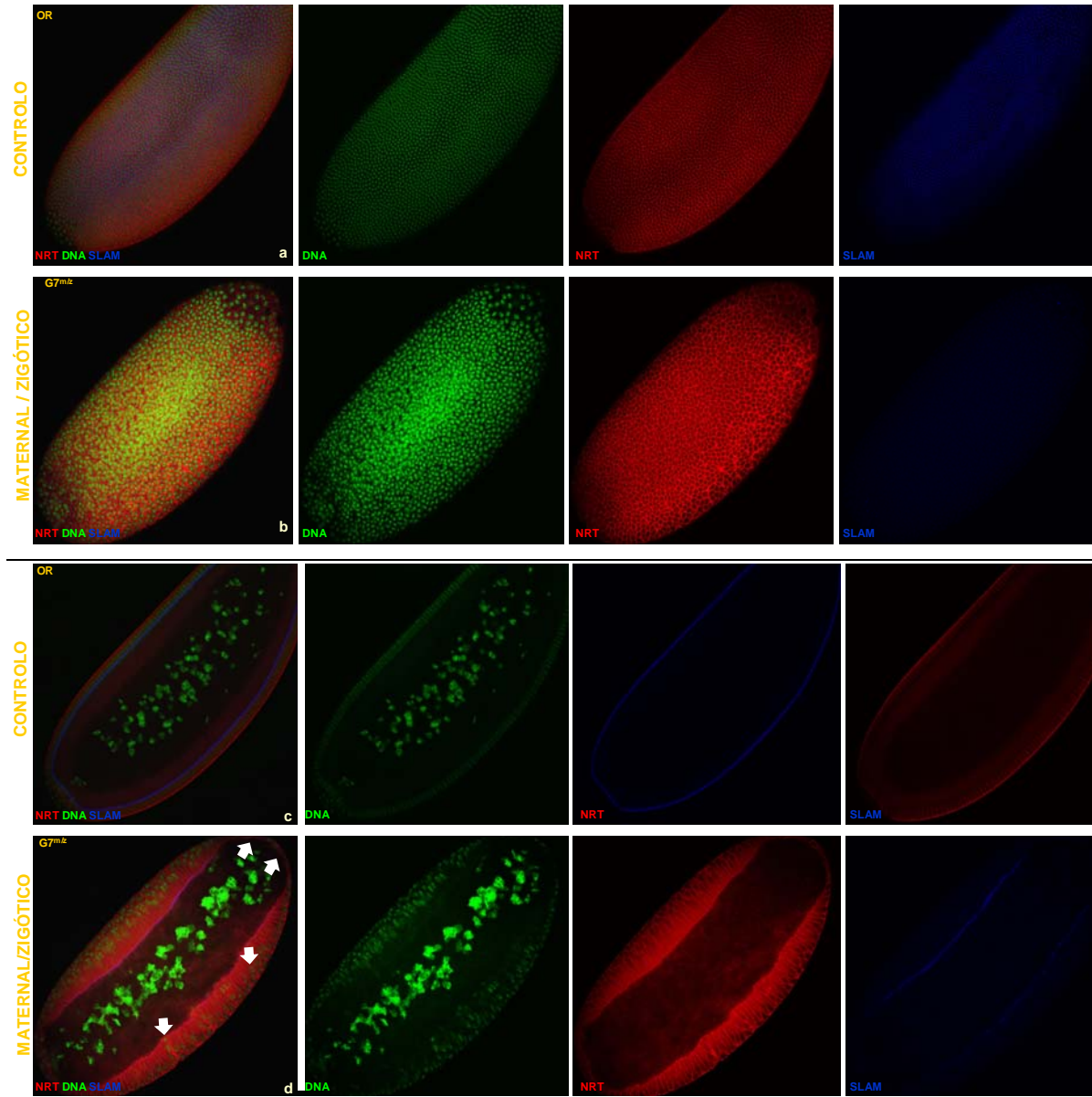
**Figura 24: Embriões mutantes maternos do G7 ( $G7^m$ ) formam normalmente o epitélio da blastoderme.** Embriões OregonR (OR) celularizam normalmente (a), e a blastoderme celular resultante está devidamente celularizada (c). Nos mutantes  $G7^m$  (b, d) a formação do epitélio da blastoderme decorre como no controlo. O grupo 7 encontra-se representado aqui pelo alelo B3-25. O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam* (azul). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*.

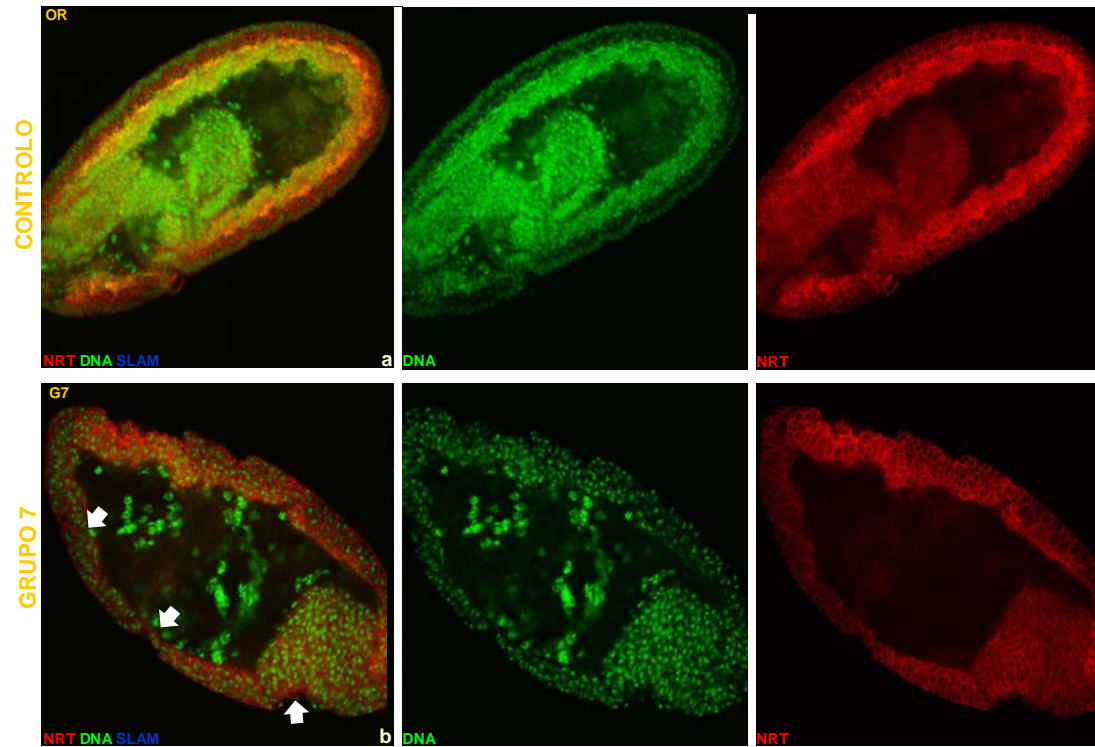


### 9.2.1.b. MATERNO/ZIGÓTICO



**Figura 25: Embriões mutantes maternos e zigóticos do G7 ( $G7^{m/z}$ ) apresentam defeitos no epitélio da blastoderme.** Em embriões OR, os núcleos corticais distribuem-se homogeneamente pela superfície do embrião (a) e celularizam normalmente, estabelecendo correctamente a polaridade ao longo do eixo apical-basal (c). Mutantes do  $G7^{m/z}$  apresentam defeitos na distribuição dos núcleos no córtex (b) e no plano do epitélio (d). O grupo 7 encontra-se representado aqui pelo alelo B3-25. O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a frente de celularização por *Slam* (azul) e a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*.

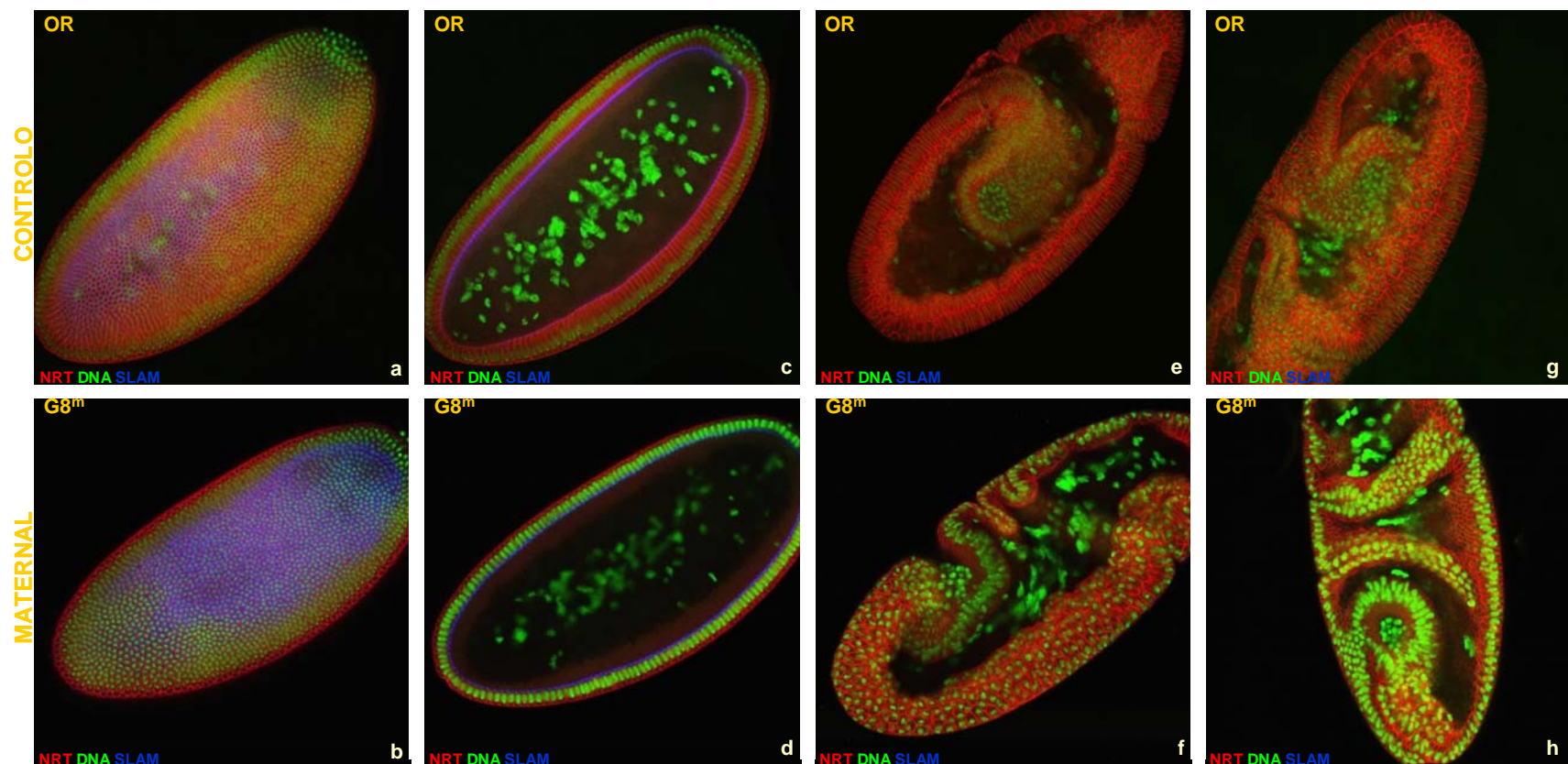




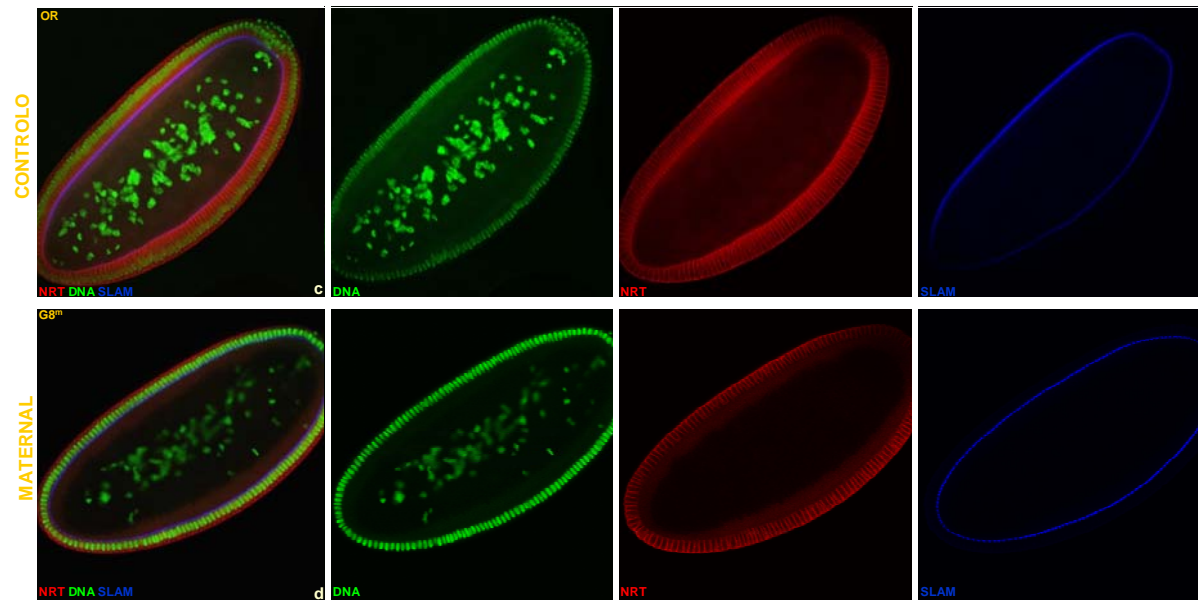
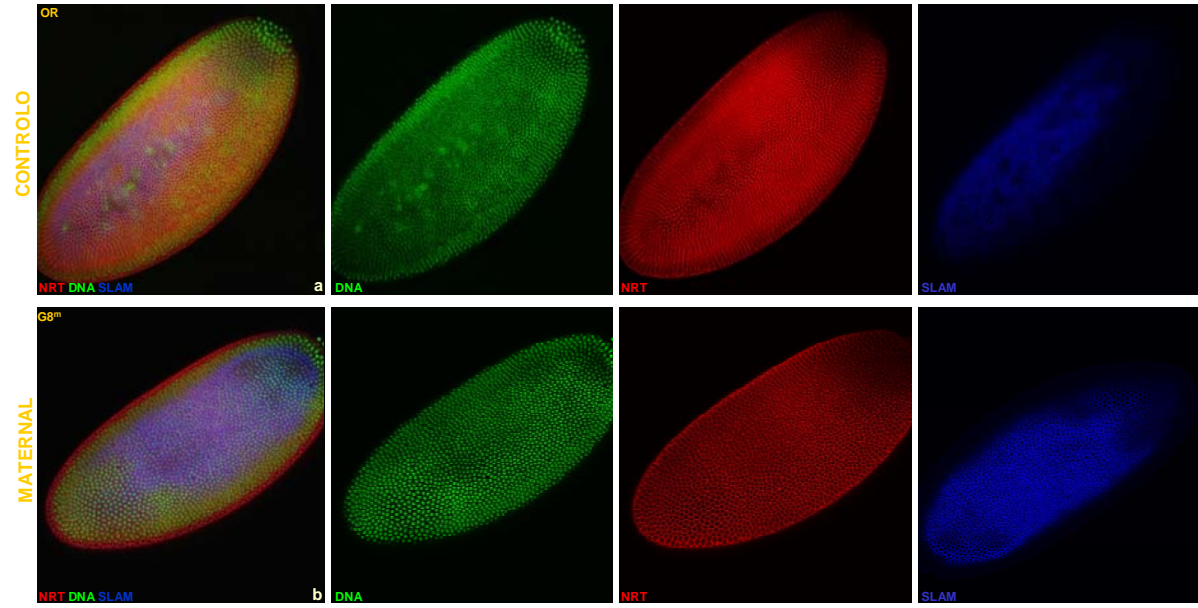
**Figura 26: Embriões mutantes maternos e mutantes maternos e zigóticos do G7 ( $G7^m$  e  $G7^{m/z}$ ) não conseguem realizar o movimento de GBE.** Quando estes embriões tentam fazer os movimentos de GBE, perdem a morfologia epitelial da ectoderme (b), ao contrário dos embriões de controlo (a). O grupo 7 encontra-se representado aqui pelo alelo B3-25. O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a frente de celularização por *Slam* (azul) e a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B3-25*.

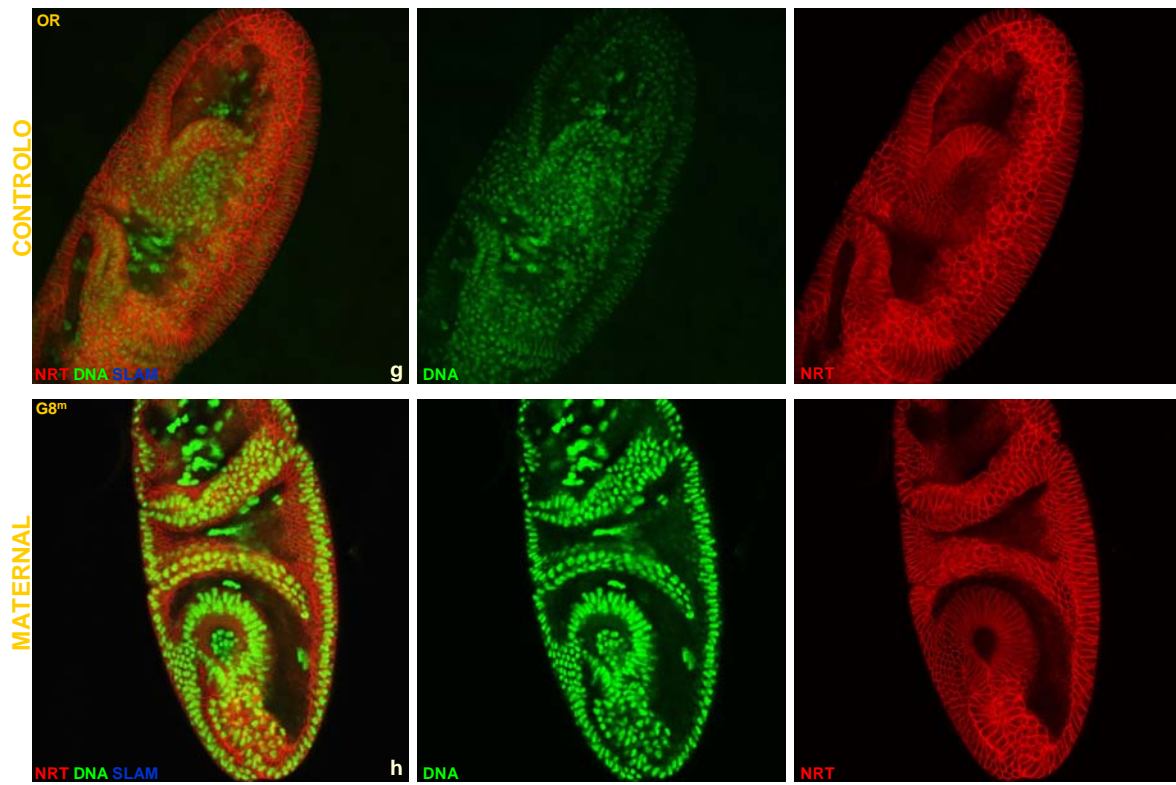
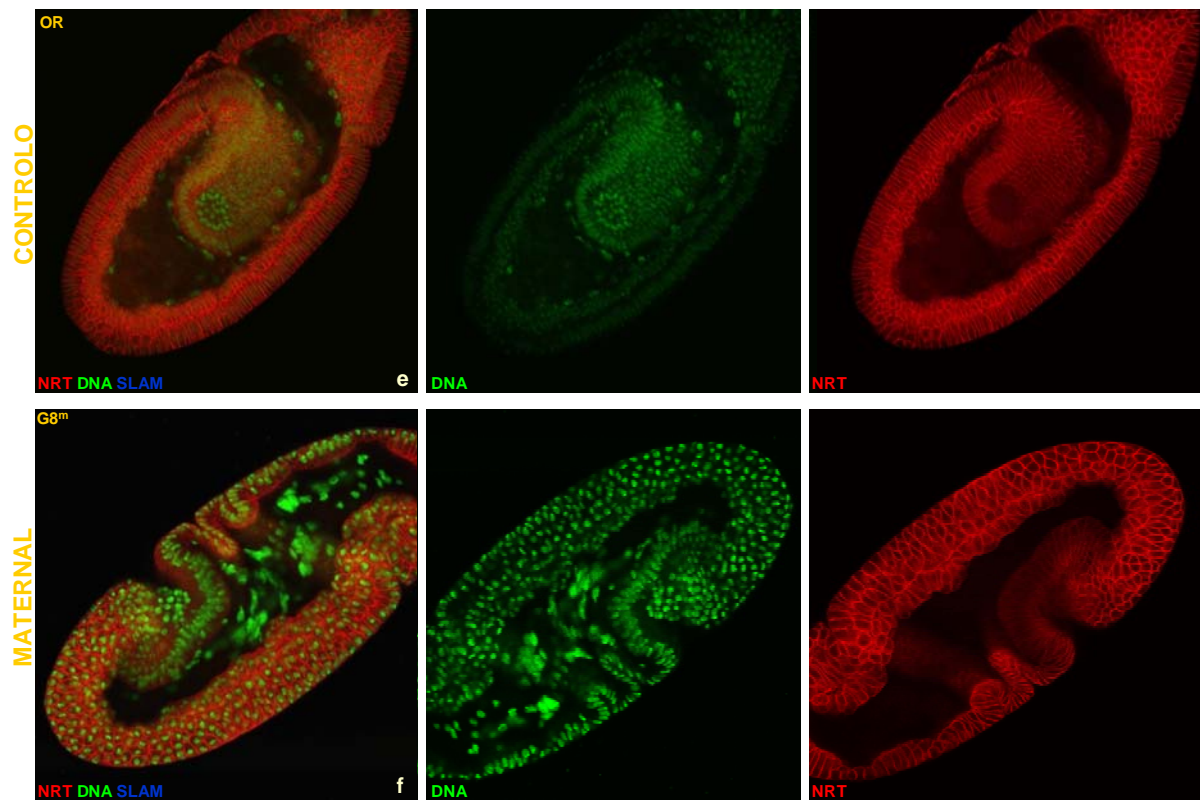
## 9.2.2. GRUPO 8

### 9.2.2.a. MATERNO

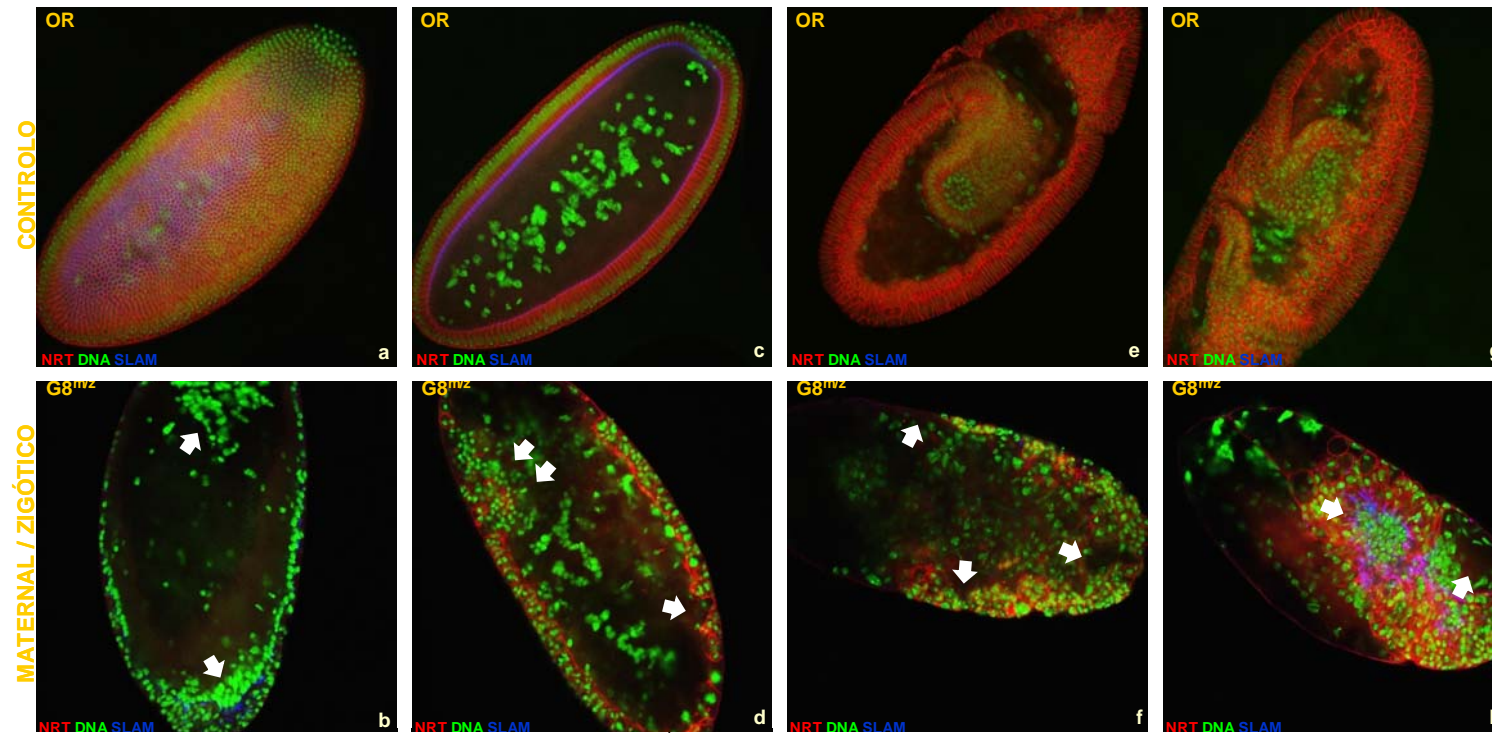


**Figura 27: Embriões mutantes maternos do G8 ( $G8^m$ ) são fenotipicamente normais ao longo o desenvolvimento embrionário.** Embriões  $G8^m$  celularizam e estabelecem polaridade apical-basal normalmente (b, d), como os embriões de controlo (a, c). Posteriormente, executam normalmente os movimentos de GBE (f) e gastrulam sem defeitos detectáveis (h); tal como ocorre nos embriões de controlo (e, g). O grupo 8 encontra-se representado aqui pelo alelo C58-31. O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam* (azul). Ampliação 40x 1x . Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*.

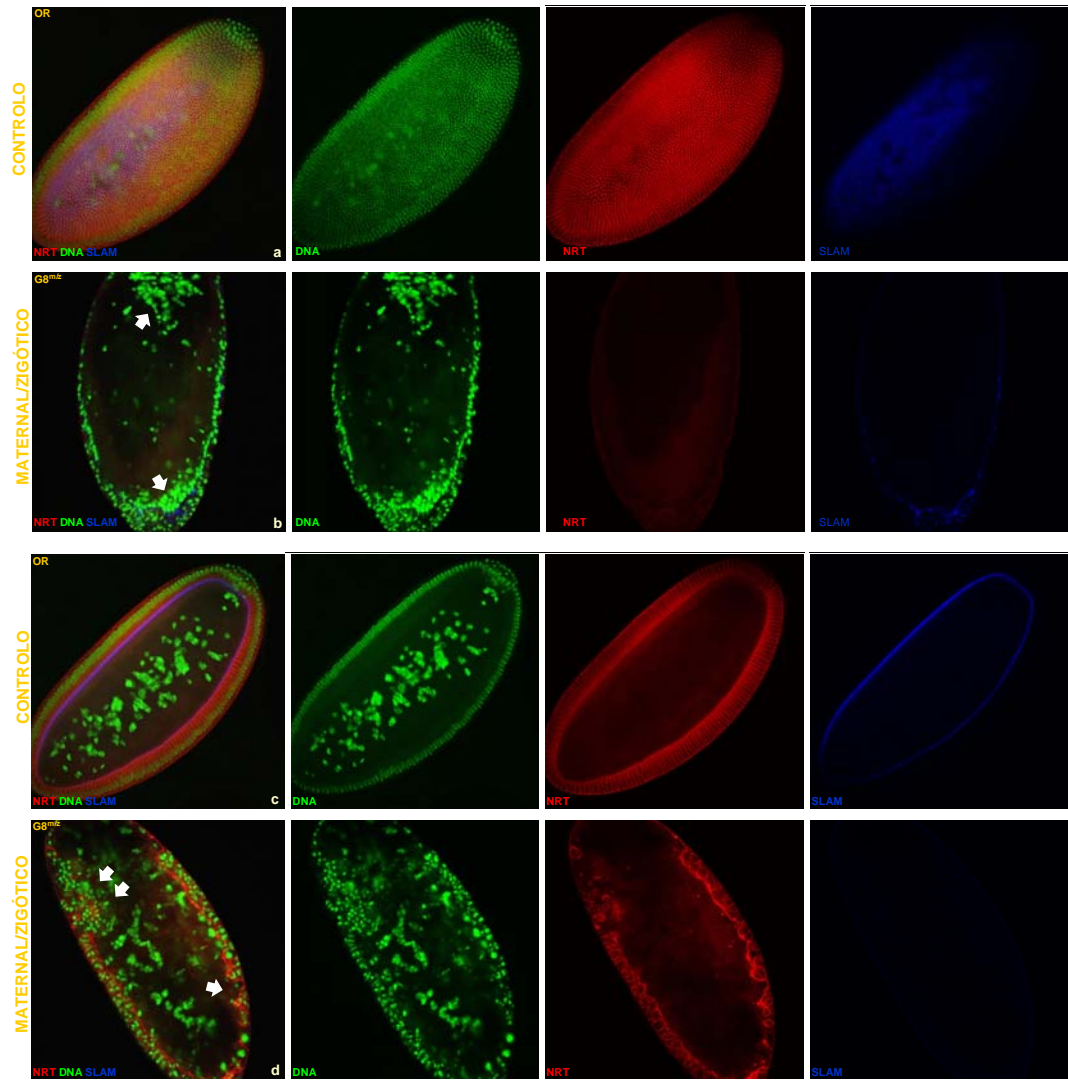


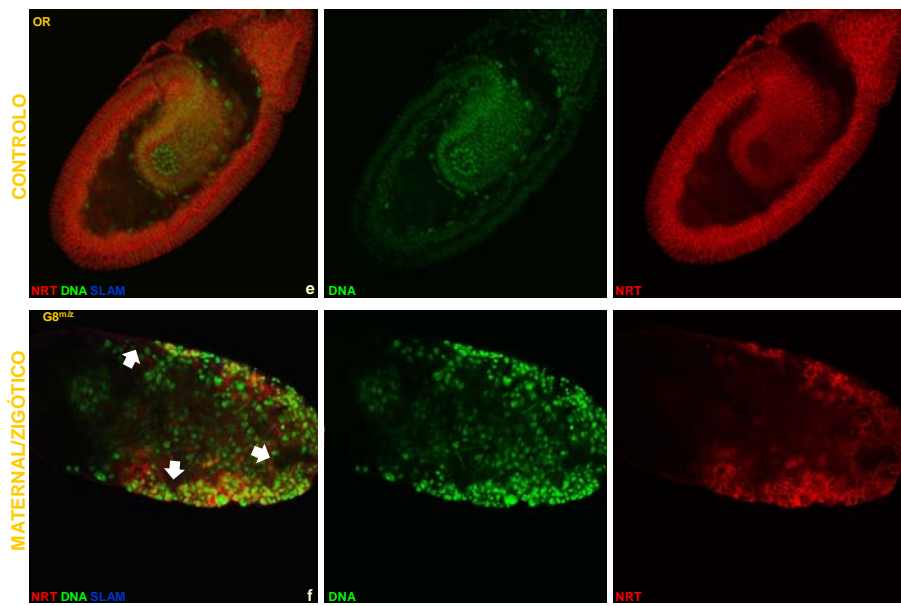


### 9.2.2.b. MATERNO/ZIGÓTICO



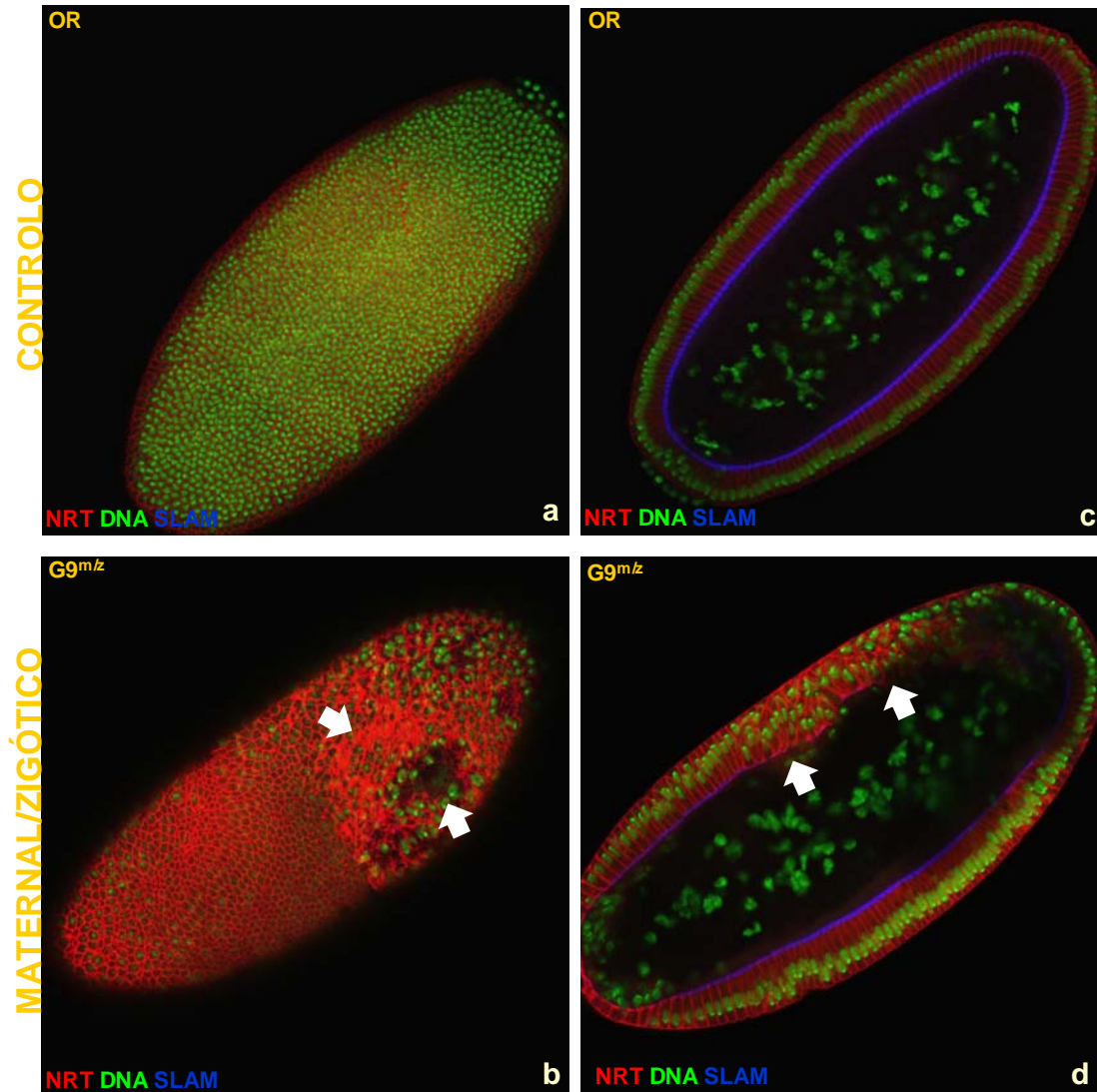
**Figura 28: Embriões mutantes maternos e zigóticos do G8 ( $G8^{m/z}$ ) têm assimetrias na distribuição cortical dos núcleos e o epitélio da blastoderme fragmentado.** Embriões OR iniciam o processo de celularização através de invaginações da membrana (*furrow canals*) que envolvem os núcleos corticais ao mesmo tempo que se estabelece o eixo de polarização apical-basal (a, c). Embriões  $G8^{m/z}$  apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos (b), e apesar de haver a invaginação das membranas (marcada por NRT) o epitélio resultante é fragmentado (d). Mais tarde, estes embriões tentam iniciar os movimentos de GBE, mas ao contrário do controle (e, g) a ectoderme acaba por colapsar e perder integridade (f, h). A marcação por *slam* persiste até mais tarde nestes embriões (h) em relação ao controle (g). O grupo 8 encontra-se representado aqui pelo alelo C58-31. O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a frente de celularização por *Slam* (azul) e a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] C58-31*.



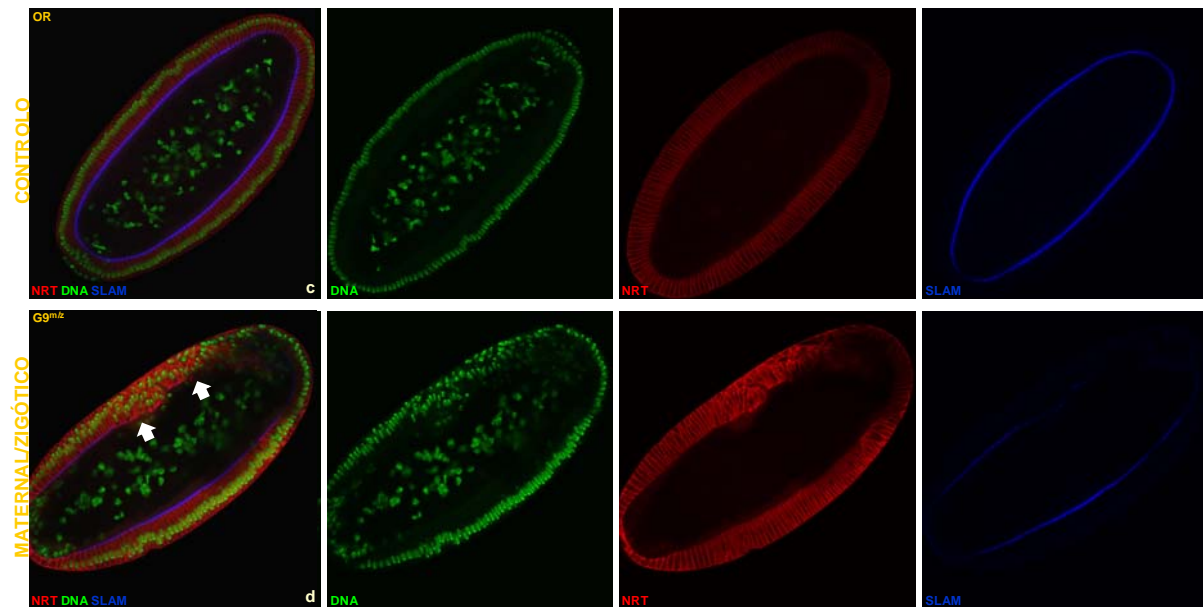
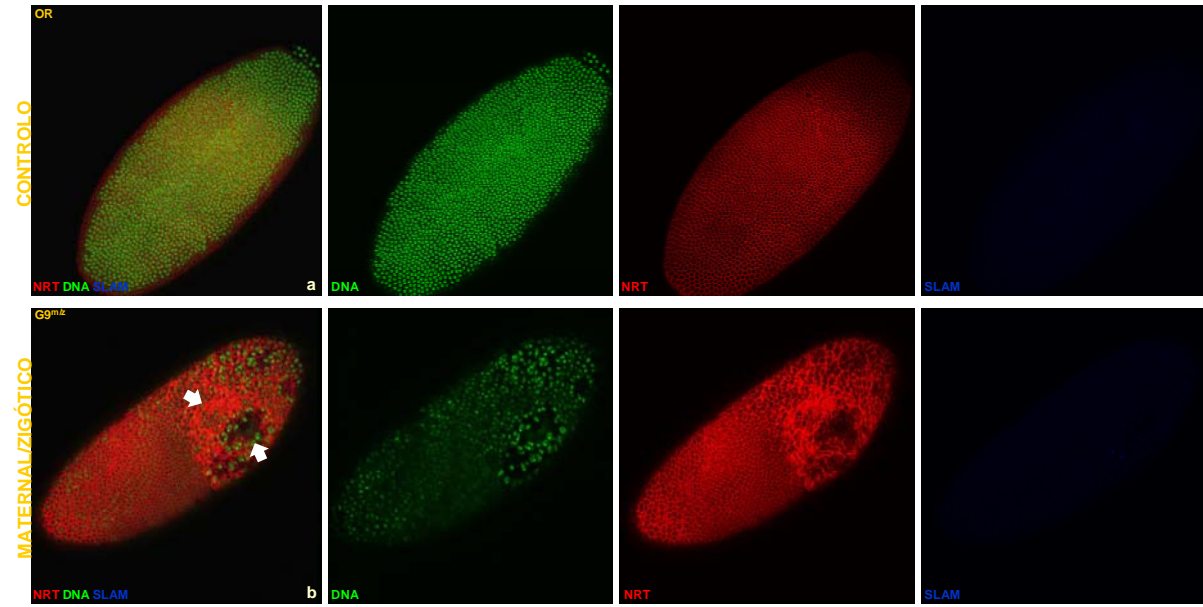


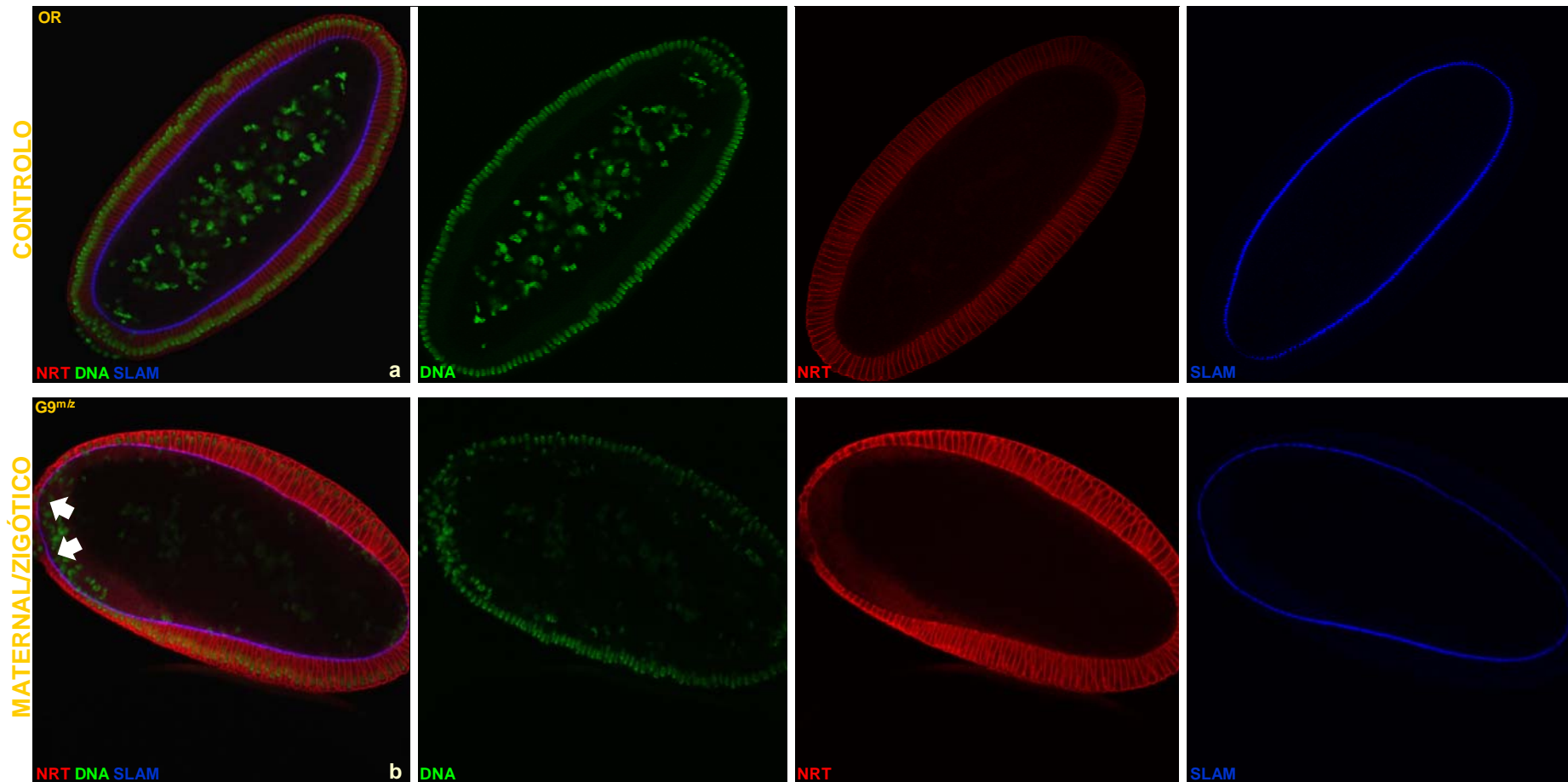
### 9.2.3. GRUPO 9

#### 9.2.3.a.MATERNO/ZIGÓTICO

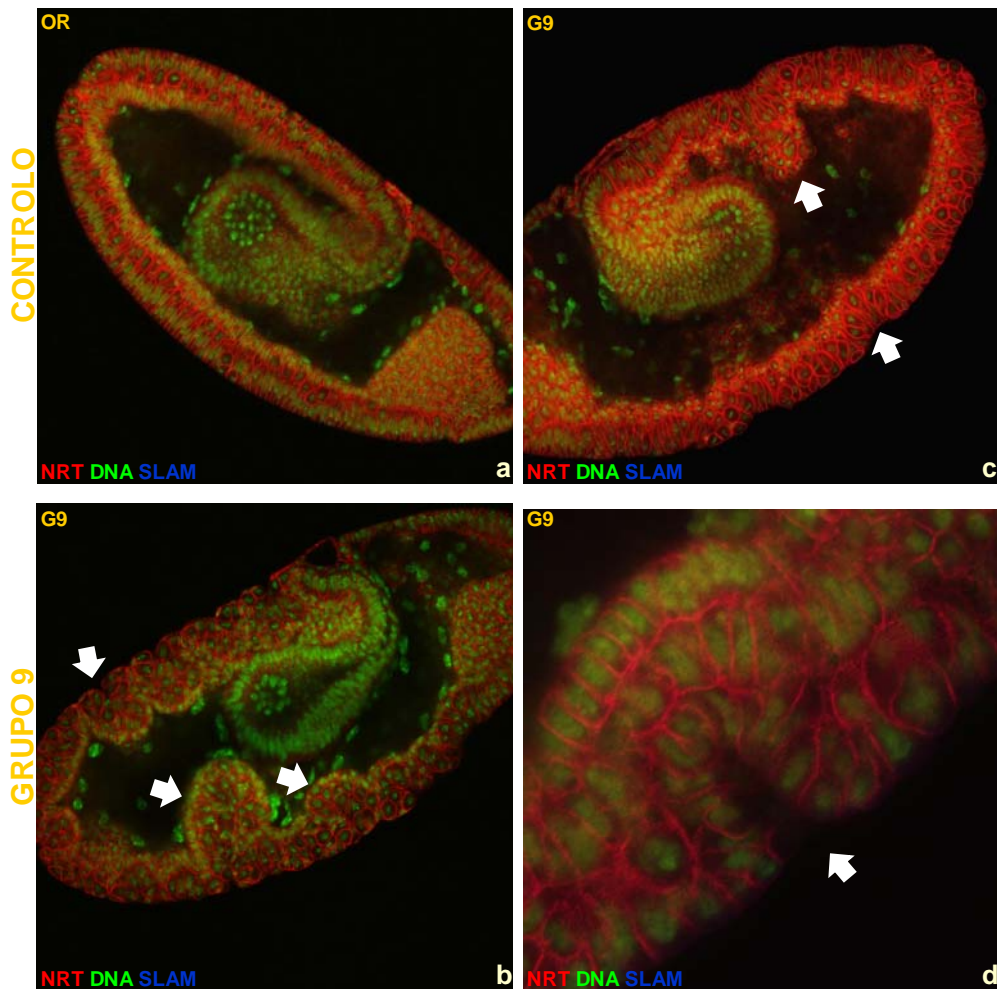


**Figura 29: Embriões mutantes maternos e zigóticos do G9 ( $G9^{m/z}$ ) apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos..** Durante a celularização da blastoderme, existem falhas na distribuição dos núcleos e na formação de nova membrana (falha de NRT, **b**) que nunca acontecem no controle (**a**). Dentro do plano do epitélio primário, os núcleos distribuem-se a vários níveis dentro das células (**d**) em vez de apicalmente (**c**), e pode haver a perda local da estrutura em monocamada do epitélio (**d**). O grupo 9 está aqui representado pelo alelo A31-11. O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam*. (azul). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] A31-11*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] A31-11*.

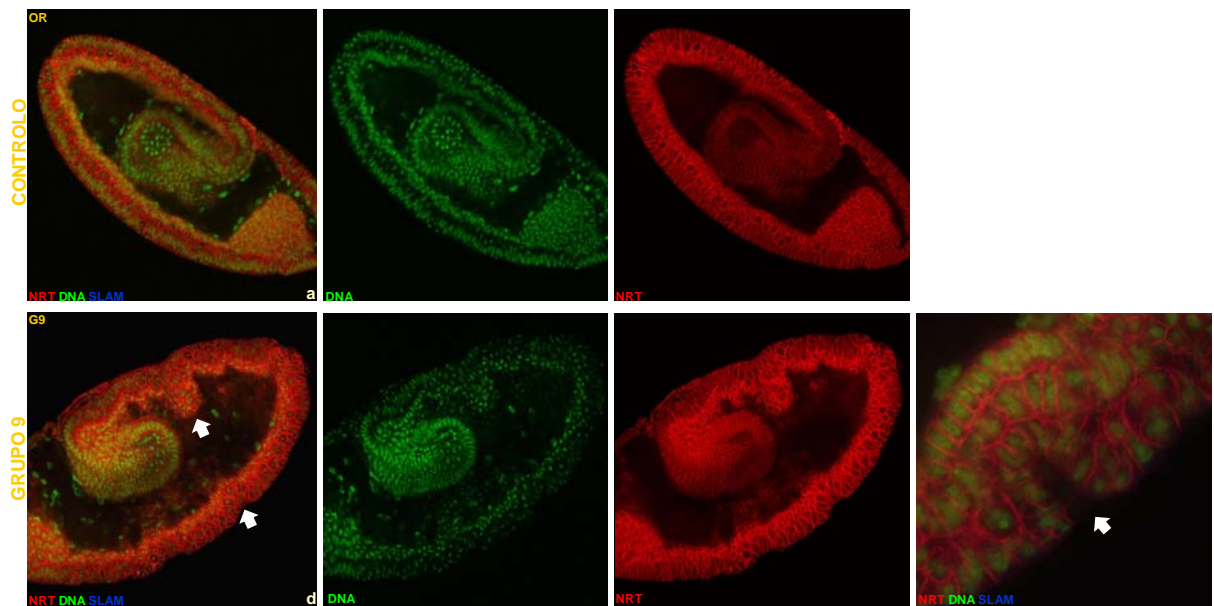
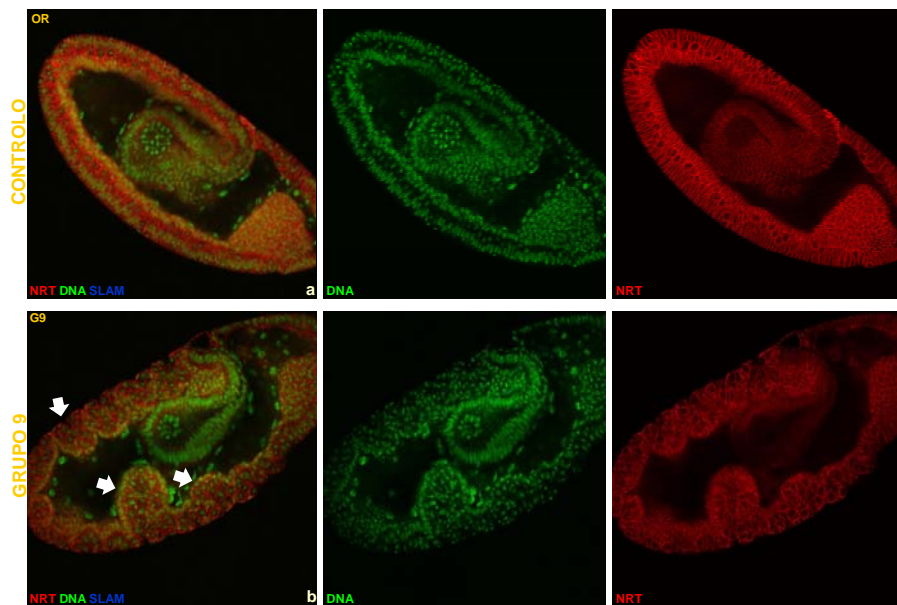




**Fig. 30: Embriões mutantes maternos e zigóticos do G9 ( $G9^{m/z}$ ), conseguem formar o epitélio da blastoderme apesar das assimetrias nucleares.** Apesar dos defeitos na distribuição nuclear, alguns mutantes  $G9^m$  conseguem formar um epitélio da blastoderme (b), morfologicamente equivalente ao do controle (a). O grupo 9 encontra-se aqui representado pelo alelo B12-28. O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam*. (azul). Ampliação 40x 1x. Fêmeas: *yw hs flp*; *ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B12-28*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-*w*<sup>+</sup>, FRT 42B] B12-28*.



**Fig. 31: Embriões mutantes maternos e mutantes maternos zigóticos do G9 ( $G9^m$  e  $G9^{m/z}$ ), conseguem executar normalmente o movimento de GBE, mas apresentam invaginações na ectoderme. Os movimentos de GBE decorrem nestes embriões normalmente (b, d) tal como nos embriões de controlo (a, c). Contudo, durante o movimento de GBE a ectoderme apresenta invaginações. Pormenor de uma invaginação da ectoderme representada em e. O grupo 9 encontra-se aqui representado pelo alelo A31-11 (b) e B12-28 (d, e). O DNA está marcado por *OligoGreen* (verde), a membrana por *Neurotactin* (NRT, vermelho) e a frente de celularização por *Slam*. (azul). Ampliação 40x 1x (a-d), e 63x 4x (e). Fêmeas: *yw hs flp; ovo<sup>D</sup> FRT 42B / P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B] A31-11* ou *B12-28*. Embriões: *P[FRT 42B, mini-w<sup>+</sup>, FRT 42B]A31-11* ou *B12-28*.**



### 9.3. ANEXO 3 – POSTERS EM CONFERÊNCIAS

**9.3.1.** Ferreira, T., Rosa, A., Marty, T. and Martinho, R. (2007), Isolation and characterization of three new complementation groups defective for *Drosophila* early embryonic development. Mechanisms of early development: cell fate determination, morphogenesis and patterning, Lisbon, Portugal.

#### 9.3.1.a. ABSTRACT

Our main interest is to further elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying the formation and morphogenesis of a polarized epithelium. In *Drosophila*, early embryonic development is syncytial and a polarized epithelium forms *de novo* through a process known as blastoderm cellularization<sup>1,2</sup>. *Drosophila* embryonic development begins with thirteen nuclear divisions without cytokinesis. Once mitosis is arrested the cortical nuclei become synchronously encased by polarized invaginations of the plasma membrane (furrow canals). During cellularization the adjacent epithelial cells begin to form polarized cell-cell contacts. Once blastoderm cellularization is completed, the embryo starts a complex set of morphogenetic movements (gastrulation) that leads to the formation of an embryo with three germ layers<sup>3</sup>. We are particularly interested in the mechanisms required for the formation and morphogenesis of a polarized epithelium. In order to identify genes whose epithelial function is conserved in larvae and adult tissue, we screened a collection of previously isolated mutants for abnormalities in the adult epithelial tissue. In parallel we performed complementation studies. These mutants were previously isolated in the laboratory of Dr. Ruth Lehmann\* for defects in the formation of embryonic cuticle. Embryonic cuticle is a good apical epithelial polarity marker.

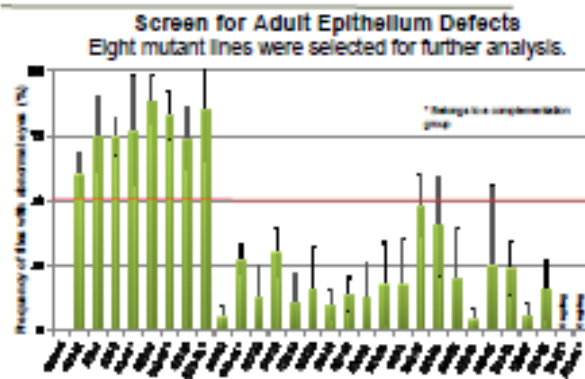
## Isolation and characterization of three new complementation groups defective for *Drosophila* early embryonic development.

Tânia Catarina Ferreira<sup>1</sup>, André Rosa<sup>1</sup>, Thomas Marty<sup>2</sup>, Rui Gonçalo Martinho<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup> Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal; <sup>2</sup> Skirball Institute, NYU-Medical Center, USA



### Introduction:

Our main interest is to further elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying the formation and morphogenesis of a polarized epithelium. In *Drosophila*, early embryonic development is syncytial and a polarized epithelium forms de novo through a process known as blastoderm cellularization<sup>1,2</sup>. *Drosophila* embryonic development begins with thirteen nuclear divisions without cytokinesis. Once mitosis is arrested the cortical nuclei become synchronously encased by polarized invaginations of the plasma membrane (furrow canals). During cellularization the adjacent epithelial cells begin to form polarized cell-cell contacts. Once blastoderm cellularization is completed, the embryo starts a complex set of morphogenetic movements (gastrulation) that leads to the formation of an embryo with three germ layers<sup>3</sup>. We are particularly interested in the mechanisms required for the formation and morphogenesis of a polarized epithelium. In order to identify genes whose epithelial function is conserved in larvae and adult tissue, we screened a collection of previously isolated mutants for abnormalities in the adult epithelial tissue. In parallel we performed complementation studies. These mutants were previously isolated in the laboratory of Dr. Ruth Lehmann<sup>4</sup> for defects in the formation of embryonic cuticle. Embryonic cuticle is a good apical epithelial polarity marker.

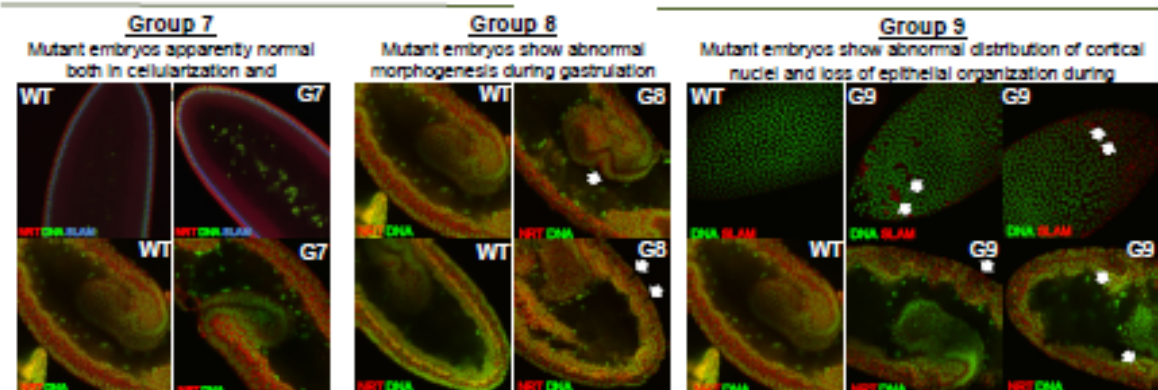
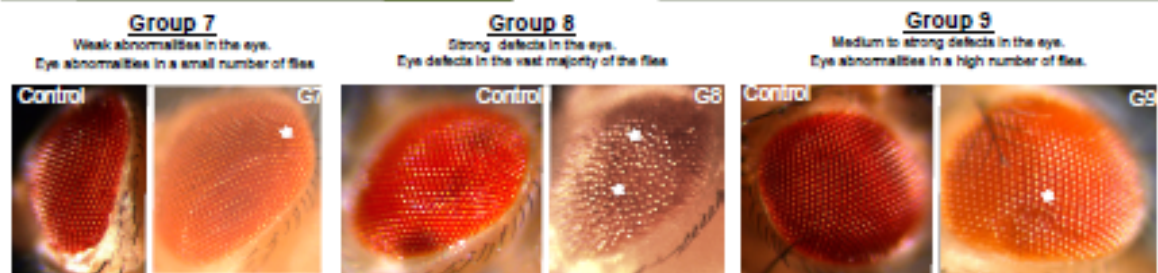


### Complementation analysis

Three new complementation groups were found.

Group	Allele	Embryo Phenotype	Adult Phenotype	Complementation Test	Protein function
7	<i>ELAV</i> <i>ELAV-16</i>	No nuclei Groups of nuclei	27%	Lethal	?
8	<i>ELAV</i> <i>ELAV-17</i>	No nuclei	77% 6%	Lethal	Myopodin?
9	<i>ADP-11</i> <i>ADP-26</i>	Groups of nuclei	6%	Lethal	Cell Cycle? Cell Cell Adhesion?

Three of these alleles were also selected in the adult screen



### Conclusion:

Screening adult epithelium as a secondary screen proved to be a good approach to identify the best candidate genes to be involved in epithelium formation and morphogenesis, allowing us to isolate at least two complementation groups with an epithelial embryonic phenotype.

### Future work:

- Identify genes whose function is affected in the isolated mutants.
- Test if the expression of proteins known to be required for cellularization, polarity and cell adhesion, is defective in the selected mutants.
- Test genetic interactions with other genes known to have similar phenotypes.
- Characterize the dorsal closure, posterior spiracles formation and wound healing phenotypes (zygotic phenotypes). This will help distinguish mutants with defects in epithelium formation from those with abnormalities during morphogenesis.

### References:

1. Nelson, W. J., *Nature*, 422: 766 - 774 (2003)
  2. Krust, E. and Bossinger, O., *Science*, 298: 1955 - 1959 (2002)
  3. Ploet, F. and Lecuit, T., *Developmental Dynamics*, 232: 685 - 694 (2005)
- \*. 2R Screen Team: Alexey Arkov, Yelena Arkova, Vitor Barbosa, Frankie Kimm, Prabhat Kunwar, Thomas Marty, Andrew Renault, Hiroko Sano, Hélène Zinszner and Ruth Lehmann

### Acknowledgments:

Ruth Lehmann (NYU - Medical Center, USA)  
 Ana Rita Marques and Rui Tostões for technical and scientific help

**9.3.2.** Rosa, A.; Ferreira, T., Marty, T and Martinho, R (2007). Embryos for *rugas* are defective for the formation and morphogenesis of an epithelium during *Drosophila* early embryonic development. DroTUGA, Porto, Portugal.

#### 9.3.2.a. ABSTRACT

The earliest events in the life cycle of *Drosophila* include fertilization, nuclear cleavage divisions, establishment of the primary body pattern and the onset of morphogenetic movements. Because of their importance for subsequent development, all these events are good candidates for a genetic dissection. Our main interest is to further elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying the formation and morphogenesis of a polarized epithelium. To address this we took advantage of a screen previously done in the laboratory of Ruth Lehmann (NYU, USA). Initially, this screen allowed the isolation of six complementation groups and 28 *singleton* mutants. From these complementation groups we identified five genes required for control of the cell cycle, cell polarity, and cell-cell adhesion. In order to identify new mutants with polarity/adhesion defects, we performed a second and more detailed analysis of the remaining *singleton* mutants. This analysis allowed the successful isolation of three new complementation groups with defects in the embryonic and in adult tissue epithelia. We will present data relating the isolation and characterization of complementation group nine, which shows an abnormal distribution of nuclei during syncytial blastoderm and loss of epithelial organization during germ band extension. Complementation group 9 was called *rugas* due to the phenotype observed during germ band extension.

## Embryos mutant for *rugos* are defective for the formation and morphogenesis of an epithelium during *Drosophila* early embryonic development

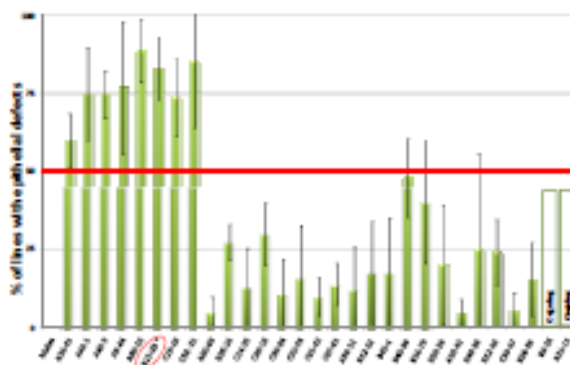
André Rossi<sup>1</sup>, Tânia Catarina Ferreira<sup>1</sup>, Thomas Marty<sup>2</sup>, Rui Gonçalo Martins<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup> Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal; <sup>2</sup> Skirball Institute, NYU-Medical Center, USA

### Introduction:

The earliest events in the life cycle of *Drosophila* include fertilization, nuclear cleavage divisions, establishment of the primary body pattern and the onset of morphogenetic movements. Because of their importance for subsequent development, all these events are good candidates for a genetic dissection. Our main interest is to further elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying the formation and morphogenesis of a polarized epithelium. To address this we took advantage of a screen previously done in the laboratory of Ruth Lehmann (NYU, USA). Initially, this screen allowed the isolation of six complementation groups and 28 singleton mutants. From these complementation groups we identified five genes required for control of the cell cycle, cell polarity, and cell-cell adhesion. In order to identify new mutants with polarity/adhesion defects, we performed a second and more detailed analysis of the remaining singleton mutants. This analysis allowed the successful isolation of three new complementation groups with defects in the embryonic and in adult tissue epithelia. We will present data relating the isolation and characterization of complementation group nine, which shows an abnormal distribution of nuclei during syncytial blastoderm and loss of epithelial organization during germ band extension. Complementation group 9 was called *rugos* due to the phenotype observed during germ band extension.

### Screen for Adult Epithelia Defects

Eight mutant lines were selected for further analysis.



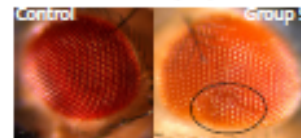
### Complementation analysis

One of the alleles from complementation group 9 was also selected in the adult screen

Group	Allele	Embryo Phenotype	Adult Phenotype	Complementation Test	Putative Function
9	A31-11 B12-28*	Scrape of cuticle	80%	Letal	Cytoskeleton?

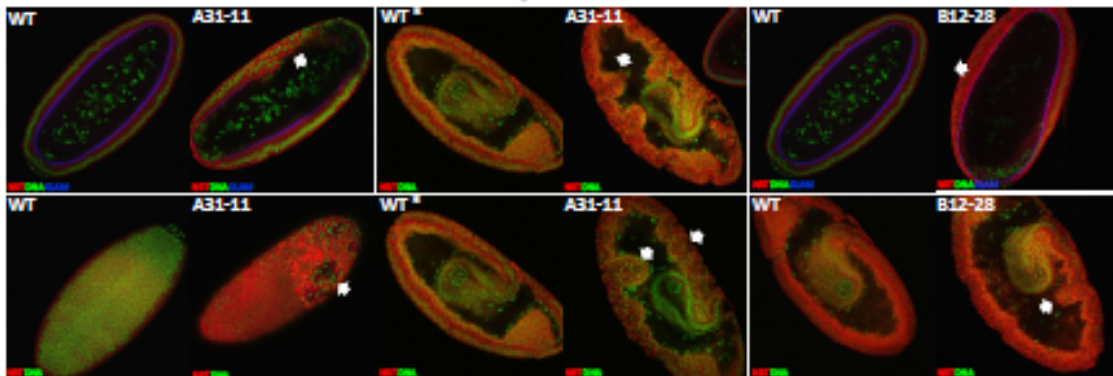
### Group 9

Medium to strong defects in the eye.  
Clones in the vast majority of the flies.



### *Rugos* mutant embryos

Group 9 was called *rugos* due to the phenotypes observed below  
 Germ line clone embryos mutant for *rugos* show abnormal blastoderm cellularization and abnormal germ band extension.



\* Same embryo

Alleles from *rugos* were mapped by deficiency kits to a cytological



### Acknowledgments:

Ruth Lehmann (NYU – Medical Center, USA)  
 Ana Rita Marques and Rui Tostões for technical and scientific help

### Conclusion:

Screening for defects in adult epithelia along with a complementation analysis allowed the isolation of three new complementation groups with putative defects for polarity and adhesion.

Accounting for complementation group 9 (*rugos*) the phenotypes of germ line clone embryos suggests that the affected gene might be related with blastoderm cellularization and germ band extension.

### Future work:

- Identify the affected gene for *rugos*.
- Test if the expression of proteins known to be required for cellularization, polarity and cell adhesion, is defective in the observed mutants.
- Test if cell intercalation is normal during germ band extension
- Perform live imaging analysis (e.g. DE-CadGFP) of *rugos* mutants in order to better understand the nature of the phenotypes observed during germ band extension.

**9.3.3.** Ferreira, T., Rosa, A., Marty, T. and Martinho, R. (2007). Characterization of a new complementation group defective for epithelium integrity during cellularization. DroTUGA. Porto, Portugal.

#### 9.3.3.a. ABSTRACT

Proper epithelial integrity is essential throughout animal development. During *Drosophila's melanogaster* early embryonic development, an epithelium is formed *de novo* through blastoderm cellularization. Later, this epithelium gives rise to a trilaminar embryo as a result of gastrulation. In our laboratory we are interested in studying epithelium formation and morphogenesis. For this purpose, we took advantage of a 2R maternal screen done in the laboratory of Dr. Ruth Lehmann. From this screen were isolated six complementation groups and 28 *singleton* mutants with defects in embryonic soma and cuticle formation. Five of the six groups were already identified, and their functions involve cell cycle (*san/atado*), cytoskeleton regulation (*scraps*) and cell-cell adhesion/polarity (*RhoGEF2*, *DaPKC*). With the isolation of the latter class, we were confident that the maternal screen worked and decided to look into our *singleton* collection. Since we had a large number of mutants, we used a combined approach to rapidly identify the most interesting mutants: 1) an adult epithelium screen, and 2) a complementation analysis. We found that eight *singletons* have defects in the adult eye, and from these we isolated three new complementation groups and another allele of the *scraps* gene. Here, we present data about the adult screen and phenotypic analysis of complementation group eight. Group eight mutants show severe abnormalities in the adult eye and fail to maintain proper epithelium integrity.

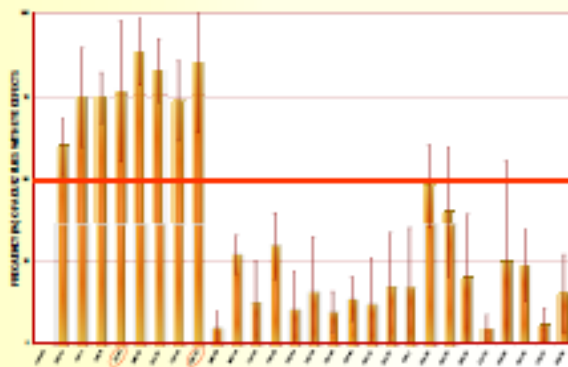
## Characterization of a new complementation group defective for epithelium integrity during cellularization

**Josh Colclough-Pereira<sup>1</sup>, André Rees<sup>1</sup>, Thomas Marly<sup>1</sup>, Rui Gonçalves Marinho<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal; <sup>2</sup>Edzell Institute, NYU Medical Center, USA

Proper epithelial integrity is essential throughout animal development. During *Drosophila*'s melanogaster early embryonic development, an epithelium is formed de novo through blastoderm cellularization. Later, this epithelium gives rise to a trilaminar embryo as a result of gastrulation. In our laboratory we are interested in studying epithelium formation and morphogenesis. For this purpose, we took advantage of a 2R maternal screen done in the laboratory of Dr. Ruth Lehmann. From this screen were isolated six complementation groups and 28 singleton mutants with defects in embryonic soma and cuticle formation. Five of the six groups were already identified, and their functions involve cell cycle (non/ototo), cytoskeleton regulation (scrap), and cell-cell adhesion/polarity (Who66/2, DoPKC). With the isolation of the latter class, we were confident that the maternal screen worked and decided to look into our singleton collection. Since we had a large number of mutants, we used a combined approach to rapidly identify the most interesting mutants: 1) an adult epithelium screen, and 2) a complementation analysis. We found that eight singletons have defects in the adult eye, and from these we isolated three new complementation groups and another allele of the scrap gene. Here, we present data about the adult screen and phenotypic analysis of complementation group eight. Group eight mutants show severe abnormalities in the adult eye and fail to maintain proper epithelium integrity.

### Screen for Adult Epithelia Defects

Eight mutant lines were selected for further analysis.

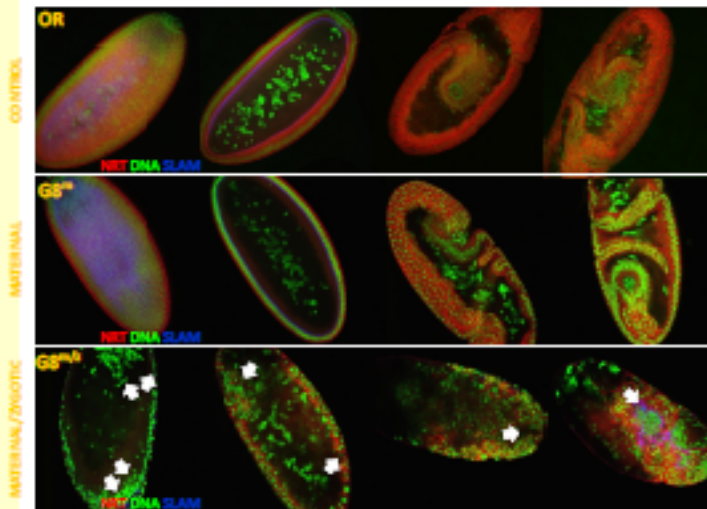
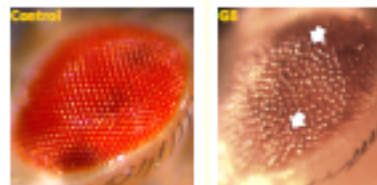


### Complementation analysis

G8 alleles are lethal and unable to secrete cuticle

Group	Allele	Cuticle Phenotype	Adult Phenotype	Complementation Test	Putative function
8	<i>ΔC-44<sup>+</sup></i>		77%		Cell Cycle?
	No cuticle			Lethal	Cellularization?
	<i>ΔC-31<sup>+</sup></i>		85%		Polarity?

... And also have strong eye defects

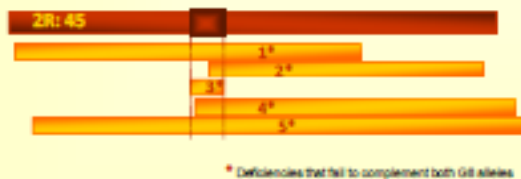


### GROUP 8

Group 8 maternal mutants (middle panel) develop normally and show no apparent defects.

Group 8 maternal and zygotic mutants (lower panel) have severe defects in cortical nuclei distribution. They are able to segregate cells, although abnormally, exhibiting gaps within the epithelial structure and unusually prolonged accumulations of slam. See arrows

Alleles from G8 were mapped by deficiency kits to the smallest cytological interval



\* Deficiencies that fail to complement both G8 alleles

### Acknowledgments:

Ruth Lehmann (NYU – Medical Center, USA)  
 Ana Rita Marques and Rui Torres for technical and scientific help

### Conclusions:

- Screening for both, defects in adult epithelia and complementation, allowed us to isolate mutants with clear defects in epithelial integrity.
- Group 8 mutant embryos show severe abnormalities in epithelial integrity that may be due to cellularization and/or nuclear migration (cytoskeleton) defects

### Future work:

- Identify the affected gene for complementation group 8.
- Further characterize the phenotype of G8 mutants through immunohistochemistry and live imaging. We will focus on cytoskeleton (mta, actin, etc.) and polarity/adhesion (DE-Cad, Arm, etc.) markers.

## 9.4 ANEXO 4 LISTAS DE IMAGENS

### 9.4.1. LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** A análise preliminar dos mutantes seleccionados no creem maternal permitiu a identificação de 6 grupos de complementação (Ana Rita Marques, Rui Tostões, Tânia Ferreira e Rui Martinho, *informação não publicada*).

**Tabela 2:** Três novos grupos de complementação foram isolados da colecção de *singletons* 2R.

### 9.4.2. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Desenvolvimento da linha germinal em *Drosophila melanogaster*.

**Figura 2:** Formação de uma câmara ovárica a partir de uma única célula germinal estaminal.

**Figura 3:** Após atingirem o córtex, os núcleos fundem o seu citoesqueleto com a actina cortical e com os microtúbulos.

**Figura 4:** A celularização e o papel do citoesqueleto em *Drosophila*.

**Figura 5:** Esquema representativo da disposição dos discos imaginais larvares, e correspondente (s) órgãos em adulto.

**Figura 6:** Complexos conservados de polarização apical–basal.

**Figura 7:** Complexos de adesão epitelial em *Drosophila melanogaster*.

**Figura 8:** Durante a GBE ocorrem eventos de intercalação celular que permitem o alongamento do eixo antero-posterior.

**Figura 9:** Olho composto em *Drosophila melanogaster*.

**Figura 10:** O complexo de caderinas-cateninas e o estabelecimento inicial dos contactos de adesão.

**Figura 11:** Proteínas do complexo da aPKC.

**Figura 12:** Interações conhecidas do dímero aPKC-PAR6.

**Figura 13:** Proteínas do complexo do Lgl.

**Figura 14:** Proteínas do complexo de Crumbs.

**Figura 15:** Organização das proteínas do complexo de Crumbs na membrana citoplasmática Crumbs.

**Figura 16:** Modelo de acção dos três complexos de polarização epitelial em *Drosophila*.

**Figura 17:** A localização assimétrica das proteínas centrais em polaridade planar é essencial para a PCP.

**Figura 18:** Recombinação mitótica na linha germinal usando o sistema FRT/ovo<sup>D</sup>.

**Figura 19:** Utilização do sistema FLP/FRT para gerar clones mitóticos

**Figura 20:** Esquema representativo da análise de complementação.

**Figura 21:** Screen em epitélio adulto para os mutantes *singleton* 2R – oito linhas apresentam defeitos na formação do epitélio do olho adulto.

**Figura 22:** Oito mutantes *singleton* foram seleccionados com defeitos em epitélio adulto.

**Figura 23:** Dois dos três novos grupos de complementação apresentam defeitos no olho adulto

**Figura 24:** Embriões mutantes maternos do G7 (G7<sup>m</sup>) formam normalmente o epitélio da blastoderme.

**Figura 25:** Embriões mutantes maternos e zigóticos do G7 (G7<sup>m/z</sup>) apresentam defeitos no epitélio da blastoderme.

**Figura 26:** Embriões mutantes maternos e mutantes maternos e zigóticos do G7 ( $G7^m$  e  $G7^{m/z}$ ) não conseguem realizar o movimento de GBE.

**Figura 27:** Embriões mutantes maternos do G8 ( $G8^m$ ) são fenotipicamente normais ao longo do desenvolvimento embrionário.

**Figura 28:** Embriões mutantes maternos e zigóticos do G8 ( $G8^{m/z}$ ) têm assimetrias na distribuição cortical dos núcleos e o epitélio da blastoderme fragmentado.

**Figura 29:** Embriões mutantes maternos e zigóticos do G9 ( $G9^{m/z}$ ) apresentam assimetrias na distribuição cortical dos núcleos.

**Figura 30:** Embriões mutantes maternos e zigóticos do G9 ( $G9^{m/z}$ ), conseguem formar o epitélio da blastoderme apesar das assimetrias nucleares.

**Figura 31:** Embriões mutantes maternos e mutantes maternos zigóticos do G9 ( $G9^m$  e  $G9^{m/z}$ ), conseguem executar normalmente o movimento de GBE, mas apresentam invaginações na ectoderme.

**Figura 32:** Mapeamento citológico do grupo 7.

**Figura 33:** Mapeamento citológico do grupo 8.

**Figura 34:** Mapeamento citológico do grupo 9.

**Figura 35:** A expressão zigótica de *Stbm* é necessária para a formação da membrana plasmática durante a embriogênese