

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**The role of ecdysone in the timely development of the
Drosophila melanogaster brain**

Andreia Costa Oliveira

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Versão pública

Dissertação orientada por:
Doutora Catarina Homem, CEDOC
Doutor Élio Sucena, FCUL

2017

Acknowledgments

First and foremost, I'd like to thank my supervisor, Catarina Homem. Thank you for the opportunity to work under your guidance on such an amazing project.

Thank you to Marisa Oliveira who first introduced me to the laboratory life and made me fell in love with *Drosophila melanogaster*.

I'd also like to thank the members of the Proliferation and Fate Regulation of Stem Cells Lab that accompanied me throughout the journey of this past year: Márcia Garcez, Graça Marques and Margarida Venda, thank you for your teaching, advice and patience to put up with my craziness, I consider all of you my good friends.

Thank you to all my friends for your moral support and for always listened to me.

Thank you to my mother for allowing me to pursue this dream of science and always supporting my decisions.

Thank you to João, for being there throughout all my crises of stress and doubt. Thank you for seeing the bright side in all the times when I couldn't, without you this would not have been possible, you got me through this journey with the rest of my sanity intact.

I dedicate this thesis to my father, Carlos Oliveira. You were always my biggest supporter, my favourite person in the world. I know you would have been the one who would be most proud of this achievement. Thank you for making me who I am.

Sumário

Para formar um organismo com o tamanho correto e as estruturas estereotípicas que são características de cada espécie, os animais têm de regular o seu crescimento. O tamanho final do corpo e dos órgãos que o constituem é determinado pelo número e tamanho das suas células no final do desenvolvimento. Para regular o crescimento dos diferentes órgãos e tecidos, os animais têm de regular a duração e o rácio do crescimento e proliferação celular.

Proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células totais num determinado tecido. Em vários tecidos do organismo nem todas as suas células têm esta capacidade, mas apenas um pequeno grupo de células com capacidades multipotentes, denominadas de células estaminais. Células estaminais são células com a capacidade de produzir os vários tipos de células de um tecido e de se auto renovar mantendo um potencial multipotente. Esta capacidade permite fazer com que estas células proliferem durante um grande período de tempo sem perderem as suas características estaminais. O processo de autorrenovação e proliferação de células estaminais é regulado por fatores intrínsecos à célula e também por fatores extrínsecos. Entre os vários fatores extrínsecos associados à regulação da proliferação e diferenciação das células estaminais, as hormonas são um dos fatores menos estudado apesar que a sua influencia na regulação destas células já ser há muito conhecida.

Hormonas são pequenas moléculas produzidas e secretadas por órgãos endócrinos. As suas funções são, entre muitas outras, promover a comunicação entre os vários órgãos do organismo e a regulação de vários processos fisiológicos, desde a reprodução e maturação sexual até à regulação do fornecimento de nutrientes, metabolismo ou mesmo a regulação direta do crescimento dos órgãos e progressão do desenvolvimento. Apesar de hormonas terem sido há muito identificadas como reguladores chave do desenvolvimento e crescimento dos organismos, o seu papel na regulação das células estaminais ainda é pouco compreendido.

Drosophila melanogaster é um inseto holometábulo, o que significa que o seu desenvolvimento consiste numa fase embrionária, uma fase larvar composta por três estádios, uma fase de pupa e uma fase de adulto. A duração do desenvolvimento deste animal depende de vários fatores externos como a temperatura e a nutrição ou viabilidade de todos os seus órgãos.

O crescimento em *Drosophila melanogaster* acontece exclusivamente durante o desenvolvimento larvar. Isto significa que o tamanho do individuo adulto é determinado pelo tamanho da larva no final do ultimo estádio larvar e início da metamorfose logo, para compreender como se forma um órgão com o tamanho e proporções corretas é essencial perceber como são regulados os mecanismos que controlam o inicio, a duração e o fim do crescimento. Em *Drosophila* a temperatura, a nutrição ou a existência de ferimentos nos tecidos são fatores que regulam diretamente o crescimento através da modulação da síntese de hormonas.

O desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* está sob o controlo de 3 hormonas e de a interação entre elas. Estas hormonas são a neuro-hormona protorácica (PTTH), a hormona Juvenil (JH) e a ecdisona. A ecdisona é uma hormona esteroide, produzida na glândula protorácica e é um dos principais reguladores fisiológicos do tamanho do corpo e dos órgãos. Depois de produzida esta hormona é libertada transformada na sua forma ativa nos vários tecidos alvo do animal. Cada tecido alvo promove então uma resposta específica a esta hormona. A libertação da ecdisona é feita em picos durante o desenvolvimento e, dependendo da sua contração em circulação no animal a sua função é a indução da transição entre os vários estádios larvares. Durante o terceiro e ultimo estádio larvar, a ecdisona tem a

função de ativar as cascatas génicas necessárias para promover as mudanças comportamentais e fisiologias que precedem a metamorfose e levam à transição do estágio larvar para uma pupa.

Ao contrário dos outros tecidos do animal, o sistema nervoso da *Drosophila melanogaster* adulta é formado a partir de um grupo pequeno de células estaminais neuronais, os neuroblastos. Estas células têm origem no embrião e proliferam durante todo o desenvolvimento larvar, dividindo-se assimetricamente para dar origem a duas células, uma célula que mantém a identidade de neuroblasto e uma célula que já está comprometida a diferenciar. A proliferação dos neuroblastos é caracterizada pela expressão de uma cascata temporal de fatores de transcrição que dão a estas células a percepção do seu estágio de desenvolvimento e regulam a formação dos diferentes tipos de neurónios. Durante o desenvolvimento na pupa os neuroblastos continuam a dividir assimetricamente por um período limitado de tempo. No entanto, estas células vão diminuindo de tamanho com cada divisão, entre as 16 e as 86 horas depois da formação da pupa os neuroblastos acabam o seu período proliferativo e desaparecem. A altura em que os neuroblastos começam e acabam esta fase proliferativa tem de ser coordenada com o estado do desenvolvimento do animal para que sejam formados os neurónios corretos em cada fase do desenvolvimento, pois diferentes tipos de neurónios têm de ser formados em diferentes alturas. O número de neurónios formados no final do desenvolvimento depende também do número de vezes que os neuroblastos dividem. Embora se saiba que as hormonas regulam o tempo de desenvolvimento, e que o desenvolvimento do sistema nervoso central está muito bem sintonizado com o desenvolvimento do animal, o papel hormonal na regulação da proliferação dos neuroblastos continua pouco descrito.

A ecdisona foi recentemente descrita como sendo um regulador chave na mudança de comportamento dos neuroblastos durante o desenvolvimento da pupa. Esta hormona em conjunto com o mediator complex, um complexo proteico que liga fatores de transcrição à RNA polimerase II, mudam a expressão de várias enzimas metabólicas durante a altura da transição de larva para pupa. Este evento vai promover uma transição no metabolismo celular dos neuroblastos, de baseado em glicólise para baseado em fosforilação oxidativa, induzindo a redução do tamanho das células após cada divisão e eventualmente o seu desaparecimento. Ecdisona está descrita como tendo a capacidade de induzir respostas diferentes no mesmo tecido, dependendo do estágio de desenvolvimento ou a sua concentração em circulação. importante na regulação da proliferação e diferenciação dos neuroblastos, embora não se tenha o completo entendimento de como o faz. Este facto associado com a identidade temporal que é característica dos neuroblastos sugere que a diminuição de tamanho e desaparecimento podem ser regulados por esta hormona durante uma janela temporal ou de desenvolvimento específica.

O primeiro objetivo deste projeto foi o de perceber se os neuroblastos têm um mecanismo intrínseco que, ou numa altura específica ou depois de um número de divisões específico, sinaliza estas células para parar de proliferar ou, se a duração da fase proliferativa dos neuroblastos é regulada exclusivamente por fatores extrínsecos. O segundo objetivo foi o de determinar se existe uma janela de desenvolvimento específica durante a qual a sinalização da hormona ecdisona promove os neuroblastos a diminuir de tamanho após cada divisão, promovendo assim o seu eventual desaparecimento e, a nível celular, este projeto teve como objetivo perceber que fatores permitem que os neuroblastos crescem e proliferem depois de cada divisão.

Neste projeto eu mostro que a falta de ecdisona durante o desenvolvimento larval leva a que os neuroblastos continuem a proliferar indefinidamente. Eu mostro também que quando a sinalização de ecdisona é bloqueada apenas durante o desenvolvimento da pupa isto não se verifica. Os meus resultados demonstram que a ecdisona atua durante uma janela de desenvolvimento fechada para ativar uma resposta temporalmente específica nos neuroblastos.

Palavras chave: drosophila, ecdisona, células estaminais, cérebro, hormonas, neuroblasto

Abstract

Development must be tightly regulated in order to form animals with the appropriate size and correctly differentiated structures. Organ growth is achieved by a balance between cell growth, proliferation, differentiation and death. Stem cells are responsible for generating the differentiated cells that will populate the different tissues of the organism. The growth process is coordinated by hormones that are responsible for modulating development and coordinating the organism's physiological responses to the external environment. However, the role hormones play in regulating stem cells is still poorly understood. The steroid hormone ecdysone, the central regulator of developmental timing in *Drosophila* is described to play a critical role in regulating cell proliferation and morphogenesis in tissues like the wing disc and the germ line. Recent work has also demonstrated that this hormone is involved in neural development. Neural stem cells, called neuroblasts are formed in the embryo and proliferate throughout larval development to originate all the neurons and glia present in the adult fly. In pupal stages, these cells cease to proliferate and disappear. The role of ecdysone in the regulation of neuroblast proliferation and fate remains unknown. In this study I demonstrate that the lack of ecdysone during larval development leads neuroblasts to change their behaviour. My results suggest that ecdysone plays a role in regulating the termination of neuroblast proliferation within a specific temporal window in larval development.

Keywords: drosophila, ecdysone, stem cells, brain, hormones, neuroblast