

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**IN VIVO CHARACTERIZATION OF CELL FATE DETERMINANTS
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* NEURAL STEM CELLS**

Patrícia Raquel Delgado Coelho

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Versão Pública

Dissertação orientada por:
Doutora Catarina Homem, CEDOC
Doutora Gabriela Rodrigues, FCUL

2018

Acknowledgments

First of all, I want to thank to my chief and supervisor, Catarina Homem, for the opportunity to work in her laboratory and for all guidance, patience and scientific knowledge that she was passed on to me.

To my laboratory colleagues: Marta Afonso, Eunice Silva, Tiago Fidalgo (a plus for the thesis correction!), Margarida Venda, Andreia Oliveira, Renato Colaço, Márcia Garcez and Graça Marques, thanks for all your support during this long live-imaging journey and for all the tips to improve my work.

A thanks with all my heart to Marta, Eunice, Marta Silva and Andreia Fernandes, that joined me in snack-, dinner-, lunch-, weekends- times. For all the jokes and tears shared. I have discovered friends for life in you.

To my dearest friend Daniela, that supported me in all my decisions.

To my family, that encouraged me to follow my scientific dreams.

This thesis is dedicated to my *grandparents*, Maria do Carmo and João Delgado, for being my role models and watching over me, to my *partner in crime*, Pedro Conde, that always sees the good in my doings, and to my *two dogs*, Cookie and Dik, because my life has no meaning without their happy wagging tails.

“Working hard is important but
there’s something that matters even
more: believing in yourself”
Harry Potter

Abstract: Balance between maintenance and differentiation of stem cells can be controlled by the mode of cell division, which can be either asymmetric or symmetric, leading to the correct growth and development of the body. Neural stem cells of *Drosophila melanogaster*, the neuroblasts (NBs), are asymmetrically dividing cells, that divide multiple times throughout development, to self-renew and give rise to more committed cells. Once NBs have generated their complete neuronal lineages disappear, which occurs in late pupa stages. Central brain NBs are divided into two groups: type I and type II NBs. Type II NBs create more progeny because they generate an intermediate neural progenitor (INP) that divides asymmetrically to form another INP and a ganglion mother cell (GMC), which originates two neuron/glial cells. While it is known that at 16h after pupa formation there are no type II NBs present in the brain, both the mechanism by which they exit cell cycle as their cell fate characteristics are unclear. Here I use a live imaging approach that allows me to do a lineage characterization of type II NBs throughout pupal stages to determine by which mechanism they disappear. I have found that approximately at 10h after pupa formation, type II NBs start exiting cell cycle. In the last division of NBs, they take a longer time to complete cell cycle and have cell sizes similar to INPs. However, this might not be due to a change in cell identity since a progressive decrease in NBs size is observed throughout pupa stages. To determine the stemness degree of NBs at their terminal division and distinguish between NBs or the more committed cells of the lineage, I used *earmuff* expression as a readout. *Earmuff* is a transcription factor required for INP cell fate commitment and is expressed in INPs but not in NBs. I determined that *earmuff* is not expressed in terminal NBs, which indicates that they have the same stemness degree as younger NBs. Interestingly, I found that terminally dividing NBs divide symmetrically into two more committed, similarly fated cells. Based on cell size, cell cycle duration and *earmuff* expression, these resulting cells seem to be INPs. Overall, terminally dividing NBs have an extended cell cycle and undergo a terminal symmetric differentiating division. Therefore, this thesis can help the characterization of type II lineages in a quantitative and qualitative way, in a temporal-related manner.

Key-words: Stem cells; asymmetric division; neuroblasts terminal division; cell cycle exit; live cell imaging

Resumo: Ao longo da vida, cada organismo tem a capacidade de crescer e de se desenvolver de uma maneira altamente controlada e programada. Este crescimento é alcançado devido a processos de divisão celular que estão inter-relacionados com a capacidade que cada célula tem de proliferar ou, em contrapartida, de terminar o seu ciclo celular, diferenciando-se, originando todos os órgãos do corpo. O balanço proliferação/diferenciação é altamente regulado nas células estaminais, pelo que compreendê-las e manipulá-las é um dos principais focos da Biologia actual. As células estaminais são células indiferenciadas que têm capacidade de se auto-replicar e de originar células mais diferenciadas. Os processos reguladores da auto-replicação e diferenciação destas células constituem pontos chave na obtenção de um crescimento e organização tecidual correcta, em momentos específicos do desenvolvimento. O controlo proliferação - diferenciação deve ser mantido ao longo de todo o ciclo de vida dos indivíduos, de modo a garantir a homeostase celular e tecidual e prevenir a formação de tumores. Uma das maneiras para alcançar e manter este controlo é através da regulação do modo de divisão celular: as células podem dividir-se simetricamente ou assimetricamente. A mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, é um dos organismos modelo que mais contribui para o conhecimento científico referente ao controlo do modo de divisão de células estaminais. Graças à simplicidade do seu Sistema Nervoso Central (SNC) e das técnicas genéticas e moleculares usadas na sua manipulação, este organismo é muito

utilizado no estudo de processos celulares, entre eles a neurogênese. As células estaminais neuronais da *Drosophila*, os neuroblastos (NBs), são células que possuem uma linhagem esterotipada. Estas células são muito importantes para perceber os mecanismos que estão por detrás da homeostase celular, tanto no controlo da proliferação como na regulação do momento em que estas já não são mais necessárias ao organismo, acabando por sair do seu ciclo celular e terminando o processo de proliferação. Os NBs são células que se dividem assimetricamente, múltiplas vezes ao longo do desenvolvimento, auto-replicando-se e originando uma célula que, ainda que considerada indiferenciada, já tem o seu potencial celular mais rescrito. No final da neurogênese, quando os NBs originam toda a sua linhagem neuronal, terminam o seu ciclo celular e, conseqüentemente, a sua proliferação. No cérebro da *Drosophila*, existem tipos de NBs muito diferentes, que podem ser distinguidos quer pela sua posição no cérebro quer pelas características da sua linhagem. Cada tipo de NBs possui uma neurogênese específica, que inclui tempos de desenvolvimento característicos tanto para o seu aparecimento como para o desaparecimento do ciclo celular. Os NBs presentes no Cérebro Central são divididos em dois grupos: tipo I e tipo II. Apesar de haver semelhanças entre as duas linhagens, ambas crescem e se desenvolvem através de divisões assimétricas. Ainda assim, os NBs tipo II criam um maior número de progenia pois geram uma célula progenitora neuronal intermédia (INP) que também se divide assimetricamente, originando outra INP e uma célula mãe-ganglionar (GMC) que se irá dividir simetricamente, dando origem a dois neurónios ou células da glia. Antes de se dividir a primeira vez, a INP passa por um período de maturação onde cresce e adquire os factores necessários à restrição da sua identidade e, conseqüentemente, da identidade diferenciada do resto da linhagem. Assim, estudar a linhagem tipo II revela-se importante pois, além desta possuir uma INP que funciona como amplificador de linhagem, torna-se mais susceptível a erros, levando mais facilmente à geração de tumores. Estudos anteriores demonstraram que por volta as 16 horas após a formação de pupa (APF), os NBs tipo II já não se encontravam presentes no cérebro. Deste modo, apesar de ser conhecida a altura do seu desaparecimento, o mecanismo através do qual estas células terminam o seu ciclo celular bem como as suas características de destino celular não são compreendidas. No presente estudo, utilizo uma técnica de imagiologia de células vivas que me permite realizar uma caracterização completa da linhagem dos NBs tipo II, ao longo do estágio de pupa, de modo a determinar o mecanismo pelo qual estas células desaparecem, bem como a identidade celular que apresentam aquando da sua última divisão. A partir desta técnica, verifiquei que os NBs começam a terminar o seu ciclo celular a partir das 10 horas APF, confirmando a sua ausência às 16 horas APF. Assim, pude caracterizar a última divisão deste tipo de células, encontrando diferenças para o que anteriormente tinha sido descrito nas abundantes divisões assimétricas. Ao contrário do que acontece nestas últimas, presentes nos estádios larvares e no princípio do estágio de pupa, os NBs que se dividem terminalmente demoram aproximadamente o dobro do tempo para completar o seu ciclo celular e possuem tamanhos celulares menores, parecidos com as INPs. Ainda assim, a redução do tamanho celular dos NBs parece não estar relacionada com uma mudança na identidade celular, visto que é verificada uma progressiva redução do seu tamanho, ao longo de todo o estágio de pupa. De modo a determinar o grau de estaminalidade dos NBs no momento da sua última divisão e permitir a distinção entre NBs e as restantes células diferenciadas da linhagem, utilizei a expressão de *Earmuff* (*erm*) como um “readout” de diferenciação. *Earmuff* é um factor de transcrição necessário na restrição de identidade celular. Estudos apontam para o facto deste factor regular negativamente os factores de transcrição envolvidos no mecanismo de auto-replicação, inibindo-os. Assim, *earmuff* é característico de células diferenciadas, sendo expresso nas INPs maduras e nas GMCs, mas não nos NBs. Os meus resultados mostram que nas divisões assimétricas encontradas em pupa os NBs não expressam *erm*, sendo este apenas encontrado nas células diferenciadas da linhagem. No seguimento, o mesmo se verifica na divisão terminal, onde

os NBs continuam a não expressar *erm*. Isto significa que, na última divisão, os NBs possuem o mesmo grau de estaminilidade que os NBs presentes em estádios mais precoces, apesar de existirem diferenças em algumas características celulares. Curiosamente, o modo de divisão dos NBs terminais parece ser diferente. Ao contrário das divisões assimétricas encontradas em larva e nos primeiros estádios de pupa, a última divisão é simétrica. Aqui, os NBs dividem-se simetricamente em duas células que aparentam ser similares e ter o mesmo destino. Com base no tamanho celular, na duração do ciclo celular, na existência de um período de maturação e na posterior expressão de *erm*, as células originadas aparentam ser INPs. Além disto, a sua progenia também aparenta ser idêntica àquela presente nas divisões assimétricas. Tal como nestas, as INPs dividem-se assimetricamente, originando outra INP e uma GMC. Mais estudos são necessários de forma a confirmar a identidade destas células e a verificar se a divisão da GMC proveniente da linhagem terminal é idêntica à encontrada nas linhagens assimétricas. Assim sendo, parece haver uma conservação no modo de progressão das linhagens de NBs tipo II presentes em fase de pupa, cuja única diferença reside no modo de divisão dos NBs: assimétrica na fase proliferativa e simétrica na fase terminal, que culmina na diferenciação celular. O trabalho desenvolvido constitui um ponto de partida no conhecimento das características celulares que identificam as células estaminais neuronais de *Drosophila* nos momentos de desenvolvimento que precedem o seu desaparecimento, pelo que pode ajudar numa caracterização mais precisa e profunda das linhagens de NBs tipo II, tanto de uma forma quantitativa quanto qualitativa, através de uma perspectiva temporal.

Palavras-chave: Células estaminais; divisão terminal do neuroblasto; divisão assimétrica; imagiologia de células vivas