

MARAYSA DE OLIVEIRA MELO

O papel do complexo PAR durante a embriogênese
do placóide do cristalino

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador: Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan

Versão corrigida. Versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

RESUMO

Melo MO. O papel do complexo PAR durante a embriogênese do placóide do cristalino [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O cristalino origina-se de um epitélio simples e cuboidal que recobre a vesícula óptica evaginada do tubo neural, chamado de ectoderma pré-placoidal. A região basal desse ectoderma pré-placoidal está voltada para a vesícula óptica e a região apical está exposta ao ambiente extraembrionário. Nesse estágio, os filamentos de actina estão distribuídos ao longo do eixo apico-basal. Após o contato com a vesícula óptica, o ectoderma pré-placoidal sofre intensas mudanças que incluem aumento da altura e rearranjo para formar o placóide do cristalino, um tecido pseudoestratificado. Uma das mudanças mais expressivas que ocorrem é o acúmulo de uma rede de actina na região apical que é importante para a constrição apical durante a invaginação do placóide do cristalino. As características dessa rede de actina é restrita à região do placóide e claramente segue a orientação da polaridade que é particular dessa região. As proteínas PAR têm sido constantemente associadas com eventos de polarização e o efeito da segregação das proteínas PAR é importante para o estabelecimento e manutenção da polaridade celular. Neste trabalho, nós propusemos estudar a função das proteínas de polarização do complexo PAR com enfoque na função da proteína de polarização PAR3 e sua fosforilação durante o estabelecimento da rede apical de actina. Para analisar o papel das proteínas PAR durante o alongamento do placóide do cristalino em embriões de galinha, o ectoderma pré-placoidal (HH9-10) foi eletroporado, com plasmídeos contendo a sequência das proteínas PAR de interesse, e analisados em estágio de placóide (HH13). Os cortes histológicos dos embriões eletroporados foram submetidos à marcação para actina e imunofluorescência para identificar as células eletroporadas. Foi visto que a superexpressão de PAR3 induz a formação de pontos ectópicos de actina na membrana baso-lateral do placóide do cristalino. A formação desses pontos ectópicos e o recrutamento de aPKC é independente do estado de fosforilação da treonina 833, resíduo localizado no PAR3, no domínio de ligação ao aPKC. Além disso, PAR3 induz o recrutamento ectópico de actina para a membrana apical do ectoderma peri-placoidal. E novamente, essa indução é independente do estado de fosforilação da treonina 833. Em conjunto, esses dados nos sugerem que PAR3 é suficiente para recrutar actina no placóide do cristalino e em contraste com o que foi visto em células migratórias, o estado de fosforilação da treonina 833 de PAR3 não interfere com a habilidade de PAR3 se associar com aPKC.

Palavras-chave: Actina. Embrião de galinha. Placóide do cristalino. Polarização celular. Proteínas PAR.

ABSTRACT

Melo MO. The role of PAR complex during lens placode embryogenesis [Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The lens originates from a simple cuboidal epithelium that overlies the optic vesicle that evaginates from the neural tube, called pre-placodal ectoderm. The basal region of this pre-placodal ectoderm faces the optic cup and its apical region is exposed to the extraembryonic environment. At this stage, the actin filaments are distributed along its apical-basal sides. After the contact with the optic vesicle, the pre-placodal ectoderm undergoes intense changes, which include height increase and rearrangement into the pseudostratified lens placode. One of the expressive changes that occur is the accumulation of an apical actin network that drives apical constriction during the lens placode invagination. The appearance of this network is restricted to the placodal region and clearly follows polarity guidance cues particular to this region. The PAR proteins have been consistently associated with polarization events and the effect of PAR proteins segregation is important for the establishment and maintenance of cell polarity. Here, we propose to study the function of the PAR complex proteins and we focused on the role of the polarity protein PAR3 and its phosphorylation in the establishment of this apical actin network. To analyze the role of Par proteins during lens placode elongation in chick embryo, the pre-placodal ectoderm (HH9-10) was electroporated, with plasmids containing the interested PAR proteins, and it was analyzed in lens placode stage (HH13). The histological sections from electroporated embryos were subjected to actin labeling and immunofluorescence to identify the electroporated cells. Overexpression of PAR3 induced formation of spot-like ectopic actin clusters in the basolateral membrane of the lens placode. The formation of these clusters, as well as recruitment of aPKC was independent of the phosphorylation state of the Threonine 833 residue at the PAR3 aPKC-binding site. In addition, PAR3 induced ectopic actin networks in the apical membrane of the periplacodal ectoderm. Again, this induction was independent of the phosphorylation state of Threonine 833. Taken together, these data suggest that PAR3 is sufficient for actin recruitment in the lens placode. In contrast to previous reports in migrating cells, the phosphorylation state of PAR3 Thr833 does not interfere with its ability to associate with aPKC in lens placodal epithelia.

Keywords: Actin. Chicken embryo. Lens placode. Cell polarization. PAR proteins

1 INTRODUÇÃO

1.1 Morfogênese do cristalino durante o desenvolvimento embrionário

O cristalino é uma estrutura biconvexa, maciça e transparente que está situado na porção distal do olho. Embriologicamente, o cristalino é formado durante o processo de neurulação. Após a elevação das dobras neurais e fechamento do tubo neural, as vesículas ópticas evaginam do tubo neural na região mais anterior da cabeça (telencéfalo) e irão dar origem ao globo ocular incluindo a retina e epitélio pigmentar. Recobrimdo toda a região cefálica existe um tecido epitelial cuboidal chamado de ectoderma cefálico, desse ectoderma apenas as células que recobrem à vesícula óptica evaginada do tubo neural darão origem ao cristalino (Lovicu, McAvoy, 2005). Para que o cristalino chegue à sua forma e composição final ocorrem diversas alterações na morfologia do tecido precursor. Inicialmente, o espaço entre o tubo neural e o ectoderme, na área correspondente ao futuro cristalino, é preenchido por células mesenquimais. Com a evaginação da vesícula óptica, esta desloca as células mesenquimais e entra em íntimo contato com o ectoderme. O ectoderme que recobre a vesícula óptica (chamado de ectoderme pré-placoidal) é um epitélio simples, formado por células cuboides, morfologicamente indistintas do ectoderme circundante, a não ser por recobrir a vesícula óptica (Figura 1). Como qualquer epitélio clássico, o ectoderme pré-placoidal é exposto aos diferentes microambientes nos domínios apical e basal. No domínio basal, o ectoderma pré-placoidal está em contato com a matriz extracelular, enquanto que o domínio apical está em contato com o fluido extraembrionário.

Apesar da íntima aposição entre vesícula óptica e o ectoderme pré-placoidal, existe um pequeno espaço entre estes dois tecidos, local onde tanto a vesícula óptica, quanto o cristalino em desenvolvimento, irão produzir a matriz extracelular (Zwaan, Hendrix, 1975). Após o contato com a vesícula óptica, e sob seu efeito indutivo, com a produção de BMP, Fgf8 e Delta (Ogino et al., 2012), as células do ectoderme pré-placoidal aumentam 4 vezes a sua altura no sentido basal-apical, se tornam colunares e formam um tecido pseudoestratificado, o placóide do cristalino (Figura 1, Lang, 2004; Lovicu, McAvoy, 2005; Sullivan et al., 2004; Zwaan, Hendrix, 1975). Posteriormente, o placóide do cristalino invagina, de modo sincronizado com

a invaginação da vesícula óptica (Figura 1), até fundir suas bordas e gerar a vesícula do cristalino.

As células adjacentes ao placóide do cristalino, que não se alongam e continuam como um epitélio simples (Figura 1), se fundem na porção mais distal do olho e formam as camadas da córnea junto com as células da crista neural, que migram para essa região (Cvekl, Tamm, 2004). A vesícula óptica dará origem à retina e ao epitélio pigmentar (Figura 1), enquanto que sua extremidade anterior cresce e forma o músculo da íris e o corpo ciliar (Cvekl, Tamm, 2004).

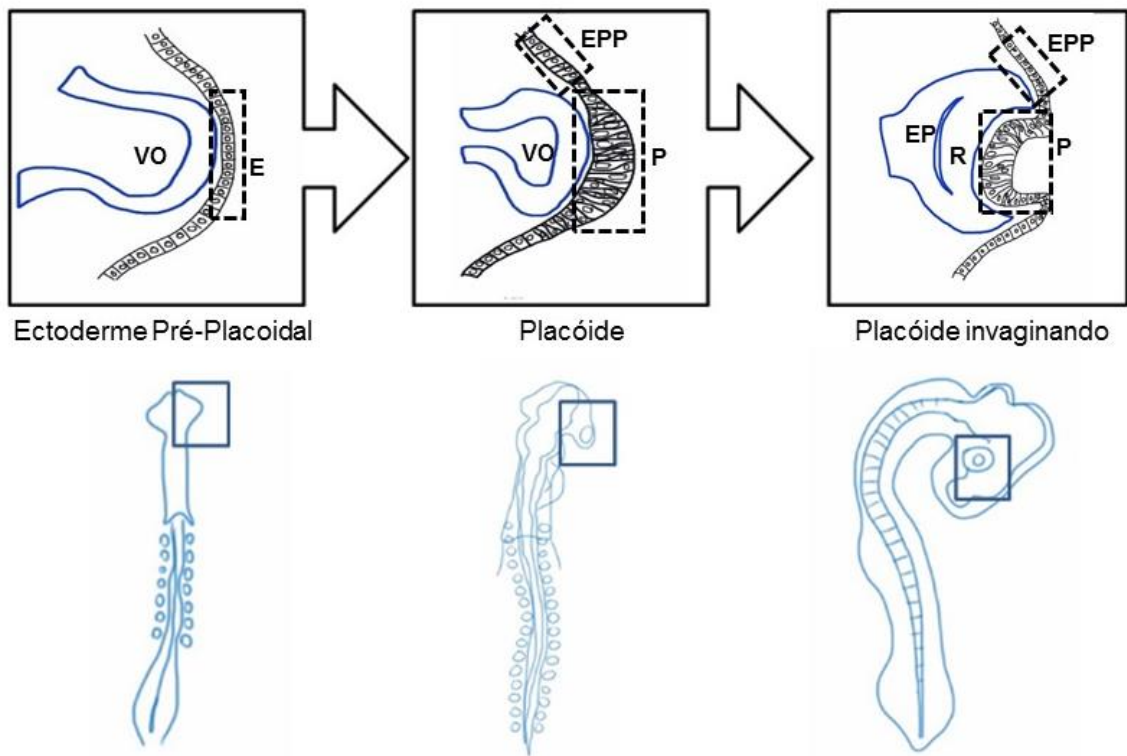


Figura 1: Diagrama com a visão lateral detalhada do placóide do cristalino em desenvolvimento. O ectoderme pré-placoidal começa como um epitélio simples cuboidal (E), que recobre a vesícula óptica (VO) evaginada do tubo neural, em embriões HH10. As células que recobrem e estão em contato com a vesícula óptica, se alongam e formam um tecido pseudoestratificado, o placóide do cristalino (P), em embriões HH13. Posteriormente, o placóide do cristalino invagina junto com a vesícula óptica para formar a vesícula do cristalino. As células adjacentes ao placóide, o ectoderme peri-placoidal (EPP), não alonga e se mantém como um epitélio cuboide simples por todo o processo. A retina (R) e o epitélio pigmentar (EP) são, respectivamente, as estruturas mais distais e proximais da vesícula óptica.

Os próximos passos na formação do cristalino envolvem, principalmente, a diferenciação dos dois tipos celulares presentes no cristalino: as células das fibras primárias e as células do epitélio do cristalino. As células das fibras primárias alongam-se em direção ao lúmen da vesícula do cristalino, obliterando-o (Ogino, Yasuda, 2000). Estas fibras são responsáveis pela propriedade de translucidez e refringência do cristalino. As células do epitélio do cristalino na porção mais distal da lente, por sua vez, permanecem indiferenciadas e proliferativas, gerando as células das fibras secundárias, que são adicionadas às fibras primárias durante toda a vida do indivíduo (Lovicu, McAvoy, 2005; Wride, 1996).

1.2 Alongamento apico-basal do placóidio do cristalino

O alongamento apico-basal em epitélios é caracterizado molecularmente e morfológicamente pelo aumento do eixo apico-basal, reorganização do citoesqueleto e, a nível de membrana, redistribuição de junções aderentes e distribuição diferenciada de proteínas nas superfícies apicais, basais e laterais.

Dependendo do tipo celular, marcadores das membranas apicais e basolaterais podem estar relacionados à futura função do epitélio em questão, como canais iônicos na região basolateral (e.g. Na⁺/K⁺ ATPase; Nelson, Hammerton, 1989) ou glicoproteínas na membrana apical (e.g. gp135; Cohen et al, 2004; Ojakian et al, 1990). Por outro lado, também são utilizados marcadores mais gerais, como junções oclusivas e junções aderentes (revisto em Gibson, Perrimon, 2003; Macara, 2004). Estes últimos têm sido mais comumente utilizados em trabalhos recentes devido à sua universalidade durante o alongamento apico-basal.

Durante o alongamento do placóide do cristalino, as células do ectoderme pré-placoidal demonstram todas as características morfológicas de alongamento apico-basal, acompanhado de um intenso rearranjo ultraestrutural. As células formam um tecido pseudoestratificado e aumentam significativamente de comprimento, evoluindo de 15µm para 50µm imediatamente antes do início da sua invaginação (Byers, Porter, 1964). A membrana apical fica irregular, apresentando microvilosidades e vesículas exocíticas e, a adesão intercelular aumenta, diminuindo o espaço intercelular (Byers, Porter, 1964; Schook, 1980; Wrenn, Wessels, 1969). Esta aproximação célula-célula pode ser devido à redistribuição de junções

aderentes. O realocamento de junções para a porção apical faz parte do processo do alongamento apico-basal em eventos de desenvolvimento epitelial. Por exemplo, durante a gastrulação de *Drosophila melanogaster*, as células ventrais correspondentes ao mesoderma se alongam e redistribuem as junções aderentes da região baso-lateral para a região apical (Kolsch et al., 2007).

O ectoderme pré-placoidal no estágio HH11 inicial, apresenta células cuboides, com núcleo esférico centralizado, e citoplasma homogêneo, com poucos filamentos de microtúbulos (Figura 2, Byers, Porter, 1964). Após exposição a presença indutiva da vesícula óptica subjacente, surgem filamentos de microtúbulos paralelos ao eixo apico-basal e os núcleos e demais organelas se movem para uma posição mais basal (Bancroft, Bellairs, 1977; Byers, Porter, 1964; Zwaan et al., 1969). Os microtúbulos são mais visíveis na região apical (Figura 2, Maraysa O. Melo) e sua presença é menos visível na região basal (Byers, Porter, 1964).

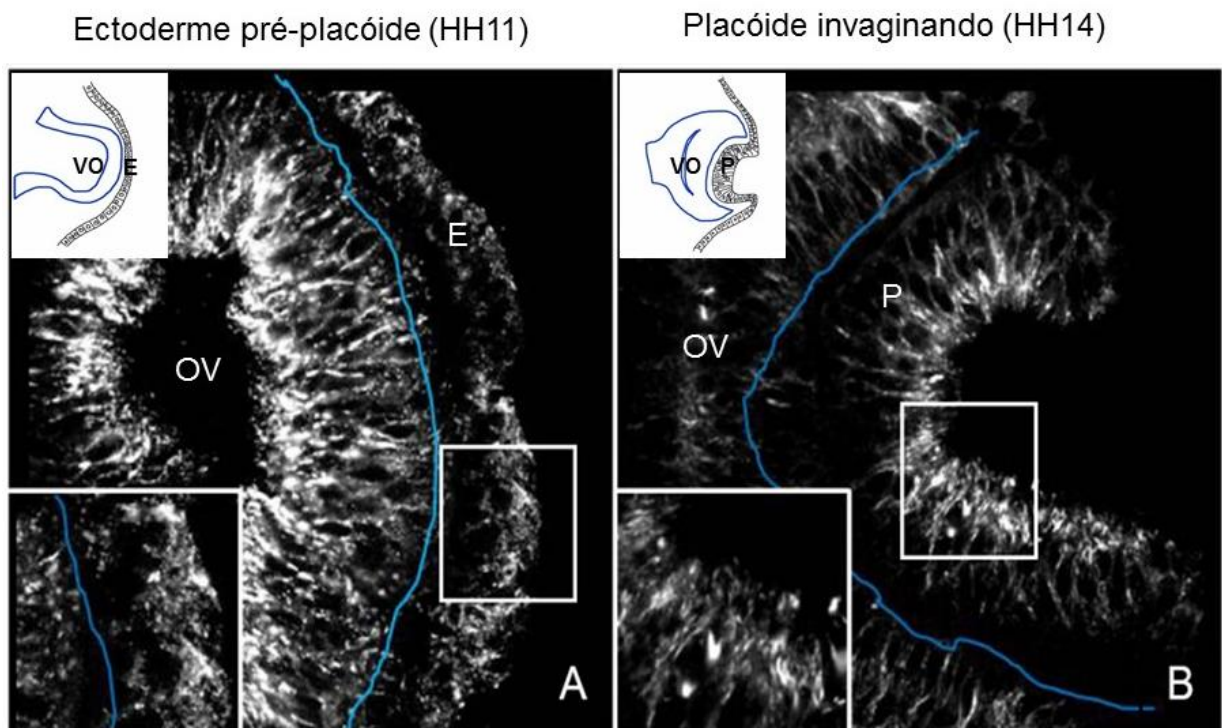


Figura 2: Dinâmica do citoesqueleto de microtúbulos no alongamento do placóide. O citoesqueleto de microtúbulos não tem uma organização evidente (A), mas são mais visíveis na região apical a partir do estágio de placóide (B). Insertos ilustram os aumentos das áreas delimitadas em A e B. No canto esquerdo de cada figura, ilustração da vesícula óptica (VO), ectoderme pré-placoidal (E) e placóide (P). Imagem de Maraysa O. Melo

A polimerização direcionada de microtúbulos ocorre em outros eventos de crescimento apico-basal e tem sido proposto como um dos mecanismos que contribuem para este fenômeno (Bre et al., 1990; Burnside, 1971; Ojakian et al., 1997; Schoenwolf, Powers, 1987). Por exemplo, a disposição de microtúbulos em células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) varia com o estado de diferenciação apico-basal destas (Bacallao et al., 1989). Quando sub-confluentes, células MDCK são achatadas e apresentam distribuição radial de microtúbulos. O aumento do contato intercelular inicia a diferenciação apico-basal, que é acompanhada do aparecimento de feixes de microtúbulos paralelos ao eixo de alongamento com o terminal positivo direcionado para a região basal e negativo para a região apical (Bacallao et al., 1989; Bre et al., 1990). A inibição da polimerização de microtúbulos por colchicina interfere com a diferenciação apico-basal de células MDCK, sugerindo que esta é necessária para a epitelização (Ojakian et al., 1990). Da mesma forma, a despolimerização de microtúbulos de nêurulas de embrião de galinha diminui o alongamento apico-basal da placa neural (Schoenwolf, Powers, 1987). Células do epitélio do cristalino cultivadas em meio com colchicina tem o alongamento celular reduzido, mostrando a importância da polimerização de microtúbulos para formar o placóide do cristalino (Piatigorsky et al., 1972).

Nosso laboratório demonstrou anteriormente, que no estágio de ectoderme pré-placoidal, a actina filamentosa e miosina II estão distribuídas de modo homogêneo por todo o contorno celular (Borges et al., 2011). Após o alongamento das células do ectoderme pré-placoidal para formar o placóide do cristalino, a actina filamentosa e miosina II se acumulam na região apical do placóide do cristalino. Quando o cristalino inicia o processo de invaginação, esta expressão aumentada de actina filamentosa e miosina II, se mantêm na porção apical das células do placóide. A inibição da polimerização do citoesqueleto de actina e da atividade da miosina, impedem a invaginação do placóide do cristalino, sugerindo que a concentração apical de actina é necessária para a progressão da morfogênese do cristalino (Borges et al, 2011).

Apesar das descrições detalhadas das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento do placóide estarem disponíveis desde o século passado, pouco se sabe sobre o que impulsiona o rearranjo do citoesqueleto durante o desenvolvimento do placóide.

1.3 Polarização celular e proteínas de polarização

A polarização celular é um evento no qual há a distribuição assimétrica de elementos celulares, conferindo diferentes funções à diferentes tecidos (Rodriguez-Boulan, Nelson, 1989). Todas as células, exceto raras exceções, apresentam polaridade. Os sinais de polarização têm como função, dentre outras, promover a migração celular, o contato intercelular, para a organização de células em tecidos, o destino celular, através das divisões celulares assimétricas e, a morfogênese.

As moléculas envolvidas na polarização celular e suas funções são conservadas durante a evolução, atuam na polarização do ovócito de *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila*, na polarização apico-basal de epitélio de *Drosophila* e em cultura de células epiteliais de mamíferos, em neuroepitélio de vertebrados, na migração celular de astrócitos, na determinação do axônio, na divisão assimétrica de células tronco, dentre outros (Afonso, Henrique, 2006; Macara, 2004; Suzuki, Ohno, 2006).

Uma característica importante do estabelecimento de polaridade celular é a distribuição assimétrica de proteínas de polarização. Cada uma das proteínas de polarização apresenta propriedades bioquímicas particulares e se associam em domínios distintos (tabela 1) na região apical e basal (Macara, 2004).

Tabela 1: Propriedades bioquímicas e domínios importantes contidos nas Proteínas de polarização.

Tabela 1. Proteínas PAR em vertebrados	
PAR1 (= MARK, EMK)	Quinase de Ser/Thr
PAR3	Contém Domínios PDZ
PAR4 (=LKB1)	Quinase de Ser/Thr
PAR5 (=14-3-3)	Proteína adaptadora
PAR6	Contém Domínios PDZ e Semi-CRIB (<i>Cdc-Rac-Interacting Binding motif</i>) e PBI
Apkc	Quinase de Ser/Thr, PBI
Cdc42	GTPase, domínio de ligação ao GTP

PAR3/PAR6/aPKC formam um complexo ternário, na região apical de epitélios polarizados, através da interação entre domínios específicos dessas proteínas (Figura 3) e através da ativação pela GTPase Cdc42 (Joberty et al., 2000). A principal característica de PAR3 e PAR6 é a ausência de domínios catalíticos.

PAR-6 possui três domínios altamente conservados. O domínio PB1, na região N-terminal, de associação com a proteína aPKC; o domínio PDZ de associação à proteína PAR3 e o domínio Semi-CRIB/PDZ de associação com GTPases, como Rac1 e Cdc42 (Figura 3, Assémat et al., 2008; Macara, 2004).

A proteína PAR3 possui um domínio CR1 na região N-terminal, responsável por sua auto-oligomeração e associação à membrana celular (Krahan et al., 2010). A interação de PAR3 com PAR6/aPKC para a formação do complexo PAR apical, é feita através da ligação PDZ-PDZ de PAR6 e PAR3 ou via domínio de ligação ao aPKC (Figura 3, Assémat et al., 2008; Izumi et al., 1998; Macara, 2004). Os domínios PDZ2 e PDZ3 de PAR3 podem se ligar aos lipídios de membrana ou a microtúbulos e, na região C-terminal, o domínio 4N1 interage com a proteína Tiam1, um fator de ativação da GTPase Rac1 que troca GDP por GTP (Chen, Zhang, 2013; Nakayama, 2007).

A proteína aPKC (atypical protein kinase C) é uma serina/treonina quinase que se associa à proteína PAR6 através de seu domínio PB1. A proteína possui um domínio *zinc-finger* (Zn) com atividade reguladora e um domínio quinásico de associação ao PAR3 (Figura 3). Quando ativada, a proteína aPKC muda de conformação, expondo seu domínio catalítico para a ligação e fosforilação de seu substrato (Costa-Junior et al., 2009). A associação PAR3-aPKC faz com que aPKC fosforile PAR3 e a interação seja desfeita, isso explicaria porque em vários exemplos de epitélios polarizados, PAR3 se localiza em um domínio subapical diferente de PAR6/aPKC (Figura 3, Chen, Zhang, 2013; Maraca 2004; Tepass, 2012).

A proteína de polarização Cdc42 faz parte da família das GTPases, quando ligadas a GTP podem ativar efetores e quando ligadas a GDP estão em sua forma inativa. As GTPases ciclam do estado ativo para inativo devido à ação das proteínas *guanine nucleotide-exchange factors* (GEFs) e das *GTPase-activating proteins* (GAPs), respectivamente.

A GTPase Cdc42 foi identificada, inicialmente, em *Saccharomyces cerevisiae* e sua função é importante para a formação de brotamento durante a divisão celular desse organismo. A redução de Cdc42 inibe a formação de brotamentos e causa

desorganização do citoesqueleto de actina (Johnson, Pringle, 1990). Além de sua função na regulação da polaridade celular, na organização do citoesqueleto de actina, na migração polarizada e no ciclo celular, a proteína Cdc42 atua, também, na ativação das proteínas do complexo PAR através da sua ligação e fosforilação da proteína PAR6 (Heasman, Ridley, 2008).

A proteína PAR6 possui um domínio de interação a GTPases chamado de domínio Semi-CRIB, pois ele não possui alguns resíduos presentes em um domínio CRIB completo. Como esse domínio de ligação do PAR6 ao Cdc42 não está completo, para que a proteína Cdc42 se ligue e ative PAR6, ela necessita do domínio semi-CRIB e do domínio adjacente, o PDZ (Garrard, 2003; Hutterer, et al, 2004; Lin et al, 2000; Yamanaka et al, 2001). Quando a GTPase Cdc42 se liga ao domínio semi-CRIB/PDZ de PAR6, ocorre uma mudança conformacional na proteína PAR6 que expõe o domínio de ligação ao aPKC. Desta maneira, PAR6 se liga à aPKC e é responsável pelo seu posicionamento apical (Garrard, 2003).

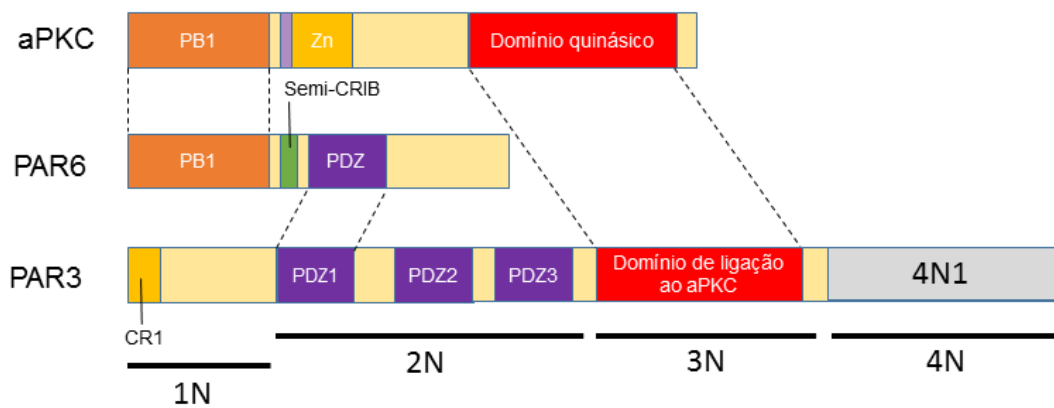


Figura 3: Proteínas PAR e seus domínios de interação. A proteína PAR6 possui um domínio PB1 de ligação ao domínio PB1 de aPKC, um domínio semi-CRIB de ligação à GTPase Cdc42 e um domínio PDZ de ligação ao PDZ1 de PAR3. Par3 possui um domínio de ligação (aPKC binding domain) ao domínio quinásico de aPKC. Domínios baseados em Macara, 2004 e Nakayama, 2007.

A proteína PAR-1 (também conhecido como MARK-2 e EMK), identificada inicialmente em *C. elegans* (Kemphues, 2000), foi identificada posteriormente em mamíferos, e onde também está relacionada com eventos de polarização em epitélios, em neurônios, em linhagens celulares renais e hepáticas (Bohm et al., 1997; Cohen, 2004). A atividade de PAR-1 e sua associação a membrana basolateral precede e é necessária para a organização e estabilização de microtúbulos durante as fases iniciais de polarização (Bohm et al., 1997; Cox et al., 2001; Doerflinger, 2003). A proteína PAR1, está localizada na região baso-lateral de epitélios polarizados e possui um domínio catalítico responsável pela fosforilação de seus substratos. PAR1 é uma proteína do tipo MARK, que regula a atividade das MAPs (Microtubule Associated Proteins). As MAPs promovem a polimerização e estabilização de microtúbulos e sua atividade depende do estado de fosforilação de sítios de serina-treonina (revisto em Drewes et al., 1998). Na maioria dos casos, a fosforilação das MAPs diminui sua afinidade por microtúbulos. As serina/treonina quisases do tipo MARK (Microtubule-Affinity Regulating Kinases) foram isoladas pela sua habilidade em fosforilar MAPs. Quando a proteína MARK fosforila MAPs, esta última se dissocia dos microtúbulos e conseqüentemente, os microtúbulos perdem a estabilidade, e podem ser polimerizados ou despolimerizados.

Para que as proteínas de polarização segreguem para domínios específicos da membrana celular, elas interagem fisicamente e/ou se reprimem mutuamente – na região apical se localizam o complexo PAR6/PAR3/aPKC e o complexo CRIB/PALS1/PATJ, enquanto que restritos à região basolateral encontram-se PAR1, PAR5, PAR4 e LGL (Figura 4, Joberty et al., 2000, Macara, 2004; Suzuki, Ohno, 2006).

A segregação de PAR-3/PAR-6/aPKC e PAR-1/PAR-5 em dois compartimentos diferentes, se dá por fosforilação inibitória recíproca (Figura 4). Em células epiteliais de mamíferos, aPKC fosforila PAR1 na treonina 595 (humanos) no nível das junções oclusivas. Assim, PAR5, proteína regulatória que se liga a proteínas fosforiladas, se liga à PAR1 e impede sua associação ao domínio próximo à aPKC (Suzuki et al., 2004). Em células epiteliais de *Drosophila*, PAR1 fosforila PAR-3 em dois resíduos: na serina 151, na região N-terminal e na serina 1085, na região C-terminal. Essas fosforilações criam regiões de ligação de PAR3 ao PAR5 e como a serina1085 fica próxima ao domínio de interação de PAR3 ao aPKC, a ligação entre ambas as proteínas é inibida, conseqüentemente PAR3 não se liga à membrana baso-lateral e

não forma um complexo com PAR6/aPKC no córtex baso-lateral (Benton, St Jonston, 2003; Goldstein, Macara, 2007).

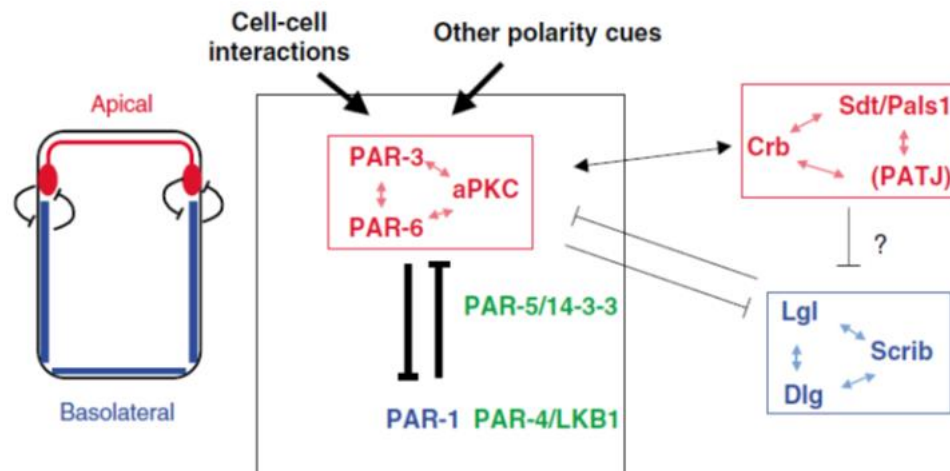


Figura 4: Interação competitiva entre as proteínas de polarização apicais e basais. O esquema representa a interação das proteínas de polarização em epitélios de mamíferos e *Drosophila*. Em vermelho, as proteínas que se localizam no domínio apical. Em azul, as proteínas do domínio baso-lateral e em verde, proteínas que não possuem uma localização assimétrica clara. Setas indicam interação física. \square : indica interação antagonista (Suzuki, Ohno, 2006).

1.4 Função das Proteínas PAR

As proteínas PAR são importantes para o estabelecimento e manutenção da polaridade celular. No estabelecimento da polaridade, há uma quebra da simetria celular e os elementos celulares se distribuem assimetricamente, como por exemplo, durante a polarização dos eixos embrionários e durante a divisão, especificação do destino celular e migração celular. Na manutenção da polaridade celular, as células já possuem assimetria, mas precisam manter a integridade celular, permitir a dinâmica de elementos intracelulares e permitir remodelamento tecidual durante eventos de morfogênese.

1.4.1 Função das proteínas PAR no estabelecimento da polaridade

Inicialmente identificado no nematodo *Caenorhabditis elegans*, as proteínas PAR (*PAR*titioning defective) tem papel fundamental na divisão assimétrica do zigoto desse animal (revisto em Rose, Kemphues, 1998).

Antes da fertilização do ovócito de *C. elegans*, os filamentos de actina, a miosina e as proteínas PAR (*partitioning defective*), proteínas de polarização, estão distribuídas simetricamente pela célula. Após a fertilização, há uma perda do citoesqueleto de actina e miosina na região posterior, região de entrada do espermatozoide. A fertilização leva à contração desse citoesqueleto e o fluxo seletivo de proteínas PAR da região cortical, em direção à região anterior. Desta maneira, as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC são levadas para a região anterior, enquanto que a proteína PAR1 fica restrita à região posterior, estabelecendo assim, uma identidade antero-posterior (Cowan, Hymam, 2007; Goldstein, Hird, 1996; St Johnston, Alringer, 2010). Mutações nas proteínas PAR, em *C. elegans*, causam alterações nos padrões das clivagens iniciais do embrião, que passam a ser simétricas e não assimétricas e, alterações no número e diferenciação de tipos celulares, como por exemplo, ausência de intestino e células germinativas (Rose, Kemphues, 1998).

Ao contrário do *C. elegans*, em *Drosophila* a polarização do ovócito ocorre antes da fertilização, através de sinais vindos das células foliculares que circundam a região posterior do ovócito. As proteínas de polarização PAR1 e LGL (*lethal giant larvae*) ficam restritas à região posterior e, as proteínas PAR3, PAR6, aPKC e os microtúbulos, se organizam na região anterior e lateral do ovócito (Doerflinger et al., 2006, Doerflinger et al., 2010, St Johnston, Alringer, 2010). O mutante de PAR3, que não possui o domínio de ligação ao aPKC, não segrega assimetricamente, se mantém ao longo do córtex celular e interfere com a localização de PAR6 na região anterior, indicando que PAR6 segrega assimetricamente se ligando à PAR3 (Doerflinger et al., 2010). O mutante de PAR1, no sítio de fosforilação por aPKC, faz com que PAR1 se localize ao longo de todo o córtex celular e além disso, leva a um acúmulo de microtúbulos por todo o ovócito. Esses dados indicam que a interação

física de PAR3/PAR6/aPKC e a interação antagonista dessas proteínas com PAR1, é importante para a assimetria antero-posterior. Além disso, esses dados sugerem que PAR1 possa estar controlando a organização de microtúbulos, inibindo-os de se ancorar ao córtex posterior do ovócito (Doerflinger et al., 2010).

As mesmas moléculas que se distribuem assimetricamente durante a polarização antero-posterior de embriões de *C. elegans* e *Drosophila* também estão presentes na polarização apico-basal em epitélios.

Em *Drosophila*, a blastoderme é formada a partir de um processo chamado de celularização. Inicialmente, os núcleos não estão delimitados por membranas, formando um embrião sincicial. Com a progressão do desenvolvimento, esses núcleos migram periféricamente para o córtex do ovócito e a membrana celular começa a ser formada entre esses núcleos gerando uma monocamada epitelial (Figura 5). Nesse processo, os mutantes de PAR6, que não se ligam à Cdc42, se mantêm no citoplasma, PAR3 não é recrutado para o domínio apical e a proteína Armadillo/beta-catenina não se concentra na região apical e lateral da membrana celular (Hutterer et al., 2004). Baseados nesses dados, foi criado um modelo para explicar o estabelecimento da polaridade apico-basal das células epiteliais neste organismo. Antes do processo de celularização, as proteínas do complexo PAR estão localizadas no citoplasma, quando a membrana celular é formada, a GTPase Cdc42 ativada na região apical recruta e ativa PAR6 que, por sua vez, recruta aPKC para a região apical, em contrapartida, a proteína LGL fica restrita à região basolateral devido à fosforilação por PAR6 na região apical (Figura 5, Hutterer et. al., 2004).

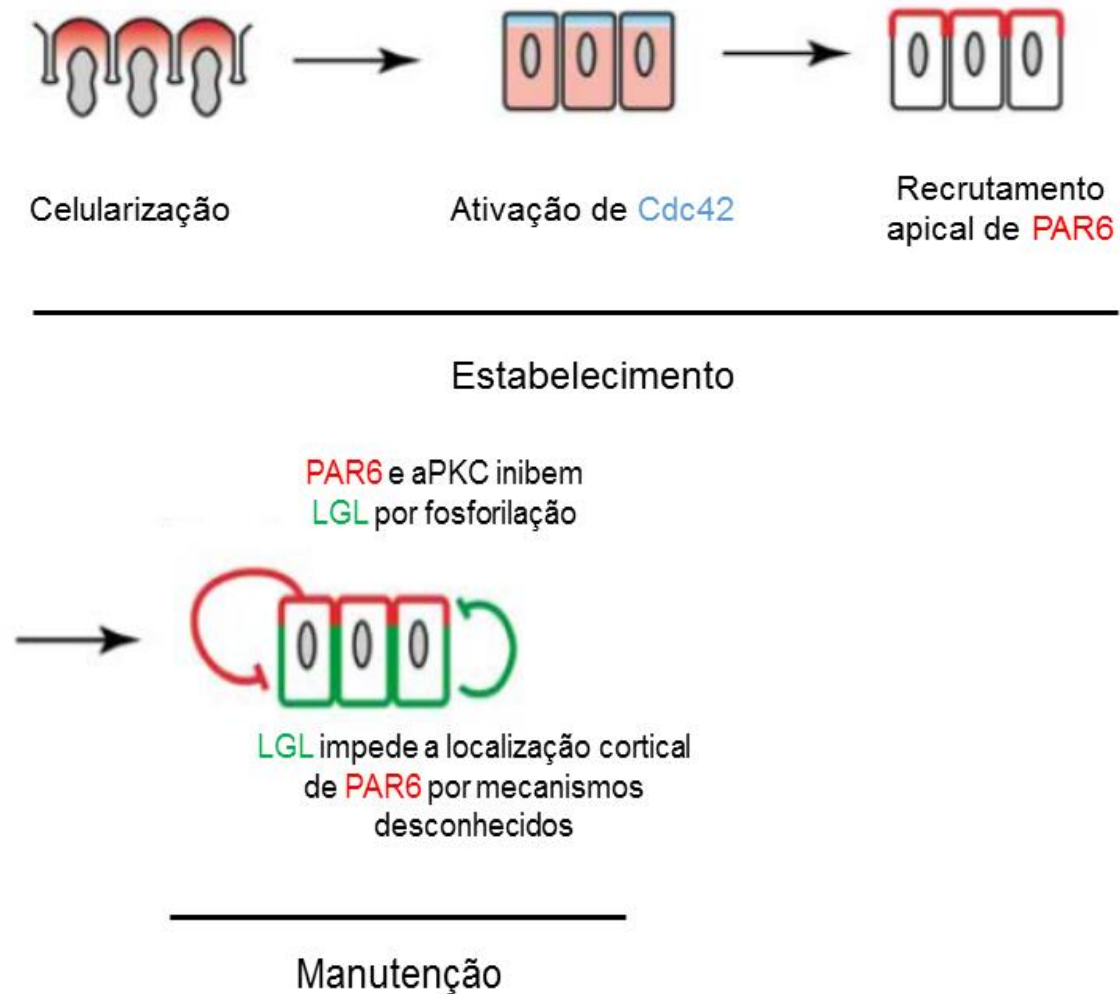


Figura 5: Modelo para o estabelecimento da polaridade epitelial em *Drosophila*. Durante a celularização PAR6 está localizado no citoplasma e os domínios apicais e baso-laterais não existem. Quando a celularização é completada, o Cdc42 ativado recruta aPKC para o córtex apical, para estabelecer o compartimento apical. aPKC é recrutado para o domínio apical, pela ligação ao PAR6, e fosforila LGL, restringindo-o ao domínio baso-lateral. A manutenção da polaridade celular envolve a inibição mútua entre o domínio apical e baso-lateral. Figura modificada de Hutterer, 2004.

A função das proteínas PAR no estabelecimento de polaridade também é bastante explorada no paradigma experimental de tecidos de vertebrados em cultura de células MDCKs (Madin-Darby Canine Kidney). Nessas células, as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC co-localizam com ZO-1 no domínio apical (Suzuki et al., 2001). Para o estudo do estabelecimento da polaridade nesse modelo, as células são

cultivadas em meio com baixo cálcio para desfazer a interação célula-célula. A restauração dos níveis normais de cálcio promove o restabelecimento das junções e do compartimento apical. As proteínas do complexo PAR3/PAR6/aPKC são recrutadas para o ponto de contato célula-célula e, são levadas para a região apical, à medida que as junções vão sendo formadas. Acredita-se que o complexo PAR se localize apicalmente devido a interação de PAR3 com a proteína JAM, recentemente identificada como componente de junções oclusivas. Essa interação ocorre através do domínio PDZ de PAR3. A superexpressão do mutante de JAM, sem a porção citoplasmática, afeta a localização de PAR3, aPKC e ZO1, no ponto de contato entre as células, mas isso ocorre apenas quando as células estão pouco confluentes, sugerindo que JAM seja importante para as fases iniciais do estabelecimento da polaridade e recrutamento de PAR3 (Ebnet et al, 2001).

Uma vez que PAR3, PAR6, aPKC são recrutadas, as proteínas precisam ser ativadas para formar o complexo na região apical, para a maturação das junções, recrutamento do citoesqueleto de actina e outras proteínas importantes, levando ao estabelecimento da assimetria e polaridade do epitélio (Ohno, 2001). Foi visto que a proteína Cdc42 é ativada a medida que as células vão formando junções via E-caderina (Kim et al., 2000) e que, a proteína Cdc42 ativada, é responsável pela ativação do complexo PAR, ligando-se ao domínio semi-CRIB de PAR6 (Garrard, 2003). Em células MDCK, o mutante de PAR6 sem o domínio de interação com Cdc42 não é capaz de se ligar ao aPKC. Além disso, a superexpressão de PAR-6 com deleção para o domínio de interação ao aPKC afeta a distribuição de junções oclusivas na membrana apical e, a superexpressão do dominante negativo de aPKC afeta a localização apical tanto de PAR6 quanto de PAR3 e de ZO-1 (junções oclusivas) durante o estabelecimento da polaridade (Gao, Macara, 2004; Joberty et al., 2000; Suzuki et al., 2001; Yamanaka et al., 2001). Esses dados indicam que a formação do complexo PAR é importante para o estabelecimento da polaridade e sugerem que Cdc42 ligado à PAR6 é responsável pela atividade de aPKC (Yamanaka et al., 2001).

As proteínas PAR não têm papel apenas na polarização antero-posterior de embriões, ou apico-basal de epitélios, elas estão presentes também em outros eventos celulares.

Por exemplo, durante a formação de “espinhos” dendríticos, que são pequenas protrusões dos neurônios, formados por filamentos de actina e que recebem

principalmente sinais excitatórios. Foi visto que a redução de PAR3 em neurônios do hipocampo, não reduziu o número de protrusões mas causou defeitos em sua morfologia, além disso, a redução de PAR6, presente nesses espinhos, reduz o número de protrusões formadas. Em contrapartida, a superexpressão de PAR6 leva a um aumento na densidade dessas protrusões, semelhante ao mutante constitutivamente ativo de aPKC, indicando que as proteínas PAR possuem papel na formação e manutenção dessas estruturas (Zhang, Macara, 2008).

As proteínas PAR também estão envolvidas com o crescimento de neuritos. Foi visto que a inibição de PAR1 (MARK-2) bloqueia o crescimento do neurito e como os microtúbulos precisam se desestabilizar para que o neurito extenda, foi sugerido que PAR1 seja importante para a dinâmica de microtúbulos e, conseqüentemente, para o crescimento do neurito (Biernat et al, 2002). PAR3 e aPKC são importantes também em células neuronais para a especificação do axônio. Foi visto que ambas as proteínas estão presentes na extremidade do neurito e que PAR3 se associa a uma proteína motora de microtúbulos, a KIF3A. Quando essas células expressam o dominante negativo de PAR3 e de KIF3A, as proteínas PAR3 e aPKC não se localizam mais na ponta do neurito e a polaridade é perdida, fragmentos da região N-terminal de PAR3 e KIF3A, inibem o crescimento do neurônio e induzem a formação de neuritos pequenos. Esses dados sugerem que PAR3 é transportado para a ponta do neurito via KIF3A e que as proteínas PAR3 e aPKC são importantes para a polarização de neuritos.

O complexo PAR está relacionado também à divisão celular assimétrica, mecanismo característico de diferenciação celular. Em neuroblastos de *Drosophila*, células progenitoras de neurônios, PAR3/PAR6/aPKC e Cdc42 estão presentes no domínio apical. O dominante negativo de Cdc42, leva a expansão do domínio de PAR6/aPKC para a região basal, mas PAR3 se mantém localizado no domínio apical. O Cdc42 constitutivamente ativo, faz com que PAR6/aPKC se localize por todo o córtex celular e as divisões celulares se mantêm simétricas. O mutante de PAR6 na região de ligação ao Cdc42 faz com que aPKC e o próprio PAR6 se localizem no citoplasma, semelhante ao que acontece com a perda de função do Cdc42. Esses dados sugerem que a interação Cdc42/PAR6/aPKC é suficiente e necessária para a localização cortical dessas proteínas, que a localização apical de PAR6/aPKC/Cdc42 é importante para as divisões assimétricas e, que PAR3 está a

montante dessas proteínas nesse contexto, pois se mantém no domínio apical com o dominante negativo de Cdc42 (Atwood et al., 2007).

O processo de migração celular também requer uma polarização para que a célula se movimente para o sentido correto. Estímulos extracelulares ativam moléculas responsáveis por guiar a polarização da célula que irá migrar. A proteína de polarização Cdc42 está presente na frente de migração da célula e sua inibição afeta a direcionalidade da migração. PAR3/PAR6/aPKC também estão presentes na frente de migração das células e, junto com Cdc42, as proteínas PAR tem papel na reorientação do centro organizador de microtúbulos e do Golgi que acompanha o direcionamento da migração de astrócitos em cultura (Etienne-Manneville, Hall, 2001; Ridley et al, 2003).

Em células em migração, a GTPase Cdc42 também tem função importante na formação de protrusões. De fato, as proteínas Cdc42 e aPKC são ativadas e encontrados na frente de migração de astrócitos (Ridley et al., 2003). Em contraste, as proteínas PAR não são requeridas para a formação, mas sim para a correta orientação das protrusões. A redução da expressão de PAR3 em células Vero, induz a formação de vários lamelipódios sem polaridade definida (Nakayama et al, 2007).

1.4.2 Função das proteínas PAR na manutenção da polaridade

As etapas que levam a polarização do epitélio *in vivo* não são muito conhecidas, mas o que se sabe é que em um epitélio polarizado, as células estão unidas por junções celulares, que dividem o domínio apical do baso-lateral. As junções oclusivas, localizadas no domínio mais apical, servem como barreira ao fluxo de moléculas entre as células, e são utilizadas como marcadores de domínio apical. As junções aderentes estão localizadas logo abaixo das junções oclusivas, se associam ao citoesqueleto de actina e separam o domínio apical do domínio baso-lateral. As proteínas PAR também estão presentes em epitélios, com PAR3, PAR6 e aPKC distribuídas ao longo da região apical, enquanto que as proteínas PAR1 e LGL ocupam o domínio baso-lateral e por fim, a região de contato das células com a matriz extracelular que é definida como domínio basal, onde estão presentes receptores de membrana, as integrinas, actina e PAR1 (Chen, Zhang, 2013; St Johnston, Alringer, 2010; Suzuki, Ohno, 2006).

As células MDCKs são comumente utilizadas para se estudar o estabelecimento de junções celulares em epitélios, mas também são ótimos modelos de estudo da manutenção da polaridade. Para se estudar o efeito das proteínas de polarização na manutenção da polaridade, as células são apenas transfectadas com as proteínas de interesse e não são submetidas a níveis baixos de cálcio. Em células MDCKs, o PAR6, sem os primeiros aminoácidos da região N-terminal (não interage com aPKC), e aPKC, apenas com o domínio de ligação ao PAR6, rompem e levam a perda das junções oclusivas (Gao et al., 2002). A superexpressão apenas do domínio semi-CRIB/PDZ de PAR6 também rompe as junções oclusivas, nesse caso, PAR6 pode se ligar a Cdc42 mas não as outras proteínas do complexo apical (Garrard et al., 2003). Esses dados indicam que a interação dessas proteínas é importante para a manutenção das junções e da polaridade dessas células.

Nas células foliculares do ovócito de *Drosophila*, as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC localizam-se na região apical mas em subdomínios diferentes, com PAR3 acima de PAR6/aPKC. Essa sub-localização deve-se à fosforilação de PAR3 por aPKC. A indução do PAR3 com uma mutação no domínio de fosforilação pelo aPKC, causa desorganização das células e alteração do formato celular. Algumas células do epitélio de *Drosophila* fazem transição cuboide-colunar, nessas células, o mutante de PAR3 (não é fosforilado por aPKC) afeta essa transição. Além disso, esse mutante causa localização de Armadillo/Beta-catenina na região apical junto com aPKC e induz a constrição apical (Morais-de-Sá et al., 2010), sugerindo que o mutante recruta moléculas de junções em excesso, desencadeando uma diminuição da área apical. Esses dados mostram a importância funcional da fosforilação de PAR3 por aPKC para a manutenção da polarização apical. Um outro estudo em células epiteliais de *Drosophila*, mostrou que o complexo PAR6/aPKC/Cdc42 podem ter uma função separada de PAR3. Mutações pontuais em regiões específicas do Cdc42, PAR6 e aPKC causam rompimento das junções aderentes. Em contraste, a deleção de PAR3 não tem efeito sobre as junções e nem sobre outras proteínas de polarização analisadas (Leibfried et al., 2008).

A proteína de polarização aPKC, junto com LGL, também é importante para a polarização apico-basal dos blastômeros de *Xenopus*, aPKC está localizada apicalmente e LGL baso-lateralmente. A superexpressão de aPKC leva a uma expansão do domínio apical e reposicionamento das junções oclusivas. Em

contraste, a injeção de aPKC sem seu domínio quinásico leva a uma expansão do domínio lateral e perda de junções oclusivas (Chalmers et al., 2004).

As proteínas PAR também podem guiar a polarização durante processos de morfogênese. Na gastrulação de *C. elegans*, a ingressão das células em direção a blastocele é acompanhada pelo acúmulo apical de miosina e constrição apical. Nesse modelo, as proteínas PAR se localizam apicalmente antes do recrutamento de miosina, quando há a mutação de PAR3 e PAR6 nessas células, o recrutamento apical de miosina é inibido e as células sofrem atraso na internalização (Nance et al., 2003).

As proteínas PAR também estão envolvidas na constrição apical das células da *amnioserosa* de *Drosophila*. Essas células recobrem a região dorsal deste animal e sofrem contração durante o processo de internalização para o fechamento da região dorsal. As células da *amnioserosa* oscilam entre momentos de contração e relaxamento, formando ou desfazendo a rede contrátil de actina-miosina. Foi visto que PAR3 regula o tempo de contração, enquanto que PAR6 e aPKC regulam o intervalo da contração (David et al., 2010; Tepass, 2012).

Em conjunto, estes dados ressaltam a importância das proteínas PAR em diversos eventos de polarização, e torna-as importantes candidatas à regulação da segregação e manutenção de componentes intracelulares durante o alongamento apico-basal do placóide do cristalino

1.5 Função da Proteína PAR3 na polarização

PAR3 tem função central no estabelecimento das junções intercelulares e tem sido proposto como iniciador da ligação do complexo PAR à membrana apical. No estabelecimento da polaridade em *Drosophila* foi demonstrado que a localização de PAR3 na região apical pode ser independente de PAR6 e aPKC. PAR6 e aPKC dependem da presença de PAR3 para se localizarem apicalmente (Harris, Peifer, 2005). Juntos, estes dados sugerem que PAR3 regula a polaridade celular a montante de PAR6 e aPKC.

Em neuroepitélio de embrião de galinha e camundongo, PAR3 se localiza no nível das junções oclusivas, num domínio subapical em relação a aPKC/PAR6 (Afonso, Henrique, 2006, Manabe et. al., 2002). A superexpressão de PAR3 neste modelo experimental forma agregados ectópicos ao longo da membrana lateral e

recruta as proteínas PAR6, aPKC e beta-catenina. Nesse caso é como se PAR3 estivesse iniciando pontos de polarização ectópicos ao longo da membrana basolateral. A geração destes pontos ectópicos resulta em aumento anormal de adesividade intercelular, que tem consequências deletérias na capacidade migratória das células do tubo neural. Como, no tubo neural, as divisões celulares ocorrem próximas ao lúmen, a consequência final é que os precursores neurais não conseguem chegar ao lúmen para se dividir (Afonso, Henrique, 2006). Esses dados mostram que PAR3 sozinho é suficiente para o recrutamento e localização de proteínas de membrana durante a polarização celular.

PAR3 também possui papel na organização do citoesqueleto em eventos de polarização celular. A inibição da expressão PAR3 no epitélio retiniano, rompe a continuidade do anel de actina na região apical (Wei et al., 2004). Em células MDCKs no modelo experimental de reestabelecimento de polaridade, o anel de actina (cinturão apical) se organiza ao longo do contorno membranar apical da célula. Com a inibição da expressão de PAR3, o citoesqueleto de actina no domínio apical deixa de ser organizado e conseqüentemente não se reestabelece o cinturão de actina na periferia celular (Chen, Macara, 2005).

PAR3 também está envolvido com a dinâmica de citoesqueleto de células em migração, possivelmente através da regulação da proteína Rac1, GTPase importante para a formação de lamelipódios e regulação da polimerização de filamentos de actina. Especificamente, PAR3/Cdc42/PAR6/aPKC pode se ligar à Tiam1/Tiam2, uma GEF (guanine nucleotide exchange factors) de Rac1 que troca GDP por GTP, e ativar Rac1. Além disto, PAR3 é alvo de um efetor de Rho GTPase (ROCK), que fosforila e ativa a rede contrátil de actina-miosina. No domínio de ligação do PAR3 ao aPKC, existe um resíduo (T833 de rPAR3) que é alvo de ROCK e sua fosforilação leva à dissociação de PAR3 do complexo Cdc42/PAR6/aPKC, mas mantém a ligação de PAR3 à Tiam1/Tiam2. Nesta situação, PAR3 desacoplado do restante do complexo, sequestra Tiam1/2 e impede a ativação de Rac1. A proteína PAR3 fosforilada é encontrada na frente de migração da célula, na região central e traseira da célula. Essa localização sugere que a fosforilação de PAR3 seja importante para modular a atividade de Rac1, em consequência, a polimerização de actina em momentos específicos da migração celular (Figura 6, Nakayama et al., 2007).

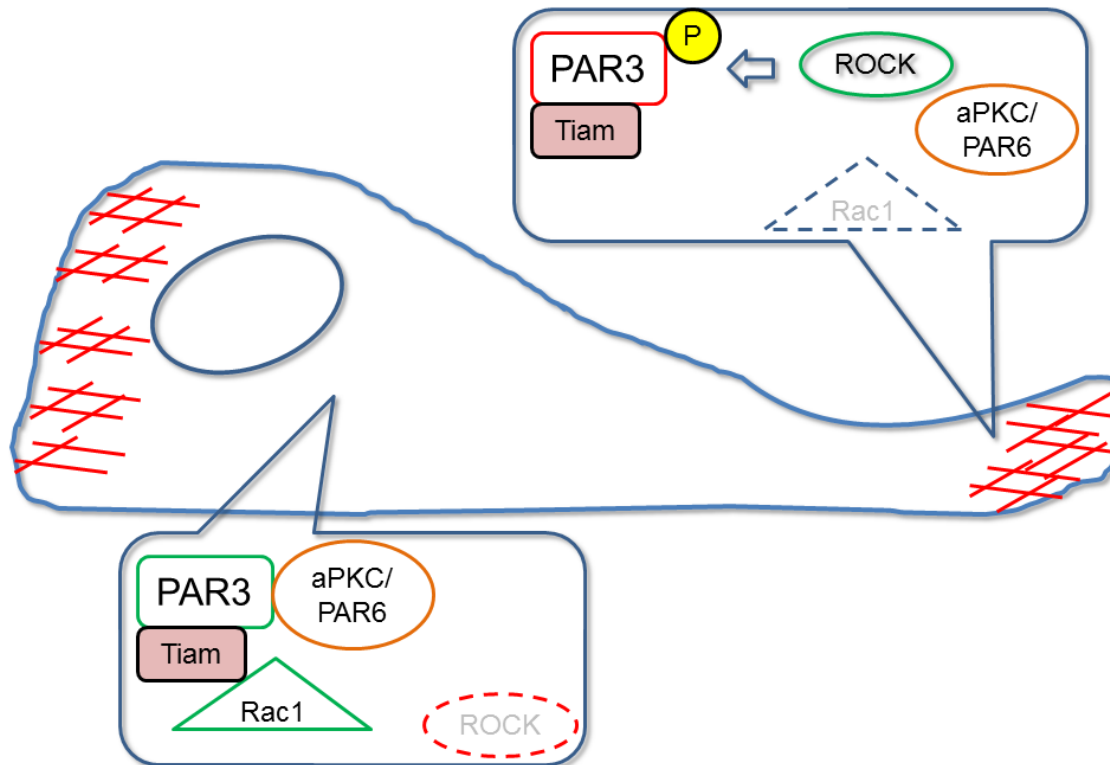


Figura 6: Fosforilação de PAR3 por ROCK em células migratórias. Na frente de migração das células PAR3 forma um complexo com Tiam e aPKC/PAR6 e ativa Rac1. Na parte traseira da célula, ROCK fosforila PAR3 e PAR3/Tiam se dissociam do complexo aPKC/PAR6 e deixa de ativar Rac1. Em vermelho: rede de actina-miosina.

A regulação negativa de Rac1 por PAR3 é importante para a localização do cinturão apical de actina em células MDCK e reorganização de junções oclusivas (Chen, Macara, 2005). A inibição da expressão PAR3 desfaz as junções oclusivas, desfaz o cinturão apical de actina e resulta na ativação constitutiva de Rac1. A inibição de Rac1 ou Tiam1 leva a restauração das junções mesmo com baixos níveis de PAR3. Além disso, a restauração dos níveis de PAR3 retornar o nível de atividade de Rac1 para o normal. Esses dados sugerem que PAR3 possa estar agindo a montante de Rac1 para regular o estabelecimento do cinturão de actina apical.

A importância de PAR3 nas mudanças do citoesqueleto e sua função no estabelecimento da polaridade celular nos levou a investigar sua contribuição no recrutamento apical e organização dos filamentos de actina durante o alongamento apico-basal das células da ectoderm pre-placoidal para formar o placóide do cristalino.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- 1- O ectoderma pré-placoidal e o placóide do cristalino são epitélios polarizados com um eixo apico-basal definido.
- 2- As proteínas PAR3, PAR6 e aPKC estão presentes no domínio apical antes do alongamento do placóide e estão segregadas em subdomínios apicais diferentes.
- 3- A proteína PAR3 pode ter função na manutenção da polaridade do placóide do cristalino independente das proteínas PAR6/aPKC.
- 4- A função de PAR3 no recrutamento de actina e aPKC, no placóide e ectoderma peri-placoidal, é independente do estado de fosforilação de PAR3 na treonina 833.
- 5- E, por fim, dependendo da localização de PAR3, a organização dos filamentos de actina pode ser distinta. Se PAR3 estiver localizado no domínio apical, a actina possui uma arquitetura em forma de cinturão, já a localização ectópica de PAR3 na membrana baso-lateral forma agregados ectópicos e pontuais de actina.

REFERENCIAS

REFERÊNCIAS*

Afonso C, Henrique D. PAR3 acts as a molecular organizer to define the apical domain of chick neuroepithelial cells. *J Cell Sci.* 2006;119:4293–304.

Article R, Chen J, Zhang M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res.* 2013;319:1357–64.

Assémat E, Bazellières E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys. Acta.* 2008;1778: 614–30.

Akimoto K, Mizuno K, Osad S, Hirai S, Tanuma S, Suzukil K, Ohno S. A new member of the third class in the Protein Kinase C family, PKC λ , expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J Biol Chem.* 1994;269:12677-83.

Atwood SX, Chabu C, Penkert RR, Doe CQ, Prehoda KE. Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6–aPKC. *J Cell Sci.* 2007;120:3200-6.

Baum B, Georgiou M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol.* 2011;192:907–17.

Bacallao R, Antony C, Dotti C, Karsenti E, Stelzer EH, Simons K. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol.* 1989;109(6 Pt 1):2817-32.

Bancroft M, Bellairs R. Placodes of the Chick Embryo Studied by SEM. *Anat Embryol (Berl).* 1977;151: 97–108.

Benton R, St Johnston D. A Conserved Oligomerization Domain in *Drosophila* Bazooka/PAR-3 Is Important for Apical Localization and Epithelial Polarity. *Curr Biol* 2003;13:1330–4.

Benton R, St Johnston D. *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 Inhibit Bazooka/PAR-3 to Establish Complementary Cortical Domains in Polarized Cells. *Cell.* 2003;115:691–704.

Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhöfer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM. Protein Kinase MARK/PAR-1 Is Required for Neurite Outgrowth and Establishment of Neuronal Polarity. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4013–28.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

REFERENCIAS

- Bohm H, Brinkmann V, Drab M, Henske A, Kurzchalia TV. Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr Biol*. 1997;7:603-6.
- Borges RM, Lamers ML, Forti FL, Santos MF, Yan CYI. Rho signaling pathway and apical constriction in the early lens placode. *Genesis*. 2011;49:368–79.
- Bré MH, Pepperkok R, Hill AM, Levilliers N, Ansorge W, Stelzer EH, Karsenti E. Regulation of microtubule dynamics and nucleation during polarization in MDCK II cells. *J Cell Biol*. 1990;111(6 Pt 2):3013-21.
- Byers B, Porter KR. Oriented microtubules in elongating cells of the developing lens rudiment after inductions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964;52:1091–9.
- Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:237–51.
- Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Bräuninger M, Eilken HM, Rieger MA, Schroeder TT, Huttner WB, Brakebusch C, Götz M. The Rho-GTPase *cdc42* regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat Neurosci*. 2006;9:1099-107.
- Chalmers AD, Pambos M, Mason J, Lang S, Wylie C, Papalopulu N. *aPKC*, *Crumbs3* and *Lgl2* control apicobasal polarity in early vertebrate development. *Development*. 2004;132:977-86.
- Chapman S, Collignon J, Schoenwolf G, Lumsden A, Communication B. Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier. *Dev Dyn*. 2001;220:284–89.
- Chauhan BK, Disanza A, Choi S-Y, Faber SC, Lou M, Beggs HE, Scita G, Zheng Y, Lang R. *Cdc42*- and *IRSp53*-dependent contractile filopodia tether presumptive lens and retina to coordinate epithelial invagination. *Development*. 2009;136: 3657–67
- Chauhan BK, Lou M, Zheng Y, Lang RA. Balanced *Rac1* and *RhoA* activities regulate cell shape and drive invagination morphogenesis in epithelia. *PNAS*. 2011,108: 18289–94.
- Chen X, Macara IG. *Par-3* controls tight junction assembly through the *Rac* exchange factor *Tiam1*. *Nat Cell Biol*. 2005;7:262–69.
- Chen X, Macara IG. *Par-3* mediates the inhibition of *LIM* kinase 2 to regulate *cofilin* phosphorylation and tight junction assembly. *J Cell Biol*. 2006;172(5):671–78.
- Chen J, Zhang M. The *Par3/Par6/aPKC* complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res*. 2013;319:1357–64.
- Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulan E, Müsch A. Mammalian *PAR-1* determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J Cell Biol*. 2004;16:1-11.

REFERENCIAS

Costa-Junior HM, Suetsugu MJ, Krieger JE, Schechtman D. Specific modulation of protein kinase activity via small peptides. *Regul Pept.* 2009;153(1-3):11-8.

Cox DN, Lu B, Sun T-Q, Williams LT, Jan YN. *Drosophila* par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr Biol.* 2001;11:75–87.

Cowan CR, Hyman AA. Acto-myosin reorganization and PAR polarity in *C. elegans*. *Development.* 2007;134:1035-43.

Cvekl A, Tamm E. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays.* 2004; 26:374–86.

David DJ, Tishkina A, Harris TJ. The PAR complex regulates pulsed actomyosin contractions during amnioserosa apical constriction in *Drosophila*. *Development.* 2010;(137)1645-55.

Doerflinger H, Benton R, Shulman JM, St Johnston D. The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Development.* 2003;130(17):3965-75.

Doerflinger H, Benton R, Torres IL, Zwart MF, St Johnston D. *Drosophila* Anterior-Posterior Polarity Requires Actin-Dependent PAR-1 Recruitment to the Oocyte Posterior. *Curr Biol.* 2006;16:1090–95.

Doerflinger H, Vogt N, Torres IL, Mirouse V, Koch I, Nüsslein-Volhard C, St Johnston D. Bazooka is required for polarisation of the *Drosophila* anterior-posterior axis. *Development.* 2010;137:1765-73.

Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J.* 2001;20(14):3738-48.

Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKC ζ . *Cell.* 2004;106:489–98.

Feng W, Wu H, Chan L-N, Zhang M. The Par-3 NTD adopts a PB1-like structure required for Par-3 oligomerization and membrane localization. *EMBO J.* 2007;26: 2786–96.

Gao L, Joberty G, Macara IG. Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol.* 2002;12:221–5.

Gao L, Macara IG. Isoforms of the Polarity Protein Par6 Have Distinct Functions. *The J Biol Chem.* 2004;279: 41557–62.

Garrard SM, Capaldo CT, Gao L, Rosen MK, Macara IG, Tomchick DR. Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *EMBO J.* 2003;22(5):1125-33.

REFERENCIAS

- Georgiou M, Marinari E, Burden J, Baum B. Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol*. 2008;18:1631–38.
- Gibson MC, Perrimon N. Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;6:747-52.
- Goldstein B, Hird SN. Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. 1996;122:1467-74.
- Goldstein B, Macara IG. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell*. 2007;13(5):609-22.
- Gumbiner B, Simons K. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J Cell Biol*. 1986;102(2):457-68.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951; 88: 49-92.
- Harris TJC, Peifer M. The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2005;170:813–23.
- Heasman SJ1, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(9):690-701.
- Hendrix RW, Zwaan J. The matrix of the optic vesicle-presumptive lens interface during induction of the lens in the chicken embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 1975;33:1023–49.
- Hutterer A, Betschinger J, Petronczki M, Knoblich J. Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell*. 2004;6:845–54.
- Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T. An Atypical PKC Directly Associates and Colocalizes at the Epithelial Tight Junction with ASIP, a Mammalian Homologue. *J Cell Biol*. 1998;143:95–106.
- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*. 2000;2:531-9.
- Johnson D. I. Cdc42: an essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63, 54–105.
- Johnson DJ, Pringle J.R. Molecular cloning of CDC42 a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*. 1990;111:143–52.
- Khazaei MR, Püschel AW. Phosphorylation of the par polarity complex protein Par3 at serine is mediated by aurora a and regulates its function in neuronal polarity. *J Biol Chem*. 2009;284:33571–79.

REFERENCIAS

Kim SH, Li Z, Sacks DB. E-cadherin-mediated Cell-Cell Attachment Activates Cdc42. *J Biol Chem.* 2000;275(47) 36999–37005.

Kishikawa M, Suzuki A, Ohno S. aPKC enables development of zonula adherens by antagonizing centripetal contraction of the circumferential actomyosin cables. *J Cell Sci.* 2008;121:2481–92.

Kölsch V1, Seher T, Fernandez-Ballester GJ, Serrano L, Leptin M. Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science.* 2007;315(5810):384-6.

Knust E, Bossinger O. Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science.* 2002;298:1955-9.

Lang RA. Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol.* 2004;48: 783–91.

Le TL, Yap AS, Stow JL. Recycling of E-Cadherin: A Potential Mechanism for Regulating Cadherin Dynamics. *J Cell Biol.* 1999; 146: 219–32.

Lecuit T, Lenne P-F, Munro E. Force Generation, Transmission, and Integration during Cell and Tissue Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:157–84.

Lecuit T, Lenne P-F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:633-44.

Leibfried A, Fricke R, Morgan MJ, Bogdan S, Bellaiche Y. *Drosophila* Cip4 and WASp Define a Branch of the Cdc42-Par6-aPKC Pathway Regulating E-Cadherin Endocytosis. *Curr Biol.* 2008;18:1639-48.

Lin D, Edwards S, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott, JD, Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol.* 2000;2:540–7.

Lovicu FJ, McAvoy JW. Growth factor regulation of lens development. *Dev Biol.* 2005;280:1–14.

Macara IG. Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* 2004;5:220–31.

Manabe N, Hirai S-I, Imai F, Nakanishi H, Takai Y, Ohno S. Association of ASIP/mPAR-3 with Adherens Junctions of Mouse Neuroepithelial Cells. *Dev Dyn.* 2002;225:61–69.

Mizuno K, Suzuki A, Hirose T, Kitamura K, Kutsuzawa K. Self association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *J Biol Chem.* 2003;278:31240–50.

Morais-de-Sá E, Mirouse V, St Johnston D. aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell.* 2010;141:509–23.

REFERENCIAS

- Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A, Ohno S. Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells*. 2002;7:1161–71.
- Nakayama M, Goto TM, Sugimoto M, Nishimura T, Shinagawa T, Ohno S, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Kinase Phosphorylates PAR-3 and Disrupts PAR Complex Formation. *Dev Cell*. 2007;14:205–15.
- Nakayama M, Goto TM, Sugimoto M, Nishimura T, Shinagawa T, Ohno S, Amano M, Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation. *Dev Cell*. 2008;14:205–15.
- Nance J, Munro EM, Priess JR. *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. *Development*. 2003;130:5339-50.
- Nelson WJ, Hammerton RW. A membrane-cytoskeletal complex containing Na⁺,K⁺-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. *J Cell Biol*. 1989;108(3):893-902.
- Nishimura T, Yamaguchi T, Kato K, Yoshizawa M, Nabeshima Y, Ohno S, Hoshino M, Kaibuchi K. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol*. 2005;7:270–77.
- Ogino H, Ochi H, Reza HM, Yasuda K. Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm. *Dev Biol*. 2012;363:333–47.
- Ogino H1, Yasuda K. Sequential activation of transcription factors in lens induction. *Dev Growth Differ*. 2000;42(5):437-48.
- Ojakian GK1, Schwimmer R, Herz RE. Polarized insertion of an intracellular glycoprotein pool into the apical membrane of MDCK cells. *Am J Physiol*. 1990;258(3 Pt 1):C390-8.
- Ojakian GK1, Nelson WJ, Beck KA. Mechanisms for de novo biogenesis of an apical membrane compartment in groups of simple epithelial cells surrounded by extracellular matrix. *J Cell Sci*. 1997;110(Pt 22):2781-94.
- Plageman TF, Chauhan BK, Yang C, Jaudon F, Shang X, Zheng Y, Lou M, Debant A, Hildebrand JD, Lang R. A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. *Development*. 2011;5188:5177–88.
- Piatigorsky J, Webster HF, Wollberg M. Cell elongation in the cultured embryonic chick lens epithelium with and without protein synthesis involvement of Microtubules. *J Cell Biol*. 1972;55:82-92.
- Roh-Johnson M, Goldstein B. In vivo roles for Arp2/3 in cortical actin organization during *C. elegans* gastrulation. *J Cell Sci*. 2009;122:3983–93.

REFERENCIAS

Rodriguez-Boulan E1, Nelson WJ. Science. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. 1989;245(4919):718-25.

Rose LS, Kemphues KJ. Early patterning of the *C. elegans* embryo Annu. Rev. Genet. 1998;32:521–45.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. Science. 2003;302: 1704-09.

Schook P. Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. A light microscopic and spatial reconstructive study. Acta Morphol Neerl Scand. 1980;18:1–30.

Schoenwolf GC, Powers ML. Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: role of cell elongation. Anat Rec. 1987;218(2):182-95.

St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. Cell. 2010;141: 757–74.

Sullivan CH, Braunstein L, Hazard-Leonards RM, Holen AL, Samaha F, Stephens L, Grainger RM. A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. Int J Dev Biol. 2004;48:771–82.

Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T, Ohno S. Atypical Protein Kinase C Is Involved in the Evolutionarily Conserved PAR Protein Complex and Plays a Critical Role in Establishing Epithelia-specific Junctional Structures. J Cell Biol. 2001;152(6):1183–96.

Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. J Cell Sci. 2002;115:3565–73.

Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, Maniwa R, Yamanaka T, Mizuno K, Kishikawa M, Hirose H, Amano Y, Izumi N, Miwa Y, Ohno S. aPKC Acts Upstream of PAR-1b in Both the Establishment and Maintenance of Mammalian Epithelial Polarity. Curr Biol. 2004;14:1425-35.

Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. J Cell Sci. 2006;119:979–87.

Swartz ME, Eberhart J, Pasquale EB, Krull CE. EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. Development. 2001;128:4669-80.

Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kemphues KJ, Miwa J, Ohno S. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. Development. 1998;125:3607–14.

REFERENCIAS

Tepass U. The Apical Polarity Protein Network in *Drosophila* Epithelial Cells: Regulation of Polarity, Junctions, Morphogenesis, Cell Growth, and Survival. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:655–85.

Warner SJ, Yashiro H, Longmore GD. The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia. *Curr Biol.* 2010;8: 677–86.

Wei X, Cheng Y, Luo Y, Shi X, Nelson S, Hyde DR. The zebrafish *Pard3* ortholog is required for separation of the eye fields and retinal lamination. *Dev Biol.* 2004;269:286–301.

Welch MD. The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.* 1999;9:423-27.

Wrenn JT, Wessells NK. An ultrastructural study of lens invagination in the mouse. *J Exp Zool.* 1969;171:359–67.

Wride MA. Cellular and molecular features of lens differentiation: a review of recent advances. *Differentiation.* 1996;61(2):77-93.

Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, Maniwa R, Nagai Y, Yamashita A, Hirose T, Ishikawa H, Ohno S. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells.* 2001;6:721–31.

Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A, Tsukita S. Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci.* 1995;108(Pt 1):127–42.

Zwaan J, Bryan PR Jr, Pearce TL. Interkinetic nuclear migration during the early stages of lens formation in the chicken embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 1969;1:71-83.

Zhang H, Macara IG. The PAR-6 polarity protein controls dendritic spine density through p190 RhoGAP and the Rho GTPase. *Dev Cell.* 2008;14(2):216–26.