



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

La autofagia regula la diferenciación de las células de la sangre de *Drosophila* mediante el control de los niveles de Notch

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Felipe Rodríguez

Director de tesis: Dr. Pablo Wappner

Director adjunto: Dr. Maximiliano Javier Katz

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Cerdán

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Instituto de Inv. Bioquímicas de Buenos Aires, CONICET.

Buenos Aires, jueves 24 de abril de 2025

La autofagia regula la diferenciación de las células de la sangre de *Drosophila* mediante el control de los niveles de Notch

Resumen

La hematopoyesis en *Drosophila* ocurre en la glándula linfática, donde células progenitoras hematopoyéticas dan lugar a dos tipos celulares posibles: los plasmatocitos, análogos a los macrófagos en mamíferos, o células cristal, cuyas funciones se asemejan a la de los megacariocitos. La activación de la vía Notch en células progenitoras hematopoyéticas induce su diferenciación a células cristal, mientras que reprime el destino plasmatocito. En esta tesis hemos investigado el rol que cumple la autofagia en la hematopoyesis de *Drosophila*. Observamos que las células progenitoras de la glándula linfática presentan niveles basales de autofagia elevados, y que una reducción de la actividad autofágica en estas células resulta en una mayor diferenciación de células cristal, debida a la acumulación de la proteína Notch. Encontramos que la activación de Notch durante la hematopoyesis depende de su tráfico a través de la vía endocítica, la cual a su vez interactúa con la vía autofágica: mientras que la endocitosis y el tráfico a través de endosomas es esencial para la activación de Notch, los autofagosomas son necesarios para su degradación lisosomal. Bajos niveles de autofagia inhiben la formación de anfisomas que contienen a Notch, siendo éstos necesarios para dirigir a Notch hacia su degradación lisosomal. Una reducción en la degradación de Notch cambia el balance hacia una mayor activación de Notch en la membrana de los endosomas, aumentando así la diferenciación de células cristal. Nuestro trabajo define un nuevo mecanismo de control de la diferenciación de las células de la sangre en el que la autofagia juega un papel central.

Palabras clave:

Drosophila-Progenitores hematopoyéticos-vía Notch- Autofagia-vía endocítica

Autophagy controls differentiation of *Drosophila* blood cells by regulating Notch levels

Abstract

Drosophila larval hematopoiesis takes place at the lymph gland, where blood cell progenitors differentiate into two possible cell types: plasmacytocytes, analogous to mammalian macrophages, or crystal cells that share features with mammalian megakaryocytes. Activation of the Notch pathway in blood cell progenitors induces crystal cell differentiation and represses the plasmacytocyte fate, being the latter the default differentiation program. In this work, we have investigated the role of autophagy in *Drosophila* hematopoiesis. We found that blood cell progenitors show elevated levels of basal autophagy and that autophagy inhibition in this cell type results in augmented crystal cell differentiation due to accumulation of high levels of Notch protein. Notch activation during hematopoiesis depends on the endocytic pathway, which crosstalks with autophagy: while endocytosis and endosomal maturation are essential for Notch activation, autophagosomes are required for Notch lysosomal degradation. Low levels of autophagosome biogenesis prevent the formation of Notch-containing amphisomes, being the latter necessary for Notch lysosomal destruction. Reduction of Notch lysosomal degradation shifts the balance towards Notch activation at late endosomal membranes, thereby enhancing differentiation of crystal cells. Our work defines a novel mechanism of regulation of immune cell differentiation in response to autophagy levels.

Key words:

Drosophila-Hematopoietic Progenitors-Notch pathway- Autophagy-endocytic pathway

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGM: aorta gónada mesonefros

AMPK: Proteina Quinasa Activada por Monofosfato de Adenina

ARN: ácido ribonucleico

Atg: Autophagy related gene

BFP: Blue Fluorescent Protein

C: Celsius

CC: Célula Cristal

CMH: Células Madre Hematopoyéticas

CMV: cuerpo multivesiculado

CPS: Centro Posterior Señalizador

DECN: Dominio Extra Celular de Notch

DICN: Dominio Intra Celular de Notch

Dome: Domeless

Dx: Deltex

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport machinery

γ-sec: γ -Secretasa

GFP: Green Fluorescent Protein

GL: Glándula Linfática

Hml: Hemolectina

Kuz: Kuzbanian

KY: Kyoto Stock Center

LIR: región de interacción LC3

Lz: Lozenge

nm: Nanometro

NRE: Notch Response Elements

PE: Fosfatidil Etanolamina

PI: fosfatidinositol

PI3P: Fosfatidil-3-fosfato

PL: Plasmatocito

PO: Fenol oxidasa

PPO: Pro-Fenoloxidasa

RE: Retículo Endoplasmático

Ser: Serrate

Su(H): Supressor of Hairless

Su(Dx): Supressor of Deltex

TA: Temperatura Ambiente

TCR: T-Cell Receptor

TepIV: Thioester containing protein-4

TOR: Target of Rapamycin

UA: Unidades Arbitrarias

UAS: Upstream Activating Sequence

UBA: Dominios asociados a la ubiquitina

VD: Vaso Dorsal

YFP: Yellow Fluorescent Protein

ZC: Zona Cortical

ZM: Zona Medular

Índice

INTRODUCCIÓN.....	10
1- <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	11
2- Autofagia.....	12
2. a- Aspectos generales.....	12
2. b- Descripción del proceso autofágico	13
2. c- Control de la autofagia.....	15
2. d- La autofagia en el desarrollo	15
3- Hematopoyesis.....	16
3. a- Generalidades.....	16
3. b- Hematopoyesis en <i>Drosophila</i>	17
3. c- Desarrollo de la glándula linfática durante los estadios larvales.....	19
4- Diferenciación de las células cristal.....	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1- Manejo de <i>Drosophila</i>.....	29
1. a- Cría y mantenimiento de moscas	29
1. b- Recolección de hembras vírgenes.....	29
1. c- Establecimiento y mantenimiento de cruzas experimentales.....	30
1. d- Cromosomas balanceadores y separación de genotipos.....	30
2- Disección y procesamiento de la glándula linfática.....	33
2. a- Disección y fijación.....	33
2. b- Inmunotinción de la glándula linfática.....	35
2. c- Montaje de la glándula linfática.....	36
3- Tinción con Lysotracker.....	37

4- Adquisición y procesamiento de imágenes.....	37
4. a- Registro.....	37
4. b- Procesamiento y cuantificación de imágenes.....	38
4. c- Análisis estadístico.....	38
5- Herramientas genéticas de <i>Drosophila</i>.....	38
5. a- Sistema Gal4/UAS.....	38
5. b- Sistema Gal80.....	39
5. c- ARN de interferencia.....	40
5. d- Proteína de fusión 3xmCherry-Atg8.....	41
5. e- Ref(2P)-GFP.....	41
6- Equipos, reactivos y materiales utilizados.....	42
7- Líneas de moscas transgénicas utilizadas en esta tesis.....	43
RESULTADOS.....	46
1- Caracterización de la autofagia en la glándula linfática.....	47
1. a- En condiciones basales, la glándula linfática presenta actividad autófágica elevada en comparación con otros tejidos de la larva.....	47
1. b- La autofagia en la glándula linfática responde a cambios en la abundancia nutricional.....	48
1. c- Diferencias en los niveles de autofagia dentro de la glándula linfática.....	50
1. d- La autofagia en la glándula linfática depende de los reguladores clásicos de la vía.....	50
2- La autofagia regula la hematopoyesis de <i>Drosophila</i>.....	52
3- La autofagia limita la activación de la vía Notch y consecuentemente la diferenciación de células cristal.....	57
3. a- La autofagia limita la activación de la vía Notch dependiente del ligando Serrate.....	59
3. b- La autofagia limita la activación de la vía Notch independiente de ligandos.....	60
4- La autofagia controla la abundancia del receptor Notch.....	62

5- Interacciones entre la vía endocítica y autofagia subyacen a la regulación de Notch dependiente de la autofagia.....	64
5. a- La vía endocítica controla la diferenciación de las células cristal.....	64
5. b- La inhibición de la formación de anfisomas o de autolisosomas limitan la degradación lisosomal de Notch.....	67
6- La autofagia regula la diferenciación específicamente en progenitores distales.....	72
DISCUSIÓN.....	76
1- Modelo propuesto para el mecanismo mediante el cual la autofagia regula la diferenciación de células cristal.....	77
2- La vía Notch en <i>Drosophila</i> y en vertebrados.....	79
3- Notch en la hematopoyesis de vertebrados.....	80
4- La autofagia en la hematopoyesis de los vertebrados.....	81
5- Control de la autofagia sobre vías de señalización.....	83
6- La autofagia y la vía Notch en <i>Drosophila</i>.....	83
7- La autofagia y la vía Notch en vertebrados.....	84
8- Posible significancia fisiológica de la diferenciación de células cristal dependiente de autofagia	85
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89

Introducción

1 - *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Drosophila melanogaster, comúnmente conocida como mosca de la fruta, es un insecto del orden Díptera, familia *Drosophilidae*. Desde su introducción al laboratorio como organismo modelo por Thomas Morgan a principios del siglo XX [1], *Drosophila* se ha popularizado por las numerosas ventajas que la caracterizan [1]. Dentro de las mismas podemos destacar un ciclo de vida corto [2] y la obtención de una numerosa descendencia en un breve periodo de tiempo. La cría y mantenimiento de *Drosophila* en condiciones de laboratorio es relativamente económica dado que requiere de poco equipamiento, un espacio reducido y sus gastos de mantenimiento son bajos en comparación con otros modelos experimentales. Entre hembras y machos existe un dimorfismo sexual claro, resultando sencillo distinguirlos en cruzas controladas. Asimismo, las hembras vírgenes, requeridas para la realización de cruzamientos controlados, presentan características morfológicas distinguibles de las hembras sexualmente maduras, lo que permite su fácil identificación y aislamiento [3] (**Fig. 8**).

El genoma de *Drosophila* es relativamente pequeño y se distribuye en cuatro pares de cromosomas, tres de ellos autosomas y uno sexual (XY) [3]. Presenta las ventajas de estar completamente secuenciado y que la mayoría de los genes presentes se encuentran en copia única, lo cual minimiza los inconvenientes derivados de la redundancia funcional. Asimismo, alrededor de un 75% de los genes vinculados a enfermedades genéticas humanas tienen ortólogos en *Drosophila* [4], lo cual hace al modelo especialmente potente para estudios vinculados a patologías. Además, existe una gran cantidad de herramientas genéticas disponibles en *Drosophila* que la convierten en un excelente modelo para abordajes genéticos y para realizar estudios moleculares y celulares *in vivo*.

El ciclo de vida de *Drosophila* dura 10 días a 25°C [5] e involucra un estadío de embrión y tres fases larvales (primer, segundo, y tercer estadío), seguidas por la formación de la pupa que finalmente dará lugar a la mosca adulta [6] (**Fig. 1**). A 25°C, la embriogénesis dura aproximadamente 21 horas y culmina cuando la larva de primer estadío eclosiona del huevo. Luego de 24 horas, la larva muda al segundo estadío, que dura otras 24 horas hasta una nueva muda, que da lugar al tercer estadío larval [7] (**Fig. 1**). Luego de 2 días en este estadío, la larva alcanza un peso y tamaño críticos (200 veces el tamaño y masa del embrión), deja de alimentarse y abandona el medio de cultivo para entrar en el estadío deambulante o *wandering* en busca de un lugar donde formar el pupario (proceso que dura 16h aproximadamente). Luego de que se ha formado el pupario, se produce la histólisis de la mayoría de los tejidos larvales por una combinación de procesos de autofagia y apoptosis, lo cual proveerá de energía y macromoléculas para la formación de las estructuras de la mosca adulta durante el proceso de metamorfosis [8]. Luego de 5 días en fase pupal, la metamorfosis llega a su fin y emerge del pupario el individuo adulto [9].

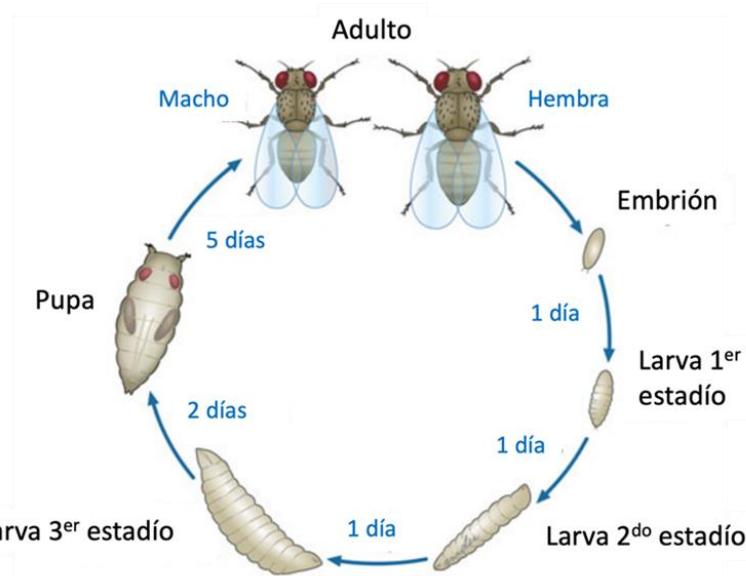


Figura 1- Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C. El embrión pasa al primer estadio larval luego del transcurso de un día, seguido del segundo y tercer estadio larval, los cuales duran un día y dos días respectivamente. Finalizados los estadios larvales, tiene lugar el proceso de metamorfosis durante el estadio de pupa. Finalmente, el adulto eclosiona del pupario, completándose así el ciclo de vida [10]. Esquema modificado, cortesía del Dr. Sebastián Pérez Pandolfo.

2- Autofagia

2. a- Aspectos generales

La autofagia es un proceso catabólico celular altamente conservado en organismos eucariotas. El término autofagia se refiere al proceso por el cual distintos componentes celulares son enviados al lisosoma para su degradación. La misma está altamente regulada e interviene en la adaptación celular a diversos tipos de estrés dentro de los que se encuentran la restricción nutricional, el estrés oxidativo y la hipoxia [11, 12]. La autofagia permite la eliminación de organelas dañadas, proteínas mal plegadas y agregados proteicos, cumpliendo un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. A su vez, la autofagia actúa como un mecanismo de reciclaje, ya que la degradación de moléculas y organelas provee a la célula de aminoácidos libres y otros precursores anabólicos necesarios para la síntesis de nuevos componentes celulares. La autofagia ocurre de manera basal en la mayoría de las células metabólicamente activas [13, 14].

Defectos en la correcta activación de la autofagia han sido relacionados con el desarrollo de patologías de diversa índole, tales como deficiencias en la respuesta inmune, cáncer y enfermedades neurodegenerativas [15-17], demostrando que el proceso es de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis celular y sistémica. En este trabajo de tesis se utiliza el término autofagia para referirse a la macroautofagia, un tipo particular de autofagia que involucra la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, las cuales secuestran en su interior los componentes a ser degradados en lisosomas (**Fig. 2**).

2. b- Descripción del proceso autofágico

En levaduras, los genes que participan en la autofagia son denominados Atg (autophagy-related genes) [13] y la mayoría de ellos cuenta con sus respectivos genes ortólogos en plantas y mamíferos. Los autofagosomas en levaduras suelen tener un diámetro que ronda entre 300 a 900 nm, siendo en células de mamífero aún mayores (1000 a 1500 nm). La biogénesis de estas vesículas es regulada por los genes Atg, los cuales se agrupan en tres complejos: 1) complejo de iniciación, 2) complejo de nucleación y 3) complejo de elongación. El complejo de iniciación [18] está formado por la quinasa de serina/treonina Atg1 [19, 20] (ULK1-2 en mamíferos), Atg17 [21] (FIP200 o RB1CC1 en mamíferos) y Atg13. Cuando se induce la autofagia, la quinasa Atg1 se activa y cataliza la fosforilación de Atg13 y Atg17, activando así al complejo de iniciación [19, 22]. El objetivo de este complejo es reclutar y activar al complejo de nucleación, además de otras Atgs, lo cual es fundamental para dar inicio al proceso de formación del autofagosoma.

El complejo de nucleación está compuesto por la fosfatidinositol-3-quinasa de clase III Vps34 [23], y las proteínas Vps15 [24] (PI3KR4/p150 en mamíferos), Atg6 (Beclin-1 en mamíferos) y Atg14 (**Fig. 2**). Cuando el complejo de nucleación se activa, Vps34 fosforila al lípido fosfatidilinositol (PI), generando fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) en la membrana del retículo endoplásmico (RE) [25]. La síntesis de PI3P marca la posición en donde comenzará la formación del autofagosoma. Esta marca permite el reclutamiento de diversas proteínas efectoras que promueven la curvatura de la membrana en esa región, dándole forma de omega (y por ende llamada omegasoma), y favoreciendo la formación del “fagóforo” o “membrana de aislamiento” (**Fig. 2**). Por un proceso de expansión y cierre, el fagóforo da lugar al autofagosoma, la organela de doble membrana distintiva del proceso de autofagia.

La expansión y cierre del fagóforo depende de las proteínas Atg2, Atg18, y del complejo de elongación [26, 27] (tercer complejo involucrado en este proceso), el cual está compuesto por las proteínas Atg8 (LC3 en mamíferos), Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 y Atg16 (**Fig. 2**). Por un lado, Atg18 interactúa con PI3P en la membrana del fagóforo y recluta a Atg2 [28]. Atg2 es una proteína transportadora de lípidos, la cual posee en su región N terminal una serie de residuos básicos que le permiten insertarse en la membrana del RE. Además, Atg2 contiene una cavidad hidrofóbica que le permite acomodar fosfolípidos, y transferirlos desde la membrana del RE al fagóforo. De esta manera, Atg2 y Atg18 contribuyen a la expansión de su membrana [28].

Por otro lado, el complejo de elongación media la fusión de Atg8 a fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana del fagóforo [27]. Experimentos de pérdida de función demostraron que la formación de PE-Atg8 en la membrana del fagóforo es esencial para la expansión y cierre del mismo, al igual que para adquirir capacidad degradativa. Atg8 cumple al menos dos funciones en la biogénesis de los autofagosomas: contribuye a generar curvatura en la membrana del fagóforo en expansión, e interactúa con adaptadores y receptores

autofágicos que presentan motivos LIR (regiones de interacción con Atg8), lo cual permite incorporar el cargo a ser degradado al fagóforo. Un ejemplo es Ref(2)P [29] (homólogo de p62 en mamíferos), el cual posee un dominio UBA que le permite unirse a proteínas poliubiquitinadas y un dominio LIR.

Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, denominándose el producto de esta fusión autolisosoma, en el cual los componentes secuestrados se degradan por acción de hidrolasas ácidas lisosomales (**Fig. 2**). Los productos de degradación son luego exportados al citoplasma a través de permeasas lisosomales para poder ser reutilizados por la célula [26]. La fusión del autofagosoma con el lisosoma depende de proteínas SNAREs como Vamp7 [30] y Syntaxina 17 [31].

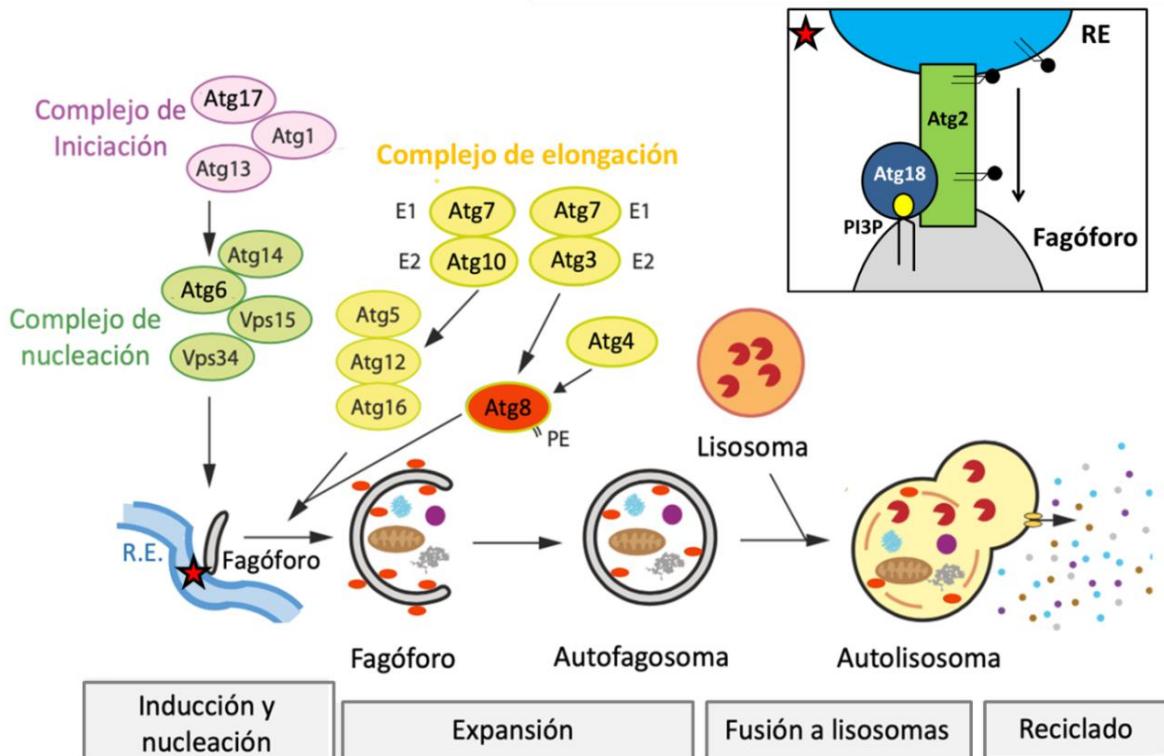


Figura 2- Mecanismos moleculares del proceso de autofagia en *Drosophila*. El complejo de iniciación (Atg1/Atg13/Atg17) recluta al complejo de nucleación (Atg6/Vps34/Atg14/Vps15), y éste define el sitio de formación del autofagosoma mediante marcas de PI3P en la membrana del RE. El complejo de elongación es reclutado y media la incorporación de Atg8-PE a la membrana del fagóforo en expansión. Atg2 y Atg18 aportan fosfolípidos desde el RE para su expansión. Mediante procesos de elongación y sellado, se forma el autofagosoma, el cual se fusionará a lisosomas (generando el autolisosoma) para degradar su contenido.

2. c- Control de la autofagia

La autofagia es regulada por un amplio rango de señales tanto intra como extracelulares, entre las cuales se incluyen la disponibilidad de nutrientes, la presencia o ausencia de factores de crecimiento e hipoxia. La principal regulación de la autofagia está mediada por las vías de señalización de mTORC1 [32] (Target of Rapamycin) y AMPK (AMP protein kinase), ambas involucradas en la homeostasis energética de la célula. En condiciones de abundancia nutricional, mTOR fosforila a ATG1 y a ATG13 [33], desactivándolas. En

condiciones de escasez nutricional, existen fosfatases que las defosforilan. La defosforilación de ATG1 y ATG13 permite la formación del complejo de iniciación y la consecuente activación de la autofagia. Por su parte, AMPK es una quinasa capaz de sensar el estado energético de la célula. En condiciones de disminución de los niveles de energía, el incremento de la relación AMP/ATP conduce a la activación de AMPK, la cual fosforila y activa al complejo TSC1/2, funcionando como regulador negativo del complejo mTORC1 e indirectamente, como activador de la autofagia. Por su parte, AMPK también fosforila directamente a ATG1, induciendo la autofagia.

2. d- La autofagia en el desarrollo

A pesar de actuar principalmente como mecanismo de reciclaje y mantenimiento de la homeostasis, la autofagia regula una gran variedad de procesos celulares, entre los cuales se pueden destacar la apoptosis, el tráfico vesicular, la señalización celular, la secreción de proteínas, el ciclo celular, el metabolismo celular y la respuesta a estrés [34-36]. Más aún, la autofagia es necesaria en varios eventos de diferenciación celular en organismos eucariotas [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43], siendo un ejemplo de esto el mantenimiento y diferenciación de células madre en diversos órganos y tejidos [44]. En *Drosophila*, se reportó que la autofagia participa en la regulación de las células madre intestinales [45], promoviendo su proliferación y asegurando su mantenimiento. En este modelo, se observó que células madre que no pueden activar la autofagia sufren daño al ADN y arresto del ciclo celular [45]. En la hematopoyesis de mamíferos, experimentos de perdida de función demostraron que la autofagia participa en la diferenciación o mantenimiento de células de la sangre, tanto del linaje mieloide como linfoide [46-50]. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la autofagia regula la hematopoyesis están poco definidos a nivel molecular y celular.

3- Hematopoyesis

3. a- Generalidades

La hematopoyesis es el proceso por el cual Células Madre Hematopoyéticas (CMHs) generan células de la sangre. En mamíferos, este proceso comienza temprano durante el desarrollo embrionario y persiste en la vida adulta. Se distinguen dos eventos de diferenciación de células sanguíneas durante el desarrollo de mamíferos: un primer evento de “hematopoyesis primitiva” en el saco vitelino extraembrionario y un segundo evento “definitivo” en la región aorta-gonal-mesonefros que contiene un endotelio a partir del cual geran CMHs al lumen aórtico [51]. A partir de los días 10-11 del desarrollo embrionario, las CMHs migran por el torrente sanguíneo y la hematopoyesis comienza a darse en el hígado fetal y eventualmente en todos los compartimentos hematopoyéticos del adulto, incluyendo el bazo, el timo y la médula ósea de los huesos largos [52].

Las CMHs, están en lo más alto del programa de diferenciación, con una alta capacidad de auto-renovación y multipotencia para producir cualquier tipo de célula de la sangre. A partir de estas células madre se produce una primera separación de linajes, dando lugar a una célula precursora mieloide común y a una célula precursora linfoide común, que darán origen al sistema inmune innato y adaptativo respectivamente (Fig. 3). En mamíferos, el linaje mieloide incluye a: los eritrocitos, encargados del transporte de oxígeno; los megacariocitos que mediante la fragmentación de su citoplasma dan lugar a las plaquetas, involucradas en el proceso de coagulación; mastocitos y basófilos, involucrados en vasodilatación y alergias; neutrófilos y macrófagos, fundamentales para la fagocitosis; y los eosinófilos, importantes en la respuesta contra parásitos. El linaje linfoide por su parte, está conformado por células natural killer, y linfocitos T y B, responsables de la inmunidad adaptativa y la memoria inmunológica tras sucesivas exposiciones del organismo a un mismo antígeno (Fig. 3).

Es importante destacar que en el sistema sanguíneo de mamíferos, la desregulación del balance existente entre quiescencia y diferenciación de las CMHs puede provocar el desarrollo de anemias y leucemias [53, 54], lo cual hace fundamental dilucidar los mecanismos involucrados en el mantenimiento del balance.

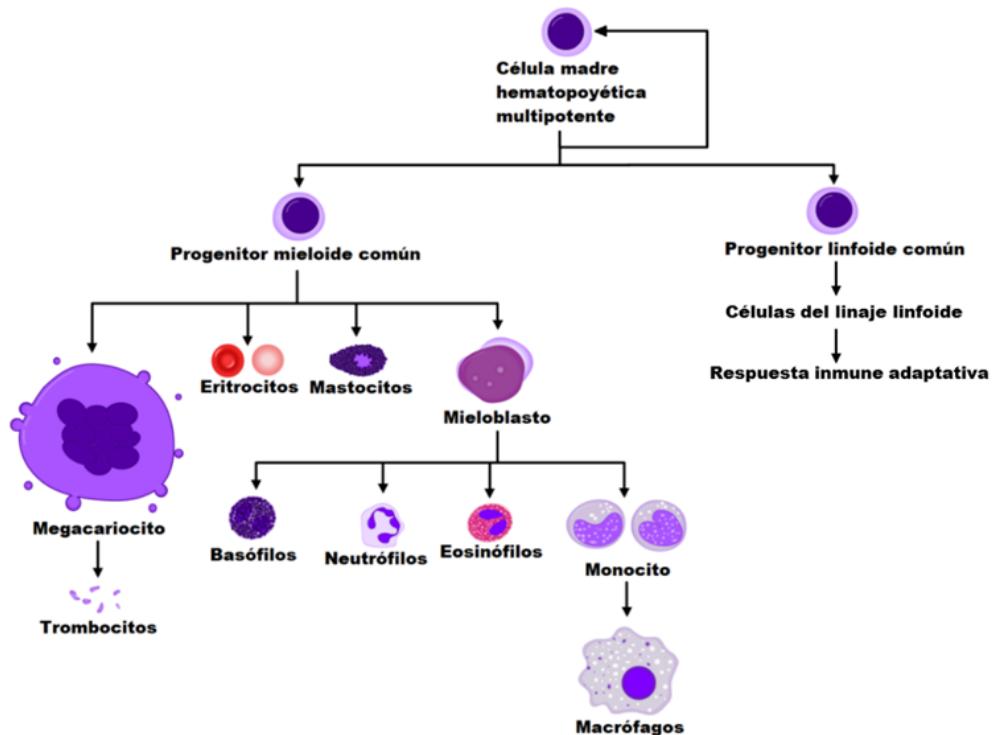


Figura 3- Esquema de la hematopoyesis en mamíferos. Las células madre hematopoyéticas dan origen al linaje mieloide (con un progenitor mieloide común) y al linaje linfoide (con un progenitor linfoide común). Cada uno de estos progenitores da lugar a los tipos celulares que se muestran en el esquema. Esquema modificado, cortesía del Dr. Dalmiro Manuel Blanco Obregón.

3. b- Hematopoyesis en *Drosophila*

Trabajos realizados desde inicios de este siglo han establecido que las células de la sangre de *Drosophila* comparten características con el sistema inmune innato de mamíferos, tanto a nivel molecular como celular. *Drosophila* ha surgido entonces como un modelo sencillo para descifrar los mecanismos de diferenciación de las células sanguíneas. La hematopoyesis de *Drosophila* es menos compleja que la de mamíferos, fundamentalmente debido a la menor diversidad de tipos celulares maduros que se generan durante el proceso. En *Drosophila* no existen células de transporte de oxígeno como los eritrocitos de los mamíferos, ya que éste es transportado por difusión desde el exterior hacia cada una de las células del organismo a través de una red de túbulos denominados tráqueas [55]. Por tal motivo, las células sanguíneas de *Drosophila* sólo cumplen funciones inmunológicas. Al igual que en el resto de los invertebrados, *Drosophila* carece de una respuesta inmune adaptativa, de modo que todas sus células de defensa, colectivamente denominadas hemocitos, participan de una respuesta inmune de tipo innata [56], siendo así análogas a células del linaje mieloide de los mamíferos.

Tres tipos de hemocitos maduros fueron identificados en *Drosophila* [57, 58]: los Plasmátocitos (PL), las Células Cristal (CC) y los Lamelocitos. Los PL comprenden el 95–98% del total de hemocitos y cumplen funciones fagocíticas y antimicrobianas, siendo análogos a los macrófagos de mamíferos. Juegan además un rol importante en procesos del desarrollo y homeostáticos, eliminando células apoptóticas durante el desarrollo embrionario [59], regulando el metabolismo de la glucosa [60] y promoviendo el mantenimiento de células madre [61], entre otras funciones. Son células altamente móviles que han servido también como modelo de estudio de migración celular y quimiotaxis.

Por otro lado, existen las CC, las cuales constituyen el restante 2–5% de los hemocitos. Este tipo celular participa de la cicatrización de heridas e interviene en el proceso de melanización de patógenos, lo cual puede analogarse a las funciones de los megacariocitos y plaquetas en mamíferos. Las CC reciben su nombre a partir de inclusiones cristalinas del zimógeno pro-fenoloxidasa (PPO), que pueden apreciarse en su citoplasma [62]. Durante la respuesta inmune, la PPO es liberada al medio extracelular tras la ruptura de la célula para ser procesada a su forma activa, Fenoloxidasa (PO), mediante una cascada de serín-proteasas altamente regulada [63]. La PO cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, que polimerizan y forman melanina, la cual sirve como barrera en torno a patógenos grandes y también como material para el cierre de heridas. La reacción de melanización libera además Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) como subproducto, que tienen efecto tóxico sobre los parásitos [64].

Finalmente existen los Lamelocitos, los cuales son indetectables en condiciones normales de desarrollo. Su diferenciación se induce frente a ciertos tipos de estrés, como lo son las infecciones por huevos de avispa

[65]. Los Lamelocitos cumplen un rol esencial en la encapsulación y eliminación de patógenos y partículas de gran tamaño [58].

Al igual que en mamíferos, en *Drosophila* todos los hemocitos maduros se producen a partir de células progenitoras en dos eventos de hematopoyesis separados espacial y temporalmente. El primer evento ocurre en el embrión temprano, cuando células progenitoras se especifican a partir del mesodermo de la cabeza y se diferencian a CC y PL (**Fig. 4**). Esta primera oleada de hematopoyesis “primitiva” da origen a los hemocitos que actuarán en la respuesta inmune a lo largo del desarrollo del embrión. Culminada la embriogénesis, estos hemocitos embrionarios continuarán ejerciendo su función en la larva, ya sea en forma de parches de células adheridas al tegumento (hemocitos sésiles), o como células circulantes en el hemocele (el sistema circulatorio abierto presente en todos los artrópodos) [66, 67].

El segundo evento de hematopoyesis (“final”) ocurre durante los estadios larvales en la glándula linfática (GL), el órgano hematopoyético por excelencia de *Drosophila* (**Fig. 4**). Los hemocitos que se forman en la GL serán liberados al hemocele durante la metamorfosis pupal, por lo que formarán parte del sistema inmune de la mosca adulta junto a los hemocitos preexistentes.

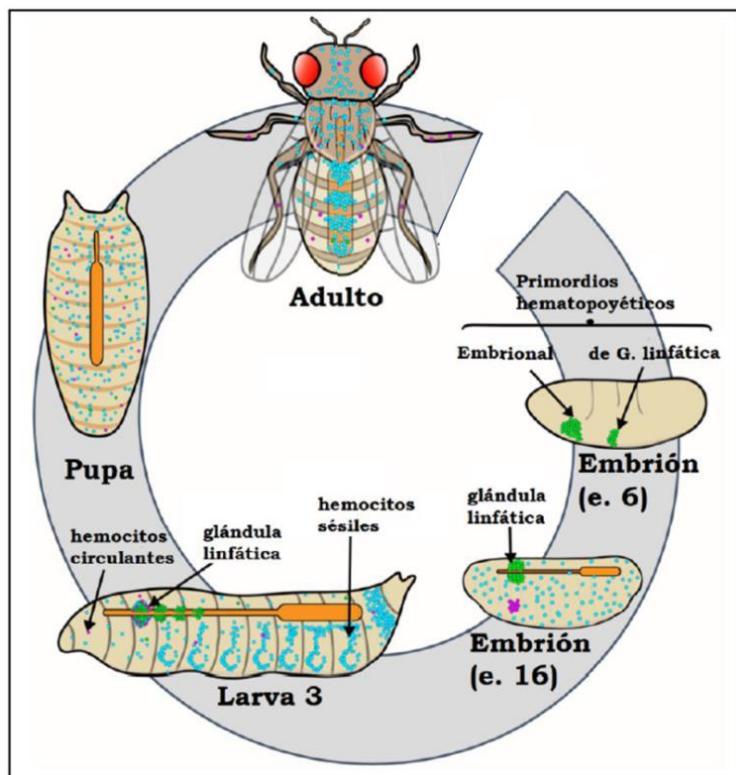


Figura 4- Existen dos eventos hematopoyéticos en distintos estadios del desarrollo de *Drosophila*. En embriones tempranos ocurre la especificación de pro-hemocitos (verdes) a partir del mesodermo de la cabeza, y paralelamente, comienza a formarse el primordio de la glándula linfática a partir del mesodermo torácico. La hematopoyesis embrionaria genera plasmacitos (en celeste), que migran a diferentes partes del embrión; y células cristal (en violeta) que permanecen en la región anterior. En el

embrión tardío, el primordio de glándula linfática presenta unas 20 células y ya exhibe la morfología característica de los futuros lóbulos primarios ubicados simétricamente a ambos lados del vaso dorsal en desarrollo. En la larva 3, la glándula linfática alcanza su máximo tamaño. En este estadio, los hemocitos circulantes y los adheridos al tegumento (sésiles) son los que se han formado en el embrión, dado que la glándula linfática recién se desintegra durante la metamorfosis en el estadio de pupa, liberando los hemocitos al hemocele. El vaso dorsal (en naranja) es el corazón del sistema circulatorio larval. Imagen adaptada de *Ong, 2015* [10].

3. c- Desarrollo de la glándula linfática durante los estadios larvales

El primordio de la glándula linfática comienza a formarse en estadios embrionarios tempranos. Entre los estadios 13 y 16, ya pueden apreciarse los lóbulos primarios de la glándula linfática (**Fig. 4**), con unas 20 células cada uno y situados simétricamente en torno al vaso dorsal en desarrollo (futuro corazón de la larva) [68].

Luego de su determinación en el embrión, los lóbulos primarios proliferan activamente durante los primeros estadios larvales, pasando de tener 20 células al inicio del 1er estadio larval a tener 200 células al final de larva 2 [69, 70] (**Fig. 5A, B**). Caudalmente a los lóbulos primarios, se forman una serie de lóbulos posteriores más pequeños y separados entre sí por células pericárdicas (nefrocitos). Se desconoce el origen de los lóbulos posteriores, pero se sabe que están atrasados en su diferenciación respecto de los lóbulos primarios. Ya desde larva 1, tanto los lóbulos primarios como los posteriores, todos ellos conformados por células progenitoras, expresan los marcadores *domeless* (*dome*) y *Thioester-Containing Protein-4* (*TepIV*) (**Fig. 5B**). *Domeless* es el receptor de la vía JAK/STAT en *Drosophila* [70], y sus funciones en hematopoyesis permanecen poco claras hasta la fecha [71, 72]. Una porción del promotor de *domeless* (*domeMESO*) ha sido clonada y se la ha utilizado para generar tanto una línea inductora (*domeMESO-Gal4*) como diversos reporteros de expresión, que se utilizan habitualmente para manipular genéticamente y visualizar a los progenitores hematopoyéticos de la GL [73] (**Fig. 5, Tabla I**). De manera similar a *domeless*, el promotor de *TepIV* ha sido clonado y utilizado para generar la línea inductora *TepIV-Gal4*. [73] [74] [75].

A partir del estadio larval 2 tardío, se da inicio al proceso de diferenciación. En ese momento las células progenitoras más lejanas al vaso dorsal siguen manteniendo la expresión de *domeless*, pero dejan de expresar *TepIV* (**Fig. 5C**). Así, la población de progenitores se sub-divide en dos grupos: los progenitores núcleo, más cercanos al vaso dorsal, los cuales expresan *TepIV* y *domeless*; y los progenitores distales, células más maduras que dejan de expresar *TepIV* y adquieren la capacidad de poder diferenciarse hacia PL o CC [76]. En el caso de diferenciarse a PL, dichas células comenzarán a expresar *hemolectina* (*hml*), marcador temprano de diferenciación característico de PL, al mismo tiempo que dejan de expresar *domeless* (**Fig. 5G**). Posteriormente estas células expresarán el receptor Nimrod o antígeno P1 [77], marcador de PL maduros. En el caso de comprometerse hacia el destino CC, dicha célula progenitora dejará de expresar *domeless* y comenzará a expresar el factor de transcripción *lozenge* (*Lz*) [78], marcador

temprano de CC (**Fig. 5G**). Una vez maduras, estas células formarán inclusiones cristalinas de Profenoloxidasa (PPO) [73, 76, 79], siendo éste un marcador de CC maduras.

En larva 3 *wandering*, momento en que se concentran las observaciones de este trabajo de tesis, la glándula linfática presenta una clara distinción de zonas, alcanza su máximo tamaño y se hace conspicua en la región ántero-dorsal del animal (**Fig. 5G**). En este estadio podemos apreciar 3 zonas definidas: 1) el Centro Posterior Señalizador (CPS) ubicado en el extremo más posterior del lóbulo primario, el cual actúa como nicho señalizador que regula el mantenimiento de los progenitores; 2) la zona medular (ZM) que incluye a los progenitores núcleo y a los progenitores distales [76] (**Fig. 5G**); y 3) la zona cortical (ZC) ubicada en la periferia del lóbulo y poblada por hemocitos diferenciados o en proceso de diferenciación (**Fig. 5G**).

Durante la pupariación, los progenitores hematopoyéticos sufren diferenciación masiva y el órgano se desintegra, liberando los hemocitos maduros al hemocele [80] (**Fig. 5F**). Los hemocitos formados en la GL larval sobreviven y proporcionan, junto a los hemocitos de origen embrionario, las funciones de defensa contra patógenos en la mosca adulta.

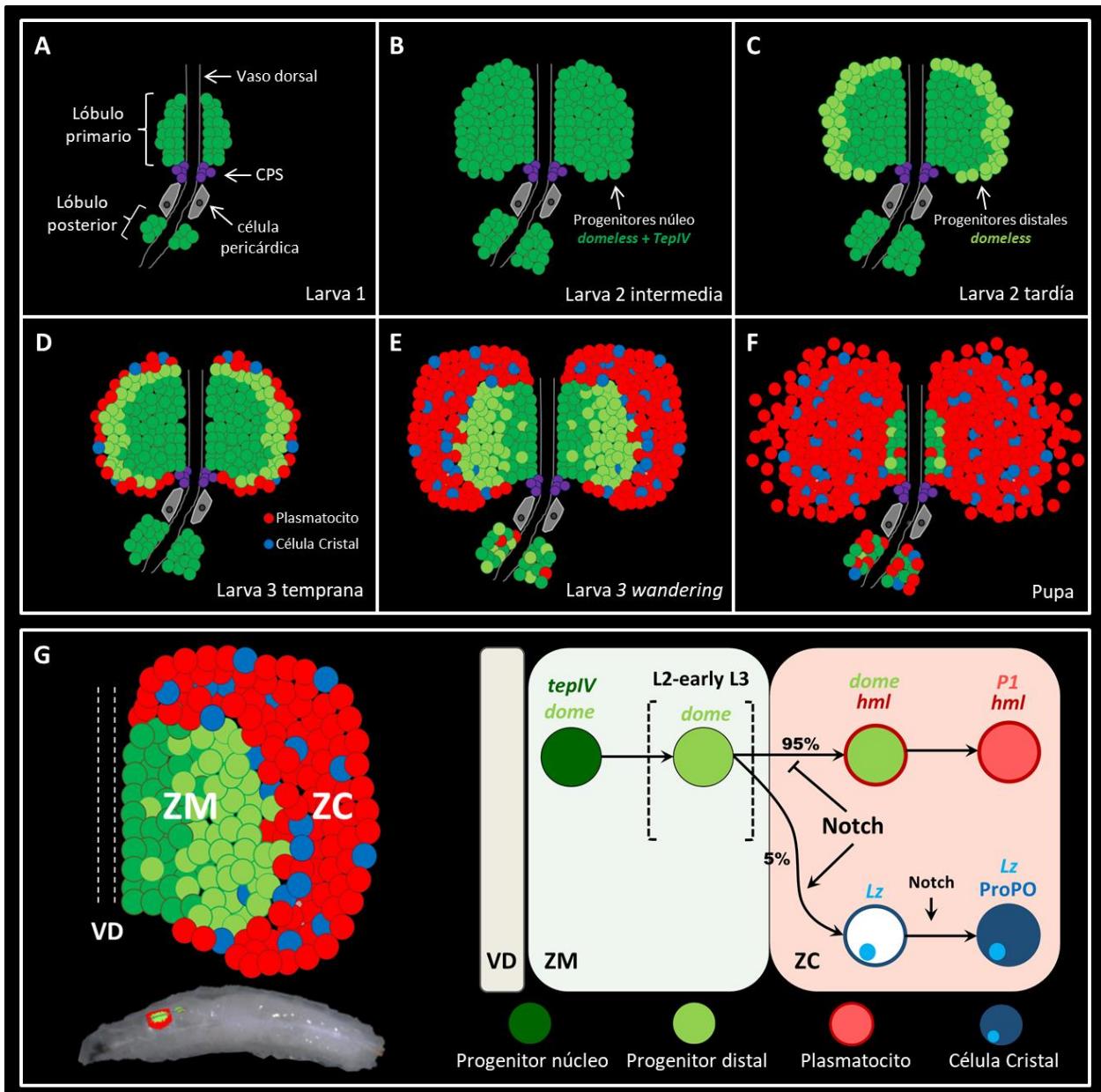


Figura 5- Desarrollo de la glándula linfática en estadios larvales. (A) En larva 1, la glándula linfática consta de dos lóbulos primarios y de lóbulos posteriores caudales, separados por células pericárdicas. Tanto los lóbulos primarios como los posteriores están formados por progenitores indiferenciados que expresan los marcadores *domeless* y *TepIV*. Los lóbulos primarios además presentan un grupo de células que conforman el centro posterior señalizador (CPS), y que se mantienen en todos los estadios posteriores del desarrollo larval. Desde larva 1, pasando por larva 2 intermedia (B) hasta larva 2 tardía, los progenitores proliferan en los lóbulos primarios (y en menor grado en los posteriores), aumentando diez veces la cantidad de células que los componen. (C) En el estadio larva 2 tardía se observan, en la periferia de los lóbulos primarios, los progenitores distales, que se definen por la falta de expresión de *TepIV*. (D). En larva 3 temprana, los progenitores permanecen en quiescencia y definen la llamada zona medular (ZM). Paralelamente, aparecen células en diferenciación (que ya no expresan más *domeless*) y las primeras células terminalmente diferenciadas: los plasmacitos (*hml*- y *P1*-positivos) y las células cristal (*Lz*- y *ProPO*- positivas). Estos tipos celulares definen una segunda región, la zona cortical (ZC). (E) En larva 3 tardía (wandering), la ZC ha alcanzado su máximo volumen. En este momento del desarrollo larval, la glándula linfática se encuentra claramente organizada con la ZM y la ZC bien definidas. La mayoría de las

observaciones de esta tesis, y de la literatura en general, se hacen en este estadio. **(F)** Finalmente, en el estadio de pupa, las células de la glándula linfática se diferencian masivamente, se liberan al hemocele, y en consecuencia la glándula se desintegra. **(G)** Representación de un lóbulo primario en el tercer estadio larval wandering (izquierda superior). Izquierda inferior: posición de la GL en larvas del tercer estadio. Derecha: esquema de las zonas de la GL del tercer estadio larval wandering y las poblaciones celulares que las conforman, incluyendo los marcadores específicos de cada zona.

4- Diferenciación de las células cristal

La diferenciación de células progenitoras a células cristal (CC) depende de la activación de la vía Notch (**Fig. 5G**), la cual es conocida por regular el mantenimiento o diferenciación de otros sistemas de células madre o progenitoras en diversos modelos biológicos. En la glándula linfática, una vez iniciada la diferenciación de las células progenitoras a CC mediante la activación de la vía Notch, uno de los primeros genes que se expresan es el del factor de transcripción *lozenge* (*lz*), ortólogo en invertebrados del factor de transcripción Runx1 [81]. En GL mutantes para Notch se pierde la expresión de *lz* y no se observan CC [82]. Contrariamente, en GL de larvas mutantes *lz*, la actividad transcripcional de Notch no se ve afectada, pero sí la cantidad de CC presentes en la GL, demostrando que la activación de Notch precede a la expresión de *lz* y que este último es necesario para la diferenciación de las CC [82]. La activación de muchos genes blanco de Notch en CC depende en parte de la unión de *lz* a sus secuencias regulatorias. De esta manera, se acepta que Notch y *lz* cooperan en la activación transcripcional del programa de diferenciación de las CC. En línea con estas observaciones, la expresión de los genes *klumpfuss* y *pebbled/hindsight*, que promueven la diferenciación de las CC e inhiben la expresión de marcadores de otros destinos celulares, es dependiente de Notch y *lz* [83].

Si bien ambos ligandos de Notch, Delta y Serrate, se expresan en la GL, solamente la función de Serrate ha sido caracterizada en este órgano. Hace tiempo se sabe que Serrate se expresa principalmente en el CPS [82], pero sólo recientemente nuestro grupo reportó que su expresión en este nicho favorece la activación de la vía Notch en los progenitores núcleo de la ZM, lo cual contribuye a que los mismos se mantengan en estado indiferenciado [84]. Por otra parte, Martinez-Agosto y colaboradores [85] reportaron que Serrate se expresa además de manera transitoria en un grupo de células presentes en la interfaz entre la ZM y la ZC. Hasta la fecha hay poca información sobre estas células, pero se sabe que se forman a partir de células que expresan *domeless* en la ZM y que la expresión de Serrate en estas células favorece la diferenciación de progenitores distales a CC [84].

Tanto el receptor Notch [86], que le da nombre a la vía, como sus ligandos [87] (Delta y Serrate en *Drosophila*), son proteínas de simple paso transmembrana, por lo que es necesario que exista contacto físico entre la célula dadora y la célula aceptora de la señal para que pueda transmitirse la información [87]. El receptor Notch es un hetero-olígomero compuesto por un dominio extra celular (DECN, Dominio extracelular

de Notch), el cual se asocia no covalentemente y de manera calcio dependiente al dominio intracelular (DICN, Dominio intracelular de Notch), el cual consta de una pequeña secuencia ubicada extracelularmente, un paso transmembrana y la región intracelular propiamente dicha (**Fig. 6**).

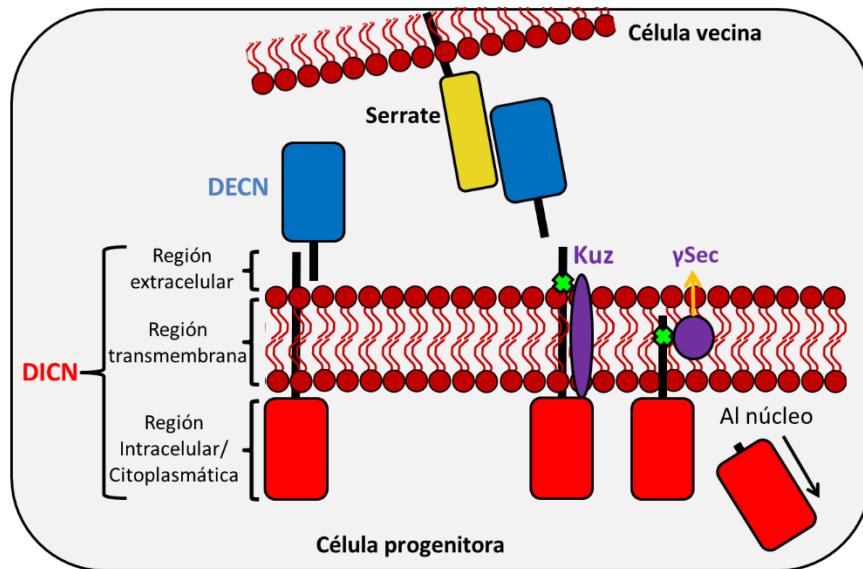


Figura 6- Pasos necesarios para la activación de la vía Notch. De izquierda a derecha: el receptor Notch está conformado por un dominio extracelular (DECN, azul) y un dominio intracelular (DICN, rojo), el cual consta de 3 regiones: extracelular, transmembrana (ambas en negro), e intracelular/citoplasmática (rojo). La interacción entre Serrate (amarillo) y el DECN (azul) favorece la endocitosis del ligando junto con el DECN en la célula vecina, lo cual expone el primer sitio de clivaje (cruz verde en la región extracelular de DICN) para la metaloproteasa Kuzbanian (Kuz, violeta). La actividad catalítica de Kuz expone un segundo sitio de clivaje en la región transmembrana, el cual es clivado por el complejo γ -secretasa (γ -sec, violeta). Este último clivaje libera la región citoplasmática del DICN, el cual, merced a una señal de localización nuclear, ingresa al núcleo para regular la expresión de genes blanco.

En la vía canónica de Notch (dependiente de ligandos), el contacto entre el ligando de la célula dadora de la señal y el DECN en la célula aceptora provoca la endocitosis del ligando en la célula dadora, el cual se lleva consigo al DECN en el proceso (**Fig. 6**). La pérdida del DECN expone en la pequeña región extracelular del DICN un sitio de clivaje para la metaloproteasa Kuzbanian (Kuz, ADAM en mamíferos). Kuz es una metaloproteasa transmembrana presente en la membrana plasmática y en endosomas. El clivaje por parte de Kuz expone un segundo sitio de clivaje presente en la región transmembrana del DICN (**Fig. 6**). Este segundo clivaje es catalizado por el complejo γ -secretasa, el cual al estar imbuido en la membrana plasmática (al igual que en la membrana de endosomas), puede clivar proteínas de simple paso transmembrana. Este segundo clivaje libera la región citoplasmática del DICN, la cual transloca al núcleo para regular la expresión génica [41] de genes blanco mediante su interacción con Suppressor of Hairless [42] y otros coactivadores transcripcionales.

En la mayoría de los casos, Notch es clivado por Kuz y γ -sec luego de unirse a su ligando en la membrana plasmática (**Fig. 7, A**). Sin embargo, se ha determinado que en ciertos contextos biológicos, Notch es clivado por la γ -secretasa no sólo en la membrana plasmática, sino también en la membrana de los endosomas (**Fig. 7, B**): luego de ser clivado por Kuz, Notch es endocitado, llegando a las membranas de Endosomas Tempranos, los cuales se acidifican y maduran a Endosomas Tardíos, finalmente dando lugar a Cuerpos Multi-Vesiculados (CMV) [88]. En este contexto, la γ -secretasa puede clivar a Notch en la membrana de Endosomas Tardíos, así como en la membrana limitante de los CMV [89], liberando el DICN que luego ingresa al núcleo. Trabajos realizados tanto en *Drosophila* como en células de mamíferos [90, 91] [92] demostraron que la endocitosis de Notch y su tráfico a través de la vía endocítica son cruciales para favorecer el clivaje por la γ -Sec y la activación de la vía. De esta manera, la activación de la vía Notch está gobernada por dos eventos: la interacción del receptor Notch con su ligando, y su tráfico a través de la vía endocítica.

La formación de vesículas intraluminales dentro de los endosomas tardíos hace que los mismos pasen a llamarse CMV. Existen 4 complejos ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport 0 to III) que promueven la invaginación de la membrana de los endosomas [93, 94], dando lugar a las vesículas intraluminales del CMV. La incorporación de Notch en estas vesículas resulta en su degradación lisosomal [95]. Mientras el receptor Notch se encuentre en la membrana externa de los CMV y no sea secuestrado en vesículas intraluminales, hay posibilidades de que éste sea clivado por γ Sec, y que el DICN quede libre para entrar al núcleo. De esta manera se establece un balance entre la activación y la degradación de Notch en la membrana de Endosomas Tardíos/CMV.

Finalmente, la activación de Notch también puede darse de manera independiente de ligandos (**Fig. 7, C**). En este caso, el receptor Notch completo es endocitado y traficado, siguiendo el mismo proceso que en la **Figura 7, B**. La única diferencia es que en esta vía es necesario que el DECN presente en el interior de los endosomas deje de interactuar con el DICN para que los sitios de clivaje queden expuestos. Hasta la fecha no se ha confirmado el mecanismo involucrado en exponer los sitios de clivaje. Sin embargo, una hipótesis es que el descenso del pH y cambios en el contenido catiónico de los endosomas, a medida que éstos maduran, desestabiliza la estructura del DECN y por lo tanto su interacción con el DICN.

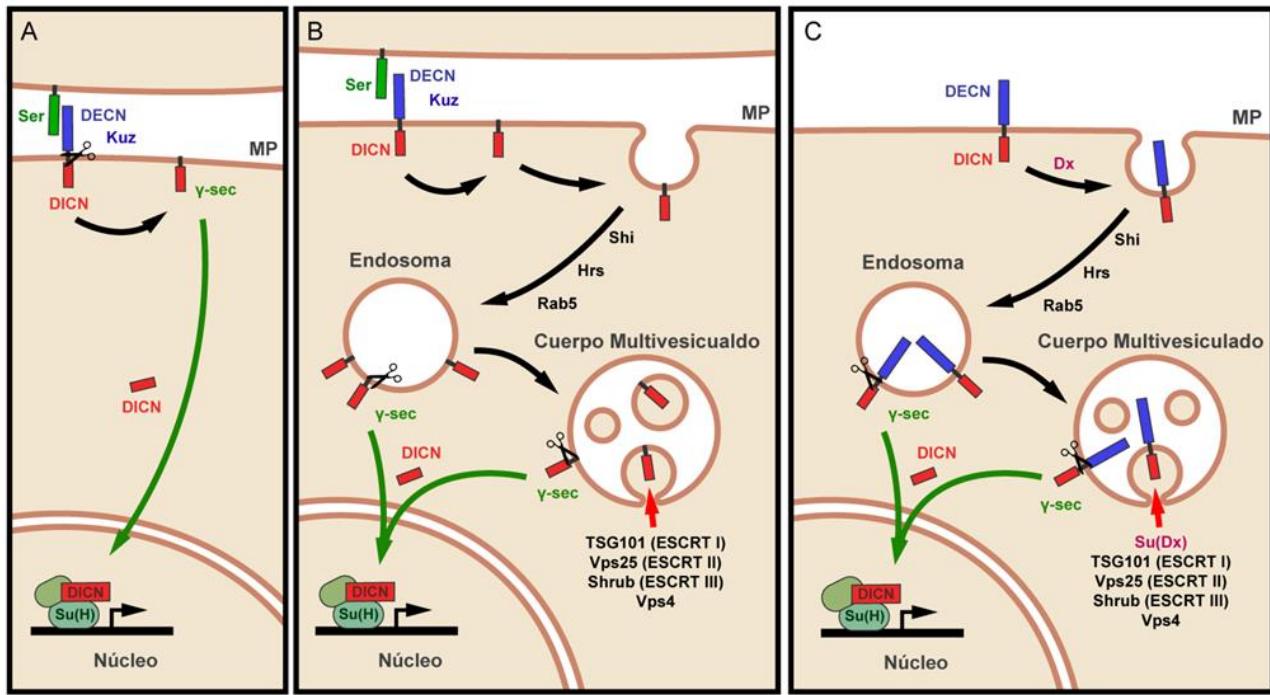


Figura 7 – Esquema de las diferentes formas de activación de la vía Notch. **(A)** Tras unirse a su ligando Serrate (Ser), Notch sufre un clivaje en la membrana plasmática mediado por la metaloproteasa Kuzbanian (Kuz) y por el complejo Y-secretasa (Y-Sec). Luego del clivaje, el DICN queda libre para ingresar al núcleo y, junto con otros coactivadores como Suppressor of Hairless (Su(H)), y regular la expresión génica. **(B)** Alternativamente, el segundo clivaje de Notch, mediado por la Y-Sec, puede darse en membranas de endosomas [96]: luego de interactuar con Ser y ser clivado por Kuz, Notch es endocitado (proceso dependiente del gen shibire (Shi) entre otros), quedando inserto en la membrana de Endosomas Tempranos que van a madurar a Endosomas Tardíos mediante la acción de genes como Hrs y Rab5. La invaginación de la membrana de Endosomas Tardíos mediada por los complejos ESCRT 0-III da lugar a vesículas intraluminales del Cuerpo Multivesiculado (CMV). De esta manera, el receptor Notch puede encontrarse en la membrana externa del CMV así como en las membranas de las vesículas intraluminales. Las proteínas Tsg101, Vps25 y Shrub son parte de los complejos ESCRT I, II y III respectivamente. Vps4 es la ATPasa efectora de los complejos ESCRT. Los receptores Notch presentes en la membrana de los CMV o en Endosomas Tardíos pueden ser clivados por Y-Sec. Las moléculas de Notch presentes en las vesículas intraluminales del CMV son degradadas en el lisosoma (no se muestra en el esquema). **(C)** Activación de Notch independiente de ligandos: Notch puede ser endocitado sin la necesidad de unirse a un ligando; en este caso, el receptor completo (DECN y DICN) llega a la membrana de endosomas tempranos. Los pasos siguientes son los mismos a los descriptos en (B). La endocitosis de Notch independiente de ligandos es estimulada por la ligasa de ubiquitina E3 Deltex (Dx); la formación de vesículas intraluminales del CMV que contienen a Notch es estimulada por la actividad de la E3 ubiquitin ligase Suppressor of Deltex (Su (Dx)).

Imagen adaptada de Katz, 2024 [96].

Hipótesis y objetivos

Hipótesis de Trabajo

La autofagia en progenitores hematopoyéticos de la glándula linfática larval contribuye al control de la diferenciación de las células de la sangre de *Drosophila*

Objetivos

- Caracterizar la vía autofágica en las células progenitoras de la glándula linfática.
- Determinar si la autofagia participa en la hematopoyesis de *Drosophila*.
- Definir el mecanismo mediante el cual la autofagia regula la diferenciación de las células de la sangre en *Drosophila*.

Materiales y Métodos

1- Manejo de *Drosophila*

1. a- Cría y mantenimiento de moscas

Las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis se mantuvieron en medio de crecimiento estándar a base de harina de maíz (ver composición en la sección de soluciones). Tanto los stocks de moscas como las cruzas experimentales fueron mantenidas en viales de plástico de 2,5 cm de diámetro y 10 cm de largo conteniendo aproximadamente 8 ml de medio de crecimiento. Para la amplificación de líneas de interés y cruzas, se utilizaron botellas de mayor capacidad (250 cm³) conteniendo 50 ml del mismo medio de crecimiento. Los viales y botellas fueron mantenidos en incubadoras a 18°C, 25°C o 29°C, dependiendo del uso de las líneas en cada caso.

El trabajo con moscas fue realizado bajo un flujo continuo de dióxido de carbono para anestesiarlas y posteriormente manipularlas con un pincel bajo lupa estereoscópica. Para la administración de CO₂ se utilizó una base de plástico cubierta por una superficie porosa que permite el paso del gas y la manipulación de las moscas.

1. b- Recolección de hembras vírgenes

Para la combinación de dos o más construcciones transgénicas en un mismo animal fue necesario realizar cruzas entre genotipos diferentes. Para las mismas, fueron utilizadas hembras vírgenes de un genotipo de interés y machos del otro. Basados en sus características morfológicas, las hembras vírgenes son fácilmente distinguibles de hembras no vírgenes y machos [97]. La característica distintiva de las hembras vírgenes es un abdomen abultado y poco pigmentado en el cual puede notarse la presencia del meconio, una mancha verde oscura en la región ventral abdominal (**Fig. 8A**). El meconio constituye las primeras heces del adulto y es visible durante las primeras 2-3 horas posteriores a la emergencia de la mosca adulta del pupario. Dado que las hembras no son receptivas a los machos sino hasta 8 horas luego de la emergencia del pupario, la presencia del meconio garantiza su virginidad. Para distinguir machos de hembras, puede observarse la pigmentación del abdomen en el extremo posterior dorsal (**Fig. 8B**) y el aparato reproductor en el extremo posterior ventral del abdomen (**Fig. 8C**).

Los viales y botellas utilizados para obtener hembras vírgenes fueron mantenidos a 18°C durante la noche para retrasar la emergencia de las mismas. Este protocolo garantiza la máxima recolección de hembras vírgenes por la mañana. Durante el día, los viales o botellas se mantuvieron a 25°C para realizar nuevas recolecciones de hembras vírgenes por la tarde también.

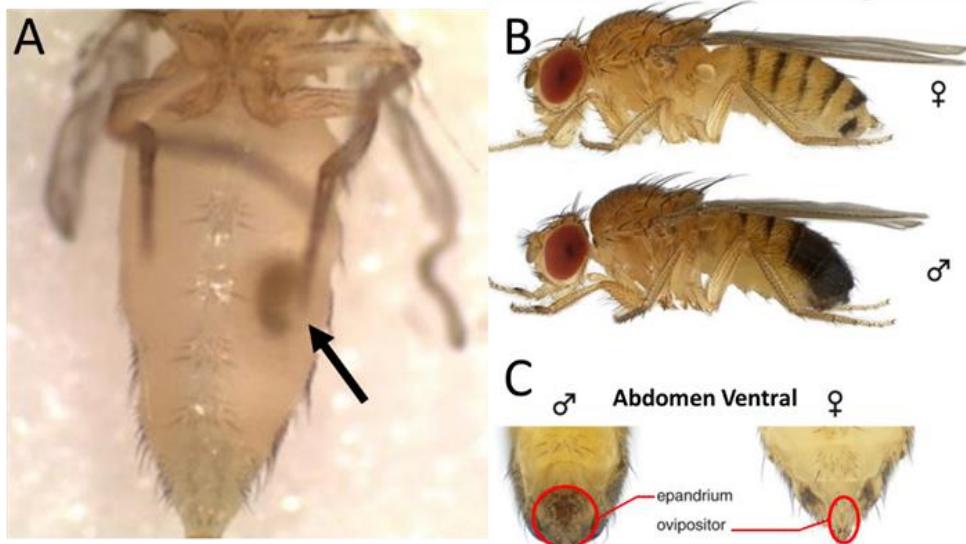


Figura 8- Morfología de machos y hembras *Drosophila*. (A) Vista ventral de una hembra virgen con meconio en el abdomen (flecha negra). (B) Vista lateral de la hembra y el macho de *Drosophila*. Notar que el macho posee una fuerte pigmentación en el abdomen. (C) Vista ventral de la terminalia (aparato reproductor) de machos y hembras. Imágenes modificadas de *Atlas of Drosophila Morphology, 2013* [98].

1. c- Establecimiento y mantenimiento de cruzas experimentales

Las cruzas experimentales de individuos parentales para combinar dos genotipos de interés en la descendencia (por ejemplo, una mosca con un inductor Gal4 y otra mosca con una secuencia UAS) se mantuvieron en viales durante los primeros 3 días para favorecer la interacción entre machos y hembras a fin de asegurar la cópula. Posteriormente las moscas fueron transferidas a botellas con medio de cultivo estándar y unos pocos granos de levadura en su superficie a fin de estimular la ovipuesta. Dado que el desarrollo de la glándula linfática es sensible a la densidad de larvas presentes en el medio de crecimiento, fue necesario evitar la sobrepoblación mediante el control de los niveles de ovipuesta. Para ello, los cruzamientos estuvieron compuestos por 13 hembras vírgenes y 4 machos. Las cruzas con individuos parentales fueron repicadas (pasadas de una botella a otra) una vez por día durante 4 días para contar con más individuos en la descendencia (generación F1) y mantener una ovipuesta constante. Los parentales se mantuvieron a 25°C, mientras que la descendencia fue transferida a 29°C para maximizar la eficiencia del sistema Gal4/UAS (ver más adelante).

1. d- Cromosomas balanceadores y separación de genotipos

Drosophila es un organismo diploide que posee además de los cromosomas sexuales X e Y, tres pares de cromosomas autosómicos. Durante la meiosis, se produce la separación de los cromosomas homólogos, transfiriendo de esta manera una copia de cada gen a su descendencia. Todos los genes codificados en un mismo cromosoma segregan de manera conjunta y se los denomina genes ligados.

En hembras de *Drosophila*, durante la profase de la meiosis I, los cromosomas homólogos se aparean e intercambian su material genético [99] (**Fig. 9**). Este proceso se denomina recombinación homóloga y cumple la función de ampliar la variabilidad de secuencias de ADN presentes en la población de moscas. En machos este proceso no ocurre.

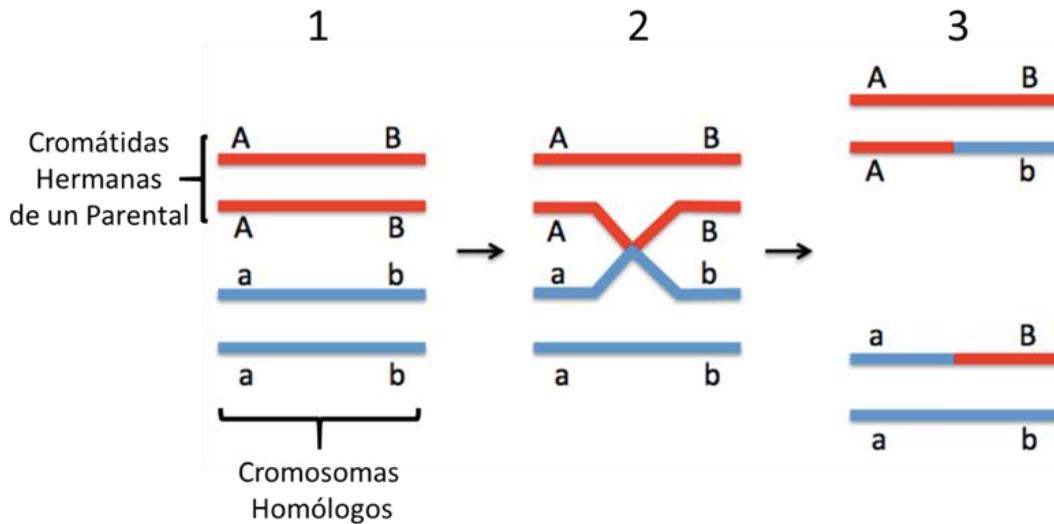


Figura 9- Esquema de recombinación homóloga. (1) A/a son diferentes alelos de un gen y B/b son diferentes alelos de otro gen. Los diferentes colores indican de qué línea parental provienen los cromosomas. (2) Recombinación: intercambio de fragmentos de ADN muy similares o idénticos entre 2 cromosomas homólogos de cada línea parental. (3) Resultado de la recombinación entre cromosomas homólogos: se genera un cromosoma recombinante formado por fragmentos de ADN de ambos parentales.

Sin embargo, la recombinación homóloga en las hembras representa un problema al momento de mantener un grupo de genes ligados en un mismo cromosoma. Una herramienta fundamental para solucionar este problema son los cromosomas balanceadores [3]. Estos cromosomas poseen en su secuencia inversiones múltiples (cambio estructural por el cual un segmento cromosómico cambia de sentido dentro del propio cromosoma) que no comprometen la viabilidad de la mosca pero anulan la posibilidad de que ocurra la recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis. Esto permite que, durante la formación de las gametas en la hembra, dos construcciones transgénicas, o mutaciones que se encuentren ligadas en un mismo cromosoma, segreguen juntas y se encuentren siempre en la misma gameta (**Fig. 10**).

Una característica distintiva de los cromosomas balanceadores es que poseen mutaciones que son letales en homocigosis. Esta característica es utilizada para el mantenimiento de líneas transgénicas o que presentan una mutación de interés que también es letal en homocigosis (**Fig. 10**). De esta manera, se evita la pérdida de la mutación de interés en la población debido a la imposibilidad de que el cromosoma balanceador lo

reemplace. Tanto el cromosoma balanceador como la mutación de interés se mantendrán en transheterocigosis.

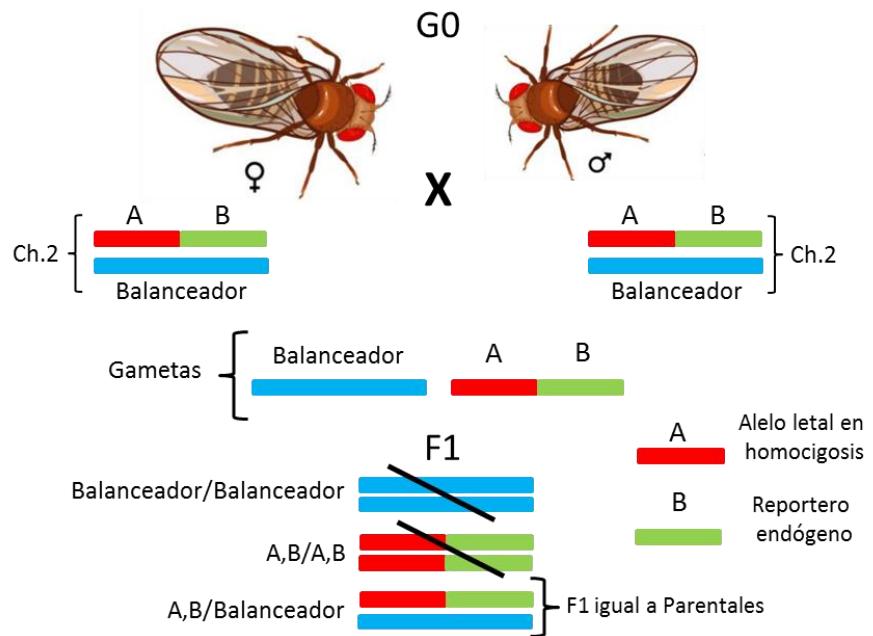


Figura 10- Esquema representativo de la utilización de cromosomas balanceadores. Cruzamiento de dos parentales (G0) de igual genotipo: heterocigotas para una mutación letal en homocigosis (A) y para un reportero endógeno (B), ambos en un mismo cromosoma, y un cromosoma homólogo balanceador. Como consecuencia de este cruzamiento tenemos 2 gametas posibles (el balanceador evita la recombinación homóloga), las cuales en la F1 pueden generar tres combinaciones, donde dos de las mismas son letales. Por un lado el alelo A es letal en homocigosis y por el otro, el balanceador posee mutaciones también letales en homocigosis. Por tal motivo, en la F1 de este cruzamiento solo se observan moscas heterocigotas para la mutación A, el reportero B y el cromosoma balanceador, genotipo idéntico al de las moscas parentales.

Para poder identificar la presencia de cromosomas balanceadores en la descendencia, los mismos portan mutaciones dominantes que producen fenotipos fácilmente distinguibles [100]. Un ejemplo es el clásico marcador de los balanceadores del cromosoma 2, la mutación dominante en el gen *Curly* (CyO) [101]. La misma en heterocigosis provoca que las alas de la mosca se curven hacia su cara dorsal, haciéndolas fácilmente distinguibles (**Fig. 11**). Por tal motivo, las moscas de la descendencia que poseen las alas curvadas son portadoras del cromosoma balanceador.

Además de los marcadores morfológicos, también se utilizan marcadores fluorescentes con patrones característicos a fin de poder reconocer la presencia del cromosoma balanceador en los diferentes estadios del ciclo de vida de *Drosophila* (**Fig. 12**).

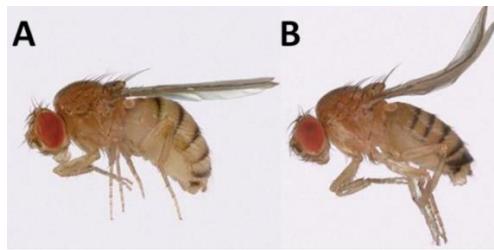


Figura 11- Fenotipo producido por la mutación *CyO* en las alas de la mosca adulta. Mientras que las alas de las moscas silvestres son planas (**A**), la presencia del cromosoma balanceador *CyO* se manifiesta por la notable curvatura de las alas de las moscas (**B**). Imágenes modificadas del *Atlas of Drosophila Morphology*, 2013 [98].

En esta tesis fueron seleccionadas larvas del tercer estadío para estudiar la glándula linfática. La selección de las larvas de interés se basó en la presencia o ausencia de cromosomas balanceadores que expresan proteínas fluorescentes como YFP, visibles bajo lupa de fluorescencia (**Fig. 12A**). Además se seleccionaron larvas por la presencia de construcciones fluorescentes de interés (**Fig. 12B**).

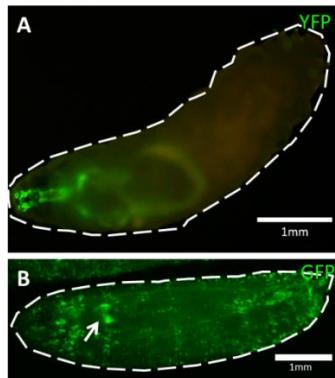


Figura 12- Selección de larvas de interés por marcadores fluorescentes. (**A**) Marca fluorescente característica del balanceador *TM3^{YFP}*, donde se observa la fluorescencia de YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) en los discos imaginales de ojo y ganchos mandibulares [100]. (**B**) Patrón de expresión de *UAS-GFP* bajo el control del inductor *Hml-Gal4*, característico de Plasmacitos presentes en la GL y en circulación [73]. Las líneas discontinuas marcan los contornos de las larvas. La flecha blanca indica la posición de la glándula linfática. Barras de escala: 1 mm.

2- Disección y procesamiento de la glándula linfática

2. a- Disección y fijación

Para la disección de la glándula linfática (**Fig. 13I**), cada larva fue colocada en una gota de PBS 1X sobre una placa de silicona, bajo lupa estereoscópica. Con la región posterior de la larva hacia la derecha del campo visual (**Fig. 13II.1**), se realizó un corte de la zona posterior de la larva utilizando dos pinzas *Dupont #5*. Tras la salida de los órganos internos por la región posterior abierta, se reposicionó a la larva con la región anterior hacia la derecha del campo visual, y utilizando una de las patas de una pinza, se empujaron los ganchos

mandibulares hacia el interior de la larva (**Fig. 13II.2**). Seguidamente, la cutícula de la región anterior que queda expuesta tras este procedimiento se cortó (**Fig. 13II.3**) para obtener una cutícula abierta por sus dos extremos, como si fuera un cilindro sin tapas. Los órganos internos fueron luego empujados para facilitar su salida por la parte posterior (**Fig. 13II.4**), de manera que se obtuvo el conjunto de órganos internos, separados de la pared del cuerpo, la cual se descarta. Tomando los ganchos mandibulares con una de las pinzas, se limpiaron los órganos que no eran de interés para este estudio (tráqueas, glándulas salivales, tracto intestinal) (**Fig. 13I, 13II.5**). De esta manera, nos quedamos solamente con un conjunto de tejidos formado por los ganchos mandibulares, el cerebro de la larva y la glándula linfática unida al vaso dorsal (de aquí en adelante referido como “complejo cabeza”). Esta técnica de disección es necesaria para evitar que la glándula linfática se pierda en los diferentes pasos del protocolo de inmunotinción. Los complejos cabeza, a medida que fueron extraídos, se almacenaron en un tubo Eppendorf de 2 ml con 900 μ l de PBS en hielo. Una vez obtenidos de 12 a 15 complejos por genotipo, se agregaron 100 μ l de formaldehído 37% y se fijó con agitación lateral suave durante 30 minutos a Temperatura Ambiente (TA). Transcurrida la fijación, se reemplazó la solución fijadora por una solución de lavado (PT), y se agitó durante 30 minutos a TA. Dependiendo de la necesidad, en este punto los complejos cabeza fueron directamente tratados para el protocolo de inmunotinción o alternativamente fueron almacenados a 4°C para ser procesados posteriormente.

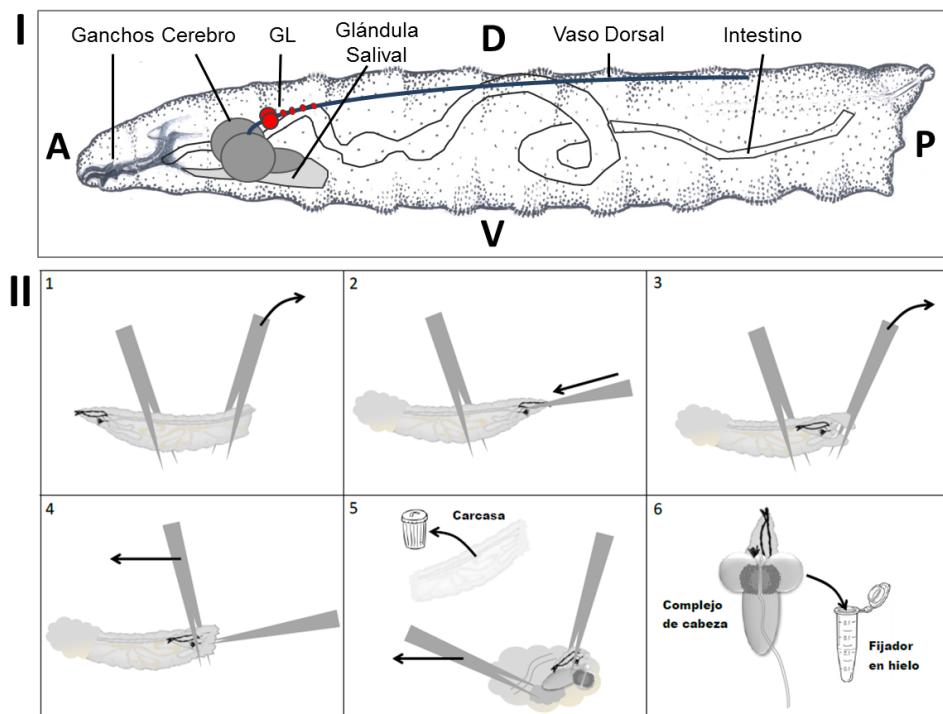


Figura 13- Disección de la glándula linfática de la larva de *Drosophila* (I) Anatomía de la larva del 3^{er} estadio. La glándula linfática está representada en rojo. Las letras A, P, D y V indican la orientación de la larva: A (anterior), P (posterior), D (dorsal), V (ventral). **(II)** Esquema representativo de la disección de glándulas linfáticas de larvas del 3^{er} estadio, momento del desarrollo en el que se

hacen todas las observaciones de esta tesis. Cada paso de la disección se describe en el texto. Esquema modificado, cortesía del Dr. Dalmiro Manuel Blanco Obregón.

2. b- Inmunotinción de la glándula linfática

En los experimentos en los cuales el marcador fluorescente fue expresado endógenamente, luego de la fijación y el posterior lavado, los complejos cabeza se almacenaron en solución de montaje a la espera de ser montados para su análisis en el microscopio. En los experimentos en los que se requirió visualizar proteínas determinadas, se realizó una inmunotinción utilizando anticuerpos contra ellas. En estos casos, los complejos cabeza suspendidos en solución de lavado fueron bloqueados con una solución de suero de cabra 10% en PT (GS-PT) con agitación suave durante una hora a TA. Luego, los tejidos fueron suspendidos en 40 μ l de diluciones apropiadas de anticuerpos primarios en GS-PT e incubados con agitación suave durante toda la noche en cámara fría a 4°C. Al día siguiente, se lavaron los complejos cabeza con PT durante 30 minutos para posteriormente incubarlos en 40 μ l de diluciones 1:250 de anticuerpos secundarios en GS-PT durante 2 horas con agitación suave a TA. En algunos casos, a la solución de anticuerpos secundarios se le agregó DAPI en una dilución 1:400. A continuación, se lavaron los tejidos con PT durante 30 minutos para finalmente agregar medio de montaje y almacenarlos en la heladera hasta el momento del montaje para su observación bajo el microscopio.

A continuación se muestra una lista de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta tesis:

Anticuerpos primarios:

- ❖ α -profenoloxidasa (PPO): reconoce la pro-enzima PPO en el citoplasma de las células cristal maduras. Generado en conejo y utilizado en concentración 1:1000 (donado por el Dr. George Christophides, Imperial College London, Inglaterra ^[102]).
- ❖ α -Lozenge (*lz*): reconoce al factor de transcripción *lz* en células cristal. Generado en ratón, y utilizado en la concentración 1:10. Hybridoma Bank AB_528346.
- ❖ α -Dominio Extracelular de Notch (DECN): reconoce el dominio extracelular del receptor Notch. Generado en ratón y utilizado en concentración 1:10. C458.2H, Developmental Studies Hybridoma Bank.
- ❖ α -P1: reconoce la proteína Nimrod (o antígeno P1) en la membrana de Plasmacitos maduros. Generado en ratón y utilizado en concentración 1:100. (laboratorio del Prof. István Andó, Biological Research Centre, Hungría).
- ❖ α -L1: reconoce al antígeno L1, expresado específicamente por Lamelocitos. Generado en ratón y utilizado en concentración 1:100. (laboratorio del Prof. István Andó, Biological Research Centre, Hungría).

Anticuerpos secundarios:

Todos los anticuerpos secundarios utilizados fueron de la empresa Jackson InmunoResearch (West Grove, Estados Unidos), generados en cabra, y utilizados en una dilución de 1:250.

- ❖ Conjugados al fluoróforo Alexa 488, anti-conejo (Jackson InmunoResearch 111-545-144) y anti-ratón (Jackson InmunoResearch 115-545-205).
- ❖ Conjugados al fluoróforo Cy3, anti-conejo (Target: Conejo, Jackson InmunoResearch 111-165-144) y anti-ratón (Target: Ratón, Jackson InmunoResearch 115-165-166).
- ❖ Conjugados al fluoróforo Cy5, anti-conejo (Alexa Fluor 647 target: Conejo, Jackson InmunoResearch 111-605-144) y anti-ratón (Alexa Fluor 647 target: Raton, Jackson InmunoResearch 115-605-166).

2. c- Montaje de la glándula linfática

Los complejos cabeza almacenados en medio de montaje se transfirieron a un portaobjetos de vidrio utilizando una pipeta Pasteur de vidrio. Los tejidos se distribuyeron formando una gota alargada (**Fig. 14.I.1**) y posteriormente se los separó mediante la utilización de pinzas ya que habitualmente suelen quedar unidos a través de fibras nerviosas. Una vez separados, se pinchó el extremo posterior libre del vaso dorsal con una aguja fina y se lo arrastró hasta la interfaz entre el medio de montaje y el aire, quedando el vaso dorsal adherido al portaobjetos sobresaliendo del medio de montaje (**Fig. 14.I.2**). Se repitió este procedimiento para cada uno de los complejos de cabeza de la muestra, tratando de que queden ubicados de manera equidistante y a una altura similar para facilitar la posterior adquisición de imágenes en el microscopio. Luego, se realizó un corte en la región anterior del vaso dorsal con un movimiento de tipo tijera a fin de separar la glándula linfática del cerebro (**Fig. 14.I.3**). Los vasos dorsales adheridos al vidrio sirven de ancla durante este movimiento de corte, evitando que el tejido se mueva. De esta manera se separó la glándula linfática del resto de los tejidos que no eran de nuestro interés. Luego, empujando la región posterior del vaso dorsal con una pinza, la glándula linfática fue acomodada en la posición final de montaje. Este movimiento no solo organiza la posición final de las glándulas en el preparado, sino que también permite que las glándulas queden adheridas al portaobjetos de vidrio para poder colocar el cubreobjetos de manera segura y así mantener la integridad del tejido (**Fig. 14.I.4**). Para evitar que la colocación del cubreobjetos aplaste las glándulas linfáticas, en cada uno de los vértices del preparado se colocó un cerebro para que actuara como sitio de apoyo del cubreobjetos y garantice una separación entre los dos vidrios (**Fig. 14.II**). Finalmente, los bordes del cubreobjetos se sellaron con esmalte de uñas para evitar su deshidratación.

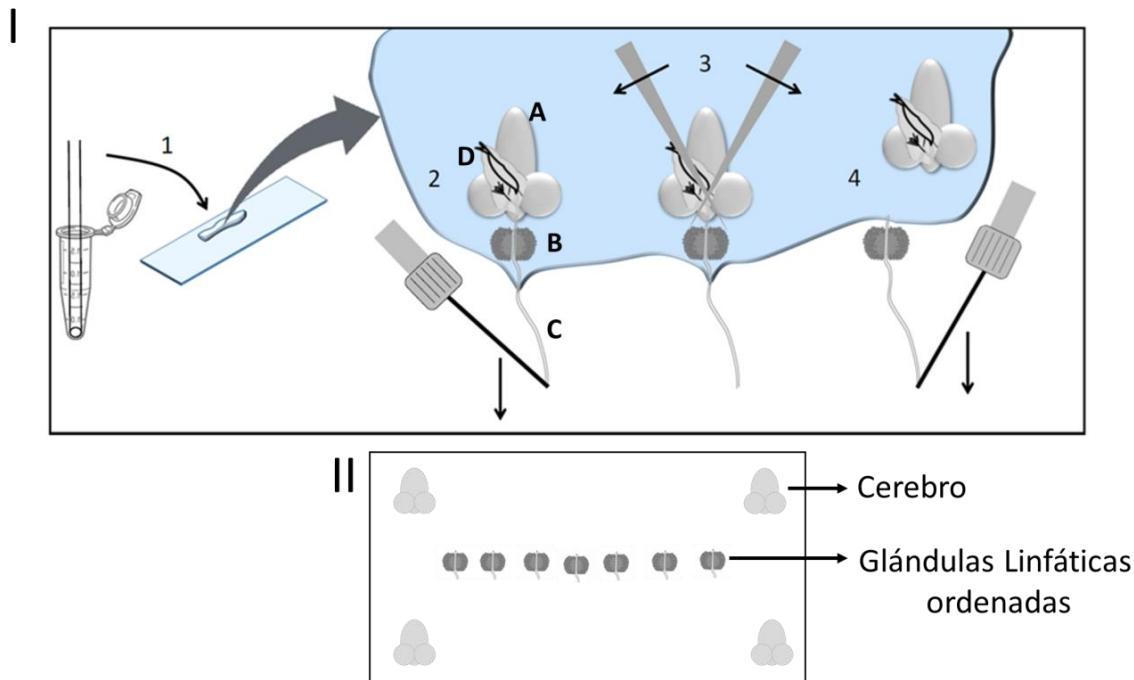


Figura 14- Montaje de la glándula linfática. (I) Esquema de los pasos del montaje. Al igual que en los pasos de la disección, se trabajó bajo lupa binocular con iluminación lateral. Las letras indican cada elemento que conforma el complejo cabeza: Cerebro (A), Glándula linfática (B), Vaso dorsal (C) y Ganchos bucales (D). (II) Representación del montaje finalizado. Las glándulas fueron ordenadas conformando una fila en la región media del portaobjetos y en cada esquina se colocó un cerebro. Imagen cortesía del Dr. Dalmiro Manuel Blanco Obregón.

3- Tinción con Lysotracker

Para la tinción con Lysotracker, se disecó el complejo cabeza de larvas del tercer estadio en PBS contenido 0.1 μ M de Lysotracker Red DND-99 (Invitrogen) [103], e inmediatamente, la glándula linfática fue montada en PBS para la captura de imágenes. Se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss-LSM 880 haciendo uso de un objetivo 40x Zeiss Plan-Apochromat. El procedimiento no duró más de 10 minutos, lo cual es esencial para evitar la descomposición del tejido no fijado.

4- Adquisición y procesamiento de imágenes

4. a- Registro

El registro de las glándulas montadas se realizó utilizando los siguientes microscopios confocales: Carl Zeiss LSM 710 o Carl Zeiss-LSM 880 (objetivos 40x Zeiss Plan-Apochromat, NA 0.8, o 63x Zeiss Plan-Apochromat, NA 1.4). Ubicada la glándula linfática en el centro del campo visual, se realizó el registro de imágenes que cubrieron el espesor total del tejido (Z-stack), utilizando un intervalo de separación de 2,5 μ m. Las

condiciones de adquisición fueron adaptadas según el experimento a fin de conseguir la mejor calidad de imagen, manteniendo constantes los parámetros de adquisición entre muestras control y experimentales. Dependiendo de la necesidad del experimento, el registro también se realizó en un plano único seleccionado de la glándula (preferentemente el plano medio). Para la observación de Notch en compartimentos subcelulares se adquirieron imágenes con un detector de super-resolución Airyscan en secciones ópticas de 100nm de espesor y se reconstruyeron las imágenes utilizando el programa Zen-Zeiss.

4. b- Procesamiento y cuantificación de imágenes

Los planos únicos o Z-stacks de cada glándula se procesaron utilizando el programa Fiji [104]. En el caso de los planos únicos, se hicieron ajustes de brillo y contraste. En el caso de los Z-stack, se realizaron proyecciones de máxima intensidad de todos los planos. En ambos casos, los canales por separado y la imagen que combina a todos ellos (merge) fueron exportadas en formato Tiff para su análisis y posterior análisis. Se realizaron distintos tipos de cuantificaciones dependiendo del experimento: 1) área de una población celular en función del área total de un lóbulo; 2) número de células positivas para un marcador, relativo al área total del lóbulo; 3) intensidad de señal de un canal dentro de un área determinada; 4) número de *foci* positivos de un fluoróforo dentro de un área determinada. Mientras 1 y 2 se realizaron a partir de Z-stacks, 3 y 4 se hicieron utilizando planos únicos.

4. c- Análisis estadístico

La cuantificación de los resultados y el análisis estadístico fueron realizados utilizando los programas Excel y GraphPad. La significancia estadística fue calculada mediante 3 métodos diferentes dependiendo el experimento:

- Prueba T-Student de dos colas, asumiendo muestras no pareadas.
- ANOVA de un factor seguido por test de Dunnett de múltiples comparaciones
- Test de Likelihood Ratio seguido por un test Dunnett's de múltiples comparaciones

5- Herramientas genéticas de *Drosophila*

5. a- Sistema Gal4/UAS

El sistema Gal4-UAS [105, 106] proveniente de levaduras es una herramienta utilizada en *Drosophila* para dirigir la expresión de un gen de interés en un grupo de células determinado. Este sistema se basa en la afinidad del factor de transcripción Gal4 por la secuencia UAS (*Upstream Activating Sequence*). A fin de activar el

sistema Gal4/UAS se realiza el cruzamiento entre una línea que expresa Gal4 bajo un promotor tejido específico de interés (*domeless* en este caso), denominada línea inductora, con otra línea que codifica en este caso un ARN de interferencia ($Atg1^{RNAi}$) río abajo de la secuencia UAS, denominada línea UAS (Fig. 15). En la progenie (F1) de este cruzamiento, aquellos individuos que hayan heredado ambas construcciones transgénicas expresarán $Atg1^{RNAi}$ bajo el control del promotor de interés (Fig. 15).

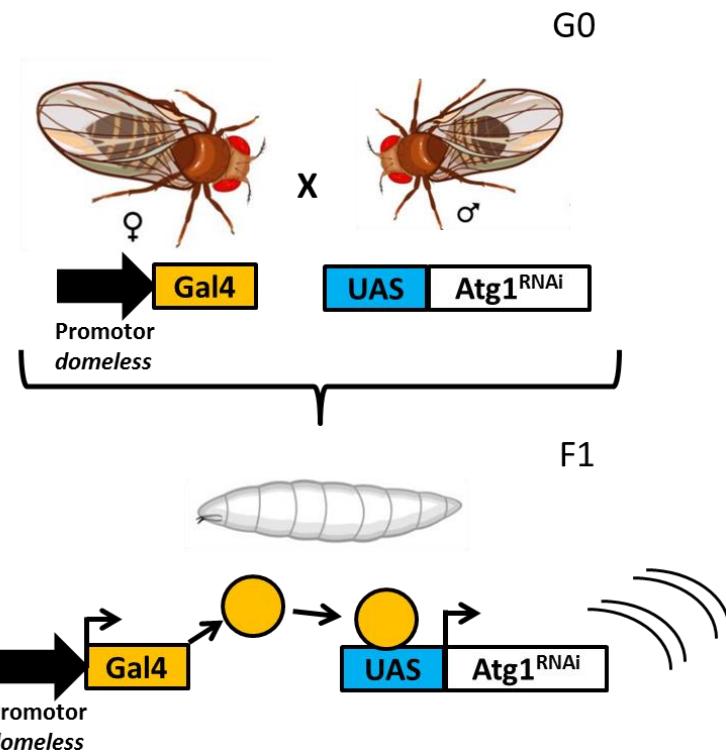


Figura 15- Esquema representativo del sistema Gal4-UAS. El factor de transcripción Gal4 es expresado bajo un promotor tejido específico (*domeless* en este caso). Una vez expresado, Gal4 se une a la secuencia UAS y activa la expresión del gen de interés que se encuentra río abajo de la misma.

5. b- Sistema Gal80

El represor transcripcional Gal80 es una herramienta ampliamente utilizada en *Drosophila* para inhibir la actividad del sistema Gal4/UAS. Cuando Gal80 se expresa, se une al dominio de transactivación del factor de transcripción Gal4, lo cual impide que este último pueda unirse a la secuencia UAS y activar la transcripción de la secuencia que se encuentra río abajo.

Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que la población de células progenitoras de la Zona Medular de la GL está compuesta por dos sub-poblaciones de progenitores: los progenitores núcleo, más cercanos al vaso dorsal, que coexpresan los marcadores *TepIV* y *domeless* [76, 107]; y los progenitores distales, los cuales sólo expresan *domeless* [76, 107] (Tabla I). Debido a la inexistencia de un inductor

específico de progenitores distales, en esta tesis hicimos uso del sistema Gal80 para limitar la expresión del inductor *domeMESO-Gal4* específicamente a esta subpoblación celular. Para hacerlo, coexpresamos al inductor *domeMESO-Gal4* junto al represor transcripcional Gal80, cuya transcripción estuvo controlada por el promotor del gen *TepIV*, específico de progenitores núcleo. De esta manera, *domeMESO-Gal4* se expresó en la totalidad de los progenitores de la GL, pero sólo indujo la transcripción en progenitores distales (**Fig. 16A**) debido a que en progenitores núcleo, la expresión de Gal80 inhibió su actividad (**Fig. 16B**).

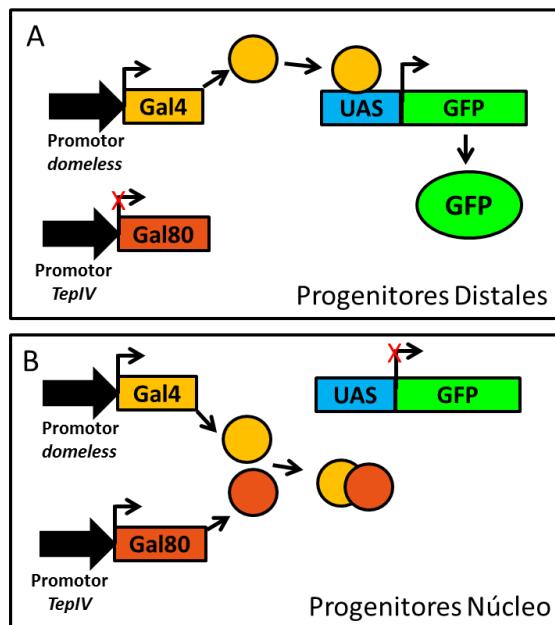


Figura 16- Interacción entre el sistema Gal4-UAS y Gal80. El factor de transcripción Gal4 es expresado bajo el promotor del gen *domeless*, mientras que la expresión del represor transcripcional Gal80 es regulada por el promotor del gen *TepIV*. En las células donde se exprese tanto *domeless* como *TepIV*, el sistema Gal4/UAS estará reprimido. En cambio, en el tipo celular donde sólo se expresa *domeless*, el sistema Gal4/UAS podrá activarse.

5. c- ARN de interferencia

En *Caenorhabditis elegans* se observó que una inyección de ARN de doble cadena es suficiente para silenciar la expresión de un gen de interés ^[108]. Desde entonces los ARN de doble cadena o ARNs de interferencia (ARNi) comenzaron a utilizarse para controlar la expresión génica. La ribointerferencia es un sistema que utilizan las células de los organismos vivos para silenciar post-transcripcionalmente la expresión de genes específicos. Esta inhibición está mediada por la expresión de moléculas de ARN de doble cadena que, siendo complementarias a un ARN mensajero, conducen habitualmente a la degradación de éste último. Este mecanismo se conoce como silenciamiento génico o *knockdown*.

En *Drosophila* existen colecciones de moscas transgénicas que expresan ARNs de interferencia río abajo de la secuencia UAS. Estas colecciones cubren casi el 100% de los genes de *Drosophila* y permiten evaluar la

función de los mismos en los diferentes tipos celulares dependiendo de la línea inductora del Gal4 que se utilice.

5. d- Proteína de fusión 3xmCherry-Atg8

Se utilizó la línea de moscas transgénicas que expresa la proteína ATG8 fusionada en el N terminal a 3 copias en tandem del fluoróforo mCherry (3xmCherry-Atg8) dirigida por su propio promotor endógeno ^[109] con el objetivo de evaluar la activación de la autofagia en la glándula linfática. Como ATG8 se incorpora a la membrana del autofagosoma en formación, y se mantiene unido a esta organela una vez que la misma madura y se fusiona con el lisosoma ^[110], el constructo 3xmCherry-Atg8 permite visualizar la presencia de autofagosomas y autolisosomas. Por lo tanto, el análisis de la distribución subcelular de 3xmCherry-Atg8 permite inferir si la autofagia se encuentra activa o inactiva en las células. Cuando está activa, la proteína 3xmCherry-Atg8 se observa en un patrón punteado en el citoplasma (**Fig. 17A**). Si la autofagia se encuentra inactiva, 3xmCherry-Atg8 se distribuye de manera ubicua en el citoplasma debido a que se halla en su forma soluble (**Fig. 17B**) ^[111].

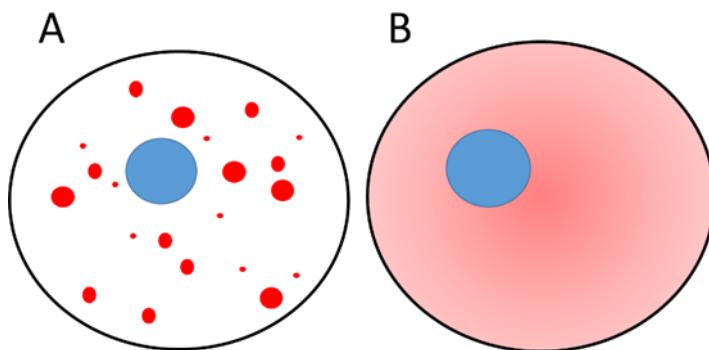


Figura 17- Distribución de 3xmCherry-Atg8 en la célula. (A) Autofagia activa. Al formarse los autofagosomas 3xmCherry-Atg8 es incorporado en sus membranas, observándose un patrón punteado en el citoplasma. (B) Cuando no se activa la autofagia, 3xmCherry-Atg8 no se nuclea, por lo que se distribuye de manera ubicua en el citoplasma.

5. e- Ref(2)P-GFP

Otra proteína de fusión utilizada en esta tesis para evaluar los niveles de flujo autofágico en las células de la glándula linfática fue *Ref(2)P-GFP* [18]. *Ref(2)P* es el homólogo en *Drosophila* de la proteína de mamíferos p62 [29], la cual, al igual que *Ref(2)P*, posee un dominio UBA que le permite unir proteínas poli-ubiquitinadas y un dominio denominado LIR de interacción con Atg8/LC3. Gracias a ello, p62/Ref(2)P funcionan como proteínas adaptadoras que reclutan cargos a ser degradados (en este caso proteínas poliubiquitinadas) al autofagosoma en formación gracias a su capacidad de unión a Atg8. De esta manera, cuanto mayor sea el flujo autofágico, mayor será la tasa de degradación del cargo y consecuentemente de *Ref(2)P-GFP*,

disminuyendo la intensidad de GFP visible. En cambio, a bajas tasas de actividad autofágica, se observa un incremento en la intensidad de GFP debido a la acumulación de Ref(2)P en el citosol.

6- Equipos, reactivos y materiales utilizados

Para realizar este trabajo de tesis se utilizaron los siguientes equipos, reactivos y materiales:

Equipos:

- Lupa Binoculars Olympus MVX10, Olympus SZ40 y Olympus SZ51
- Microscopio confocal Carl Zeiss-LSM 880 (objetivos 40x Zeiss Plan-Apochromat, NA 0.8, o 63x Zeiss Plan-Apochromat, NA 1.4).
- Microscopio confocal LSM 710 NLO con excitación multi-fotónica.
- Incubadora Forma Series II, Water Jacketed CO2 incubator, Thermo electron corporation.
- Agitador orbital, Thermomixer eppendorf, Marshall Scientific
- Agitador Maxi Rocker

Materiales:

- Viales de vidrio o plástico de 2,5cm de diámetro y 10cm de alto
- Botellas plásticas de 250 cm3
- Elementos para la manipulación de moscas:
 - Plataforma porosa para anestesia con CO2
 - Pinceles
 - FlyPads
- Tubos eppendorf de 2ml
- Pinzas para disección #5 Dumostar – Dumont Biology
- Pipetas marca GILSON:
 - Pipetman Classic P2
 - Pipetman Classic P20
 - Pipetman Classic P100
 - Pipetman Classic P1000
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Portaobjetos Henso Medical Co. Ltd 25,4 x 76,2 mm; 1,0 - 1,2 mm de espesor.
- Cubreobjetos Paramount 18 x 18 mm; 0.13-0.17 mm de espesor.
- Esmalte de uñas transparente.
- Placa de disección de silicona.

Reactivos:

- Dióxido de carbono gaseoso
- Levadura instantánea natural marca LEVEX
- Harina de maíz (Presto pronta).
- Nipagin (Cicarelli)
- Acido Propiónico (VanRossum)
- Suero de Cabra Sigma-Aldrich, G9023
- DAPI FluoroPure™ (Invitrogen)
- LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen)
- Formaldehido 37% Anedra (Research AG)

Soluciones:

- Alimento de moscas: harina de maíz 8,25%, levadura 2%, sacarosa 3%, agar-agar 1,5%, suplementado con el anti-fúngico Nipagin (1.19 g/l) y ácido propiónico (4,36 g/l).
- PBS: 8g/L NaCl, 0,2g/L KCl, 1,44g/L Na₂HPO₄, 0,247g/L KH₂PO₄
- Solución de Fijación: PBS + 9.25% Formaldehido 37% (Anedra)
- Solución de Lavado (PT): PBS + 0,4% Triton X-100
- Solución de montaje (Gelvatol): 0,1g/ml MOWIOL (4-88 Reagent Calbiochem 9CAS 9002-89-5), 0,25g/ml glicerol, 0,5ml TRIS 0,2M

7- Líneas de moscas transgénicas utilizadas en esta tesis

Obtenidas del Bloomington *Drosophila* Stock Center (<https://bdsc.indiana.edu>):

- *w¹¹¹⁸* (BL 3605)
- Canton-S (BL 9515)
- *UAS-GFP* (BL 1521)
- *YFP-Rab7* (BL 62545)
- *YFP-Rab5* (BL 52543)
- *Notch^{55e11}* (BL 28813)
- *Su(H)¹* (BL 417)
- *Atg1^{RNAi}* (BL 26731)
- *Atg17^{RNAi}* (BL 36918)
- *Atg18^{RNAi}* (BL 34714)
- *Vps15^{RNAi}* (BL 34092)

- *Vps34^{RNAi}* (BL 33384)
- *Notch^{RNAi}* (BL 33611)
- *Su(dx)^{RNAi}* (BL 67012)
- *E(spl)mβ-HLH-GFP* (BL 65294)
- *shibire^{RNAi}* (BL 28513)
- *Hrs^{RNAi}* (BL 33900)
- *UAS-Rab5^{DN}* (BL 9772)
- *Tsg101^{RNAi}* (BL 38306)
- *Vps25^{RNAi}* (BL 54831)
- *Fab1^{RNAi}* (BL 35793)
- *Vamp7^{RNAi}* (BL 38300)
- *Syx17^{RNAi}* (BL 29546)
- *Hml-Gal4* (BL 30139)
- *UAS-mCherry-NLS* (BL 38424)
- UAS-Notch full (BL 26820)
- *UAS-BFP* (BL 55094)

Obtenidas de Vienna *Drosophila* Resource Center (<https://stockcenter.vdrc.at>):

- *shrub^{RNAi}* (v108557)
- *Vps4^{RNAi}* (v105917)

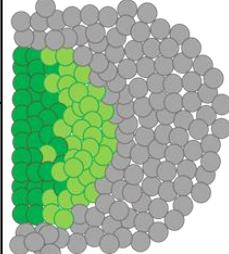
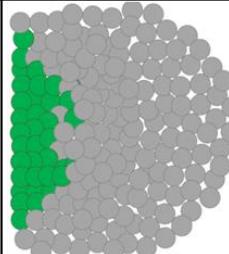
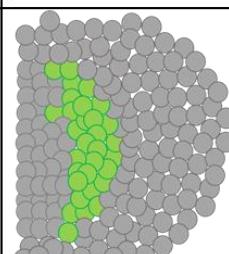
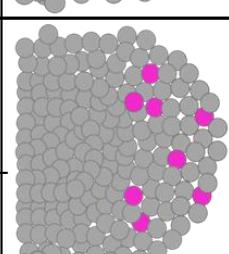
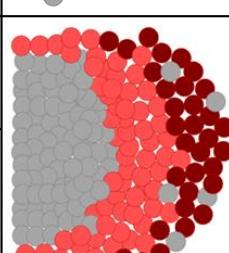
Obtenidas de Kyoto *Drosophila Stock Center*:

- *TepIV-Gal4* (KY 105-442)

Provistas amablemente por colegas:

- *domeMESO-Gal4* (Utpal Banerjee, UCLA, USA)
- *Lozenge-Gal4* (Utpal Banerjee, UCLA, USA)
- *Hml-dsred* (Utpal Banerjee, UCLA, USA)
- *domeMESO-GFP* (Utpal Banerjee, UCLA, USA)
- *3xmCherry-Atg8a* (Gábor Juhász, Eötvös Loránd University, Budapest)
- *Atg1^{Δ3D}* (Gábor Juhász, Eötvös Loránd University, Budapest)
- *UAS-LacZ* (Ben Shilo, Weizmann Institute of Science, Rehovot)
- *UAS-GFP-Ref2P* (Thomas Neufeld, University of Minnesota, USA)
- *UAS-GFP-Lamp* (Helmut Kramer, UT Southwestern Medical Center, USA)
- *UAS-deltex* (Spyros Artavanis-Tsakonas, Blavatnik Institute, Harvard, USA)
- *TepIV-Gal80* (Lauren Goins, Stanford University, USA)
- *BcF6- GFP* (Tsuyoshi Tokusumi, University of Notre Dame, USA)

Tabla I- Patrón de expresión de líneas transgénicas de *Drosophila* utilizadas en esta tesis.

Progenitores Totales (Zona Medular)	domeMESO-Gal4, UAS-GFP (Lab. Banerjee, UCLA, USA)	Línea inductora	
	domeMESO-GFP (Lab. Banerjee, UCLA, USA)	Línea reportera: porción del promotor del gen domeless clonado río arriba de GFP	
Progenitores Núcleo (Zona Medular)	tepIV-Gal4 (KY, Stock #105-442)	Línea inductora	
Progenitores Distales (Zona Medular)	domeMESO-Gal4, UAS-GFP; TepIV-Gal80 (Lab. Banerjee, UCLA, USA) (Lab. Goins, Stanford University School of Medicine)	Línea inductora	
Células Cristal (Zona Cortical)	Lz-Gal4 (Lab. Banerjee, UCLA, USA)	Línea inductora	
	BcF6-GFP (Tsuyoshi Tokusumi)	Línea reportera: parte del promotor <i>black cells</i> clonado río arriba de GFP	
Plasmatocitos (Zona Cortical)	hml-Gal4, UAS-GFP (BL, Stock #30139)	Línea inductora	
	hml-dsRed (Lab. Banerjee, UCLA, USA)	Línea reportera: porción del promotor del gen hemolectina clonado río arriba de dsred	

Resultados

1- Caracterización de la autofagia en la glándula linfática

1. a- En condiciones basales, la glándula linfática presenta actividad autofágica elevada en comparación con otros tejidos de la larva.

El grupo liderado por el Dr. Eric Baehrecke observó en el año 2013 que larvas mutantes para el gen ATG6 (homólogo de Beclina1) presentan acumulaciones de masas melanóticas (tumores de origen hematopoyético en *Drosophila*) [112], un fuerte incremento en el número de hemocitos libres en circulación e hipertrofia de la GL, sugiriendo que la autofagia podría participar en el proceso de diferenciación hematopoyética. Dado que ATG6 participa no sólo en la vía autofágica, sino también en la apoptosis [113] y otras funciones celulares [114], en esta tesis realizamos estudios para determinar el rol que la autofagia podría cumplir en la hematopoyesis de *Drosophila*. En primer lugar analizamos el grado de actividad autofágica de la GL en comparación con otros tejidos de la larva. Con este fin, utilizamos dos criterios: 1) nucleación del reportero 3XmCherry-Atg8a [115]. Al estimularse la autofagia, Atg8 se incorpora a las membranas de los autofagosomas, observándose foci positivos para mCherry en el citosol (**Fig. 17**), de modo que utilizamos a la nucleación del reportero de formación de autofagosomas 3XmCherry-Atg8a [115] para monitorear el proceso. 2) Incorporación del colorante acidotrópico Lysotracker [103], lo cual nos permite identificar tanto lisosomas como autolisosomas. En condiciones de alta actividad autofágica se produce un aumento en la cantidad de autolisosomas, y por lo tanto, una mayor cantidad de estructuras que incorporan Lysotracker. Utilizando ambos criterios, observamos que los niveles basales de autofagia en las GL de larvas alimentadas del tercer estadio son particularmente altos en comparación con otros tejidos, presentando la GL una mayor nucleación del reportero 3XmCherry-Atg8a, y una mayor cantidad de estructuras ácidas positivas para Lysotracker (**Fig. 18**).

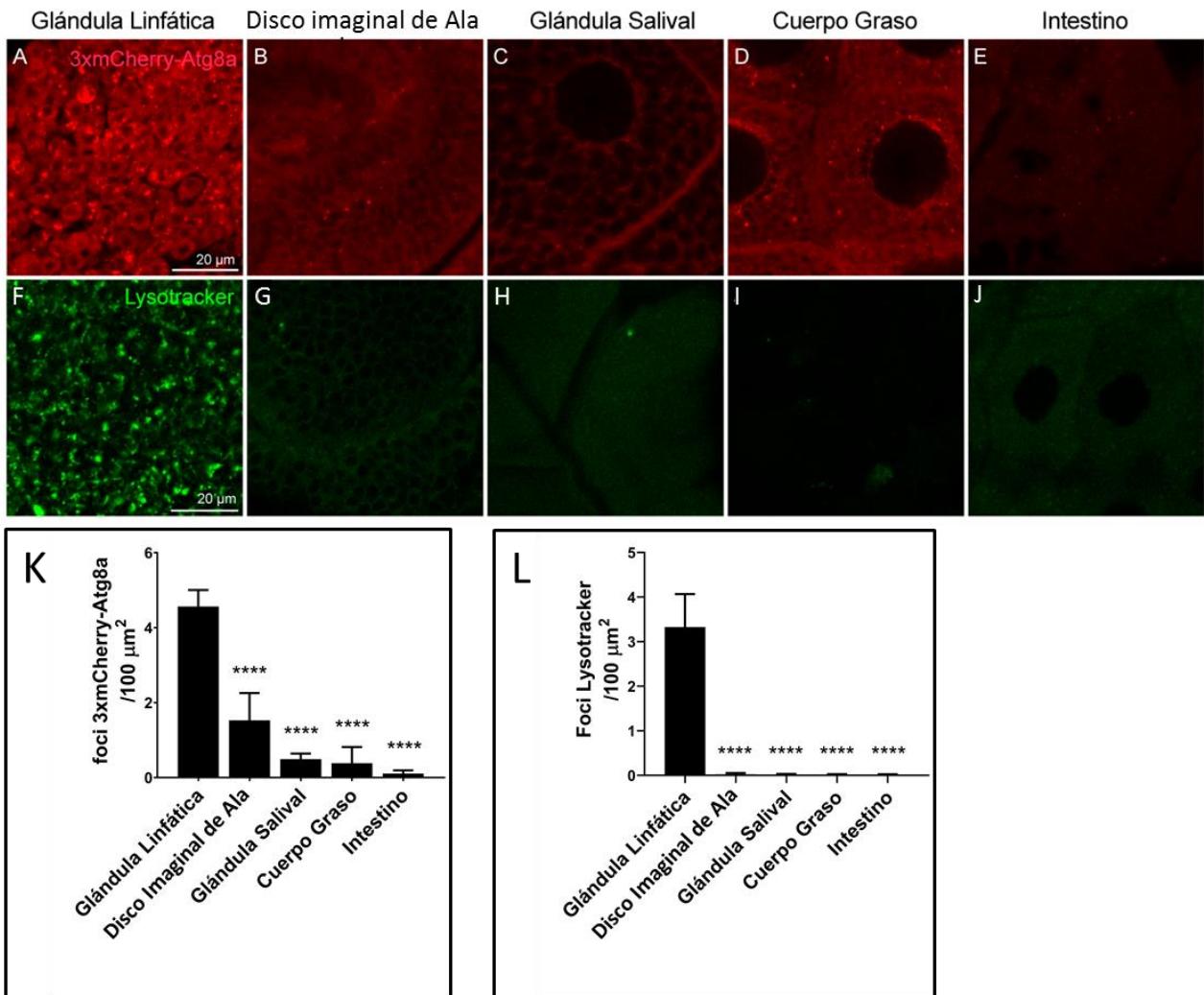


Figura 18- Niveles de autofagia basal en diversos órganos larvales de *Drosophila*. La actividad autófágica en cada órgano larval indicado se analizó en base a la nucleación del reportero de autófagia 3xmCherry-Atg8a (A-E), y en base a la cantidad de *foci* positivos para el colorante acidotrópico Lysotracker (F-J) en larvas alimentadas del tercer estadio temprano. (K) Cuantificación del número de *foci* de 3xmCherry-Atg8a cada $100 \mu\text{m}^2$. (L) Cuantificación del número de *foci* de Lysotracker cada $100 \mu\text{m}^2$. Análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por test de Dunnett de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. Para 3xmCherry-Atg8a, $n \geq 8$; para Lysotracker, $n \geq 5$. Barras de escala: $20 \mu\text{m}$. **** = $p < 0,0001$.

1. b- La autófagia en la glándula linfática responde a cambios en la abundancia nutricional

Como ya ha sido reportado en otros órganos [103], corroboramos que en la GL la autófagia se activa tras someter a las larvas a 6h de ayuno (Fig. 19). Esto se debe en parte a la inhibición que ejerce mTORC1 sobre la autófagia [32, 103, 116]. En condiciones de abundancia nutricional, mTORC1 se encuentra activo, inhibiendo la autófagia. En cambio, en condiciones de ayuno esta inhibición no ocurre, permitiendo que la autófagia tenga lugar. La inducción de la autófagia frente al hambre se observó mediante el incremento de la nucleación del reportero 3XmCherry-Atg8a y por tinción con Lysotracker, pero también utilizando el reportero de flujo autófágico *Ref2P-GFP* [18]. *Ref2P* es un receptor autófágico clásico que interactúa con

Atg8 y al mismo tiempo une el cargo que va a ser degradado [29]. De esta manera, Ref2P recluta el cargo al autofagosoma en formación, y junto con éste, es degradado tras la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Cuanto mayor sea el flujo autofágico, menores son los niveles de Ref2P que se observan en el citoplasma. Es por eso que el ayuno de las larvas, reduce la cantidad de Ref2P en las células de la GL (**Fig. 19**).

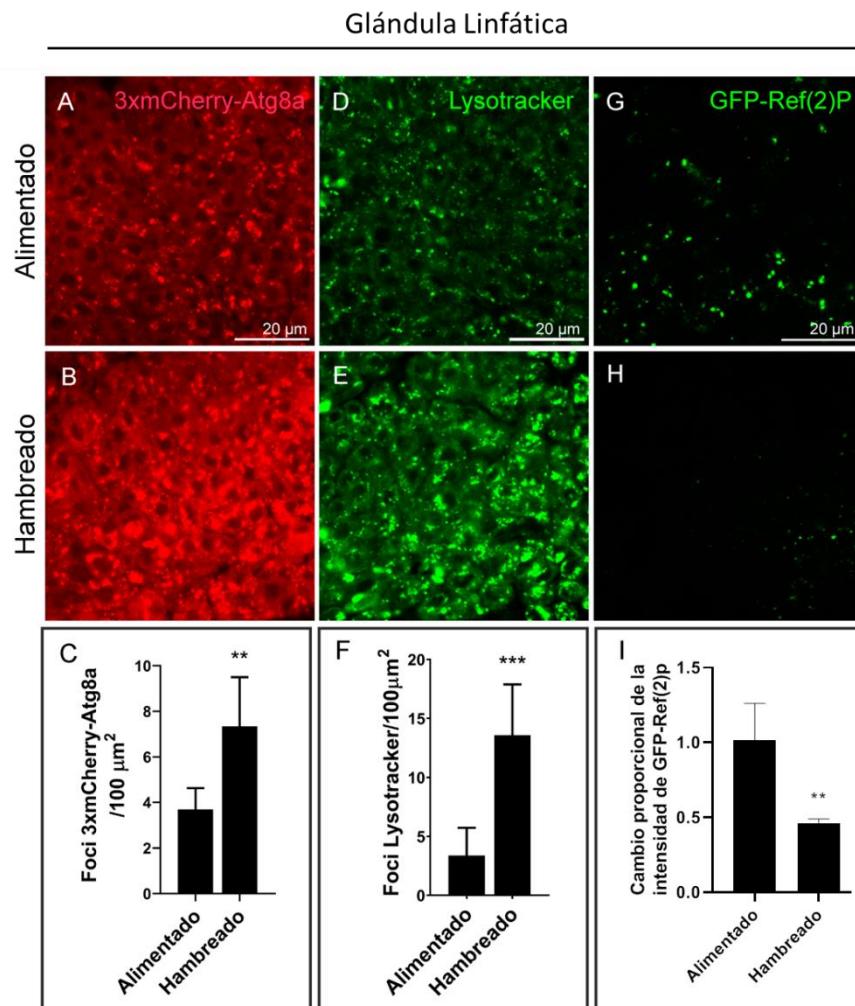


Figura 19- La autofagia se induce en la glándula linfática tras someter a las larvas a 6 horas de ayuno. La actividad autofágica en la GL se analizó en base a la nucleación del reportero 3xmCherry-Atg8a (**A, B**), a la fluorescencia de Lysotracker (**D, E**), y a la acumulación del reportero del flujo autofágico GFP-Ref(2)P (**G, H**). (**C**) Cuantificación del número de *foci* de 3xmCherry-Atg8a cada 100 μm^2 , $n \geq 4$ lóbulos primarios; (**F**) del número de foci de Lysotracker cada 100 μm^2 , $n \geq 8$; (**I**) de la intensidad de fluorescencia de GFP-Ref(2)P cada 100 μm^2 , $n \geq 4$. Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Barras de escala: 20 μm .

1. c- Diferencias en los niveles de autofagia dentro de la glándula linfática

Habiendo confirmado que la GL presenta alta actividad autofágica en comparación con otros órganos larvales, decidimos analizar si la misma varía entre regiones dentro de la glándula linfática. Para distinguir a la Zona Medular (ZM) de la Zona Cortical (ZM), utilizamos larvas *domeMESO-Gal4/UAS-GFP* en las que la ZM queda marcada fluorescentemente. Nuevamente, utilizamos el reportero *3xmCherry-Atg8a* y observamos que la ZM presentan niveles de autofagia notablemente mayores que la ZC (**Fig. 20**), sugiriendo que la autofagia basal juega un papel importante en los progenitores hematopoyéticos que se encuentran presentes en la zona medular.

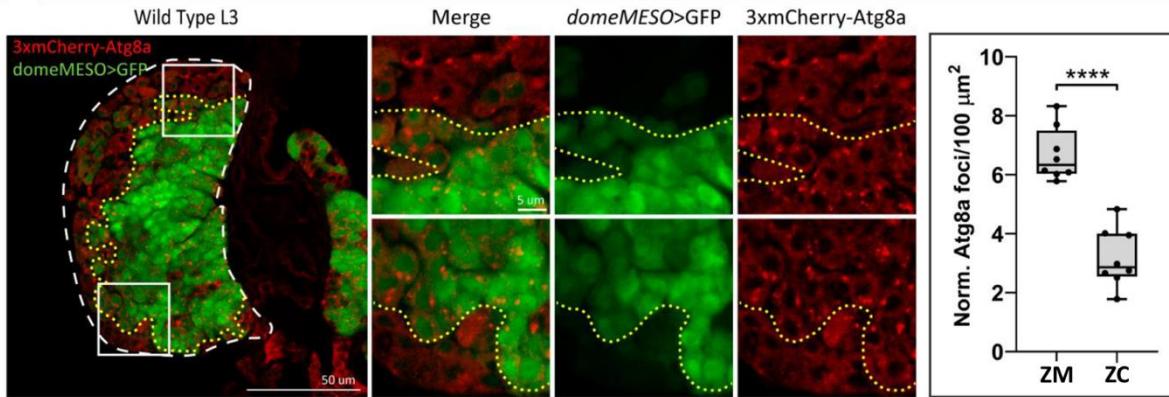


Figura 20: En la glándula linfática los niveles de autofagia son mayores en la zona medular que en la zona cortical. El reportero autofágico *3xmCherry-Atg8a* fue utilizado para analizar la activación de la autofagia en la GL, en larvas en que la ZM está marcada por la expresión de GFP. La abundancia de *foci* positivos para mCherry fue mucho mayor en la ZM que en la ZC. Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%, ****p<0.0001. Las líneas punteadas amarillas marcan el límite entre la ZM y la ZC. Barras de escala: 50 μ m.

1. d- La autofagia en la glándula linfática depende de los reguladores clásicos de la vía

Continuando con la caracterización de la autofagia en la GL, analizamos si los reguladores clásicos de la vía autofágica son requeridos para la autofagia basal observada en este órgano hematopoyético, específicamente en la ZM. Para ello, inhibimos por expresión de ARNs de interferencia en células progenitoras la expresión de los genes del complejo de iniciación *Atg1* [117] o *Atg17* [21] [18, 19], los genes *Vps34* [23] o *Vps15* [24] del complejo de nucleación [118], o de *Atg18*, fundamental para la elongación del fagóforo [28, 70, 73]. En todos los casos, observamos una reducción de la nucleación del reportero *3xmCherry Atg8a*, y acumulación del reportero de flujo autofágico *Ref2P-GFP* (**Fig. 21**), indicando, tal como se esperaba, que los genes canónicos de la vía autofágica operan en la glándula linfática.

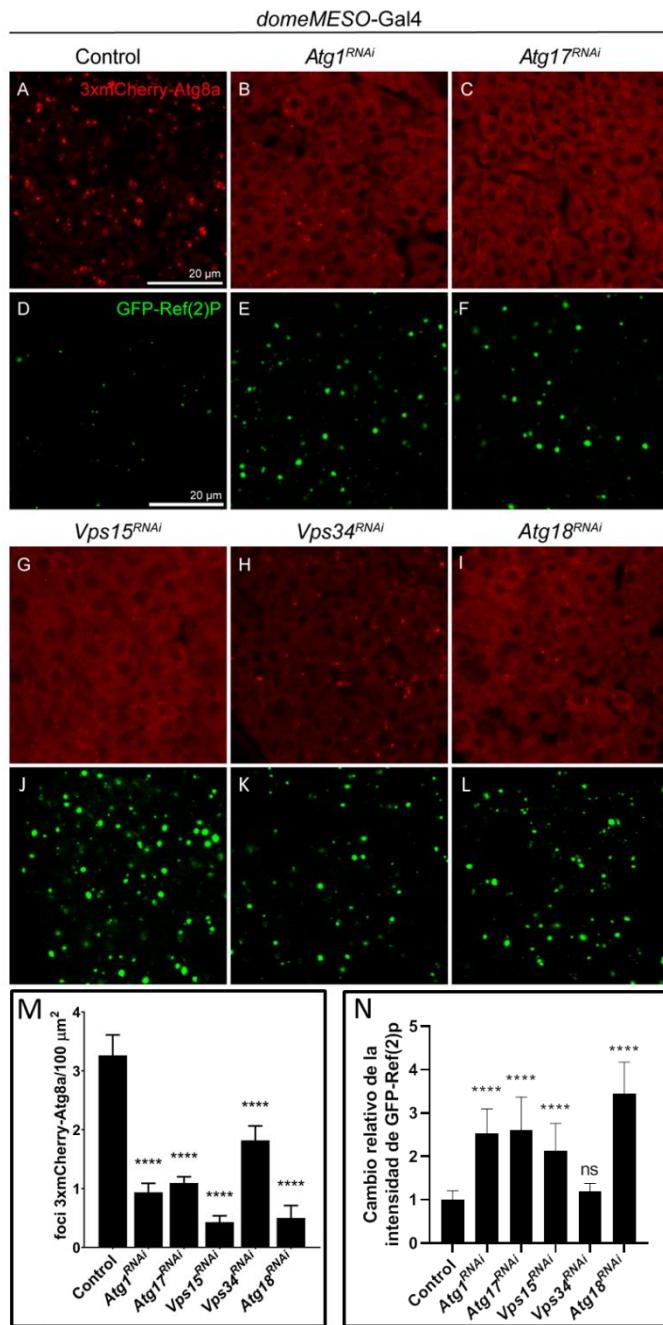


Figura 21- La activación de la autofagia en la glándula linfática depende de los genes canónicos de la vía autofágica. Se utilizaron los reporteros 3xmCherry-Atg8a (A-C; G-I) y GFP-Ref(2)P (D-F; J-L) para analizar los niveles de activación de la autofagia en larvas que expresan los ARNs de interferencia indicados, bajo el control del inductor *domeMESO-Gal4*, el cual se expresa en células progenitoras de la GL. La autofagia se inhibe luego de silenciar cada uno de los genes canónicos que participan en esta vía. (M) Cuantificación de la nucleación del reportero 3xmCherry-ATG8a y de la (N) intensidad de fluorescencia de GFP-Ref(2)P. (M) Control, n = 29 lóbulos primarios; *Atg1^{RNAi}*, n = 19; *Atg17^{RNAi}*, n = 22; *Vps15^{RNAi}*, n = 20, *Vps34^{RNAi}*, n = 17; *Atg18^{RNAi}*, n = 10. Análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por test de Dunnett de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. (N) Control, n = 33; *Atg1^{RNAi}*, n = 9; *Atg17^{RNAi}*, n = 7; *Vps15^{RNAi}*, n = 22, *Vps34^{RNAi}*, n = 12; *Atg18^{RNAi}*, n = 31. Análisis estadístico por test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn's de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. ***p<0.001, ****p<0.0001, ns, no significativo (p>0.05). Barras de escala: 20 μm .

Los resultados presentados hasta aquí sugieren que en la GL la autofagia se encuentra basalmente activada, en especial en la ZM, y que dicho proceso depende de los genes clásicos que regulan a la autofagia en otros sistemas biológicos. Corroboramos asimismo que nuestras herramientas genéticas funcionan eficientemente para inhibir la autofagia en los progenitores hematopoyéticos de la glándula linfática.

2- La autofagia regula la hematopoyesis de *Drosophila*

Habiendo caracterizado a la autofagia de la GL, continuamos con el análisis del posible rol que la misma podría cumplir en la diferenciación de las células de la sangre. Para ello, realizamos experimentos de pérdida de función de genes esenciales de la vía autofágica, observando marcadores específicos de las distintas poblaciones de hemocitos presentes en la GL. En larvas homocigotas mutantes *Atg1*⁴³ [117], la autofagia se encuentra inhibida y la cantidad de Células Cristal (CC) [73, 76, 79, 81] se vio claramente incrementada, mientras que la proporción de plasmatocitos y de células progenitoras no se vio afectada. (**Fig. 22**).

Dado el particular incremento de CC en el mutante *Atg1*⁴³, y al no ver cambios en las otras poblaciones celulares (**Fig. 22**), nos preguntamos si la autofagia es requerida de manera autónoma en las células progenitoras de la GL para la correcta diferenciación a CC. A tal fin, expresamos ARNs de interferencia contra varios genes de la autofagia, utilizando el inductor de progenitores *domeMESO-Gal4*. El silenciamiento de componentes del complejo de iniciación, al igual que el silenciamiento de componentes de los complejos de nucleación o de elongación provocó un incremento de la cantidad de CC (**Fig. 23**), sugiriendo que la autofagia opera en progenitores hematopoyéticos regulando la diferenciación de CC. El incremento de CC se observó tanto con anticuerpos contra Lozenge [81], como contra PPO [73, 76, 79], al igual que utilizando el reportero específico de células cristal BC-GFP [119] (**Fig. 24**).

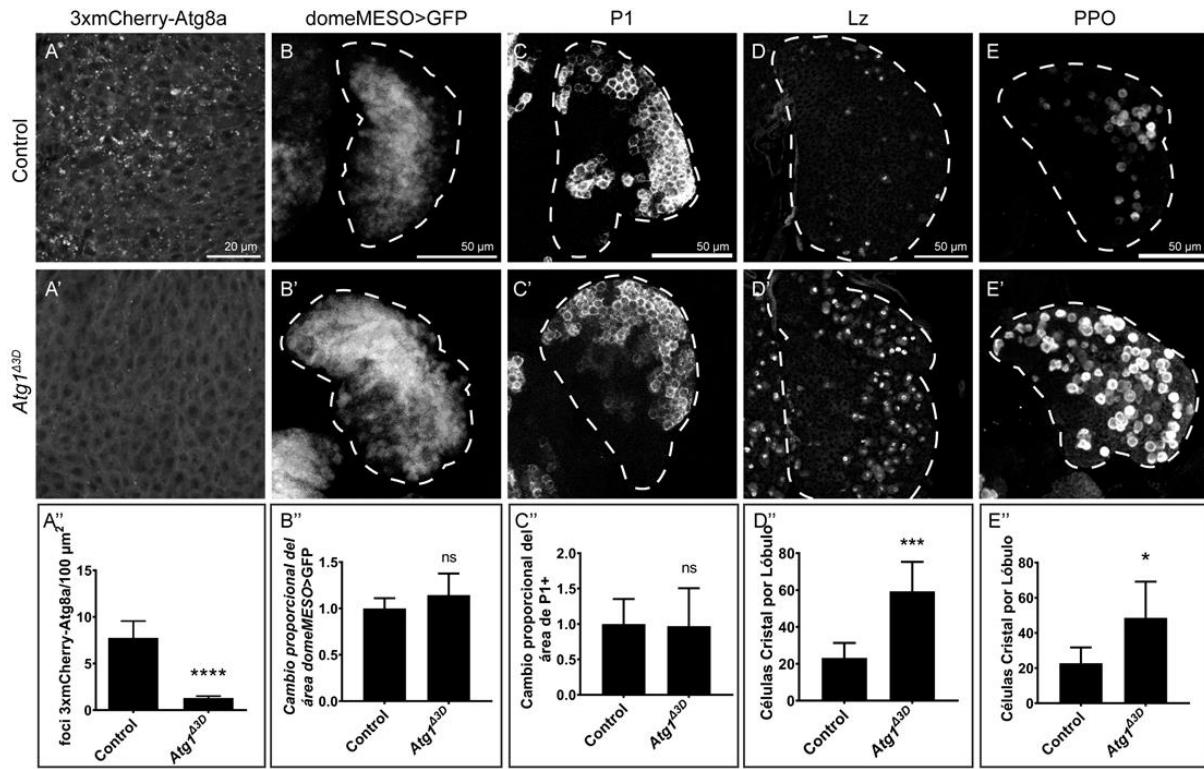


Figura 22- Larvas mutantes para *Atg1* presentan una cantidad incrementada de células cristal. Imágenes de microscopía confocal de lóbulos primarios. En larvas mutantes homocigotas *Atg1*^{Δ3D}, los niveles de autofagia se encuentran reducidos, lo cual se observa por la disminución de la nucleación del reporter 3xmCherry-Atg8a (A, A', A''; n ≥ 8). Las poblaciones de progenitores (*domeMESO>GFP*; B, B', B''; n ≥ 13) y de Plasmátocitos (P1; C, C', C''; n ≥ 24) no se vieron alteradas en larvas mutantes *Atg1*^{Δ3D}. En cambio, se observa un aumento de células cristal, detectadas con el anticuerpo anti-Lozenge (Lz; D, D', D''; n ≥ 7) o con el anticuerpo anti-Profenoloxidasa (PPO; E, E', E''; n ≥ 10). Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%. *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns, no significativo, p>0.05. Barras de escala: 20 μm y 50 μm. Las líneas discontinuas marcan los contornos de un lóbulo primario.

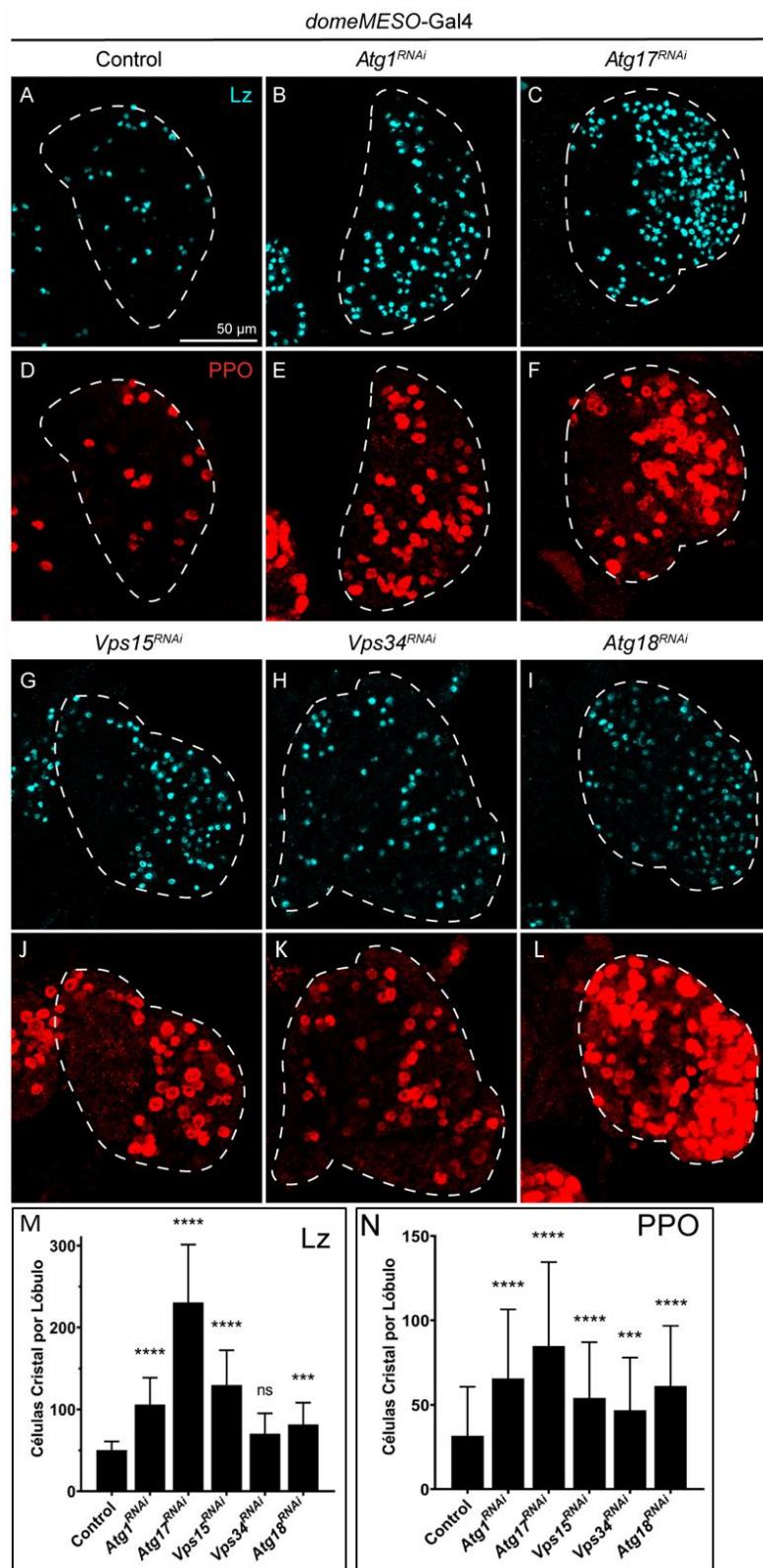


Figura 23- La inhibición de genes de la vía autofágica en células progenitoras incrementa la diferenciación de células cristal. Las células cristal fueron visualizadas por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos anti-Lozenge (Lz; A-C; G-I) o anti-Profenoloxidasa (PPO; D-F; J-L) en lóbulos primarios, donde la autofagia fue inhibida específicamente en células progenitoras expresando cada uno de los ARNs de interferencia indicados bajo el control del inductor *domeMESO-Gal4*. La cantidad de células cristal se incrementa en comparación con el Control (A, D). Los paneles M (anti-Lz) y N (anti-PPO) muestran la cuantificación del número de células cristal en

cada genotipo. Análisis estadístico por test de Likelihood Ratio seguido por un test Dunnett's de múltiples comparaciones (tratamientos versus control) con un intervalo de confianza del 95%. ***p<0.001, ****p<0.0001, ns, no significativo, p>0.05. Para Control, n = 65 lóbulos primarios; para *Atg1^{RNAi}*, n = 24; para *Atg17^{RNAi}*, n = 25; para *Vps15^{RNAi}*, n = 19; para *Vps34^{RNAi}*, n = 13; para *Atg18^{RNAi}*, n = 21 para Lz, n = 20 para PPO. Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos de un lóbulo primario.

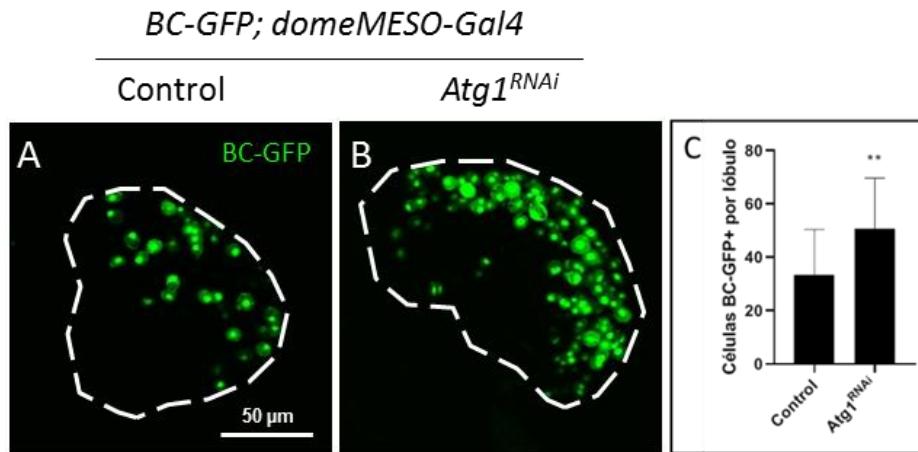


Figura 24- Visualización del incremento de células cristal utilizando el reportero BC-GFP. Para confirmar el aumento de CC con una herramienta adicional, utilizamos el reportero endógeno de CC Bc-GFP. **(A, B)** La cantidad de Células Cristal se incrementa en larvas que expresan *Atg1^{RNAi}* en progenitores en comparación con el control. El panel **C** presenta la cuantificación del número de células cristal. Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%. **p<0.01. Control, n = 21 lóbulos primarios; *Atg1^{RNAi}*, n = 13. Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

Al igual que en larvas homocigotas mutantes *Atg1^{Δ3}* (Fig. 22), la cantidad de células progenitoras (GFP) y Plasmacitos (Hml-dsred, P1) no se vieron alteradas al inhibir la autofagia específicamente en células progenitoras (Fig. 25). Debido a que la diferenciación de células progenitoras a CC o PL constituye una decisión binaria [76], uno esperaría ver que una mayor diferenciación de CC conlleve una reducción en la cantidad de plasmacitos. Esto no se observa en las mediciones probablemente debido a que la proporción de plasmacitos es mucho mayor que la de CC. En condiciones control, los plasmacitos conforman el 95% del total de hemocitos de la GL, mientras que las CC conforman el restante 5% [70, 120]. Aunque la población de CC se duplique, el cambio en la población de plasmacitos sería sutil, pasando de un 95% del total de hemocitos de la GL a un 90%, no pudiendo reflejarse esto estadísticamente en las mediciones.

Finalmente, corroboramos la ausencia de Lamelocitos en la GL (Fig. 25) (identificados mediante el anticuerpo L1 [121]), los cuales sólo se diferencian a partir de células progenitoras frente a ciertas situaciones de estrés, como la parasitación por huevos de avispa [70, 121]. Todos estos resultados sugieren que la autofagia participa específicamente en la diferenciación de células progenitoras a células cristal.

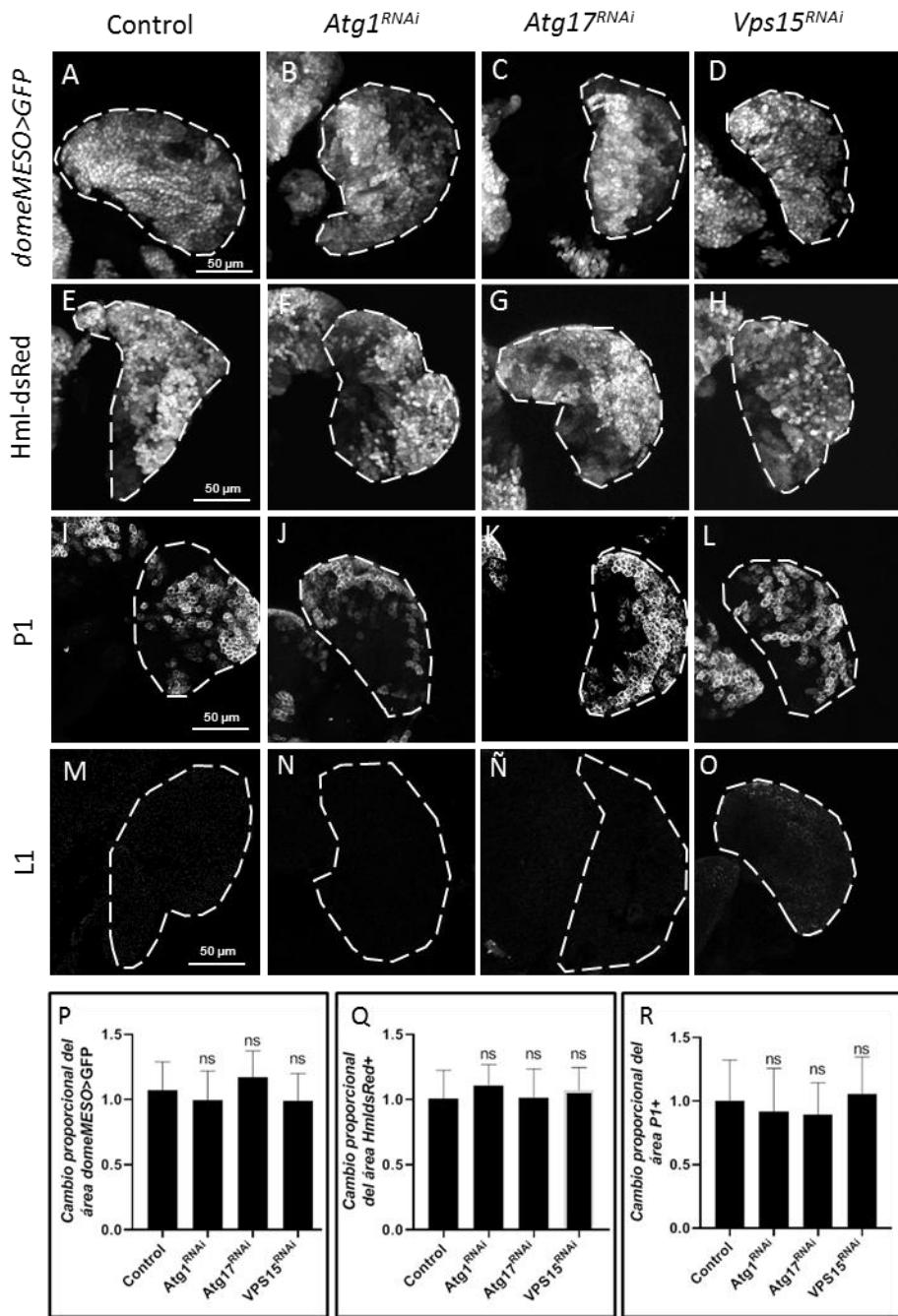


Figura 25- La inhibición de genes de la vía autófágica en células progenitoras no altera la diferenciación de plasmacitos o células progenitoras. Imágenes de microscopía confocal de lóbulos primarios, donde cada ARN de interferencia indicado fue expresado bajo el control del inductor *domeMESO*-Gal4 para inhibir la autófaga en células progenitoras de la GL. Las poblaciones de progenitores (*domeMESO*>*GFP*; A-D; $n \geq 20$) y de Plasmacitos (*Hml-dsRed*; E-H; $n \geq 10$. P1; I-L; $n \geq 20$) no se vieron alteradas. No se observó la presencia de Lámelocitos (L1; M-O) en ningún caso. (P-R) Cuantificación del cambio proporcional de las áreas que ocupan los Progenitores y Plasmacitos. (P) Control, $n = 20$ lóbulo primario; *Atg1*^{RNAi}, $n = 21$; *Atg17*^{RNAi}, $n = 20$; *Vps15*^{RNAi}, $n = 24$. (Q) Control, $n = 21$ lóbulo primario; *Atg1*^{RNAi}, $n = 13$; *Atg17*^{RNAi}, $n = 11$; *Vps15*^{RNAi}, $n = 10$. (R) Control, $n = 20$ lóbulo primario; *Atg1*^{RNAi}, $n = 21$; *Atg17*^{RNAi}, $n = 20$; *Vps15*^{RNAi}, $n = 24$. Análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por test de Dunnett de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. ns, no significativo, $p > 0.05$. Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

3- La autofagia limita la activación de la vía Notch y consecuentemente la diferenciación de células cristal

Habiendo determinado que la inhibición de la autofagia en células progenitoras promueve un aumento de la diferenciación de CC (**Fig. 22-24**), y sabiendo que dicha diferenciación depende de la activación de la vía Notch [76, 122] (**Fig. 5-7**), decidimos investigar si los niveles de autofagia regulan el grado de activación de la vía Notch en células progenitoras. A ese fin, realizamos experimentos de interacciones génicas para determinar si la autofagia ejerce un efecto sobre la diferenciación de CC, de manera dependiente de la vía Notch. En efecto, el incremento de CC, observado al inhibir la autofagia en células progenitoras utilizando ARNs de interferencia contra Atg1 o Atg17 no se observa cuando se silencia simultáneamente la expresión del receptor Notch en este tipo celular (**Fig. 26**). En línea con la idea de que el efecto de la autofagia sobre la diferenciación de CC depende de la vía Notch, tras inhibir la autofagia en larvas mutantes heterocigotas para componentes de la vía Notch ($N^{55e11}/+$ [123] o *Suppressor of Hairless*¹/ $+$), no observamos cambios en la cantidad de CC (**Fig. 26**). Estos resultados de interacciones génicas sugieren que la autofagia podría limitar la activación de la vía Notch durante la diferenciación de CC.

domeMESO-Gal4

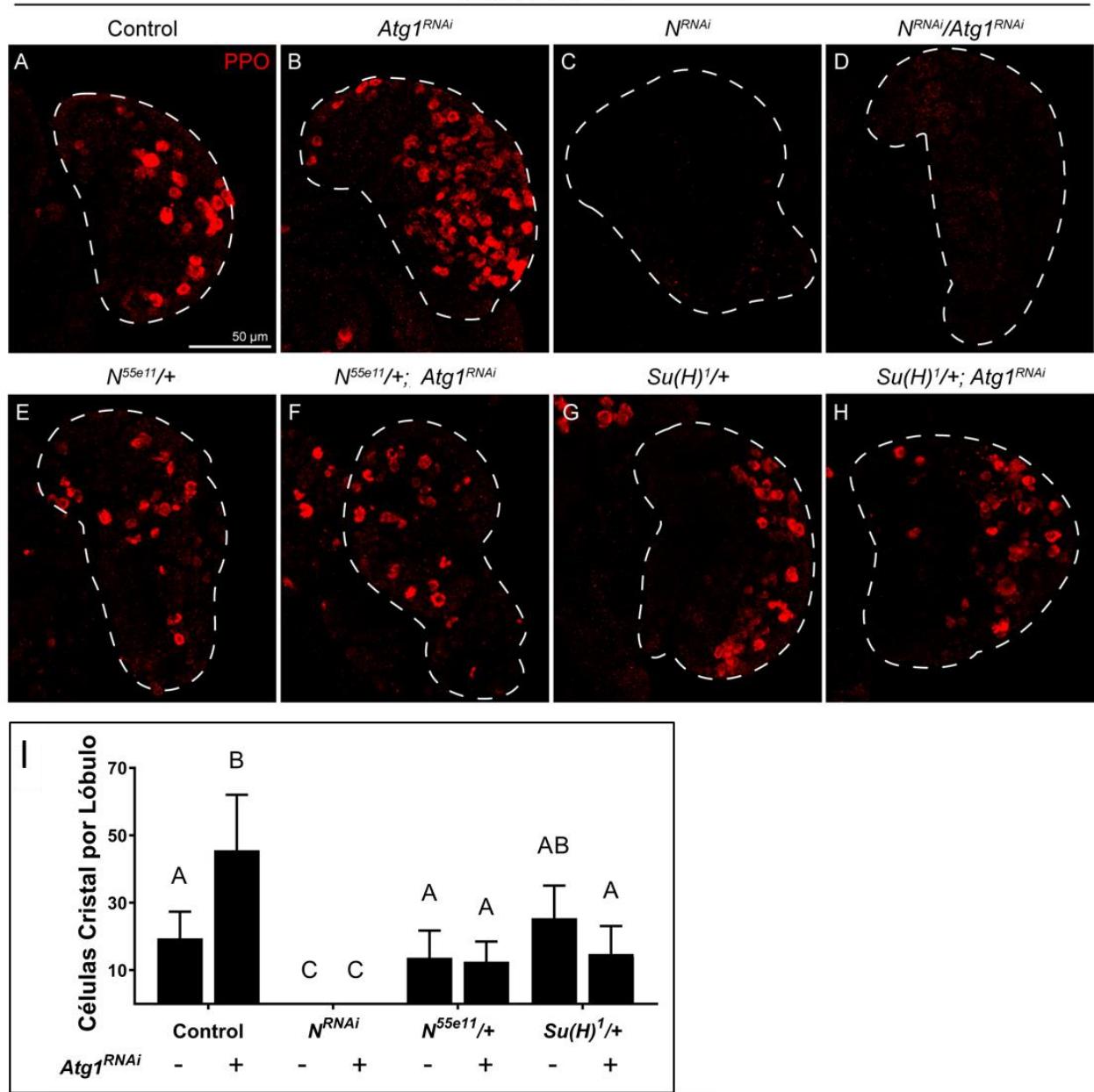


Figura 26- Interacciones génicas entre la vía de la autofagia y la vía Notch. Las CC fueron visualizadas por inmunotinción con un anticuerpo anti-PPO. La expresión de *Notch^{RNAi}* con el inductor *domeMESO-Gal4* bloqueó completamente la diferenciación de CC (**A**, **C**), mientras que la expresión de *Atg1^{RNAi}* incrementó su número (**A**, **B**). Tras inhibir la expresión de Atg1 coexpresando simultáneamente *Notch^{RNAi}* tampoco se observan CC (**D**). En larvas mutantes heterocigotas para Notch (*N^{55e11}*) o Suppressor of Hairless (*Su(H)¹*), se suprime el aumento de CC observado tras inhibir la autofagia (**E-H**). (**I**) Cuantificación del número de CC por lóbulo. Análisis estadístico por test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn's de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. Distintas letras representan diferencias significativas ($p<0.05$). (**I**) Control, $n = 33$ lóbulos primarios; *Atg1^{RNAi}*, $n = 43$; *N^{RNAi}*, $n = 18$; *N^{RNAi}/Atg1^{RNAi}*, $n = 23$; para *N^{55e11/+}*, $n = 14$; *N^{55e11/+}; Atg1^{RNAi}*, $n = 28$, para *Su(H)^{1/+}*, $n = 18$; *Su(H)^{1/+}; Atg1^{RNAi}*, $n = 18$.

3. a- La autofagia limita la activación de la vía Notch dependiente del ligando Serrate

Es sabido que el ligando de la vía Notch, Serrate (Ser), se expresa de manera transitoria en la GL, en células aisladas presentes en la periferia de la ZM. Estas células a su vez expresan *domeless* [76], y se sabe que la expresión de Serrate en estas células es necesaria para la formación de CC [81, 122, 124]. Para analizar el rol de la autofagia en la regulación de la vía Notch dependiente de Ser, silenciamos simultáneamente la expresión de *Atg1* y de *Serrate* utilizando RNAs de interferencia contra cada uno, con el inductor *domeMESO-Gal4*. El incremento de CC observado al inhibir la autofagia en células progenitoras se suprimió al silenciar la expresión del ligando Ser (Fig. 27), lo cual va en línea con la posibilidad de que la autofagia antagonice la activación de la vía Notch dependiente del ligando durante la diferenciación de CC.

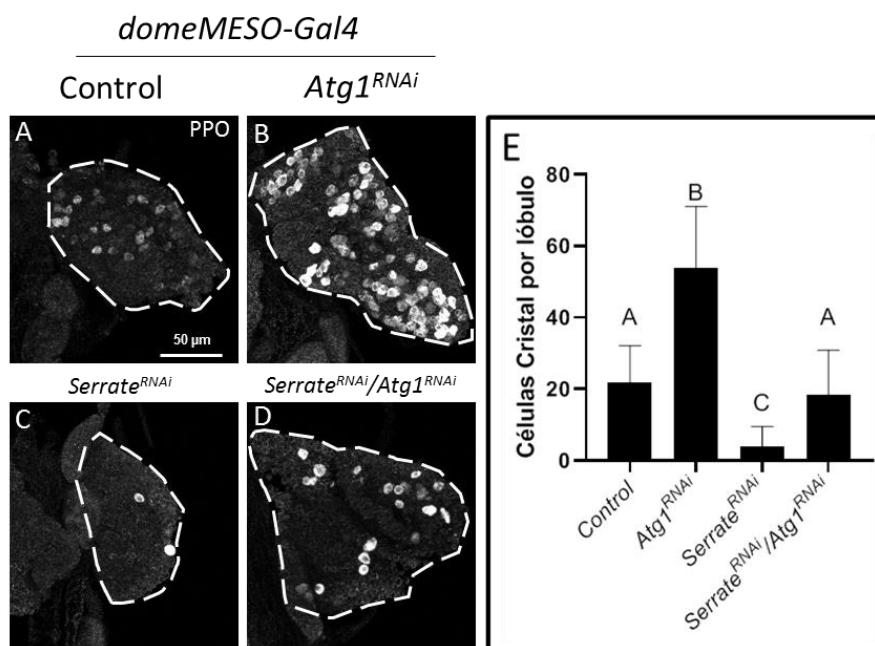


Figura 27- Interacciones génicas entre los genes de la autofagia y la vía Notch. La expresión de *Serrate^{RNAi}* con el inductor *domeMESO-Gal4* redujo la diferenciación de CC (A, C), mientras que la expresión de *Atg1^{RNAi}* incrementó su número (A, B). Este aumento provocado tras inhibir la expresión de *Atg1* se revirtió a niveles comparables con el del control al coexpresar *Ser^{RNAi}* (A, D). Las dosis de UAS de cada cruza fue compensada siendo: (A) UAS-GFP, UAS-Cherry^{RNAi}; (B, C) UAS-Cherry^{RNAi}. (E) Cuantificación del número de CC por lóbulo visualizadas con un anticuerpo anti-PPO. Análisis estadístico por test ANOVA de un factor seguido por el test de Tukey's de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. $n \geq 14$ de lóbulos primarios en cada genotipo. Distintas letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

3. b- La autofagia limita la activación de la vía Notch independiente de ligandos

Dado que en ciertos contextos biológicos la activación de la vía Notch puede darse de manera independiente de ligandos (Fig. 7C), investigamos la posibilidad de que esta forma de activación ocurra en las células progenitoras de la GL durante la diferenciación a CC. Este parece ser el caso, ya que la manipulación de la expresión de genes que participan específicamente en la activación de Notch independiente de ligandos así lo indica. La sobre-expresión en células progenitoras de la E3 ubiquitin ligasa Deltex (*Dx*), que promueve la endocitosis en la membrana plasmática y consecuente activación de la vía Notch independiente de ligandos [125-127], incrementó significativamente la diferenciación de CC (Fig. 28). Asimismo, el silenciamiento del gen *Suppressor of Deltex* (*Su(Dx)*), otra E3 ligasa, que en este caso inhibe la activación independiente de ligandos promoviendo la degradación lisosomal de Notch [128, 129], también incrementó la diferenciación de CC (Fig. 28). Estas observaciones apoyan la posibilidad de que la activación de Notch independiente de ligandos contribuya a la diferenciación de CC en la GL.

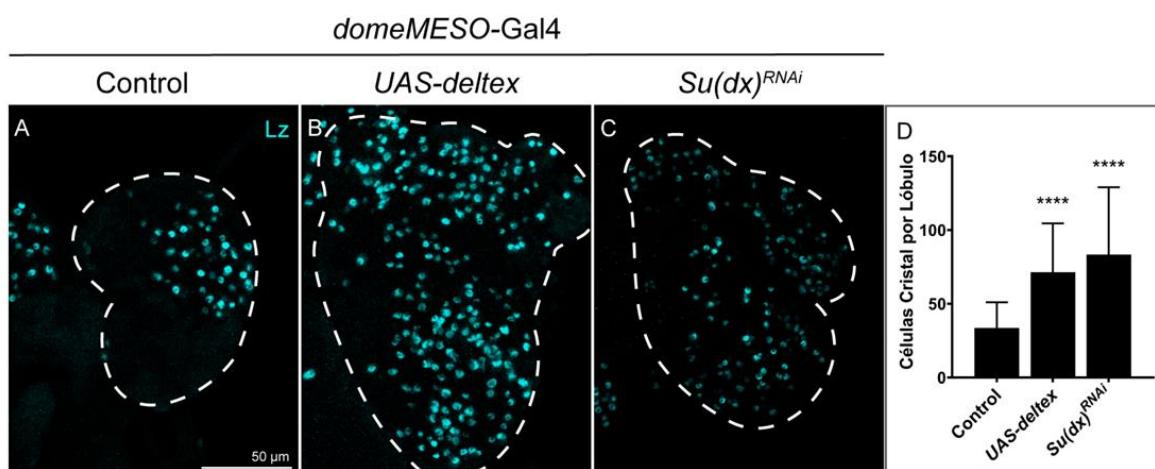


Figura 28- La activación de la vía Notch independiente de ligandos induce la diferenciación de células cristal. (A-C) Las células cristal fueron visualizadas por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-Lozenge (Lz). La sobreexpresión del gen *deltex* (B), o el silenciamiento de *Suppressor of Deltex* (C) produjeron un incremento de CC. (D) Cuantificación del número de CCs. Análisis estadístico por test de Likelihood Ratio seguido por un test Dunnett's de múltiples comparaciones (tratamientos versus control) con un intervalo de confianza del 95%. Control, n = 22 lóbulos primarios; UAS-deltex, n = 52; *Su(dx)RNAi*, n = 17. ****p<0.0001. Barras de escala: 50 μm. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

De manera similar a los experimentos de interacción génica presentados más arriba, genes que participan en la vía Notch independiente de ligandos también presentaron interacciones génicas antagónicas con la autofagia: el silenciamiento de *Deltex*, que por sí mismo no modifica la diferenciación de CC, suprimió el aumento de CC ocasionado tras silenciar a *Atg1* (Fig. 29A-D, G). De igual manera, silenciar a *Atg1* simultáneamente con *Su(dx)*, el cual por sí solo tampoco altera la cantidad de CC, bloqueó el aumento de CC observado al silenciar *Atg1* solamente (Fig. 29A,B, E-G). Estos resultados sugieren nuevamente que la autofagia antagoniza la activación de Notch durante la diferenciación de CC, ya sea la misma dependiente o independiente de ligandos.

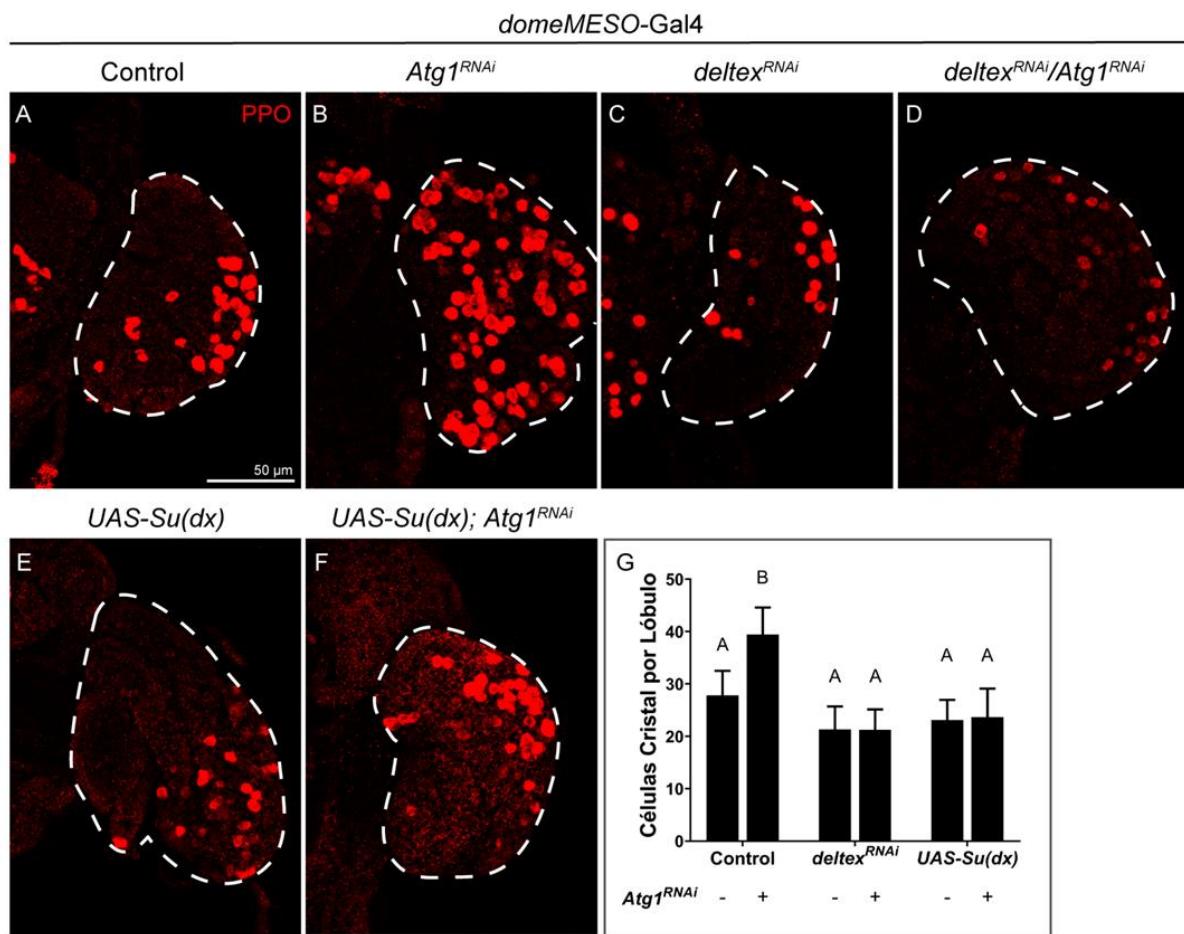


Figura 29- Interacciones génicas entre los genes de la autofagia y la vía Notch independiente de ligandos. (A-F) La diferenciación de CC se evaluó por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-profenoloxidasa (PPO). El silenciamiento del gen *Deltex* (C) o la sobre-expresión de *Suppressor of Deltex* (E) no modificaron el número de CC. La inhibición de *Atg1* (B) provocó una mayor diferenciación de CC, pero dicho aumento se suprimió al coexpresar *Deltex^{RNAi}* (D) o sobre-expresar *Suppressor of Deltex* (F) con el inductor *domeMESO-Gal4*. (G) Cuantificación de los resultados de los paneles (A-F). Análisis estadístico por test ANOVA de un factor seguido por el test de Tukey's de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. $n \geq 20$ de lóbulos primarios para cada genotípico. Distintas letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

4- La autofagia controla la abundancia del receptor Notch

Se sabe que la sobre-expresión del receptor Notch completo en células progenitoras provoca un incremento de la diferenciación de CC [76] (**Fig. 30**).

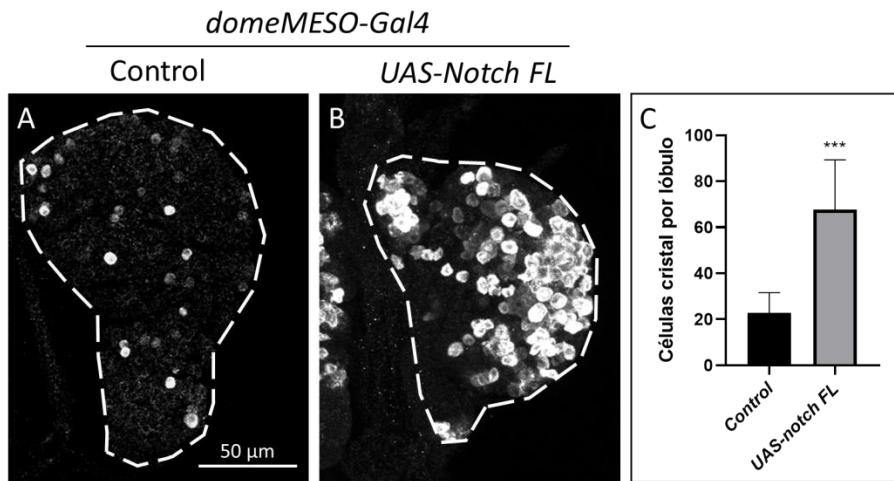


Figura 30- La sobre-expresión del receptor Notch en células progenitoras incrementa la diferenciación de células cristal. Las células cristal fueron visualizadas por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-Profenoloxidasa (PPO) en lóbulos primarios, donde el receptor Notch FL (Full Length) fue expresado bajo el control del inductor *domeMESO-Gal4* (B). La cantidad de células cristal se vio incrementada en comparación con el control (UAS-BFP; A). El panel C muestra la cuantificación del número de células cristal de los experimentos de los paneles A y B. Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%. ***p<0.001. Control, n = 13 lóbulos primarios; *UAS-Notch FL*, n = 25. Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

Decidimos por lo tanto investigar si el efecto de la autofagia en la vía Notch se da a través de un control directo sobre la abundancia del receptor Notch. Si bien hasta el momento se reportaron casos aislados en los que la autofagia regula directamente los niveles de moléculas señalizadoras [130-132], la autofagia es normalmente considerada un proceso de degradación masiva en el que la abundancia de moléculas individuales no suele estar específicamente regulada. Sin embargo, en el caso de Notch, sí parece existir una regulación específica, ya que tras silenciar la autofagia en células progenitoras, se observó un aumento de la cantidad de proteína Notch (**Fig. 31**). Consistentemente con esto, observamos un incremento del número de células que expresan al reportero de actividad transcripcional de la vía Notch *E(spl)-GFP* [133, 134] (**Fig. 31**), aportando evidencia adicional de que al inhibir la autofagia, la abundancia del receptor Notch se ve incrementada y la vía se sobre-activa.

domeMESO-Gal4

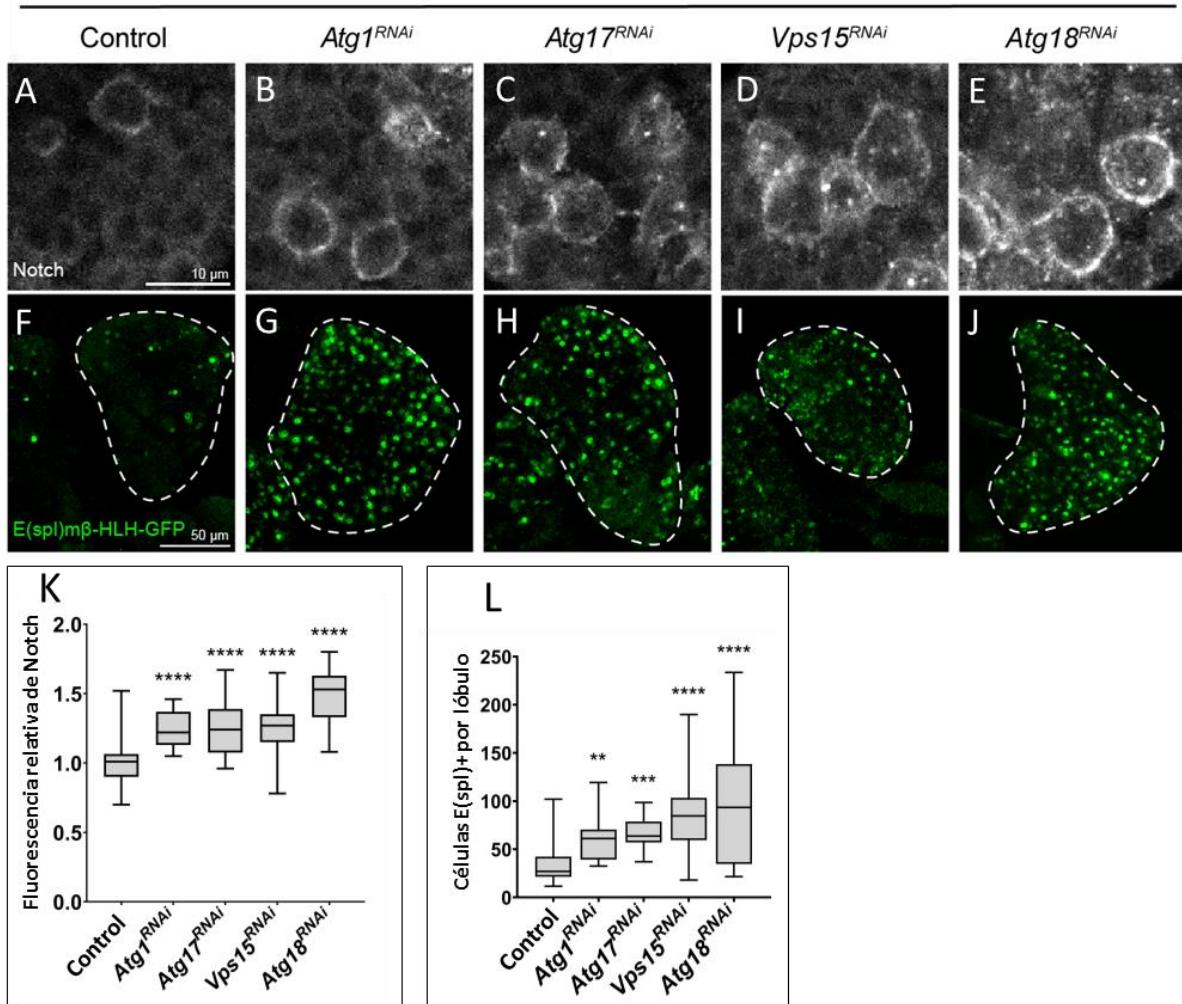


Figura 31- Los niveles de proteína de Notch, al igual que su actividad transcripcional, se incrementan al silenciar genes de la vía autofágica en células progenitoras. (A-E) Inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Notch reveló que los niveles del receptor se incrementan de manera significativa, tras expresar ARNs de interferencia contra genes de la autofagia con el inductor *domeMESO-Gal4*. **(K)** Cuantificación de la intensidad promedio de fluorescencia de las imágenes de los paneles A-E, con un intervalo de confianza del 95%. Control, n = 37 lóbulos primarios; *Atg1^{RNAi}*, n = 25; *Atg17^{RNAi}*, n = 16; *Vps15^{RNAi}*, n = 16; *Atg18^{RNAi}*, n = 25. **(F-J)** La actividad transcripcional de Notch se evaluó con el reportero transcripcional *E(spl)-GFP* tras el silenciamiento de genes de la autofagia, revelando un incremento de la transcripción dependiente de Notch. **(L)** cuantificación del número de células positivas para el reportero GFP, con un intervalo de confianza del 95%. Control, n = 19 lóbulos primarios; *Atg1^{RNAi}*, n = 21; para *Atg17^{RNAi}*, n = 20; *Vps15^{RNAi}*, n = 22; *Atg18^{RNAi}*, n = 25. Análisis estadístico **(K, L)** por test ANOVA de un factor seguido de test Dunnett's para comparación de tratamientos versus control. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. Barras de escala: 10 y 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

5- Interacciones entre la vía endocítica y la vía autofágica subyacen a la regulación de Notch dependiente de la autofagia

5. a- La vía endocítica controla la diferenciación de las células cristal

A continuación, investigamos los mecanismos mediante los cuales la autofagia controla la abundancia de Notch. Como la autofagia es esencialmente un proceso de degradación en masa y, con sólo unas pocas excepciones [130, 131, 133], no suele degradar moléculas específicas, razonamos que podría existir un vínculo entre la maquinaria autofágica y la vía endocítica, la cual es esencial para la activación de Notch en ciertos contextos biológicos [135, 136] (Fig. 7B, C). En esta línea, decidimos primeramente explorar si la progresión normal de la vía endocítica es requerida para la activación de Notch en células progenitoras y la diferenciación de CC, y de ser así, si la vía endocítica interactúa con la autofagia, explicando el mecanismo de regulación de Notch dependiente de autofagia. En línea con esta hipótesis, el silenciamiento en células progenitoras del gen *shibire*, el cual codifica una dinamina esencial para completar la endocitosis [137] (Fig. 7), bloquea la diferenciación de CC (Fig. 32), lo cual sugiere que la endocitosis es requerida para la activación de Notch en este contexto. De igual manera, afectar la actividad de hrs así como la de la GTPasa pequeña Rab5, ambas necesarias para la maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos [138] [89, 139] (Fig. 7), reduce de manera significativa la diferenciación de CC (Fig. 32), sugiriendo nuevamente que en células progenitoras, el tráfico de Notch a través de la vía endocítica es necesario para la activación de la vía, y en consecuencia, para diferenciación de CC.

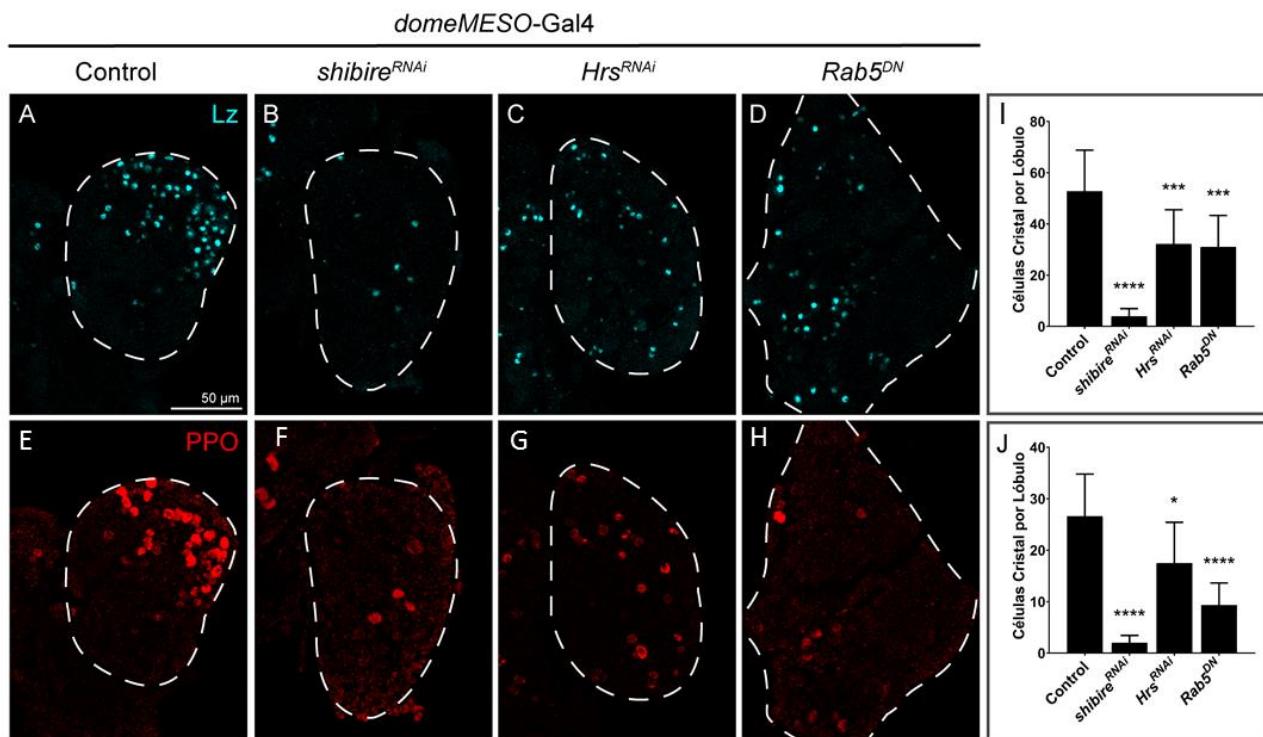


Figura 32- La vía endocítica controla la diferenciación de CCs. La cantidad de CC, analizada por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Lozenge (Lz; A-D) o anti-profenoloxidasa (PPO; E-H), decrece al silenciar la expresión de la dinamina Shibire (B, F), o de los genes *Hrs* (C, G) o *Rab5* (D, H). (I, J) Cuantificación de los resultados presentados en los paneles A-D y E-H. Control, n = 86 lóbulos primarios; *shibire*^{RNAi}, n = 24; *Hrs*^{RNAi}, n = 24; *Rab5*^{DN}, n = 22. Análisis estadístico por test de Likelihood Ratio seguido por el test de Dunnett's para comparación de tratamientos versus control con un intervalo de confianza del 95%. *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001. Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

Existen 4 complejos ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport 0 to III) que promueven la invaginación de la membrana externa de los endosomas tardíos, dando lugar a la formación de vesículas intraluminales [93, 94] del Cuerpo Multivesiculado (CMV) (Fig. 7). La incorporación de Notch a dichas vesículas, lo cual resulta en su degradación lisosomal [95], es favorecida por *Su(Dx)* [129]. Mientras el receptor Notch se encuentre en la membrana limitante del CMV, y no sea secuestrado en vesículas intraluminales, Notch puede ser clivado por la γ -secretasa, liberando el DICN para que ingrese al núcleo y regule la transcripción (Fig. 7). Para sumar evidencias de que la vía endocítica es importante en la regulación de Notch en progenitores hematopoyéticos, y particularmente para determinar si los complejos ESCRT contribuyen a la degradación de Notch en esta población celular, silenciamos en células progenitoras la expresión de *Tsg101*, componente del complejo ESCRT-I, de *Vps25*, componente del complejo ESCRT-II, de *Shrub*, miembro del complejo ESCRT-III, y de *Vps4*, el cual codifica a la ATPasa efectora de todos los complejos ESCRT (Fig. 7) [140, 141]. El silenciamiento de estos genes provocó un claro incremento de CC, al igual que la cantidad de proteína Notch en células progenitoras (Fig. 33), contribuyendo al concepto de que, impidiendo la formación de vesículas intraluminales del CMV y la consecuente degradación lisosomal de Notch, la abundancia y actividad de Notch aumentan.

domeMESO-Gal4

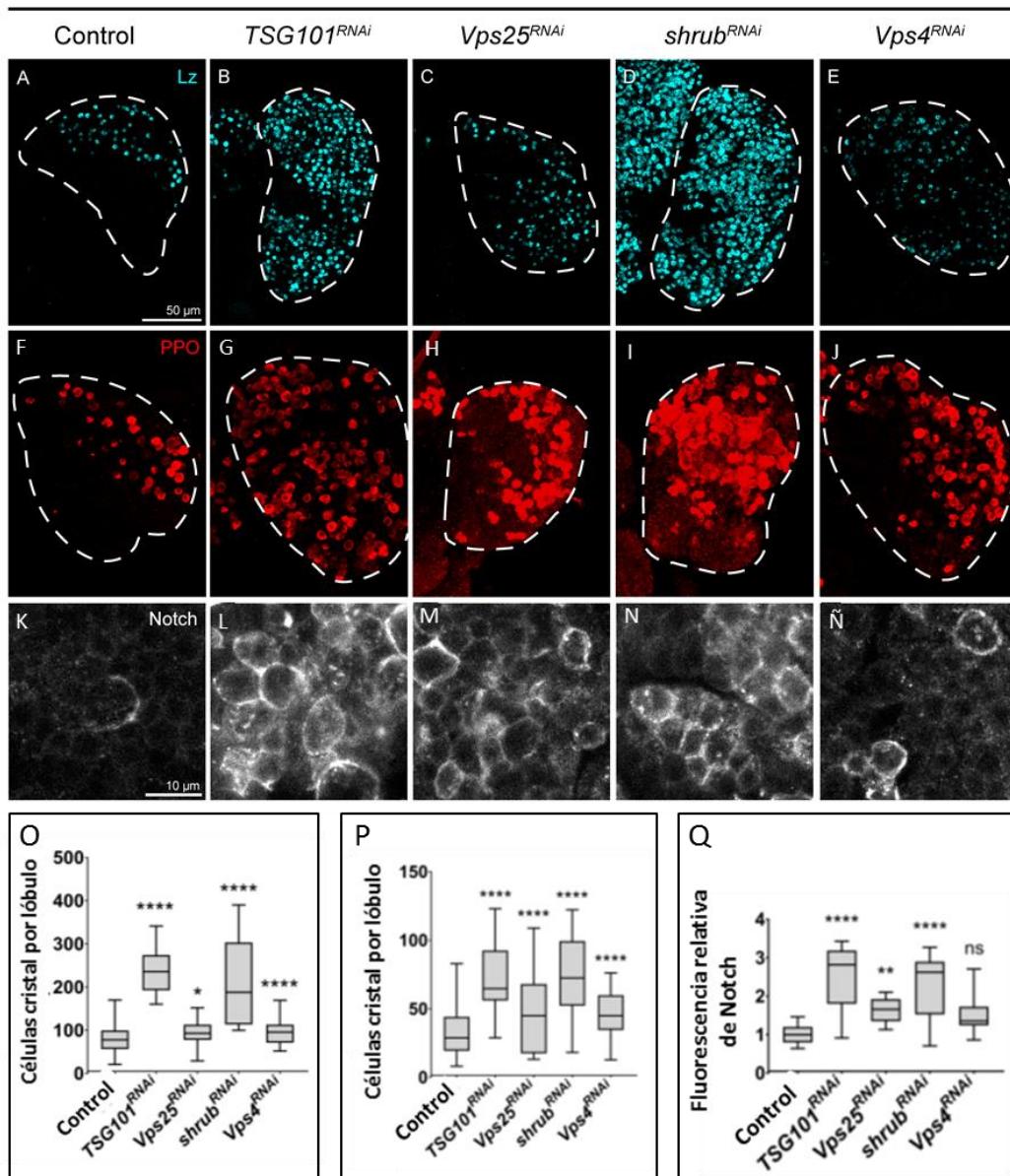


Figura 33- La inhibición de componentes de los complejos ESCRT resulta en una mayor abundancia de Notch y un aumento de la diferenciación de células cristal. Se realizaron tinciones Anti-Lozenge (Lz) y anti-Profenoloxidasa (PPO) para visualizar CC y determinar el efecto provocado por el silenciamiento de diferentes componentes de los complejos ESCRT (**B-D; G-I**) o del gen *Vps4* (**E, J**) que codifica a la ATPasa efectora de los complejos ESCRT. **(O, P)** Cantidad de CC por lóbulo. Análisis estadístico por test de ANOVA de un factor seguido por un test de Dunnett's de múltiples comparaciones de tratamientos versus control con un intervalo de confianza del 95%. Control, n = 86 lóbulos primarios; *TSG101*^{RNAi}, n = 24 Lz y n = 22 para PPO; *Vps25*^{RNAi}, n = 24; *shrub*^{RNAi}, n = 19; *Vps4*^{RNAi}, n = 33. **(K-Ñ)** Inmunofluorescencia contra Notch que revela que los niveles de proteína Notch aumentan en cada uno de los tratamientos, acompañando el incremento de CCs. **(Q)** Cantidad de la inmunofluorescencia contra Notch expresada como el cambio relativo de intensidad de fluorescencia respecto del control. Control, n = 20; *TSG101*^{RNAi}, n = 16; *Vps25*^{RNAi}, n = 19; *shrub*^{RNAi}, n = 15; *Vps4*^{RNAi}, n = 14. ANOVA de un factor seguido del test de Dunnett's de comparaciones múltiples de tratamientos contra control. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns, no significativo (p>0.05). Barras de escala: 10 y 50 μm. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

5. b- La inhibición de la formación de anfisomas o de autolisosomas limitan la degradación lisosomal de Notch

Habiendo establecido que la vía endocítica cumple un rol central en la diferenciación de las células cristal, la siguiente pregunta fue cómo la autofagia afecta la activación de Notch a través de la vía endocítica. Es bien sabido que los autofagosomas pueden fusionarse con el CMV, dando lugar a anfisomas, y que los anfisomas pueden a su vez fusionarse con lisosomas para generar autolisosomas [142, 143] (Fig. 34). Más aún, algunos autores han propuesto que los autolisosomas, organelas en las que ocurre la degradación del contenido de los autofagosomas [143], se originan exclusivamente mediante la formación previa de anfisomas [144, 145].

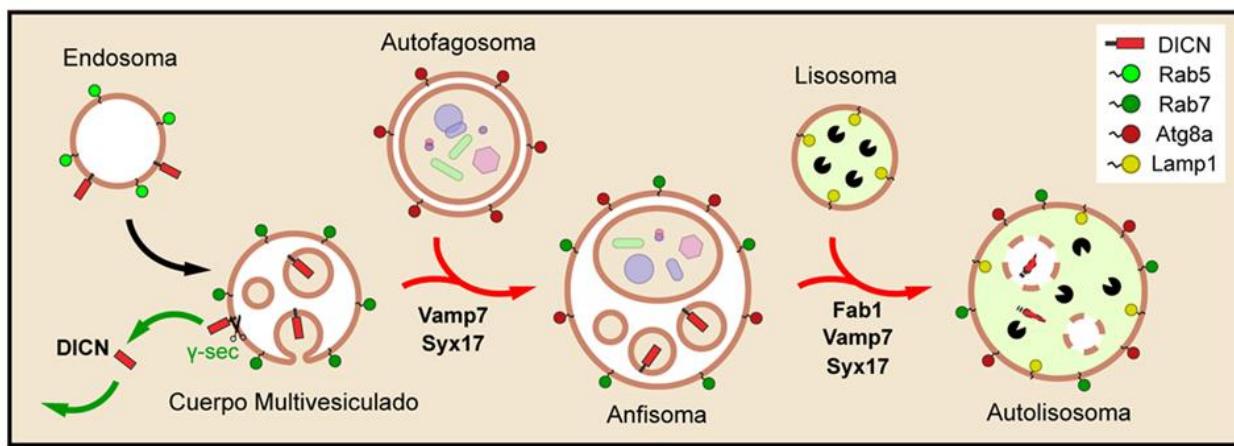


Figura 34- Esquema del proceso de maduración de endosomas, su fusión con autofagosomas, y su posible implicancia en la regulación de Notch. El endosoma con el dominio intracelular de Notch (DICN) insertado en su membrana madura dando lugar al CMV, en cuya membrana externa el complejo gamma-secretasa (γ -sec) puede clivar y liberar al DICN. Alternativamente, la invaginación de la membrana externa de CMV da lugar a vesículas intraluminales que pueden contener al DICN. Hipotetizamos que la fusión del CMV con el autofagosoma, para generar el anfisoma media la degradación del DICN. De manera semejante, la fusión del anfisoma con el lisosoma, dando lugar al autolisosoma es también necesaria para la degradación del DICN. Imagen adaptada de Katz, 2024 [96].

De acuerdo con esta hipótesis, la inhibición de la autofagia en células progenitoras provocó una acumulación de vesículas Rab7 positivas (endosomas tardíos y CMVs) (Fig. 35) [115, 146, 147]. A continuación, analizamos entonces la posibilidad de que la formación de anfisomas y autolisosomas sean necesarias para la degradación lisosomal del DICN (Fig. 34), regulando así qué proporción de Notch que se activa en la membrana externa del CMV y qué proporción se degrada en el lisosoma.

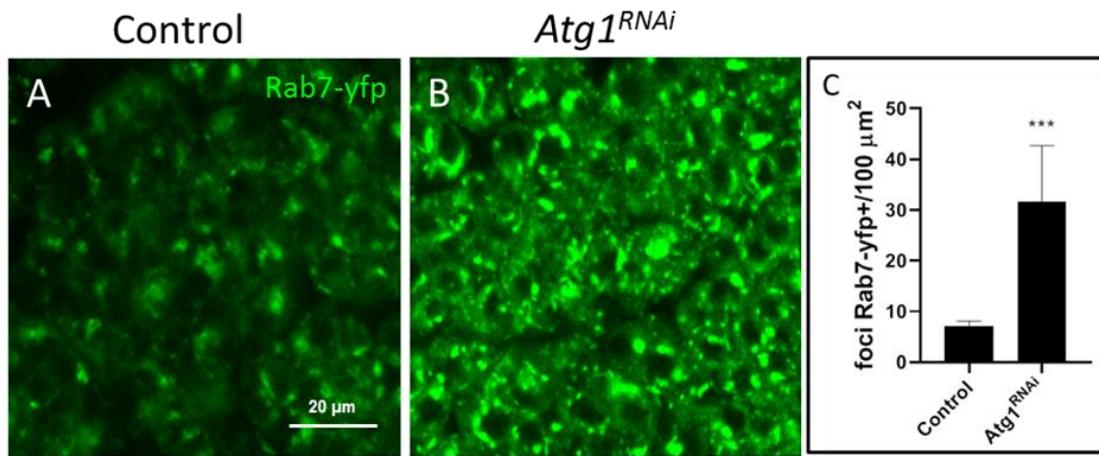


Figura 35- Los Endosomas Tardíos/CMV se acumulan tras inhibir la autofagia. (A, B) La inhibición de la autofagia en células progenitoras mediante la expresión de *Atg1^{RNAi}* incrementa la cantidad de vesículas positivas para Rab7. **(C)** Cuantificación del número de foci positivos para Rab7 cada 100 μm², n ≥ lóbulos primarios. Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%. ***p<0.001. Barras de escala: 50 μm.

El silenciamiento de la quinasa de fosfatidinositol *Fab1*, que es requerida para la maduración y actividad de los endolisosomas [148], incrementa la diferenciación de CC (Fig. 36). De manera similar, el silenciamiento de las SNAREs *Vamp7* [30] o *Syntaxina 17*, requeridas para la fusión entre autofagosomas y CMV [31, 149], así como entre anfisomas y lisosomas, incrementan la diferenciación de CC (Fig. 36), al igual que los niveles de proteína Notch (Fig. 37). Estos resultados sugieren que, inhibiendo los eventos de fusión que dan lugar a anfisomas y autolisosomas, se reduce la degradación de Notch, lo cual favorece su activación y consecuente diferenciación a CC.

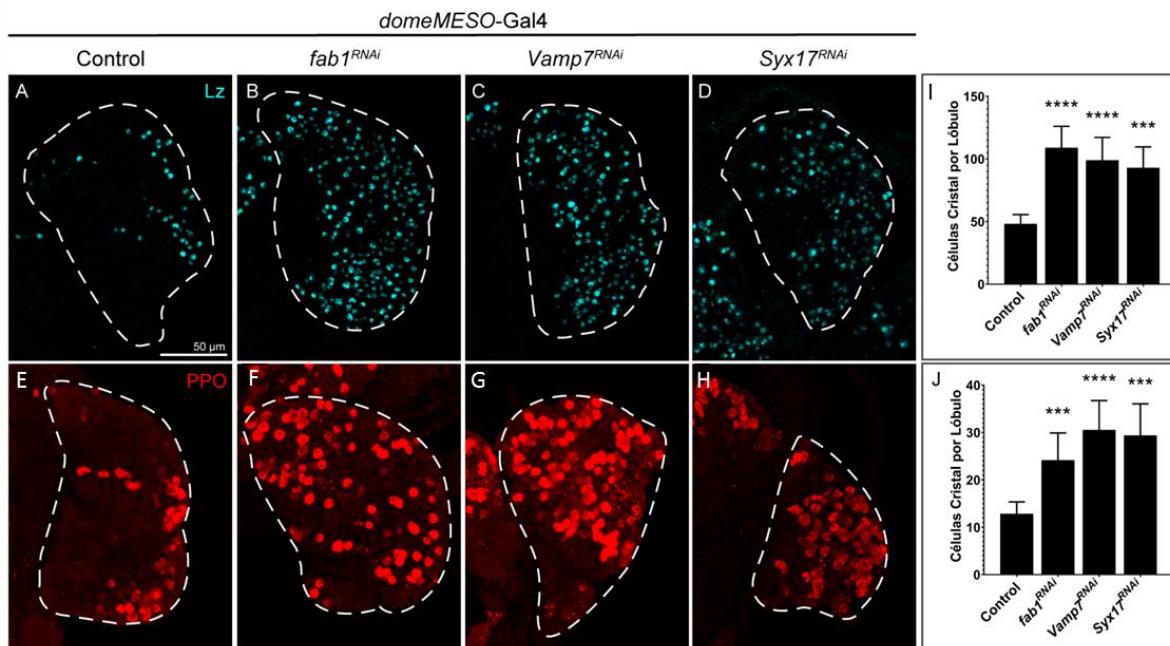


Figura 36- La inhibición de la maduración de los lisosomas o de los eventos de fusión que dan lugar a anfisomas o autolisosomas incrementa la diferenciación de células cristal. Tinciones con Anti-Lozenge (Lz) y anti-Profenoloxidasa (PPO) para visualizar CC. El silenciamiento de la expresión de *Fab1* con el inductor *domeMESO-Gal4* incrementa la cantidad de CC (A, B, E, F). La inhibición de las SNAREs *Vamp7* o *Syntaxina 17* también incrementa la diferenciación de CC (C, D, G, H). (I, J). Cuantificación de CC por lóbulo con un intervalo de confianza del 95%. Control, n = 22; *fab1^{RNAi}*, n = 21; *Vamp7^{RNAi}*, n = 20; *Syx17^{RNAi}*, n = 19. Análisis estadístico por Brown-Forsythe y Welch ANOVA seguido por un test de Dunnett's T3 comparando tratamientos contra control. ***p<0.001, ****p<0.0001. Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

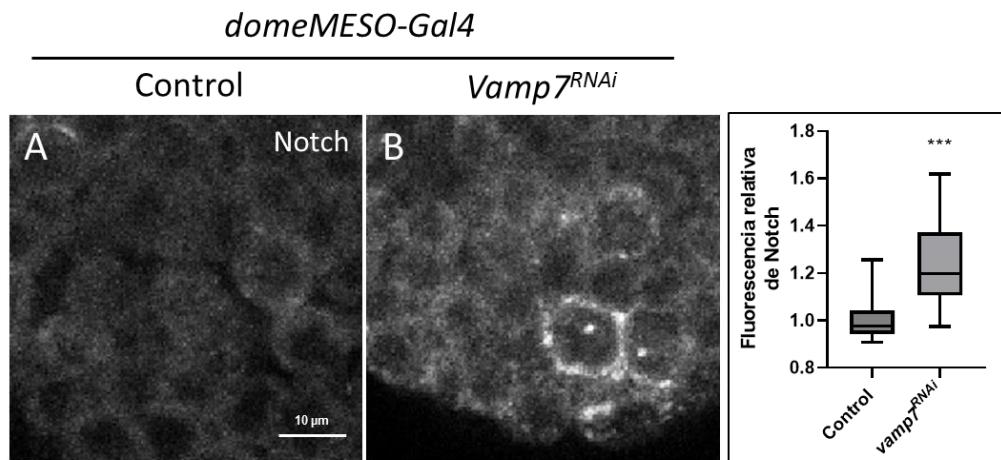


Figura 37- Los niveles de proteína de Notch se incrementan al inhibir la fusión que da lugar a anfisomas o autolisomas. (A, B) Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Notch reveló que los niveles del receptor aumentan de manera significativa en los lóbulos primarios, donde *Vamp7^{RNAi}* se expresó bajo el control del inductor *domeMESO-Gal4*. (C) Cuantificación del cambio relativo al control de la intensidad promedio de fluorescencia de Notch a partir de imágenes únicas con un intervalo de confianza del 95%. Control, n = 22 lóbulos primarios; *Vamp7^{RNAi}*, n = 24. Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%. ***p<0.001. Barras de escala: 10 μ m.

A fin de verificar la presencia de Notch en las diferentes vesículas autofágicas y endocíticas que se predijeron a partir de los experimentos presentados hasta aquí, realizamos un análisis por microscopía confocal de alta resolución (AiryScan). Observamos que Notch se encuentra asociado o en el interior de vesículas positivas para Rab5 o Rab7, que serían respectivamente Endosomas Tempranos y Endosomas Tardíos/CMV [150, 151] (**Fig. 38**). Al inhibir la autofagia en células progenitoras, las vesículas Rab7+ (E.Tardíos/CMVs) presentaron un tamaño mayor que el de las larvas control, así como también una mayor cantidad de Notch en su interior (**Fig. 38**). Estas observaciones apoyan la idea de que la autofagia regula la cantidad de Notch presente en endosomas, el cual puede ser potencialmente clivado para estimular la activación de la vía.

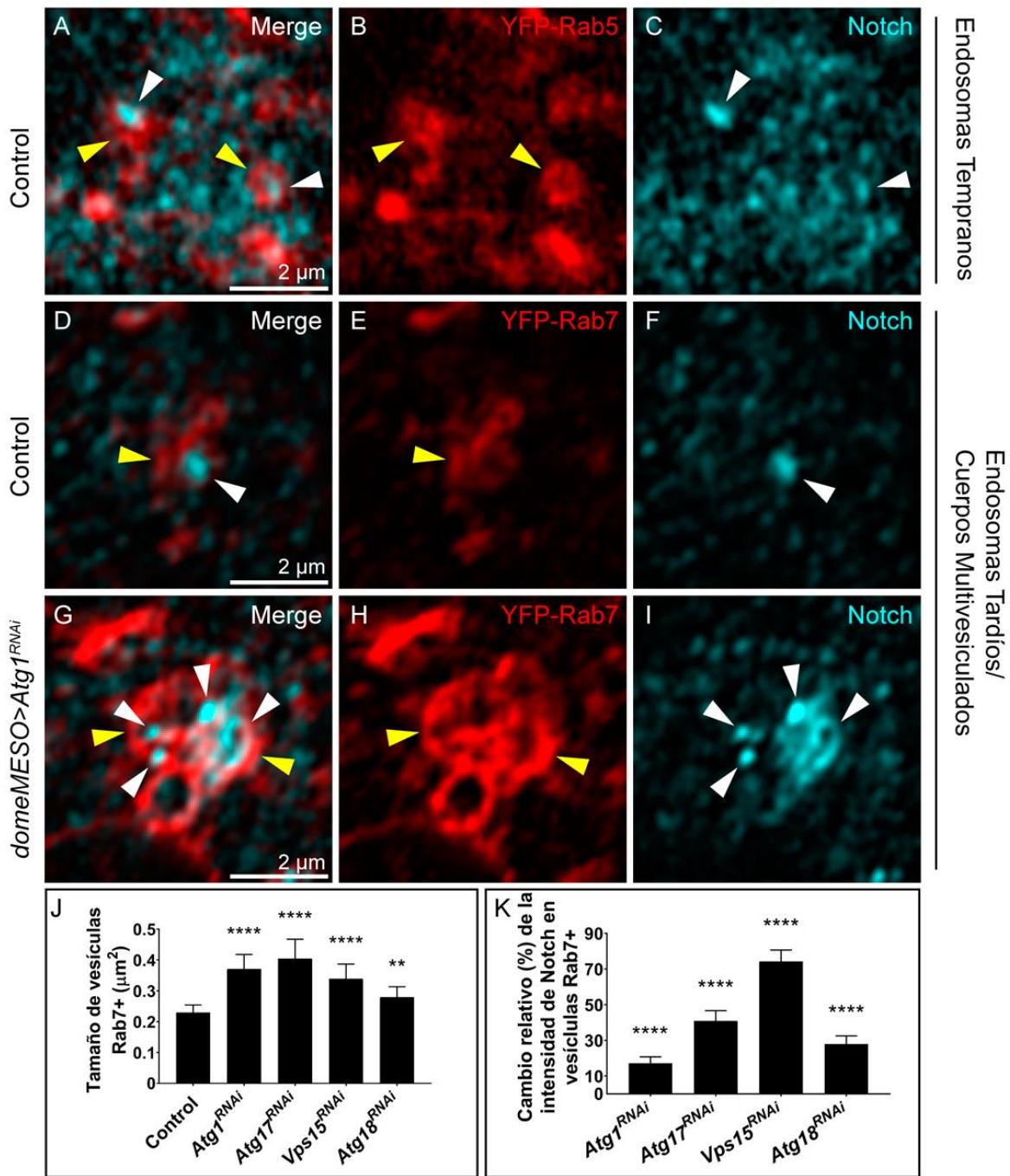


Figura 38- La presencia de Notch en compartimentos endosomales se incrementa al inhibir la autofagia. (A-I) Imágenes confocales de alta resolución (Airyscan) de Notch asociado a vesículas endosomales. **(A-C)** El receptor Notch (cian, flechas blancas) se encuentra en Endosomas Tempranos positivos para Rab5 (rojo, flechas amarillas). **(D-F)** El receptor Notch (cian, flechas blancas) se encuentra en Endosomas Tardíos/CMV positivos para Rab7 (rojo, flechas amarillas). **(G-I)** Al inhibir la autofagia mediante la expresión de *Atg1^{RNAi}*, las vesículas positivas para Rab7 (rojo, flechas amarillas) incrementaron su tamaño, al igual que la cantidad de Notch (cian, flechas blancas) presente en ellas. Este mismo experimento se realizó también con *Atg17^{RNAi}*, *Vps15^{RNAi}* y *Atg18^{RNAi}* dando resultados similares (no mostrados con imágenes). **(J)** Cuantificación del tamaño de vesículas positivas para Rab7 en los experimentos de los paneles **(D-I)** con un intervalo de confianza del 95%, incluyendo los resultados obtenidos con *Atg17^{RNAi}*, *Vps15^{RNAi}* y *Atg18^{RNAi}*. **(K)** Cuantificación del cambio relativo de intensidad de fluorescencia de Notch en vesículas Rab7⁺ en los experimentos de los paneles **(D-I)**, incluyendo además resultados obtenidos con *Atg17^{RNAi}*, *Vps15^{RNAi}* y *Atg18^{RNAi}*. Los datos se expresan como cambio relativo de

la intensidad de fluorescencia cian asociada a vesículas Rab7 positivas (rojo). Intervalo de confianza del 95%, $n \geq 966$ vesículas por genotipo. $n \geq 628$ vesículas para cada experimento. En ambos casos se realizó un análisis estadístico mediante test de Kruskal-Wallis seguido por un test de Dunn's de múltiples comparaciones (tratamientos vs. control). ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. Barras de escala: 2 μm .

A continuación, investigamos si Notch se encuentra presente en anfisomas (positivos para Atg8 y Rab7) o en autolisosomas (positivos para Atg8 y Lamp) [152], y pudimos verificar que efectivamente se halla en dichas estructuras (**Fig. 39**), confirmando la vía de tránsito de Notch inferida a partir de los experimentos genéticos descriptos más arriba.

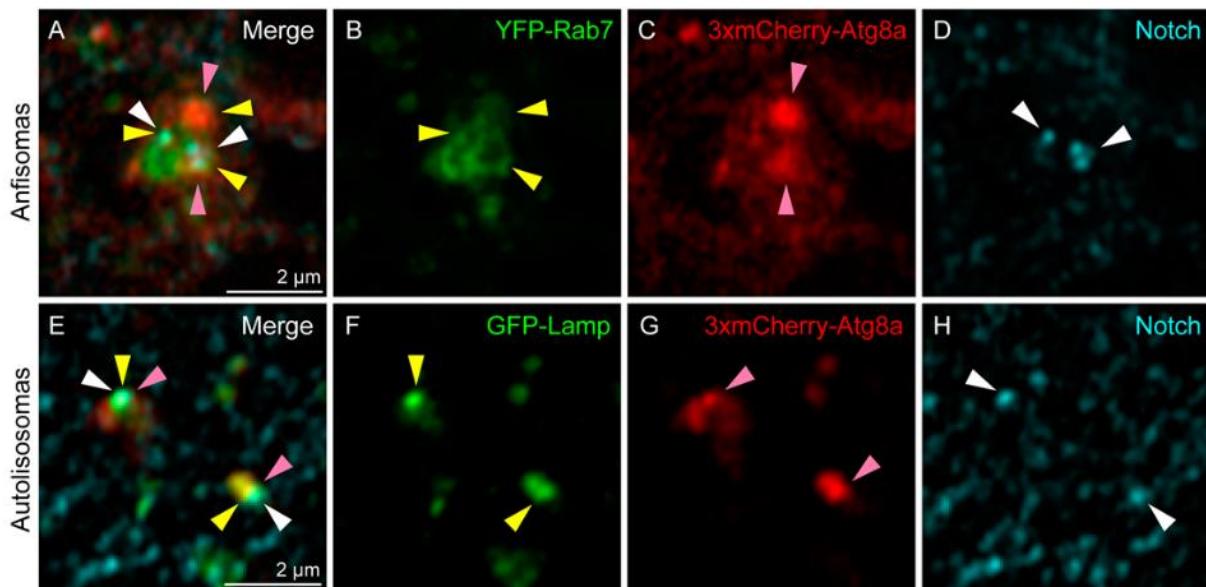


Figura 39- Notch co-localiza con marcadores lisosomales, autofágicos y endocíticos. Imágenes confocales de super-resolución (Airyscan) de Notch asociado a anfisomas y autolisomas. **(A-D)** Notch (cian, flechas blancas) co-localiza con vesículas positivas para Rab7 (verde, flechas amarillas), y con estructuras positivas para Atg8a (rojo, flechas rosas). **(E-H)** Notch (cian, flechas blancas) aparece asociado con vesículas positivas para Lamp (verde, flechas amarillas) y para Atg8a (rojo, flechas rosas). Barras de escala: 2 μm .

Finalmente, gracias a la combinación de diferentes marcadores vesiculares cuantificamos en células progenitoras la localización intracelular de Notch en condiciones normales de desarrollo (**Fig. 40**). Del total de Notch intracelular, aproximadamente el 26% se encuentra en endosomas tempranos (Rab5+), el 9.5% en anfisomas (Rab7+, Atg8+), el 6.2% en autolisomas (Atg8+, Lamp+) y entre el 3.6% al 5.3% en Endosomas tardíos/CMV/lisosomas.

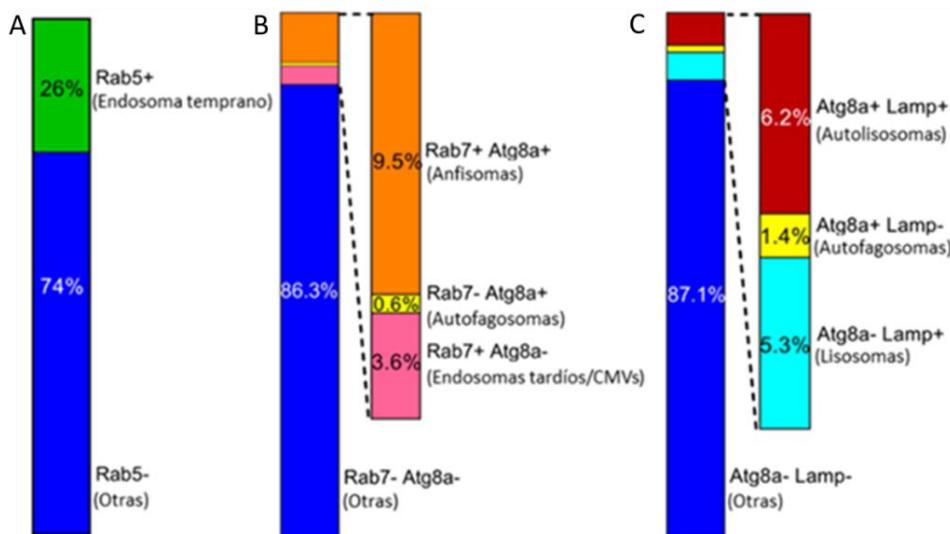


Figura 40- Cuantificación de la localización de Notch en vesículas endocíticas y autofágicas. Imágenes como las de las figuras 36 y 37 fueron utilizadas para estimar la proporción de Notch presente en cada compartimento subcelular. **(A)** foci de Notch n = 354; correspondientes a la figura 36, A-C; **(B)** foci de Notch, n = 461; correspondientes a la figura 37, A-D; **(C)** foci de Notch, n = 404; correspondientes a la figura 37, D-H.

En base a los resultados presentados, proponemos un modelo donde la autofagia, mediante la fusión de autofagosomas con CMV, establece un balance entre la activación de Notch en la membrana externa del CMV, y su degradación lisosomal luego de ser incorporado a vesículas intraluminales del CMV (**Fig. 45**).

6- La autofagia regula la diferenciación específicamente en progenitores distales

Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que la población de células progenitoras de la zona medular consta de dos subpoblaciones: los progenitores núcleo, más cercanos al vaso dorsal y que coexpresan los marcadores *TepIV* y *domeless* [76, 107]; y los progenitores distales, los cuales sólo expresan *domeless* [76, 107] (**Fig. 5**). Asimismo, hemos determinado que en los progenitores distales se da la toma de decisiones que desencadena la diferenciación a CC. Para confirmar que la autofagia limita la diferenciación de CC específicamente en progenitores distales, utilizamos una construcción *TepIV-GAL80* para limitar la inhibición de la autofagia a esta subpoblación celular (**Fig. 16**). De esta manera, solamente los progenitores núcleo expresarán Gal80, lo cual inhibe la actividad de Gal4 en este tipo celular, sin afectar la actividad de Gal4 en progenitores distales. Debido a que esta herramienta molecular, generada y amablemente donada por la Dra. Lauren Goins (Stanford University, USA), todavía no fue utilizada en trabajos publicados, decidimos hacer las caracterizaciones necesarias para corroborar la funcionalidad de la misma. Como se observa en las **Figs. 41, 42**, Gal4 sólo induce la expresión de elementos bajo UAS en progenitores distales, confirmándose así la validez de la herramienta.

TepIV-Gal4, dome-GFP; UAS-mCherry

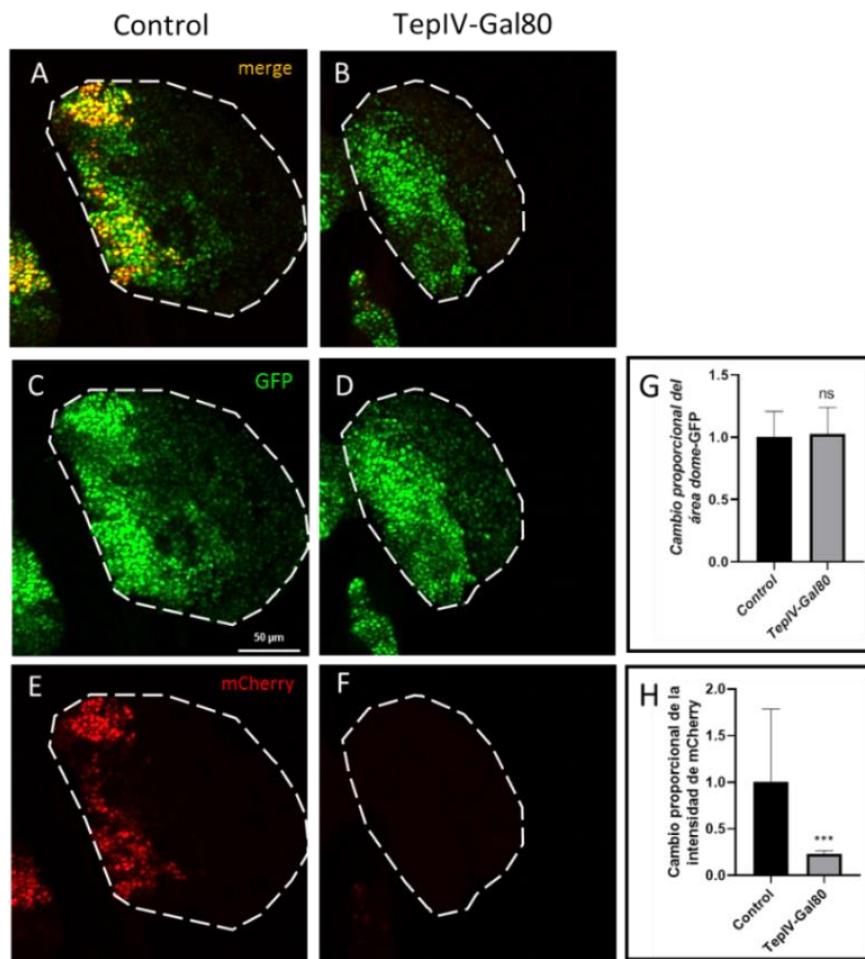


Figura 41- La herramienta *TepIV-Gal80*. Para confirmar que la construcción *TepIV-Gal80* bloquea la actividad del sistema *Gal4-UAS* en progenitores núcleo sin afectar a la población total de progenitores, co-expresamos *TepIV-Gal80* junto con el inductor de progenitores núcleo *TepIV-Gal4*, la secuencia *UAS-mCherry* y el reportero endógeno de progenitores *dome-GFP*. **(C, D, G)** La expresión de *TepIV-Gal80* no afecta la cantidad de progenitores totales. **(E, F, H)** El sistema *TepIV-Gal80* bloquea la expresión de *UAS-mCherry* dependiente del inductor *TepIV-Gal4*. **(G, H)** Cuantificaciones del cambio proporcional del área cubierta por progenitores totales (*dome-GFP*) y del cambio proporcional de la intensidad de mCherry (*TepIV>mCherry*). Análisis estadístico por test de Student con un intervalo de confianza del 95%. Control, n = 16 lóbulos primarios; *TepIV-Gal80*, n = 15. ***p<0.001; ns, no significativo, p>0.05. Barras de escala: 50 μm. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

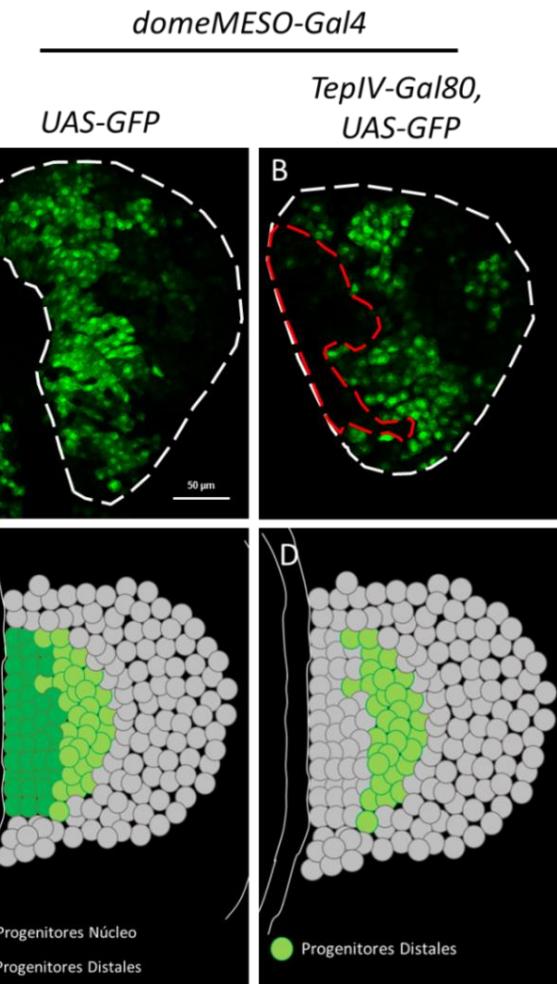


Figura 42- La expresión de *TepIV-Gal80* bloquea la actividad del sistema Gal4-UAS en la población de progenitores núcleo. (A)

Continuando con los controles para verificar el funcionamiento del sistema *TepIV-Gal80*, expresamos esta construcción en moscas que también expresaban la secuencia UAS-GFP con el inductor *domeMESO-Gal4*, el cual se expresa tanto en progenitores núcleo como distales. **(B)** La expresión de Gal80 específicamente en progenitores núcleo se pone en evidencia por la falta de fluorescencia de GFP en la región más cercana al vaso dorsal (líneas discontinuas rojas), la cual corresponde a la región que ocupan los progenitores núcleo. **(C, D)** Esquema de la ubicación de cada subpoblación de progenitores en la GL. Barras de escala: 50 μ m. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

Habiendo confirmado que el sistema *TepIV-Gal80* inhibe la actividad del sistema Gal4-UAS solamente en progenitores núcleo (**Fig. 41, 42**), procedimos a inhibir la autofagia específicamente en progenitores distales y analizar de este modo si se observan los mismos fenotipos en la diferenciación de CC que se describieron más arriba en esta tesis. Se observó una vez más un incremento en la cantidad de CC (**Fig. 43**), sugiriendo que la autofagia limita la diferenciación de CC en progenitores distales.

TepIV-Gal80; domeMESO-Gal4, UAS GFP

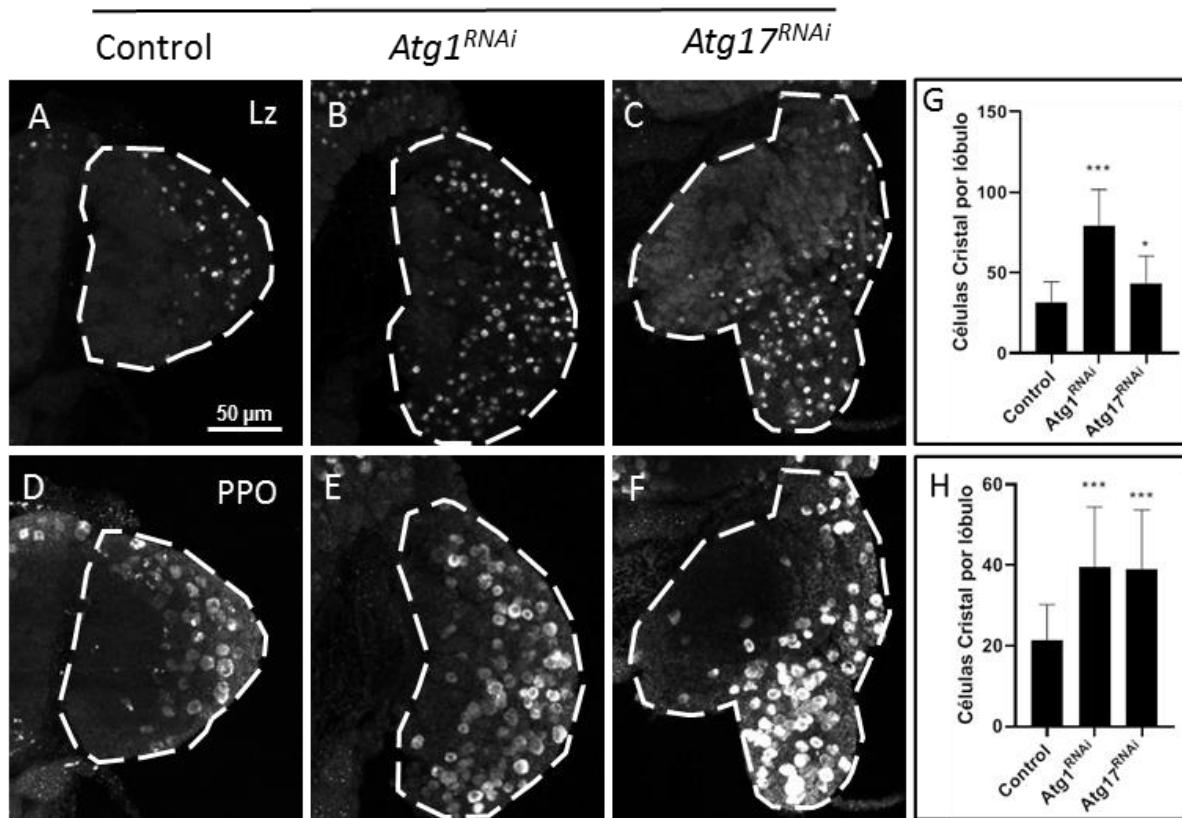


Figura 43- La inhibición de la autofagia en células progenitoras distales altera la diferenciación de células cristal. (A-F) Cada ARN de interferencia indicado fue expresado bajo el control del inductor *domeMESO-Gal4* junto con *TepIV-Gal80* para inhibir la autofagia en células progenitoras distales específicamente. La cantidad de Células Cristal aumenta en comparación con GL Control. Los paneles **G** (Lz) y **H** (PPO) presentan la cuantificación del número de Células Cristal por lóbulo. Análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por test de Dunnett de múltiples comparaciones con un intervalo de confianza del 95%. *p<0.1, ***p<0.001. Control, n = 24 lóbulos primarios; *Atg1^{RNAi}*, n = 23; *Atg17^{RNAi}*, n = 20. Barras de escala: 50 μm. Las líneas discontinuas marcan los contornos del lóbulo.

Discusión

1- Modelo propuesto para el mecanismo mediante el cual la autofagia regula la diferenciación de células cristal

En esta tesis se ha investigado el rol que cumple la autofagia en la hematopoyesis de *Drosophila*. Observamos que las células progenitoras de la glándula linfática presentan niveles basales de autofagia elevados, y que la reducción de la actividad autofágica resulta en la acumulación de la proteína Notch y en una mayor diferenciación de células cristal. La acumulación del receptor en células progenitoras es condición suficiente para inducir la activación de la vía, y en consecuencia, la diferenciación de células cristal.

Como se ha reportado en otros contextos biológicos [89, 126, 127, 153, 154], corroboramos en células progenitoras de la GL que la activación de Notch, así como su degradación lisosomal, requieren del tráfico a través de compartimientos de la vía endocítica. Las primeras etapas de la vía son necesarias para que Notch se active, siendo éstas la endocitosis del receptor, su tráfico a través de endosomas tempranos y la posterior maduración a endosomas tardíos. Las etapas finales (formación de vesículas intraluminales y consecuente degradación de Notch en lisosomas) limitan la activación de la vía Notch. Tanto mediante el bloqueo de la endocitosis, como inhibiendo la maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos/CMV, la diferenciación de CC se vio afectada. En cambio, una reducción de la actividad de los complejos ESCRT, lo cual evita la formación de vesículas intraluminales en CMV, produjo la acumulación de Notch, y en consecuencia, una mayor diferenciación de CC.

La autofagia es esencialmente un proceso de degradación masivo y, con algunas excepciones, no suele degradar moléculas específicas. El hecho de que la autofagia sea necesaria para la degradación de Notch es consistente con un modelo donde la fusión del CMV con autofagosomas -lo cual da lugar a anfisomas- es necesaria para dirigir a Notch hacia su degradación lisosomal. La inhibición de la autofagia bloquea el tráfico hacia lisosomas, provocando la acumulación de endosomas tempranos, tardíos y CMV, en los cuales se encuentra el receptor Notch. Una reducción de la degradación de Notch cambia el balance hacia la activación del receptor en la membrana de endosomas, aumentando así la diferenciación de células cristal. Consistentemente con este modelo, la inhibición de la maduración de los lisosomas o de los eventos de fusión que dan lugar a anfisomas o autolisomas reducen los niveles de degradación de Notch, lo cual favorece su activación y la consecuente diferenciación de CC.

De esta manera, nuestros resultados establecen una relación entre la autofagia y la diferenciación de las células de la sangre, donde los niveles de activación de Notch se regulan a través de los niveles de autofagia (Fig. 44).

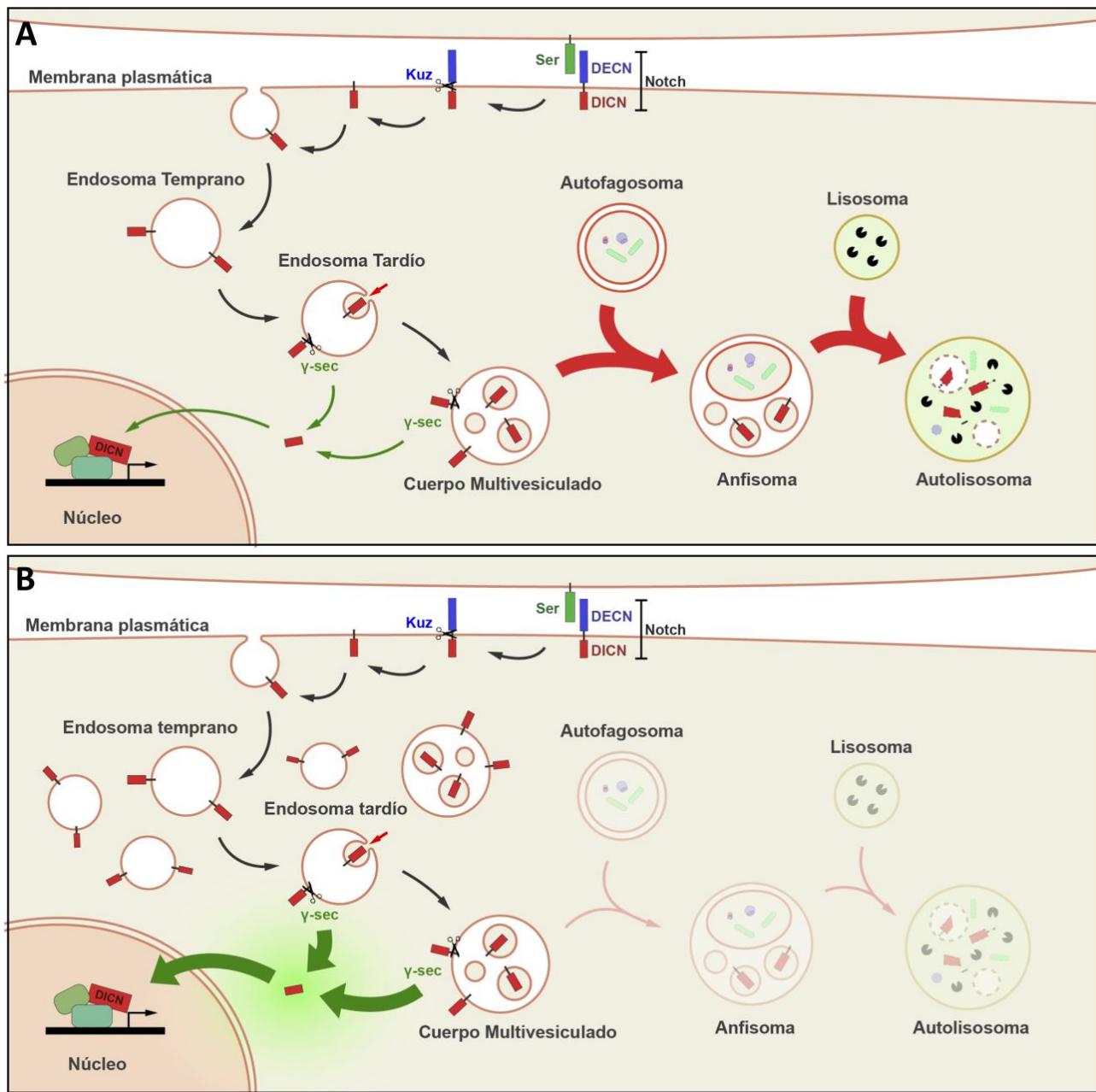


Figura 44 - Modelo propuesto para la regulación de la actividad de Notch a través de la autofagia en células progenitoras. (A)
 Tráfico de Notch con el proceso de autofagia activo. Notch se endocita luego de interactuar con su ligando Serrate y se cliva de manera dependiente de Kuzbanian. El Dominio Intracelular de Notch (DICN) permanece unido a la membrana de endosomas tempranos, los cuales maduran, dando lugar a endosomas tardíos y CMV (flechas negras). El DICN puede ser clivado por la γ -secretasa (γ -sec) en la membrana de endosomas tardíos o CMV, quedando libre para entrar al núcleo y regular la transcripción (Flechas verdes). Alternativamente, el DICN presente en la membrana de CMV puede ser internalizado, quedando atrapado en vesículas intraluminales. La fusión del CMV con autofagosomas resulta en anfisomas que contienen a Notch, los cuales se fusionan con lisosomas para formar autolisosomas (flechas rojas), lugar donde Notch es degradado. De esta manera, los niveles de autofagia limitan la degradación lisosomal de Notch. **(B)** Tráfico de Notch en condiciones de inhibición de la autofagia. La fusión de autofagosomas con endosomas tardíos/CMV es necesaria para que estos últimos sean direccionados al lisosoma para su degradación. Una reducción de la formación de autofagosomas limita el tráfico hacia lisosomas, provocando la acumulación de

endosomas tempranos, tardíos y CMV, en los cuales se encuentra el receptor Notch. Una reducción de la degradación de Notch cambia el balance hacia una mayor activación del receptor en la membrana de los endosomas, aumentando así la diferenciación de células cristal. Imagen adaptada de Katz, 2024 [96].

2- La vía Notch en *Drosophila* y en vertebrados

El gen Notch fue reconocido por primera vez en estudios realizados en *Drosophila* a comienzos del 1900, donde se observó la presencia de muescas en las alas de moscas mutantes heterocigotas para dicho gen. Desde entonces se han encontrado homólogos de Notch en múltiples organismos, todos con estructura y función similares al Notch de *Drosophila* [155, 156]. *Drosophila* tiene un solo receptor Notch, mientras que *C. elegans* tiene dos receptores redundantes, LIN-12 y GLP-1. Los vertebrados tienen 4 parálogos de Notch, Notch-1, -2, -3, y -4, los cuales tienen algunas funciones redundantes y otras únicas [157]. En humanos, al igual que en *Drosophila*, los precursores de Notch son generados en el RE, donde se les añaden diversos tipos de glicósidos necesarios para su estabilidad y función [158]. Luego, son translocados al aparato de Golgi, donde el receptor Notch es clivado, pasando a ser un heterodímero, antes de ser transportado a la membrana plasmática. El dominio extracelular de Notch1 (DECN) está formado por 36 repeticiones EGF-like. Notch 2-4 poseen un DECN similar, variando la cantidad de repeticiones y el tipo de glicosilaciones. Los humanos al igual que los ratones poseen 5 ligandos de Notch: delta-like ligand 1 (DLL1), delta-like ligand 3 (DLL3), delta-like ligand 4 (DLL4), Jagged-1 (JAG1), y Jagged-2 (JAG2), todos ellos con algunas funciones redundantes y otras que son únicas de cada uno [157]. La estructura de los ligandos es similar a la del receptor. Son proteínas de un solo paso transmembrana cuyo dominio extracelular se compone de repeticiones EGF-like, las cuales determinan la interacción con el receptor correspondiente. En *Drosophila* sólo existen dos ligandos de Notch, Delta (análogo a delta-like) y Serrate (análogo a Jagged).

Históricamente, los componentes involucrados en la vía Notch así como los mecanismos que regulan la vía fueron descriptos primero en *Drosophila*, principalmente en trabajos realizados en el disco imaginal de ala, buscándose luego posibles similitudes en mamíferos. Un ejemplo de esto fue el descubrimiento de una manera de activación de la vía independiente de ligandos. Se determinó que Deltex [126], una E3 ubiquitin ligasa que ubiqutina a Notch, favorece la endocitosis del receptor completo, sin la necesidad de que el mismo interactúe con ligandos [89, 159]. Una vez endocitado, el receptor se encuentra en compartimentos endocíticos y se acumula en la membrana de endosomas tardíos/CMV, lo cual promueve su clivaje y activación [126]. En mamíferos, el homólogo de Deltex se denomina DTX1 [160] y también regula mediante ubiquitinación la endocitosis de Notch y su tráfico endocítico posterior. En mamíferos se observó que DTX1 induce el pasaje de Notch desde la membrana plasmática a endosomas. El silenciamiento de DTX1 por lo tanto incrementa sus niveles en la membrana plasmática y en consecuencia su activación [160]. De esta manera, Deltex y DTX1 cumplen funciones evolutivamente conservadas.

Otro gen fundamental de la vía independiente de ligandos descubierto en *Drosophila* es Suppressor of Deltex. Su(Dx) es otra E3ubiquitin ligasa que ubiquitina a Notch en una posición diferente, favoreciendo en este caso su incorporación a vesículas intraluminales del CMV, impidiendo así su activación. En mamíferos se identificó un ortólogo de Su(Dx) llamado WWP2 [161], el cual ubiquitina al dominio intracelular de Notch3, disminuyendo la actividad de la vía [161]. Por lo tanto, también en este caso, Su(Dx) y WWP2 cumplirían funciones similares en *Drosophila* y en mamíferos.

En este trabajo de tesis hemos determinado que Deltex y Su(Dx) cumplen funciones regulatorias en células progenitoras de la GL, controlando los niveles de actividad de la vía Notch y en consecuencia, la cantidad de CC. De esta manera, en la GL, al igual que en discos imaginarios de ala, la vía Notch se activa tanto de manera dependiente de ligandos, como de manera independiente de ligandos [89]. Sin embargo, la vía predominante de activación de Notch en la GL parece ser la vía dependiente de ligandos, ya que la expresión de un ARN_i contra Serrate redujo muy fuertemente la cantidad de CC. Dado que la manipulación de elementos de la vía independiente de ligandos también tiene efecto sobre la diferenciación de CC, proponemos que ambas vías cooperan en los progenitores de la GL durante la diferenciación de CC, tal como fue reportado previamente en otros órganos de *Drosophila* [127]. Se ha propuesto que las dos vías constituyen un módulo de robustez, que permite mantener estable la actividad de la vía a pesar de las variaciones ambientales tales como la temperatura [127]. Experimentos futuros a diferentes temperaturas podrían aportar información relevante acerca del rol específico de la vía Notch independiente de ligandos en la GL.

3- Notch en la hematopoyesis de vertebrados

Mientras que el rol principal de la vía Notch en la hematopoyesis de *Drosophila* es el de promover la diferenciación de progenitores distales a CC [76, 79, 122, 162], en la hematopoyesis de mamíferos Notch cumple funciones más complejas en diferentes linajes hematopoyéticos [163-168], las cuales en algunos casos fueron definidas con escasa precisión. En línea con esto, Notch funciona tanto como supresor tumoral, como promoviendo diferentes tipos de leucemias [169, 170]. Existen evidencias de que la vía Notch es inductora de la leucemia Linfoblástica Aguda de células T (T-ALL) [171], Leucemia Linfocítica Crónica (CLL) [172], Leucemia Megacarioblástica Aguda (AMKL) [173] y Leucemia Mieloide Crónica (CML). Se ha reportado sin embargo, que la vía Notch es además supresora de la Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (B-ALL) [174] y de la Leucemia Mielomonocítica Crónica (CMML) [175].

En el pez Zebra, al igual que en otros vertebrados, la hematopoyesis tiene lugar en 2 oleadas, siendo la segunda de ellas la que produce células madre hematopoyéticas que constituyen el sistema hematopoyético del organismo adulto [164]. Se pudo verificar en este organismo que la activación de Notch promueve la expansión de las células madre hematopoyéticas, al igual que la cantidad de precursores hematopoyéticos. Resultados similares fueron reportados en estudios realizados en ratones, donde cepas deficientes para

Notch1 mostraron problemas en la generación de células madre hematopoyéticas durante la hematopoyesis definitiva que ocurre tempranamente en el embrión [99]. Sin embargo, este tema es controversial, ya que existen también reportes que argumentan en contra de un rol de Notch en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas. Por ejemplo, la inducción de la expresión de Notch1 en la línea celular 32D de progenitores hematopoyéticos reduce la proliferación y acelera su diferenciación hacia linajes mieloides [108].

Otro ejemplo de funciones que cumple la vía Notch en la hematopoyesis de mamíferos fue verificada durante la diferenciación de los linfocitos-T [176]. Defectos de la vía Notch en linfocitos-T se correlacionan con el desarrollo de leucemias T-ALL en ratones y humanos [177]. En este contexto, la activación de Notch es esencial en al menos 2 instancias del desarrollo de los linfocitos-T: primero, en la diferenciación de los linfocitos-T en el timo [178] y posteriormente en la maduración de los mismos una vez que éstos se liberan a la periferia [179], siendo el primer evento dependiente de ligandos, y el segundo evento independiente de ligandos. Durante la maduración de los linfocitos-T en la periferia ocurre la activación del receptor TCR, lo cual desencadena la endocitosis de Notch independiente de ligandos y su consecuente activación [176]. De esta manera, la activación de Notch tanto dependiente, como independiente de ligandos, es esencial para la correcta diferenciación y maduración de los linfocitos-T. Será interesante investigar si los mecanismos de regulación de Notch propuestos en esta tesis operan también en la diferenciación hematopoyética de los vertebrados.

4- La autofagia en la hematopoyesis de los vertebrados

La autofagia se activa por cambios en las condiciones ambientales, tales como variaciones en los niveles de oxígeno y nutrientes. Asimismo, la autofagia puede modularse por hormonas, citoquinas o factores de crecimiento, lo cual contribuye a la diferenciación o el mantenimiento de la quiescencia de las células madre hematopoyéticas. Trabajos realizados en células madre hematopoyéticas aisladas de la medula ósea de ratones, demostraron que la autofagia se encuentra activa de manera basal en estas células [180], lo cual va en línea con nuestras observaciones en células progenitoras de *Drosophila*. Se reportó que las células madre hematopoyéticas pueden inducir la autofagia en condiciones de deprivación nutricional, y que la autofagia se induce además de manera dependiente de FoxO3a, siendo esta autofagia esencial para lidiar con la escasez de nutrientes. Se sabe que las células madre hematopoyéticas tienen tiempos de vida largos, y que, a medida que envejecen, presentan menor capacidad de incorporación de nutrientes, de modo que la autofagia sería necesaria para poder mantener la homeostasis energética de las células madre hematopoyéticas.

Otro ejemplo del rol que la autofagia cumple en la hematopoyesis de los mamíferos ocurre en linfocitos-T de memoria, un subtipo de linfocitos importante en la respuesta inmune adaptiva. Los linfocitos-T de

memoria dependen de la fosforilación oxidativa para producir energía, lo cual provoca que una elevada actividad autofágica sea necesaria para mantener la homeostasis celular [181, 182], debido a la necesidad de controlar la calidad y la cantidad de las mitocondrias mediante mitofagia. Cuando se inhibe la autofagia, se acumulan mitocondrias dañadas, lo cual reduce la capacidad de realizar fosforilación oxidativa, obligando a las células a compensar con mayores niveles de glicolisis aeróbica [182]. Células inmunes que realizan preferentemente glicólisis aeróbica, como es el caso de los linfocitos-T efectores, tienden a ser menos sensibles a alteraciones de la vía autofágica. Asimismo, en células madre hematopoyéticas se ha propuesto que la autofagia es central para limitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno [183], mediante la eliminación de mitocondrias dañadas.

Por otra parte, durante la maduración de linfocitos B a plasmocitos productores de anticuerpos, se observó que la autofagia es necesaria para limitar el estrés de retículo merced a la degradación de agregados proteicos [184]. Otro caso es el de los neutrófilos que representan el tipo celular más abundante de todos los linajes hematopoyéticos terminalmente diferenciados, y se caracterizan por un ciclo de vida corto. Estas células se diferencian a partir de progenitores GMP (granulocyte–monocyte progenitors). El silenciamiento de la expresión de Atg7 en este tipo celular inhibe su diferenciación a neutrófilos, dejando que se acumulen tipos celulares inmaduros que son funcionalmente defectivos. Estos precursores de neutrófilos con la autofagia inhibida se caracterizan por la acumulación de gotas lipídicas y por entrar en crisis energética que impide la transición de glicólisis a fosforilación oxidativa [47, 185]. Se propuso entonces que la pérdida de la autofagia disminuye la liberación de los ácidos grasos presentes en las gotas lipídicas (lipofagia) [47], lo cual reduce la entrada de ácidos grasos en el ciclo del ácido cítrico. En línea con este modelo, la suplementación de ácidos grasos a estas células con autofagia inhibida y acumulación de gotas lipídicas rescata su diferenciación.

En todos estos ejemplos de linajes sanguíneos de mamíferos, el rol de la autofagia se vincula a un control sobre la homeostasis energética celular y a la disponibilidad de nutrientes. En dichos casos, los elementos a ser degradados son organelas tales como mitocondrias o gotas lipídicas, como así también agregados proteicos. En ningún caso se ha descripto que la autofagia actúe sobre moléculas específicas pertenecientes a vías señalizadoras.

5- Control de la autofagia sobre vías de señalización

Existen sin embargo ejemplos aislados en que se ha reportado que la autofagia media la degradación de moléculas de señalización. Uno de estos ejemplos lo constituye el caso de la vía Wnt [130]. En un trabajo realizado en células HEK-293T se observó que la autofagia regula negativamente a la vía, mediante la degradación de la proteína Dishevelled (Dvl). Dvl es ubiquitinado por el factor de Von Hippel–Lindau (VHL), modificación que permite su interacción con p62 (Ref2P en *Drosophila*). De esta manera, Dvl es reclutado a

los autofagosomas en formación para ser luego degradado tras la fusión del autofagosoma con lisosomas. El reclutamiento de Dvl a autofagosomas se estimula por deprivación nutricional.

Otro ejemplo de secuestro directo de moléculas dentro del autofagosoma se observa durante la ferritinofagia [131]. Trabajos realizados en cultivos celulares humanos utilizaron proteómica cuantitativa para identificar proteínas enriquecidas en autofagosomas. Encontraron así a NCOA4, que es una proteína adaptadora que puede interactuar con Atg8-LC3 para reclutar ferritina al autofagosoma, de manera que la autofagia, mediante la degradación de ferritina, contribuye a mantener una correcta disponibilidad de hierro intracelular.

Por otra parte, trabajos realizados en células de la glía de ratón demostraron que la autofagia regula la actividad del EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), mediante su interacción con la vía endocítica [186]. Es sabido que la actividad del EGFR, al igual que la de otros RTK (Receptores Tirosina Quinasa), es regulada negativamente por endocitosis. Se sabe además que la autofagia puede identificar y direccionar endosomas tempranos defectuosos hacia su degradación lisosomal. De esta manera, la inhibición de la autofagia provoca la acumulación de endosomas tempranos defectuosos, lo cual afecta el tráfico intracelular de EGFR y en consecuencia, la actividad transcripcional de la vía.

Existen por lo tanto algunos otros ejemplos en los que la autofagia, ya sea merced a la degradación directa de cargos, o mediante su interacción con el tráfico endocítico, afecta la actividad de vías de señalización intracelular.

6- La autofagia y la vía Notch en *Drosophila*

En *Drosophila* no hay estudios que analicen el rol de la autofagia en la hematopoyesis. Como ya se comentó en secciones anteriores, el único trabajo que aborda esta pregunta lo hizo de manera superficial [112]. Sin embargo, en *Drosophila* existen casos reportados donde la autofagia participa en la diferenciación de células madre de otros tipos celulares. Un ejemplo es el de las de las células madre intestinales [45], donde se reportó que la autofagia promueve la proliferación, asegurando así su mantenimiento. En este modelo, se observó que células madre que no pueden activar la autofagia sufren daño al ADN y arresto del ciclo celular [45]. Se propuso que la inhibición de la autofagia en estas células provoca la acumulación de mitocondrias defectuosas, lo cual incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno, con el consecuente daño al ADN.

Por otra parte, se ha reportado que en células foliculares del ovario de *Drosophila*, Notch se degrada de manera dependiente de la autofagia [187]. Notch participa en la comunicación entre las células germinales y las células foliculares que conforman el folículo ovárico de *Drosophila*. En este contexto, el ligando Delta expresado en las células germinales dispara la señalización de Notch que se expresa en las células foliculares,

siendo esta comunicación esencial en etapas tempranas, intermedias y tardías de la ovogénesis. En este trabajo se observó que la falta de autofagia en las células foliculares perturba la formación del huevo, siendo esta perturbación dependiente de la vía Notch. Esta evidencia reportada en el ovario abre la posibilidad de que el mecanismo propuesto en esta tesis opere de manera más general en otros tejidos de *Drosophila* además de los progenitores hematopoyéticos.

7- La autofagia y la vía Notch en vertebrados

En células humanas iniciadoras de gliomas, se reportó que la autofagia tiene la capacidad de regular a la vía Notch [188]. Se pudo verificar la presencia de Notch1 en vesículas positivas para LC3B (autofagosomas), y que la inducción de la autofagia por suplementación de rapamicina reduce los niveles de Notch en dichas organelas. Recíprocamente, la reducción de la autofagia en estas células provoca un aumento de los niveles de activación de la vía Notch y la capacidad de proliferación, la cual se sabe que depende de dicha vía. Se implantaron células iniciadoras de gliomas en cerebros de rata para medir su capacidad de inducir tumores, y 7 semanas luego de la implantación, se inyectó rapamicina de manera intraperitoneal. Las ratas inyectadas con rapamicina presentaron tumores más pequeños y mayor tasa de supervivencia que el grupo control, sugiriendo que la autofagia promueve la degradación de Notch, atenuando así la activación de la vía. Resultados similares fueron obtenidos en células progenitoras hepáticas de ratón, donde la inducción de la autofagia reduce la diferenciación de manera dependiente de la activación de Notch [189].

Por otra parte, en células humanas HEK 293, la degradación de Notch también depende de la autofagia [190], si bien en este contexto el mecanismo involucra la incorporación de Notch a vesículas positivas para Atg16L-1, y no a endosomas positivos para Rab5/Rab7, como se reportó en esta tesis. Se observó en dicho trabajo que el receptor Notch completo presente en la membrana plasmática se endocita para dar lugar a vesículas positivas para Atg16 y negativas para Atg8, siendo estas vesículas denominadas pre-autofagosomas. Los pre-autofagosomas pueden homo-fusionarse entre sí para luego comenzar a incorporar Atg8, expandirse y así formar autofagosomas maduros. En dicho modelo, Notch es entonces incorporado directamente al autofagosoma, sin pasar previamente por endosomas tempranos o tardíos. En línea con este modelo, trabajos realizados en otros cultivos celulares humanos [191] determinaron que el dominio intracelular de Notch-1 puede unirse directamente a p-62, lo cual promueve su degradación.

En esta tesis presentamos evidencias de que la degradación de Notch dependiente de la autofagia requiere de los complejos ESCRT y de la vía endocítica. Por lo tanto, en el caso de que la incorporación directa de Notch a autofagosomas a través de vesículas ATG16 ocurriera en la glándula linfática de *Drosophila*, se presume que este mecanismo debería ser minoritario, no cumpliendo un rol central en la regulación de Notch. Será interesante analizar en un futuro si el mecanismo de control de la vía Notch vía autofagia

descripto en esta tesis ocurre en mamíferos, ya sea durante la hematopoyesis o en otros contextos biológicos en que la vía Notch opera. No descartamos además la posibilidad de que otras vías de señalización, que también se valen del tráfico endocítico para regular su actividad, puedan controlarse por la autofagia.

8- Possible significancia fisiológica de la diferenciación de células cristal dependiente de autofagia

Como ya mencionamos en la introducción, la vía principal de regulación de la autofagia es la vía TOR, la cual responde a la disponibilidad de nutrientes. Existen reportes que indican que la vía TOR controla el mantenimiento y la diferenciación de las células progenitoras de la glándula linfática, si bien los mecanismos involucrados no fueron dilucidados completamente [74, 192]. Sin embargo, existen reportes en otros tejidos de *Drosophila* tales como el intestino, que sugieren que la actividad de la vía Notch es regulada por la vía TOR. En uno de dichos reportes, el control está mediado por micro-ARNs [167]; cabe mencionar que estas observaciones no excluyen la posibilidad de que la autofagia también pueda mediar la regulación de Notch por parte de la vía TOR.

¿Cuál es la significancia biológica de la regulación de la diferenciación de las células cristal por parte de la autofagia? La respuesta más simple es que a través del mecanismo propuesto, la diferenciación de células cristal podría quedar bajo el control de la disponibilidad de nutrientes. Trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio, en paralelo con esta tesis, indican que esto es lo que efectivamente ocurre. En la glándula linfática la diferenciación de células cristal depende de la disponibilidad de aminoácidos en la dieta. La disponibilidad de aminoácidos regula a la vía TOR, la cual a su vez controla la autofagia, y de esta manera a la vía Notch [96].

Estas observaciones trasladan nuestra pregunta sobre el significado fisiológico aún más lejos: ¿De qué le sirve al organismo regular la diferenciación de las células inmunológicas en función de la disponibilidad de nutrientes? Se puede especular que frente a condiciones de abundancia nutricional, esperamos un mayor crecimiento del organismo, de modo que se haría necesario producir un mayor número de células cristal para acompañar dicho crecimiento. Abonando esta hipótesis, un trabajo muy reciente reportó una nueva función de las células cristal, por fuera del rol que cumplen en la respuesta inmune [193]. Sorprendentemente, demostraron que las células cristal, tal como nuestros glóbulos rojos, tienen la capacidad de transportar oxígeno desde las terminales de las tráqueas que conducen aire desde el exterior hasta los diferentes tejidos de la mosca [193]. En base a esto, se puede especular que el control de la cantidad de células cristal dependiente de la autofagia, y por lo tanto, de la disponibilidad de nutrientes, podría explicarse por la necesidad de proveer oxígeno a un organismo cuya masa corporal aumenta en condiciones de abundancia nutricional. Nuevas funciones de las células cristal están actualmente siendo investigadas en

diversos laboratorios, de modo que la necesidad de las células cristal de responder a la disponibilidad de nutrientes podría estar relacionada con funciones de estas células que todavía desconocemos.

Conclusiones

En esta tesis hemos demostrado que la autofagia controla la diferenciación de las células progenitoras a células cristal en *Drosophila melanogaster*, desarrollando particularmente los siguientes puntos:

- Las células progenitoras de la glándula linfática presentan actividad autofágica basal elevada en comparación con otros tejidos larvales.
- Dicha autofagia está controlada por los genes clásicos de la vía autofágica y responde al ayuno.
- La inhibición de la autofagia en progenitores hematopoyéticos incrementa la cantidad de células cristal y la cantidad de proteína Notch, al igual que la actividad de la vía.
- La activación de Notch en la glándula linfática ocurre con y sin ligandos.
- La autofagia antagoniza a la vía Notch, ya sea la misma dependiente o no de ligandos.
- El tráfico de Notch a través de la vía endocítica permite su activación en endosomas al igual que su degradación en lisosomas.
- La degradación lisosomal de Notch requiere de la autofagia.
- Inhibir la autofagia provoca la acumulación de Notch en endosomas tardíos/CMV.

Bibliografía

1. Markow, T.A., *The secret lives of Drosophila flies*. Elife, 2015. **4**.
2. Fernández-Moreno, M.A., et al., *Drosophila melanogaster as a model system to study mitochondrial biology*. Methods Mol Biol, 2007. **372**: p. 33-49.
3. Greenspan, R.J., *Fly pushing : the theory and practice of Drosophila genetics*. 2nd ed ed. 2004, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Reiter, L.T., et al., *A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster*. Genome Res, 2001. **11**(6): p. 1114-25.
5. Linford, N.J., et al., *Measurement of Lifespan in Drosophila melanogaster*. JoVE, 2013(71): p. e50068.
6. *Drosophila: A Laboratory Handbook. Second Edition. By Michael Ashburner, Kent G Golic, and R Scott Hawley*. The Quarterly Review of Biology, 2005. **80**(2): p. 249-249.
7. Bainbridge Sp Fau - Bownes, M. and M. Bownes, *Staging the metamorphosis of Drosophila melanogaster*. (0022-0752 (Print)).
8. Mulakkal, N.C., et al., *Autophagy in Drosophila: from historical studies to current knowledge*. (2314-6141 (Electronic)).
9. Tomlinson, A., *Fly Assembly: The Development of Drosophila melanogaster*. Michael Bate and Alfonso Martinez Arias, Eds. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993. In two volumes. xxii, 1558 pp., illus., + atlas + poster. \$350. Science, 1994. **265**(5173): p. 819-820.
10. Ong, C., et al., *Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity*. (1743-5404 (Electronic)).
11. Fang, C., et al., *The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 8495160.
12. Pajares, M., et al., *The Role of Free Radicals in Autophagy Regulation: Implications for Ageing*. Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 2450748.
13. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. (1097-4172 (Electronic)).
14. Lőrincz, P., C. Mauvezin, and G. Juhász, *Exploring Autophagy in Drosophila*. LID - 10.3390/cells6030022 [doi] LID - 22. (2073-4409 (Print)).
15. Evangelisti, C., et al., *Autophagy in acute leukemias: a double-edged sword with important therapeutic implications*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(1): p. 14-26.
16. Auberger, P. and A. Puissant, *Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia*. Blood, 2017. **129**(5): p. 547-552.
17. White, E., J.M. Mehnert, and C.S. Chan, *Autophagy, Metabolism, and Cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2015. **21**(22): p. 5037-5046.
18. Chang, Y.Y. and T.P. Neufeld, *An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 2004-14.
19. Mizushima, N., *The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation*. Current Opinion in Cell Biology, 2010. **22**(2): p. 132-139.
20. Scott, R.C., G. Juhász, and T.P. Neufeld, *Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death*. Current Biology, 2007. **17**(1): p. 1-11.
21. Cheong, H., et al., *Atg17 Regulates the Magnitude of the Autophagic Response*. Molecular Biology of the Cell, 2005. **16**(7): p. 3438-3453.
22. Chang, Y.Y. and T.P. Neufeld, *Autophagy takes flight in Drosophila*. (1873-3468 (Electronic)).
23. Juhász, G.b., et al., *The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila*. Journal of Cell Biology, 2008. **181**(4): p. 655-666.
24. Lindmo, K., et al., *The PI 3-kinase regulator Vps15 is required for autophagic clearance of protein aggregates*. Autophagy, 2008. **4**(4): p. 500-506.
25. Sanchez-Wandelmer, J., N.T. Ktistakis, and F. Reggiori, *ERES: sites for autophagosome biogenesis and maturation?* (1477-9137 (Electronic)).
26. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 460-73.
27. Geng, J. and D.J. Klionsky, *The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series*. (1469-3178 (Electronic)).

28. Kotani, T., et al., *The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(41): p. 10363-10368.
29. Nezis, I.P., et al., *Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain*. Journal of Cell Biology, 2008. **180**(6): p. 1065-1071.
30. Jian, F., et al., *The STX17-SNAP47-VAMP7/VAMP8 complex is the default SNARE complex mediating autophagosome-lysosome fusion*. Cell Research, 2024. **34**(2): p. 151-168.
31. Takáts, S., et al., *Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila*. J Cell Biol, 2013. **201**(4): p. 531-9.
32. Rabanal-Ruiz, Y., Elsje G. Otten, and Viktor I. Korolchuk, *mTORC1 as the main gateway to autophagy*. Essays in Biochemistry, 2017. **61**(6): p. 565-584.
33. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nature Cell Biology, 2011. **13**(2): p. 132-141.
34. Kroemer, G., G. Mariño, and B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. Molecular cell, 2010. **40**(2): p. 280-293.
35. Gerónimo-Olvera, C. and L. Massieu, *Autophagy as a Homeostatic Mechanism in Response to Stress Conditions in the Central Nervous System*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(9): p. 6594-6608.
36. Galati, S., et al., *Autophagy: A Player in response to Oxidative Stress and DNA Damage*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p. 1-12.
37. Vázquez, P., et al., *Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells*. Autophagy, 2012. **8**(2): p. 187-99.
38. Zhang, J., et al., *FRS2α-mediated FGF signals suppress premature differentiation of cardiac stem cells through regulating autophagy activity*. Circ Res, 2012. **110**(4): p. e29-39.
39. Wang, S., et al., *Autophagy-related gene Atg5 is essential for astrocyte differentiation in the developing mouse cortex*. EMBO Rep, 2014. **15**(10): p. 1053-61.
40. Chen, X., Y. He, and F. Lu, *Autophagy in Stem Cell Biology: A Perspective on Stem Cell Self-Renewal and Differentiation*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 9131397.
41. Bankston, A.N., et al., *Autophagy is essential for oligodendrocyte differentiation, survival, and proper myelination*. Glia, 2019. **67**(9): p. 1745-1759.
42. Varga, V.B., et al., *Autophagy is required for spermatogonial differentiation in the Drosophila testis*. Biol Futur, 2022. **73**(2): p. 187-204.
43. Tan, J.Y.K., et al., *Interplay between autophagy and CncC regulates dendrite pruning in Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2024. **121**(10): p. e2310740121.
44. García-Prat, L., P. Sousa-Victor, and P. Muñoz-Cánores, *Proteostatic and Metabolic Control of Stemness*. Cell Stem Cell, 2017. **20**(5): p. 593-608.
45. Nagy, P., G.O. Sándor, and G. Juhász, *Autophagy maintains stem cells and intestinal homeostasis in Drosophila*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 4644.
46. Jacquel, A., et al., *Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions*. Blood, 2012. **119**(19): p. 4527-31.
47. Riffelmacher, T., et al., *Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation*. Immunity, 2017. **47**(3): p. 466-480.e5.
48. Riffelmacher, T., F.C. Richter, and A.K. Simon, *Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells*. Autophagy, 2018. **14**(2): p. 199-206.
49. Menshikov, M., et al., *Autophagy, Mesenchymal Stem Cell Differentiation, and Secretion*. Biomedicines, 2021. **9**(9).
50. Metur, S.P. and D.J. Klionsky, *Adaptive immunity at the crossroads of autophagy and metabolism*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(5): p. 1096-1105.
51. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. LID - 10.1101/cshperspect.a008250 [doi] LID - a008250. (1943-0264 (Electronic)).

52. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. (1097-4172 (Electronic)).
53. Clarke, C.J. and T.L. Holyoake, *Preclinical approaches in chronic myeloid leukemia: from cells to systems*. *Exp Hematol*, 2017. **47**: p. 13-23.
54. Porter, A.H., et al., *Acute myeloid leukemia stem cell function is preserved in the absence of autophagy*. *Haematologica*, 2017. **102**(9): p. e344-e347.
55. Ghabrial, A., et al., *Branching morphogenesis of the Drosophila tracheal system*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003. **19**: p. 623-47.
56. Troha, K. and N. Buchon, *Methods for the study of innate immunity in Drosophila melanogaster*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2019. **8**(5): p. e344.
57. Evans, C.J., T. Liu, and U. Banerjee, *Drosophila hematopoiesis: Markers and methods for molecular genetic analysis*. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2014. **68**(1): p. 242-251.
58. Yu, S., F. Luo, and L.H. Jin, *The Drosophila lymph gland is an ideal model for studying hematopoiesis*. *Dev Comp Immunol*, 2018. **83**: p. 60-69.
59. Tepass, U., et al., *Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila*. (0950-1991 (Print)).
60. Woodcock Kj Fau - Kierdorf, K., et al., *Macrophage-derived upd3 cytokine causes impaired glucose homeostasis and reduced lifespan in Drosophila fed a lipid-rich diet*. (1097-4180 (Electronic)).
61. Ayyaz, A., H. Li, and H. Jasper, *Haemocytes control stem cell activity in the Drosophila intestine*. (1476-4679 (Electronic)).
62. Eleftherianos, I. and C. Revenis, *Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis*. (1662-8128 (Electronic)).
63. Bidla, G., U. Dushay Ms Fau - Theopold, and U. Theopold, *Crystal cell rupture after injury in Drosophila requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger*. (0021-9533 (Print)).
64. Rizki Tm Fau - Rizki, R.M., R.A. Rizki Rm Fau - Bellotti, and R.A. Bellotti, *Genetics of a Drosophila phenoloxidase*. (0026-8925 (Print)).
65. Evans, C.J., V. Hartenstein, and U. Banerjee, *Thicker Than Blood: Conserved Mechanisms in Drosophila and Vertebrate Hematopoiesis*. *Developmental Cell*, 2003. **5**(5): p. 673-690.
66. Holz, A., et al., *The two origins of hemocytes in Drosophila*. (0950-1991 (Print)).
67. Makhijani, K., et al., *The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the Drosophila larva*. (1477-9129 (Electronic)).
68. Mandal, L., et al., *A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila haematopoietic precursors*. *Nature*, 2007. **446**(7133): p. 320-4.
69. Evans, C.J., et al., *Genetic Dissection of Hematopoiesis Using Drosophila as a Model System*, in *Advances in Developmental Biology*. 2007, Elsevier. p. 259-299.
70. Jung, S.H., et al., *The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis*. *Development*, 2005. **132**(11): p. 2521-33.
71. Mondal, Bama C., et al., *Interaction between Differentiating Cell- and Niche-Derived Signals in Hematopoietic Progenitor Maintenance*. *Cell*, 2011. **147**(7): p. 1589-1600.
72. Rodrigues, D., et al., *Differential activation of JAK-STAT signaling reveals functional compartmentalization in Drosophila blood progenitors*. *eLife*, 2021. **10**: p. e61409.
73. Evans, C.J., T. Liu, and U. Banerjee, *Drosophila hematopoiesis: Markers and methods for molecular genetic analysis*. *Methods*, 2014. **68**(1): p. 242-251.
74. Benmimoun, B., et al., *Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in Drosophila*. *Development*, 2012. **139**(10): p. 1713-7.
75. Ferguson, G.B. and J.A. Martinez-Agosto, *The TEAD family transcription factor Scalloped regulates blood progenitor maintenance and proliferation in Drosophila through PDGF/VEGFR receptor (Pvr) signaling*. (1095-564X (Electronic)).
76. Blanco-Obregon, D., et al., *Context-specific functions of Notch in Drosophila blood cell progenitors*. *Dev Biol*, 2020. **462**(1): p. 101-115.

77. Kurucz, E., et al., *Definition of Drosophila hemocyte subsets by cell-type specific antigens*. (0236-5383 (Print)).
78. Lebestky, T., et al., *Specification of Drosophila Hematopoietic Lineage by Conserved Transcription Factors*. *Science*, 2000. **288**(5463): p. 146-149.
79. Mukherjee, T., et al., *Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of Drosophila blood cells*. *Science*, 2011. **332**(6034): p. 1210-3.
80. Grigorian, M., L. Mandal, and V. Hartenstein, *Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the Drosophila lymph gland*. *Development Genes and Evolution*, 2011. **221**(3): p. 121-131.
81. Lebestky, T., et al., *Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors*. *Science*, 2000. **288**(5463): p. 146-9.
82. Lebestky, T., S.-H. Jung, and U. Banerjee, *A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis*. *Genes & development*, 2003. **17**(3): p. 348-353.
83. Terriente-Felix, A., et al., *Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme*. *Development*, 2013. **140**(4): p. 926.
84. Blanco-Obregon, D., et al., *Context-specific functions of Notch in Drosophila blood cell progenitors*. *Developmental Biology*, 2020. **462**(1): p. 101-115.
85. Ferguson, G.B. and J.A. Martinez-Agosto, *Kicking it up a Notch for the best in show: Scalloped leads Yorkie into the haematopoietic arena*. *Fly (Austin)*, 2014. **8**(4): p. 206-17.
86. Chillakuri, C.R., et al., *Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies*. *Semin Cell Dev Biol*, 2012. **23**(4): p. 421-8.
87. D'Souza, B., L. Meloty-Kapella, and G. Weinmaster, *Canonical and non-canonical Notch ligands*. *Current topics in developmental biology*, 2010. **92**: p. 73-129.
88. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. *The EMBO Journal*, 2011. **30**(17): p. 3481-3500-3500.
89. Vaccari, T., et al., *Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(4): p. 755-62.
90. Steinbuck, M.P. and S. Winandy, *A Review of Notch Processing With New Insights Into Ligand-Independent Notch Signaling in T-Cells*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1230.
91. Schnute, B., T. Troost, and T. Klein, *Endocytic Trafficking of the Notch Receptor*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1066**: p. 99-122.
92. Chapman, G., et al., *Notch1 endocytosis is induced by ligand and is required for signal transduction*. (0006-3002 (Print)).
93. Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I*. *Cell*, 2001. **106**(2): p. 145-155.
94. Hurley, J.H., *ESCRTs are everywhere*. *The EMBO Journal*, 2015. **34**(19): p. 2398-2407.
95. Jia, L., et al., *Lysosome-dependent degradation of Notch3*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009. **41**(12): p. 2594-2598.
96. Katz, M.J., et al., *Autophagy controls differentiation of Drosophila blood cells by regulating Notch levels in response to nutrient availability*. *bioRxiv*, 2024: p. 2024.06.25.600418.
97. Chyb, S. and N. Gompel, *Wild-type morphology*, in *Atlas of Drosophila Morphology*, S. Chyb and N. Gompel, Editors. 2013, Academic Press: San Diego. p. 1-23.
98. Zurovec, M., *Book review: Chyb S. & Gompel N. 2013: The Atlas of Drosophila Morphology: Wild-type and Classical Mutants*. *European Journal of Entomology*, 2014. **111**.
99. Roote, J. and A. Prokop, *How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for Drosophila Genetics*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2013. **3**(2): p. 353-358.
100. Chyb, S. and N. Gompel, *Balancer chromosomes*, in *Atlas of Drosophila Morphology*, S. Chyb and N. Gompel, Editors. 2013, Academic Press: San Diego. p. 183-208.
101. Chyb, S. and N. Gompel, *Wing markers*, in *Atlas of Drosophila Morphology*, S. Chyb and N. Gompel, Editors. 2013, Academic Press: San Diego. p. 57-87.

102. Müller, H.M., et al., *A hemocyte-like cell line established from the malaria vector Anopheles gambiae expresses six prophenoloxidase genes*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11727-35.
103. Scott, R.C., O. Schuldiner, and T.P. Neufeld, *Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body*. Developmental cell, 2004. **7**(2): p. 167-178.
104. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
105. Kakidani, H. and M. Ptashne, *GAL4 activates gene expression in mammalian cells*. Cell, 1988. **52**(2): p. 161-167.
106. Webster, N., et al., *The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator*. Cell, 1988. **52**(2): p. 169-78.
107. Goins, L.M., et al., *Wnt signaling couples G2 phase control with differentiation during hematopoiesis in Drosophila*. Developmental Cell, 2024.
108. Kennerdell, J.R. and R.W. Carthew, *Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(8): p. 896-8.
109. Hegedűs, K., et al., *The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy*. Molecular biology of the cell, 2016. **27**(20): p. 3132-3142.
110. Geng, J. and D.J. Klionsky, *The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series*. EMBO reports, 2008. **9**(9): p. 859-864.
111. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
112. Shravage, B.V., et al., *Atg6 is required for multiple vesicle trafficking pathways and hematopoiesis in Drosophila*. Development, 2013. **140**(6): p. 1321-1329.
113. Cho, D.-H., et al., *Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells*. Cancer Letters, 2009. **274**(1): p. 95-100.
114. Thoresen, S.B., et al., *A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic*. Experimental Cell Research, 2010. **316**(20): p. 3368-3378.
115. Hegedűs, K., et al., *The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(20): p. 3132-3142.
116. Neufeld, T.P., *TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 157-68.
117. Scott, R.C., T.P. Juhász G Fau - Neufeld, and T.P. Neufeld, *Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death*. (0960-9822 (Print)).
118. Devereaux, K., et al., *Regulation of Mammalian Autophagy by Class II and III PI 3-Kinases through PI3P Synthesis*. PLOS ONE, 2013. **8**(10): p. e76405.
119. Gajewski, K.M., et al., *Identification of a crystal cell-specific enhancer of the black cells prophenoloxidase gene in drosophila*. genesis, 2007. **45**(4): p. 200-207.
120. Banerjee, U., et al., *Drosophila as a Genetic Model for Hematopoiesis*. Genetics, 2019. **211**(2): p. 367-417.
121. Crozatier, M., et al., *Cellular Immune Response to Parasitization in Drosophila Requires the EBF Orthologue Collier*. PLOS Biology, 2004. **2**(8): p. e196.
122. Duvic, B., et al., *Notch signaling controls lineage specification during Drosophila larval hematopoiesis*. Curr Biol, 2002. **12**(22): p. 1923-7.
123. Miller, M., et al., *Control of RUNX-induced repression of Notch signaling by MLF and its partner DnaJ-1 during Drosophila hematopoiesis*. PLOS Genetics, 2017. **13**(7): p. e1006932.
124. Ferguson, G.B. and J.A. Martinez-Agosto, *Kicking it up a Notch for the best in show: Scalloped leads Yorkie into the haematopoietic arena*. Fly, 2014. **8**(4): p. 206-217.
125. Matsuno, K., et al., *Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats*. Development, 1995. **121**(8): p. 2633-44.

126. Hori, K., et al., *Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling*. Development, 2004. **131**(22): p. 5527-37.
127. Shimizu, H., et al., *Alternative mechanisms of Notch activation by partitioning into distinct endosomal domains*. Journal of Cell Biology, 2024. **223**(5): p. e202211041.
128. Fostier, M., et al., *Genetic characterization of the Drosophila melanogaster Suppressor of deltex gene: A regulator of notch signaling*. Genetics, 1998. **150**(4): p. 1477-85.
129. Cornell, M., et al., *The Drosophila melanogaster Suppressor of deltex gene, a regulator of the Notch receptor signaling pathway, is an E3 class ubiquitin ligase*. Genetics, 1999. **152**(2): p. 567-76.
130. Gao, C., et al., *Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation*. Nature Cell Biology, 2010. **12**(8): p. 781-790.
131. Mancias, J.D., et al., *Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy*. Nature, 2014. **509**(7498): p. 105-109.
132. Simpson, J.E., et al., *Autophagy supports PDGFRA-dependent brain tumor development by enhancing oncogenic signaling*. Developmental Cell, 2024. **59**(2): p. 228-243.e7.
133. Rodrigues, D., et al., *Differential activation of JAK-STAT signaling reveals functional compartmentalization in Drosophila blood progenitors*. Elife, 2021. **10**.
134. Couturier, L., et al., *Regulation of Notch output dynamics via specific E(spl)-HLH factors during bristle patterning in Drosophila*. Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 3486.
135. Hounjet, J. and M. Vooijs, *The Role of Intracellular Trafficking of Notch Receptors in Ligand-Independent Notch Activation*. Biomolecules, 2021. **11**(9).
136. Le Borgne, R., A. Bardin, and F.o. Schweiguth, *The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling*. Development, 2005. **132**(8): p. 1751-1762.
137. van der Bliek, A.M. and E.M. Meyerowitz, *Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 411-414.
138. Lloyd, T.E., et al., *Hrs Regulates Endosome Membrane Invagination and Tyrosine Kinase Receptor Signaling in Drosophila*. Cell, 2002. **108**(2): p. 261-269.
139. Bucci, C., et al., *The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway*. Cell, 1992. **70**(5): p. 715-728.
140. Williams, R.L. and S. Urbé, *The emerging shape of the ESCRT machinery*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(5): p. 355-368.
141. Vietri, M., M. Radulovic, and H. Stenmark, *The many functions of ESCRTs*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020. **21**(1): p. 25-42.
142. Berg, T.O., et al., *Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21883-92.
143. Zhao, Y.G., P. Codogno, and H. Zhang, *Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021. **22**(11): p. 733-750.
144. Filimonenko, M., et al., *Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease*. Journal of Cell Biology, 2007. **179**(3): p. 485-500.
145. Razi, M., E.Y.W. Chan, and S.A. Tooze, *Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy*. Journal of Cell Biology, 2009. **185**(2): p. 305-321.
146. Wang, T., et al., *Rab7: Role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic*. Cellular Signalling, 2011. **23**(3): p. 516-521.
147. Poteryaev, D., et al., *Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition*. Cell, 2010. **141**(3): p. 497-508.
148. Rusten, T.E., et al., *Fab1 phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase controls trafficking but not silencing of endocytosed receptors*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(9): p. 3989-4001.
149. Itakura, E., C. Kishi-Itakura, and N. Mizushima, *The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes*. Cell, 2012. **151**(6): p. 1256-69.
150. Behnia, R. and S. Munro, *Organelle identity and the signposts for membrane traffic*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 597-604.

151. Dunst, S., et al., *Endogenously Tagged Rab Proteins: A Resource to Study Membrane Trafficking in Drosophila*. *Developmental Cell*, 2015. **33**(3): p. 351-365.
152. Akbar, M.A., S. Ray, and H. Krämer, *The SM Protein Car/Vps33A Regulates SNARE-mediated Trafficking to Lysosomes and Lysosome-related Organelles*. *Molecular Biology of the Cell*, 2009. **20**(6): p. 1705-1714.
153. Schneider, M., et al., *Activation of Notch in *lgl* mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 2): p. 645-56.
154. Johnson, S.A., D. Zitserman, and F. Roegiers, *Numb regulates the balance between Notch recycling and late-endosome targeting in *Drosophila* neural progenitor cells*. *Mol Biol Cell*, 2016. **27**(18): p. 2857-66.
155. Austin, J. and J. Kimble, *Transcript analysis of *glp-1* and *lin-12*, homologous genes required for cell interactions during development of *C. elegans**. (0092-8674 (Print)).
156. Coffman, C., C. Harris W Fau - Kintner, and C. Kintner, *Xotch, the Xenopus homolog of *Drosophila notch**. (0036-8075 (Print)).
157. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. (1097-4172 (Electronic)).
158. Moloney, D.J., et al., *Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch*. (0028-0836 (Print)).
159. Yamada, K., et al., *Roles of *Drosophila* *deltex* in Notch receptor endocytic trafficking and activation*. *Genes Cells*, 2011. **16**(3): p. 261-72.
160. Zheng, L. and S.A.-O. Conner, *PI5P4K γ functions in DTX1-mediated Notch signaling*. (1091-6490 (Electronic)).
161. Jung, J.-G., et al., *Notch3 Interactome Analysis Identified WWP2 as a Negative Regulator of Notch3 Signaling in Ovarian Cancer*. *PLOS Genetics*, 2014. **10**(10): p. e1004751.
162. Ho, K.Y.L., et al., *Kinetics of blood cell differentiation during hematopoiesis revealed by quantitative long-term live imaging*. *eLife*, 2023. **12**: p. e84085.
163. Stier, S., et al., *Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome*. *Blood*, 2002. **99**(7): p. 2369-78.
164. Burns, C.E., et al., *Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway*. *Genes Dev*, 2005. **19**(19): p. 2331-42.
165. Lee, D., et al., *ER71 Acts Downstream of BMP, Notch, and Wnt Signaling in Blood and Vessel Progenitor Specification*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(5): p. 497-507.
166. Mercher, T., et al., *Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 314-26.
167. Wang, L., et al., *Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF- κ B-dependent manner*. *Cell Stem Cell*, 2014. **15**(1): p. 51-65.
168. Suresh, S. and A.E. Irvine, *The NOTCH signaling pathway in normal and malignant blood cell production*. *J Cell Commun Signal*, 2015. **9**(1): p. 5-13.
169. Kushwah, R., et al., *Pleiotropic roles of Notch signaling in normal, malignant, and developmental hematopoiesis in the human*. *EMBO Rep*, 2014. **15**(11): p. 1128-38.
170. Láinez-González, D., J. Serrano-López, and J.M. Alonso-Dominguez, *Understanding the Notch Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: From Hematopoiesis to Neoplasia*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(6).
171. Weng, A.P., et al., *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia*. (1095-9203 (Electronic)).
172. Rosati, E., et al., *Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells*. (1528-0020 (Electronic)).
173. Mercher, T., et al., *The OTT-MAL fusion oncogene activates RBPJ-mediated transcription and induces acute megakaryoblastic leukemia in a knockin mouse model*. (1558-8238 (Electronic)).
174. Zweidler-McKay, P.A., et al., *Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies*. (0006-4971 (Print)).

175. Klinakis, A., et al., *A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia*. (1476-4687 (Electronic)).
176. Steinbuck, M.P., K. Arakcheeva, and S.A.-O. Winandy, *Novel TCR-Mediated Mechanisms of Notch Activation and Signaling*. (1550-6606 (Electronic)).
177. Pear, W.S., et al., *Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles*. (0022-1007 (Print)).
178. Pui, J.C., et al., *Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination*. (1074-7613 (Print)).
179. Amsen, D., C. Helbig, and R.A. Backer, *Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered*. (1471-4981 (Electronic)).
180. Warr, M.R., et al., *FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells*. *Nature*, 2013. **494**(7437): p. 323-7.
181. Puleston, D.J., et al., *Autophagy is a critical regulator of memory CD8(+) T cell formation*. *LID - 10.7554/eLife.03706 [doi] LID - e03706*. (2050-084X (Electronic)).
182. Clarke, A.J. and A.K. Simon, *Autophagy in the renewal, differentiation and homeostasis of immune cells*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(3): p. 170-183.
183. Jensen, K.S., et al., *FoxO3A promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function*. *Embo j*, 2011. **30**(22): p. 4554-70.
184. Pengo, N., et al., *Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production*. *Nature Immunology*, 2013. **14**(3): p. 298-305.
185. Suda, T., K. Takubo, and G.L. Semenza, *Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche*. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(4): p. 298-310.
186. Fraser, J., et al., *Targeting of early endosomes by autophagy facilitates EGFR recycling and signalling*. (1469-3178 (Electronic)).
187. Barth, J.M.I., E. Hafen, and K. Köhler, *The lack of autophagy triggers precocious activation of Notch signaling during Drosophila oogenesis*. *BMC Developmental Biology*, 2012. **12**(1): p. 35.
188. Tao, Z., et al., *Autophagy suppresses self-renewal ability and tumorigenicity of glioma-initiating cells and promotes Notch1 degradation*. (2041-4889 (Electronic)).
189. Zeng, J., et al., *Autophagy regulates biliary differentiation of hepatic progenitor cells through Notch1 signalling pathway*. (1551-4005 (Electronic)).
190. Wu, X., et al., *Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10533.
191. Zhang, T., et al., *Macroautophagy Regulates Nuclear NOTCH1 Activity Through Multiple p62 Binding Sites*. *IUBMB Life*, 2018. **70**(10): p. 985-994.
192. Dragojlovic-Munther, M. and J.A. Martinez-Agosto, *Multifaceted roles of PTEN and TSC orchestrate growth and differentiation of Drosophila blood progenitors*. *Development*, 2012. **139**(20): p. 3752-63.
193. Shin, M., et al., *Drosophila immune cells transport oxygen through PPO2 protein phase transition*. *Nature*, 2024.