



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Análisis de las diferencias entre células progenitoras y no progenitoras en el sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*

V. Beatriz Pino

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



V. Beatriz Pino Jiménez

Tesis Doctoral 2022



Análisis de las diferencias entre células  
progenitoras y no progenitoras en el sistema traqueal  
de *Drosophila melanogaster*

Tesis Doctoral

V. Beatriz Pino Jiménez

Mayo 2022



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística  
Programa de Doctorado de Genética  
Facultad de Biología  
Universidad de Barcelona (UB)

**“Análisis de las diferencias entre células progenitoras y no  
progenitoras en el sistema traqueal de  
*Drosophila melanogaster*”**

Memoria presentada por  
**V. Beatriz Pino**

Para optar al Grado de  
Doctor por la Universidad de Barcelona

Tesis dirigida por  
**Jordi Casanova i Roca**  
**Panagiotis Giannios**

**Directores**

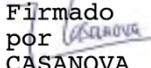
Jordi Casanova i Roca  
Panagiotis Giannios

**Autora**

V. Beatriz Pino

**Tutor**

Florenci Serras

Firmado  
por   
CASANOVA



Barcelona, Mayo 2022

**Imagen de portada y contrapostada:** Proyección de Tronco Dorsal de último estadio de larva de fenotipo WT, marcado con DAPI (azul), anti Disc Large (rojo) y anti dp62 (amarillo).



Este proyecto de Tesis doctoral fue realizado bajo la supervisión del Dr. Jordi Casanova i Roca y del Dr. Panagiotis Giannios, en el laboratorio de Desarrollo y morfogénesis en *Drosophila*, del programa de Envejecimiento y Metabolismo del Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB) y Departamento de Desarrollo del Instituto de Biología molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

La autora de la tesis ha sido becada por el programa FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación.



*"Puede que sea al final de una jornada de trabajo... O en el laboratorio, después de haberte pasado años analizando datos, pero llega un momento en el que descubres algo, ves algo, o de repente algo adquiere sentido y te das cuenta de que sabes algo que aún no sabe nadie más en el mundo entero. Solo tú. Nadie más. Y te das cuenta de que eso es lo único que importa y de que lo conservarás durante poco tiempo antes de que se lo cuentes a otra persona, pero durante ese tiempo te sientes más vivo que nunca. Ese es el motivo. Por eso hacemos esto, aguantamos los sueldos bajos y los riesgos altos, las condiciones indignas. Lo hacemos por ese momento".*

Aleta. Christopher Moore. (A través del tiempo y del espacio)

*If our ignorance is infinite, the only possible course of action is to muddle through as best we can. (...) What makes it difficult is that research is immersion in the unknown. We just don't know what we're doing. We can't be sure whether we're asking the right question or doing the right experiment until we get the answer or the result (...) The more comfortable we become with being stupid, the deeper we will wade into the unknown and the more likely we are to make big discoveries.*

Schwartz M. A. (2008). The importance of stupidity in scientific research. *Journal of cell science*





## Agradecimientos

Cuando llegué a Barcelona para hacer un doctorado, yo pensaba que el objetivo principal era convertirme en científica. Quería hacer muchas preguntas y encontrar las respuestas. Cinco años después, me doy cuenta de que ha sido mucho más. He hecho muchas preguntas, y he aprendido que no todo tiene respuesta. He aprendido sobre ciencia, pero también sobre muchas otras cosas, porque como dice mi codirector “la ciencia es como la vida”, y como dice uno de mis mejores amigos “el doctorado sirve para aprender a gestionar la frustración y resolver problemas”. Me he enfrentado a muchas cosas durante este tiempo, pero estoy segura de que mucho de lo que he conseguido ha sido gracias a las personas increíbles que me han rodeado, que me han hecho crecer y me han enseñado tanto. Me siento tan inmensamente agradecida y afortunada por todos ellos que no sé si podría expresarlo con palabras, voy a intentarlo.

En primer lugar, he tenido la suerte inmensa de contar con Jordi Casanova, mi jefe, por haber sido el mejor jefe que podría tener para una aventura como esta. Valoro muchísimo toda la libertad y confianza que nos ofrece, y todos los sabios consejos que me ha dado a lo largo de estos años. Ha sido paciente, comprensivo, siempre dispuesto a dar ideas, ayudarme y apoyarme a todos los niveles. No lo he llamado amigo porque lo llamo jefe (y no sé si voy a poder cambiar eso a estas alturas) pero espero que en la forma que sea siga presente en mi vida mucho tiempo.

Tengo mucho que agradecer también a Panos, mi otro referente, por todo. Por ser mi principal soporte en el lab, por explicarme tantas cosas, aunque fuera mediante metáforas incomprensibles. Por la sonrisa que pones a veces cuando me acerco a preguntarte y soportar con paciencia mis miles de preguntas, las científicas y las filosóficas. Porque durante estos 5 años he aprendido casi todo de ti, y también he aprendido a distinguir lo que hay que aprender y lo que no. Gracias por hacerme crecer.

A mis padres, por confiar en mí siempre y así darme alas, por animarme en cada paso que me hiciera feliz y no dudar jamás. Por cuidarme, protegerme y quererme tanto. Por los mensajes de buenos días que me encuentro siempre al despertar y me hacen empezar el día sonriendo y llena de amor. Por celebrar cada pequeño logro como si fuera vuestro y como si fuera una montaña.

A Arturo, por hacerme sentir hermana mayor.

A Dani, que fue mi primer amigo en Barcelona y lo ha sido todos los días. Por ese sexto sentido para saber a distancia cuando lo necesito. A Dani, por "quién te dijo que fuera a ser fácil niña? Pero has llegado hasta aquí y llegarás más lejos" Por empujarme a pesar de mí misma. Por creer tanto en mí, incluso cuando no creía yo. A Javi, por entrar a nuestras vidas y hacerme mejor. Por todos los consejos y las lecciones. A ambos por ser inteligentes, divertidos y tan buenos amigos, porque nunca olvidaré como me salvasteis de mí misma, por todo el cariño, las carcajadas hasta llorar, por reírnos de todo, y sobre todo de nosotrxs mismxs. Por cuidar tanto de mí, por apoyarme y protegerme. No sé cómo agradecer todo lo que hacéis por mí. Sois increíbles y contar con vosotros me llena de alegría.

A los chicos, Josep, Manu y Marcos, por todo el apoyo, las fiestas planeadas y las improvisadas, por los “minutos de gloria” compartidos, las risas y los planes.

A Ettore, por ser uno de mis pilares, por saber mi estado de ánimo solo por como suenan mis pasos, y alegrarse conmigo o consolarme cada día que hemos compartido. Por ser justo, inteligente, comprensivo, divertido y leal, y porque es verdad, siempre tienes razón, y si más gente fuera como tú el mundo sería mejor. Te quiero tanto por cómo te enfadas cuando dudo. Por todas las risas detrás de las puertas y todos los secretos misteriosos. No te librarás de mí nunca.

A Elena, por todos los momentos juntas y por las canciones que te inventabas sobre nuestras aventuras. Te he echado de menos. A Anni, aunque no te lo creas, por las pesadillas. Por estar siempre dispuesta a ayudar, por las conversaciones de chicas con la "mamma". A Fleur, por ser siempre amable y comprensiva. A Nico, por ser el responsable de que sigamos vivos en el lab, por su paciencia y por las risas. A Nat, por ser la persona más eficiente del universo, por escucharme, por los consejos. No sé qué sería del lab sin ti. A Marc, por ser genial. Por explicarme tantas cosas y por hacerme tantas preguntas. Por los suspiros compartidos y las conversaciones en catalán. Siempre le diré a cualquiera que me pregunte que lo he aprendido de ti. A Bea, por ser una tía genial, por ser “como yo con 5 años más”, y ayudarme tanto cuando llegué. Recuerdo con mucho cariño todo lo que me enseñaste en tan poco tiempo. A las chicas de Milán y Jiménez, por ser siempre amables, por el tiempo compartido entre moscas.

A Delia, porque te agradezco tanto, por tantos momentos, por estar a mi lado, por tus palabras diarias, por los "todo va a ir bien" mutuos, por tu alegría permanente. Eres inspiración, y ha sido una suerte compartir tiempo contigo. A Bitarka, por todas las carcajadas, las confidencias, por traerme comida y dejarme siempre probar de la tuya. A Lluisa, Xavi, David, Silvia y Pepi, por sus siempre magníficos consejos, comentarios y recomendaciones. A Sofía y Florenci, por el apoyo y los consejos. A Marta, por ser ejemplo.

A Silvia por ser siempre tan linda, tan amable y divertida, por las conversaciones y las risas en los pasillos, por preocuparte por mí con tanto amor, por el cariño que le pones a la vida, por entender mi estado de ánimo a 20 metros de distancia.

A todo el equipo de la facility de microscopía, pero especialmente a Lidia y Anna, por el soporte técnico, pero sobre todo por las risas, y a Seb, por ayudarme siempre, pero sobre todo por darme mil soluciones cuando yo sólo iba a quejarme.

A Kat, por las nuevas amigas. A Pablo, por toda la diversión. A Mercedes, por las conversaciones de horas sobre libros mientras cuidábamos moscas, por los ánimos, por los consejos.

A Israel, por los ánimos mutuos, por desahogarnos en los cinco minutos de un piti al sol, por encontrar siempre tiempo para ayudarme. Por ese "yo no sé cómo eres como científica, pero se cómo eres como persona y con eso me basta". A él y a María, por toda la ayuda y los buenos consejos.

A mis chicas, por haber crecido juntas y querernos igual, incluso más a través del tiempo y las diferencias, por estar a mi lado siempre, por hacerme sentir la libertad de ser yo tal cual y no juzgarme nunca, por quererme tanto en mis momentos de duda, y Paloma y su "pero bea tú te crees que yo te quiero por ser científica? En todo caso te quiero a pesar de eso". A Inma por las aventuras compartidas y por darme una niña preciosa más a quien querer, a Rak y Noa por construir juntas un refugio, a Sandra por conocerme y saber siempre lo que necesito para verme bien, por repetirme mil veces el color adecuado. A Mari, por ser luz en el camino, por abrirme nuevos mundos que ni hubiera imaginado, por ser guía y refugio, por escucharme con paciencia y amor infinito, te doy 237486 puntos extra de amor. A todas, ojalá dure como mínimo otros 30 años, ojalá sigamos siempre creciendo juntas.

A Bea, por todos los momentos compartidos en la habitación de al lado y a miles de kilómetros, porque hablar contigo es fácil, como si nos siguiéramos contando las cosas en el mismo sofá, y es encontrar siempre comprensión, ánimos y diversión. Te quiero y te admiro por ser valiente, fuerte, inteligente y divertida. Que suerte fue encontrarte en la vida, amiga.

A las chicas de telas, por crear juntas un espacio de empatía, diversión y apoyo, donde sentirme cómoda, acogida y acompañada. Empecé para divertirme, pero no esperaba encontrar tan buenas personas y buenas amigas. Es más fácil subir a 4 metros, o donde sea, con vosotrxs animándome. El tiempo con vosotrxs me llena de energía.

Me siento llena de gratitud también por contar en la vida con alguien como mi compi. Por ser ejemplo, inspiración, roca y refugio, por ser el hermano mayor que elegí, por escucharme siempre sin el más mínimo juicio, por entendernos tan bien, por darme consejos y recordarme los que antes te di yo si se me olvidan. Por ser especial, y la única persona que conozco que disfruta al mismo nivel que yo de las pequeñas cosas de la vida. Por acabar nuestras conversaciones con ese "que suerte tenemos de tenernos el uno al otro". Es una suerte inmensa, y ojalá algún día volvamos a compartir pasillo, Dr. Polonio.

A Julio y Flo, por ser junto con mi compi de lo mejor que saqué del Máster, por las tardes de buceo y las conversaciones hasta las 7 de la mañana sobre cómo funciona el universo, cómo cambiar el mundo y como hacernos ricos.

A Eugeni, por ese verano del FP que se transformó en buenos amigos y añadió a Vero, a Vero, a Luis por la calma, a Sila, a Pepe y Martina, por todos los momentos en Sarriá y "homeless", a Tere, por querernos a través de las diferencias, a Joaquín y Silvia, a Vane y a Marina, mis andaluzas aquí, por querernos a mí y a Irka, por el apoyo y las risas y las conversaciones, por haber compartido casa y vida. Todos me habéis ayudado también a crecer.

A Marc, por todas las cosas que viste en mí, y por los buenos momentos compartidos. A Montse y Vicky, por hacerme sentir parte de su familia.

A los vigilantes del IRB, que me abrían la puerta a cualquier hora de la noche con una broma y me hacían entrar ya sonriendo, a María y el equipo de la cafetería que me servía raciones extragrandes de comida, y a las limpiadoras, cuyo trabajo nos permite hacer el nuestro, y que me ayudaban a encontrar las cosas que perdía por todas partes.

A Irka, por estar, siempre. Por esperarme en la puerta cuando llegaba a las tantas. Por acercarse en cuanto me oye suspirar. Por darme besos cuando lloraba de frustración, y por saltar de alegría cuando me río. Por ser el mayor ejemplo de amor incondicional que existe sobre la tierra.

A todos porque me habéis animado cuando yo no podía, pero sobre todo habéis celebrado mis triunfos también, y ver tu alegría en sonrisas ajenas es una de las mejores cosas del mundo. A todos los que se han preocupado por mí, y me han cuidado y han creído en mí todos los días que yo no era capaz de hacerlo, hasta que al final lo han conseguido. A veces no me puedo creer lo afortunada que soy por contar con gente así a mi alrededor.

Y por último, también me lo agradezco a mí. Por cada día, y noche, y fines de semana y madrugadas pasados en el lab, o pensando, o leyendo. Por los papers leídos en la playa, en la cama, en aviones. Por construir esto con ganas y a pesar del miedo. Por las veces que lo he hecho con miedo, con todo el cuerpo temblando, pero lo he hecho igual. Por no rendirme nunca, a pesar del cansancio y la frustración, y los "esto no funciona" y "esto no lo entiendo". Por haber llegado hasta aquí. Me agradezco el esfuerzo de haber llegado donde quería, la perseverancia y el crecimiento.

## Summary

In the *Drosophila* larva, most of the juvenile tissues are made up of large polyploid cells fated to die during metamorphosis stage. The dorsal trunk of the tracheal system is composed mainly of these cells, apart from the second metamere, that is formed by the Differentiated Adult Progenitor (DAP) cells. These cells remain diploid during the larval stages, survive metamorphosis and contribute to the formation of the adult respiratory system. Both the DAPs and the rest of the cells that form the tracheal system, are exposed to the same nutritional and hormonal cues during development, suggesting that there must be different molecular components in each, that lead them to the acquisition of opposing cell fates during the metamorphosis.

The initial objective of this thesis was to establish a differential gene expression profile between progenitor and non-progenitor cells of the dorsal trunk, that would allow us to detect specific functions and processes that determine the development of each group. Through this analysis, components of the autophagic pathway were found differentially expressed between DAPs and the rest of the dorsal trunk cells.

We confirmed these results using the appropriate markers, and we analyzed the effects of altering the autophagic pathway in the last larval stage and during metamorphosis. These results allowed us to conclude that autophagy is required for the degradation of the larval dorsal trunk during the pupal stage.

In parallel, we examined the relationship between the progressive increase in autophagy levels along the dorsal trunk and the degree of polyploidy in non-progenitor cells. Through experiments that allowed us to increase the replication cycles of these cells, we were able to conclude that there is a correlation between the degree of polyploidy and the level of autophagy.

Finally, we studied the effect of nutritional and oxidative stress in the progenitor cells of the tracheal system. We found that the nutritional restriction of amino acids inhibits the mitotic cycle, which can be reactivated when standard nutrition conditions are restored.



# Índice

## Introducción

1.- Remodelación de estructuras existentes para la formación de otros sistemas.....	3
2.- <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	4
3.- El sistema respiratorio en la larva de <i>Drosophila</i> .....	6
3.1.- El sistema traqueal de la larva de <i>Drosophila</i> como modelo.....	6
3.2.- Desarrollo y estructura del sistema respiratorio de la larva de <i>Drosophila</i> .....	6
3.3.- Células traqueales y eventos morfogenéticos durante la metamorfosis.....	8
3.3.1.- Células poliploides.....	8
3.3.2.- Células progenitoras.....	8
3.3.2.1.- <i>Traqueoblastos</i> .....	9
3.3.2.2.- <i>Progenitores Adultos Diferenciados (Differentiated Adult Progenitors, DAPs)</i> ...	10
4.- Degeneración del sistema larvario traqueal durante la metamorfosis.....	12
4.1.- La autofagia como vía de muerte celular.....	12
4.1.1.- El papel de la autofagia durante la metamorfosis de <i>Drosophila</i> .....	14
4.1.2.- Regulación de la autofagia.....	15
4.2.- Apoptosis.....	16
4.2.1.- El papel de la apoptosis en la metamorfosis de <i>Drosophila</i> .....	17
4.2.2.- Regulación de la apoptosis y conexión con autofagia.....	18
<b>Objetivos</b> .....	23
<b>Materiales y métodos</b> .....	25
1.- Cepas de <i>Drosophila</i> .....	27
2.- MicroArrays .....	29
2.1.- Obtención de muestras .....	29
2.2.- Procesamiento de las muestras biológicas.....	30
2.3.- Análisis bioinformático de los resultados.....	30
3.- qRT-PCR.....	31
4.- Observación de embriones.....	32
4.1.- Colección y decorionación de embriones.....	32
4.2.- Observación <i>in vivo</i> .....	32
4.3.- Fijación y montaje.....	32
5.- Disección y preparación de tejidos para su observación.....	32
5.1.- Sistema traqueal y discos imaginales de larva .....	32
5.1.1.- Disección de larvas .....	32
5.1.2.- Fijación de tráquea de larvas .....	33
5.1.3.- Montaje directo de tráqueas de larvas .....	33
5.1.4.- Incubación con anticuerpos (inmunohistoquímica) .....	33
5.2.- Marcaje específico para LysoTracker .....	34
5.3.- Sistema traqueal de pupa .....	34
5.3.1.- Disección de pupas 5h-7h apf.....	34
5.3.2.- Fijación de tráquea de pupas .....	35
5.3.3.- Montaje directo de tráquea de pupas .....	35
6.- Captura de imágenes .....	36

7.- Observación de tráquea de pupas <i>in vivo</i> .....	36
7.1.- Obtención de muestras .....	36
7.2.- Captura de imágenes de pupas <i>in vivo</i> .....	37
8.- Análisis de imágenes y estadística .....	37
8.1.- Fiji (ImageJ) .....	37
8.1.1.- Cuantificación de contenido de DNA .....	37
8.1.2.- Cuantificación de dp62 .....	37
8.1.3.- Cuantificación de Atg8Cherry .....	38
8.2.- IMARIS .....	38
8.3.- Adobe Photoshop CC .....	38
8.4.- Análisis de datos y estadística .....	38
9.- Preparación de medios para inducción de estrés nutricional u oxidativo.....	39
9.1.- Restricción nutricional de aminoácidos .....	39
9.2.- Restricción nutricional de carbohidratos .....	40
9.3.- Inducción de estrés oxidativo por Paraquat .....	40
<b>Resultados</b> .....	41
1.- Análisis de la expresión diferencial entre células progenitoras diferenciadas (DAPs) y células no progenitoras.....	44
1.1.- Genes diferencialmente expresados entre DAPs y células no progenitoras .....	44
1.2.- Análisis de enriquecimiento de las muestras DAPs y células no progenitoras .....	46
1.3.- Corroboración de los resultados de Arrays mediante qPCR .....	50
2.- Estudio de genes con alta expresión diferencial entre células progenitoras y no progenitoras de la tráquea de larva de <i>Drosophila</i> .....	50
3.-Análisis de grupos de genes en base a los resultados GSEA .....	52
3.1.-Estudio de ATPasas vacuolares con mayor expresión diferencial en células no progenitoras respecto a DAPs .....	52
3.2.- Autofagia regulada diferencialmente al alza en células no progenitoras en comparación con DAPs .....	54
4.- Autofagia diferencial en el sistema traqueal en estadio L3 .....	54
4.1.- dp62 como marcador inverso de autofagia: patrón diferencial en el sistema traqueal...54	
4.2.- Atg8 como marcador directo de autofagia: incremento de los niveles a lo largo del DT. ....	56
5.- Análisis de la autofagia en el DT en L3 .....	58
5.1.- Alteración en el patrón de autofagia en el DT: la actividad autofágica en tráquea es dependiente de los genes <i>atg</i> .....	58
6.- Efectos de la inhibición de la autofagia en el sistema traqueal .....	61
6.1.- Inactivación de genes de autofagia en L3 .....	61
6.2.-La sobreexpresión de <i>atg1</i> en el DT provoca la aparición de células morfológicamente alteradas en Tr2 y letalidad en la fase de metamorfosis .....	61
6.3.- La inactivación de la autofagia en el DT provoca un retraso en la desaparición de la tráquea larval durante la metamorfosis .....	63
7.- Implicación de la apoptosis en la degradación del DT.....	67
8.- Relación entre la autofagia y la poliploidía en el sistema traqueal.....	69



8.1.- Relación autofagia-poliploidía en L3: El incremento en el nivel de autofagia a lo largo del DT se correlaciona con el incremento en los niveles de poliploidía .....	70
8.2.- Relación entre autofagia y poliploidía en la tráquea de pupa de 7h apf .....	71
8.3.- Los niveles de autofagia se incrementan al aumentar el grado de poliploidía .....	73
9.- Efecto del estrés en la inducción de la autofagia en el DT .....	74
9.1.- El estrés nutricional de aminoácidos provoca alteraciones en los niveles de autofagia en el DT en L3.....	74
9.2.- La inducción de estrés nutricional no muestra efectos fenotípicos al inactivar la autofagia en el DT en L3 .....	75
9.3.- Evaluación de distintos grados de estrés nutricional en L3 .....	76
9.4.- El fenotipo de inhibición de la mitosis en Tr2 se revierte al retornar a los animales a medios nutricionales estándar .....	78
9.5.- El estrés nutricional de carbohidratos no provoca efectos en el sistema traqueal ni en la viabilidad de los individuos .....	82
9.6.- Búsqueda de alteraciones en las DAPs relacionados con el estrés oxidativo .....	82
<b>Discusión</b> .....	85
1.- Perfil de expresión diferencial entre células traqueales .....	87
2.- Autofagia como ruta de degradación de las células traqueales .....	89
3.- Caracterización de los niveles de autofagia a lo largo del DT .....	89
4.- Alteración de la actividad autofágica en el DT en L3 .....	91
5.- Efectos durante la metamorfosis de la alteración de la autofagia en el DT.. .....	92
6.-Apoptosis en la degradación del sistema traqueal de larva durante la metamorfosis.....	95
7.-Autofagia diferencial ligada a la poliploidía en el sistema traqueal de <i>Drosophila</i> .....	96
8.- Incremento de los niveles de autofagia en los estadios iniciales de pupa.....	97
9.- Función dual de la autofagia .....	98
10.- Efectos de la inducción del estrés en las DAPs .....	100
Observaciones finales.....	103
<b>Conclusiones</b> .....	105
<b>Bibliografía</b> .....	109
<b>Anexos</b> .....	121
- <b>Anexo1:</b> Abreviaturas .....	123
- <b>Anexo 2:</b> Macros creadas para Fiji .....	124
- <b>Anexo 3:</b> RNA ISOLATION & cDNA AMPLIFICATION REPORT (de <i>Functional Genomics</i> IRB Facility) .....	126
- <b>Anexo 4:</b> Protocolo de extracción de RNA de larvas (Thomas Whitenant) .....	128
- <b>Anexo 5:</b> Preprocesamiento bioinformático de muestras de Arrays .....	130
- <b>Anexo 6:</b> <i>Probesets</i> diferencialmente expresados entre los grupos Tr2 y Tr6 .....	134
- <b>Anexo 7:</b> Anotaciones GSEA .....	136

# **INTRODUCCIÓN**



# Introducción

## 1.- Remodelación de estructuras existentes para la formación de otros sistemas

La generación, desarrollo y especificación de una nueva estructura ha sido y es una cuestión central en la biología clásica. Cómo nuevos órganos aparecen y se definen, el desarrollo de sistemas vivos pluricelulares desde un principio unicelular es un complejo proceso que requiere de una delicada coordinación y que ha sido ampliamente estudiado desde múltiples enfoques. Sin embargo, quedan aún numerosas incógnitas por revelar en torno a estos eventos, especialmente cuando estos órganos ya formados sufren modificaciones durante el desarrollo para readaptarse a nuevos sistemas o funciones. En ocasiones, los tejidos ya bien desarrollados y definidos deben reformarse e incluso desensamblarse para generar nuevas estructuras adaptadas al crecimiento del organismo.

A menudo, el desensamblaje de un órgano está asociado a la generación de otro nuevo a partir de poblaciones de células progenitoras, aquellas no especificadas y que mantienen intacta su capacidad proliferativa, y un ejemplo clásico de esto es la metamorfosis de los insectos holometábolos. Durante este proceso, ocurre una reestructuración del organismo donde gran parte del cuerpo de la forma juvenil es desarmado y muchos tejidos son destruidos, para formar los nuevos que compondrán el cuerpo del adulto.

Aunque la metamorfosis es un proceso ampliamente extendido en el mundo animal, muy poco se sabe sobre cómo se lleva a cabo a nivel celular, y cuáles son los patrones moleculares específicos que lo permiten. Hasta ahora, es sabido que conforme se van degenerando los tejidos juveniles, se van generando los órganos y sistemas adultos, a partir de células progenitoras que permanecen inactivas durante el ciclo de vida larvario, sin participar en funciones activas del metabolismo del animal, hasta el momento de su activación durante la metamorfosis. En el desarrollo de este tipo de procesos se ven implicadas numerosas funciones como muerte celular, proliferación y especificación. La mayor parte de los sistemas juveniles son destruidos por completo y las nuevas estructuras son generadas a partir de estos grupos de células. Sin embargo, existen tejidos que no son completamente eliminados, y en lugar de generar el nuevo órgano completamente *de novo*, se aprovechan estructuras ya existentes, que se reorganizan y modifican, y se adaptan al cuerpo del adulto. Además, se ha descubierto un tipo particular de células progenitoras, que, en lugar de permanecer inactivas y quiescentes

durante el desarrollo, están formando parte activa y funcional de los sistemas, pero llegado el momento de la metamorfosis, recuperan su capacidad multipotente, y en lugar de degenerar, participan en la construcción del nuevo organismo adulto.

Para estudiar como ocurre este proceso de desensamblaje y formación de nuevas estructuras a partir de otras ya existentes, y en concreto, como actúan las células progenitoras diferenciadas pero que mantienen su capacidad proliferativa y pueden generar distintos tipos celulares, utilizamos *Drosophila melanogaster* y su sistema respiratorio durante la metamorfosis.

## **2.- *Drosophila melanogaster* como organismo modelo**

*Drosophila melanogaster* empezó a usarse como modelo animal en un laboratorio a principios del siglo XX gracias al trabajo de Tomas Hunt Morgan en Columbia, y su uso se fue extendiendo hasta ser en la actualidad uno de los organismos modelo más comunes y prácticos (Arias, 2008).

*Drosophila* es un pequeño insecto díptero ampliamente utilizado en laboratorios de investigación debido a sus múltiples ventajas. Presenta un ciclo de reproducción relativamente corto, un bajo coste de mantenimiento, facilidad de manipulación y una gran variedad de potentes herramientas genéticas disponibles. Su genoma ha sido secuenciado por completo y puede ser modificado de muchas formas diferentes. Existen numerosas técnicas que permiten a los investigadores un amplio control sobre la expresión espaciotemporal de los genes, y la manipulación simultánea de múltiples cromosomas es mucho más rápida y efectiva en estos insectos (ya que poseen sólo 4 cromosomas) que por ejemplo en vertebrados. Además, existe una vasta y bien documentada variedad de perfiles fenotípicos asociados a diversos procesos celulares, así como una gran cantidad de rutas metabólicas y funciones moleculares conservadas evolutivamente (Harnish *et al.*, 2021).

Al ser un insecto holometábolo, su desarrollo comprende diversos estadios incluyendo una fase de metamorfosis, en la que gran parte del organismo sufre una intensa remodelación para dar lugar al cuerpo del animal adulto.

El ciclo de vida comienza cuando la hembra pone una extensa cantidad de huevos, que, habiendo sido fertilizados por el macho, se desarrollan en unas 24h (a temperatura ambiente),

para eclosionar como larva. Durante 4-5 días, esta larva se alimenta y crece pasando por tres mudas, hasta que alcanza un peso crítico, momento a partir del cual empieza a prepararse para la fase de pupa. En este punto deja de alimentarse, y comienza una etapa errante de varias horas, hasta que se asienta y forma la pupa, iniciando así la metamorfosis para alcanzar el estado adulto en el transcurso de unos cinco días (Fig. 1). Durante este proceso, la mayoría de los tejidos larvarios son destruidos y sustituidos por tejidos adultos, desarrollados principalmente a partir de poblaciones celulares progenitoras conocidas como discos imaginales. Estos grupos de células han permanecido quiescentes desde la fase embrionaria, sin participar de forma funcional ni estructural en la vida y fisiología de la larva. Al iniciar la metamorfosis, estos progenitores son reactivados para generar tejidos del cuerpo del adulto, como las alas, los ojos o las patas (Jennings, 2011). Sin embargo, algunas estructuras como el sistema nervioso o el respiratorio no emergen desde estas poblaciones celulares, sino que sufren una remodelación del órgano existente para adaptarse al organismo adulto (Lee y Park, 2021; Chen y Krasnow, 2014).

Para llevar a cabo este proceso de reestructuración, durante la metamorfosis ocurren importantes eventos de proliferación, diferenciación y muerte celular que permiten la generación y el desarrollo de los tejidos y órganos que compondrán finalmente el organismo adulto.

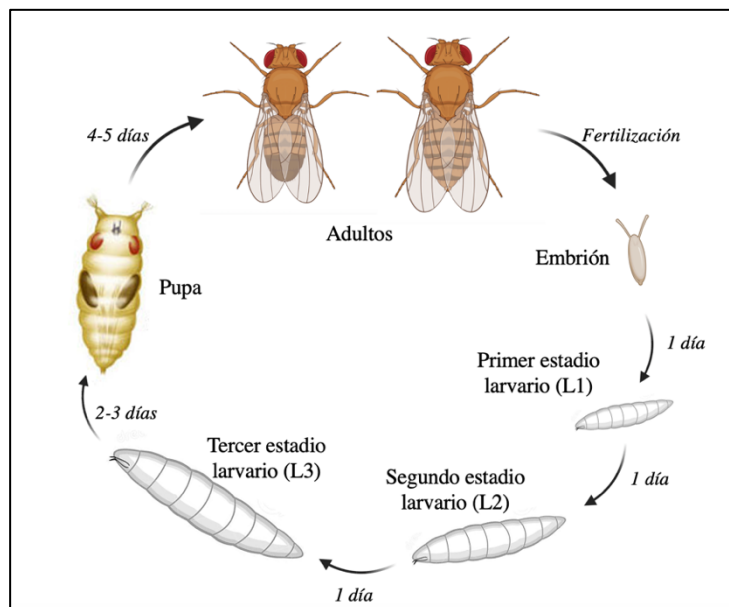


Fig. 1: A 25°C, el ciclo de generación de *Drosophila* es de unos 10 días, y comprende 1 día de embriogénesis, 1 día de primer estadio larvario (L1), 1 día de segundo estadio larvario (L2), 2-3 días de tercer estado larvario incluyendo la etapa errante, y unos 4 días de pupa hasta que eclosiona el nuevo individuo adulto.

### **3.- El sistema respiratorio en la larva de *Drosophila***

#### **3.1.- El sistema traqueal de la larva de *Drosophila* como modelo**

El sistema respiratorio de *Drosophila* es un órgano tubular ramificado que proporciona oxígeno a los tejidos del animal. Ha sido ampliamente estudiado no sólo a nivel de desarrollo y funcionalidad en larva (Manning y Krasnow, 1993; Loganathan *et al.*, 2016), sino también como modelo de organogénesis de una estructura tubular ramificada, encontrando múltiples similitudes con el desarrollo de tejidos como los sistemas circulatorio y respiratorio de mamíferos (Faisal *et al.*, 2014). Muchas herramientas genéticas y análisis celulares se encuentran disponibles para estudiar la formación y el desarrollo del sistema respiratorio traqueal. La existencia de una gran batería de marcadores moleculares que orquestan la construcción y remodelación de este sistema tubular, además de la identificación de numerosos mutantes en este proceso, proporcionan un territorio excelente para analizar los mecanismos de la morfogénesis ramificada (Samakovlis *et al.*, 1996). Sin embargo, su remodelación durante la fase de pupa alberga aún numerosas incógnitas.

#### **3.2.- Desarrollo y estructura del sistema respiratorio de la larva de *Drosophila***

El sistema traqueal se extiende a través de toda la cavidad corporal, y permite el flujo del aire desde el exterior mediante unas aperturas llamadas espiráculos, situadas en la parte más anterior de la larva (Wigglesworth, 1972). Presenta una simetría bilateral y un patrón metamérico anteroposterior (Sato *et al.*, 2008).

Durante la embriogénesis, el sistema respiratorio se forma a partir de conjuntos definidos de células precursoras ectodérmicas denominadas placodas traqueales, que se invaginan en el mesodermo manteniendo la continuidad con la epidermis. Estas células proliferan y el sistema experimenta repetidos procesos estereotipados de ramificación y fusión para formar una red de epitelio tubular (Manning y Krasnow, 1993). El desarrollo larvario sin embargo, presenta plasticidad, ya que este órgano detecta tanto el nivel de oxígeno externo como la actividad metabólica de los órganos internos, y permite al animal adaptarse a los cambios en los niveles de oxígeno ambiental (Scholl *et al.*, 2021).

La rama principal de la tráquea de larva, que recorre todo el cuerpo del animal y sirve como vía respiratoria primaria es conocida como tronco dorsal (en adelante, DT por su nombre en inglés, *Dorsal Trunk*), y se extiende desde los espiráculos anteriores hasta la zona más posterior

del animal. Es un tubo compuesto por múltiples células contribuyendo a la superficie del lumen, mientras que las ramas secundarias que parten de él son mucho más finas, y en su mayoría, están formadas por una sola célula (Hayashi y Kondo, 2018).

El DT está formado por 10 regiones denominadas metámeros (Tr1-10 en sentido anteroposterior). De cada metámero parten dos ramas menores, la Dorsal (DB) y la Transversal (TC), que a su vez se ramifican múltiples veces (Fig. 2). Al finalizar la embriogénesis, la mayor parte de las células que componen el DT cambian su ciclo celular de mitosis a endorreplicación, creciendo en tamaño mediante repetidos endociclos. Esto ocurre en el Tr1 y en los metámeros 3 a 9, pero no en el Tr2, cuyas células permanecen diploides durante la fase larvaria (Weaver y Krasnow, 2008).

Al llegar al último estadio larvario (L3), encontramos tres grupos de células en el sistema respiratorio: en primer lugar, grandes células poliploides que componen la mayor parte de la DT y las ramas secundarias, contribuyendo a la estructura y la función del órgano. En segundo lugar, las células localizadas en el Tr2, que comparten funciones con las anteriores, pero se mantienen diploides. Por último, encontramos grupos de células progenitoras indiferenciadas (traqueoblastos), diploides, situadas en las ramas espiraculares (SB), una ramificación que parte de las TC. Estas células permanecen quiescentes sin participar en ninguna función del sistema, hasta el momento de la metamorfosis (Chen y Krasnow, 2014).

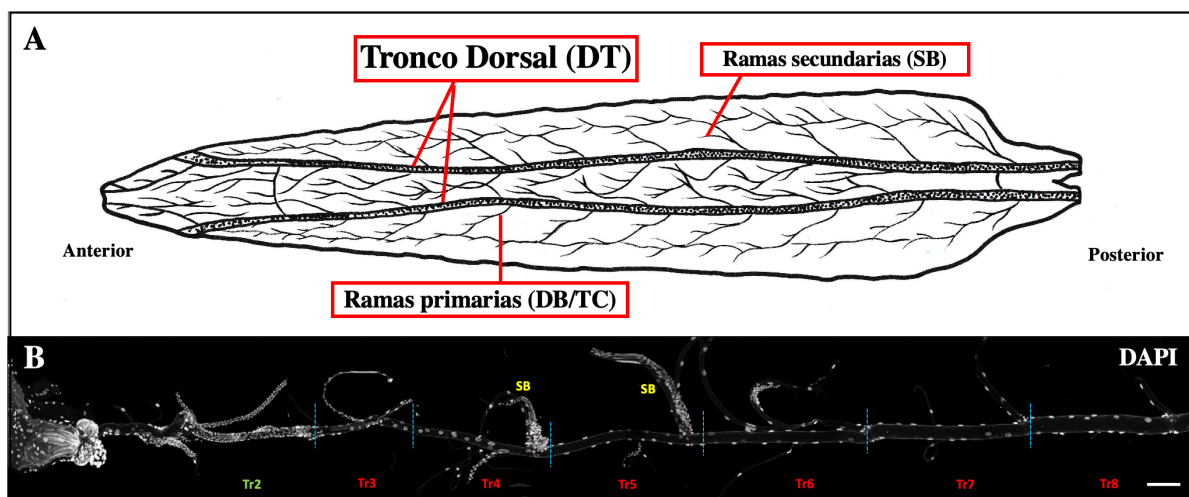


Fig. 2: A) Representación esquemática del sistema respiratorio de larva de *Drosophila* en vista dorsal. Las ramas menores terminales se han truncado para facilitar la representación. B) Proyección de tráquea de larva en estadio L3. Se muestra el núcleo de las células diploides del Tr2, las células poliploides de los metámeros Tr3-Tr9, y los traqueoblastos de las SB de los metámeros 4 y 5. La barra de escala indica 100  $\mu$ m.



### 3.3.- Células traqueales y eventos morfogénicos durante la metamorfosis

En el último estadio larvario, previo a la fase de metamorfosis, encontramos tres grupos de células en el sistema traqueal de *Drosophila*, que pese a formar parte del mismo órgano, se comportan de forma distinta frente a este proceso de remodelación del organismo.

#### 3.3.1.- Células poliploides

Las células que componen la mayor parte del tejido respiratorio son grandes células poliploides que forman el DT y múltiples ramas secundarias (Fig. 3). Están perfectamente diferenciadas y especializadas, y destinadas a degradarse y morir durante la metamorfosis para dejar paso al nuevo sistema respiratorio del adulto (Manning y Krasnow, 1993). Estas células sufren repetidas replicaciones del DNA durante la fase de larva, y alcanzan la metamorfosis con valores que pueden cuadruplicar los de células diploides.

Que la mayoría de las células que componen el tejido respiratorio sean poliploides representa una ventaja a varios niveles. Para empezar, en situaciones en las que los recursos son limitados o se requiere un crecimiento rápido, incrementar el volumen celular sin división resulta más conveniente (Kondorosi *et al.*, 2000). Además, las células poliploides pueden suponer en sí mismas una fuente de energía. Durante la metamorfosis, cuando la pupa está completamente aislada de un aporte de comida exógeno, la biomasa acumulada en estas células es reciclada y utilizada para la morfogénesis y desarrollo de los tejidos adultos (Lee *et al.*, 2009).

Uno de los principales responsables de esta situación de poliploidía es *fzr*, el homólogo en *Drosophila* de *Cdh1*, y principal activador del Complejo Promotor de la anafase/Ciclosoma (APC/C). APC/C induce la destrucción de las ciclinas mitóticas a través de ubiquitina (Morgan, 2007), y resulta crucial para reprimir la expresión de *string/cdc25*, una fosfatasa que activa la kinasa dependiente de ciclina Cdk1, complejo necesario para realizar la mitosis (Schaeffer *et al.*, 2004).

Durante la metamorfosis, la región posterior del DT (Tr3-10) colapsa y estas células son eliminadas (Manning y Krasnow, 1993). A partir de resultados recientes en nuestro laboratorio, se ha descrito como la apoptosis participa de forma determinante en la degradación de estas células durante la fase de pupa, aunque aún se desconoce si existen otras vías implicadas (Fraire-Zamora *et al.*, 2021).

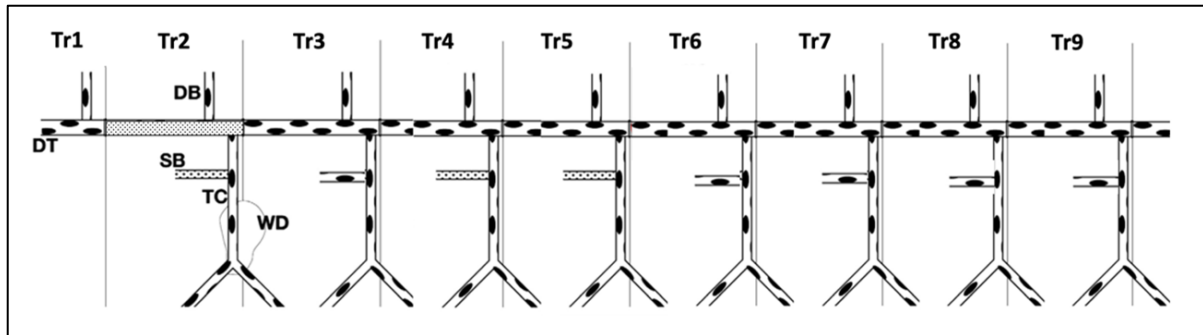


Fig. 3: Representación esquemática del DT y las ramas secundarias en estado de L3. El Tr1 y los metámeros Tr3-Tr9 están compuestos por células poliploides. DT: Tronco dorsal. DB: Rama dorsal. SB: Rama espiracular. TC: Rama transversal. WD: Disco imaginal de ala. Adaptado de Sato *et al.*, 2008.

### 3.3.2.- Células progenitoras

En el sistema respiratorio de la larva de *Drosophila*, existen dos tipos de células progenitoras que participarán en la formación y el desarrollo del sistema respiratorio del adulto.

#### 3.3.2.1.- Traqueoblastos

En primer lugar, localizadas en el segmento proximal de las ramas espiraculares (SB) encontramos las células progenitoras clásicas del sistema respiratorio, denominadas traqueoblastos. Estas células, indiferenciadas, permanecen quiescentes desde el desarrollo embrionario hasta el tercer estadio larvario, cuando empiezan a proliferar (Whitten, 1980; Weaver y Krasnow, 2008). Esto ocurre en todas las SB, pero sólo las células progenitoras de los metámeros 4 y 5 comienzan a migrar por la DT al final de L3 para formar el sistema traqueal adulto durante la metamorfosis (Chen y Krasnow, 2014) (Fig.4). Se desplazan mediante la emanación de proyecciones citoplasmáticas, expresando *breathless* FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) siguiendo la señal del factor *branchless* FGF (*Fibroblast Growth Factor*), emitida por las células poliploides del DT. La descendencia de estos progenitores se va posicionando sobre la estructura traqueal larvaria, que posteriormente será destruida y reemplazada, diferenciándose a medida que avanza el proceso de metamorfosis (Sato y Kornberg, 2002; Chen y Krasnow, 2014).

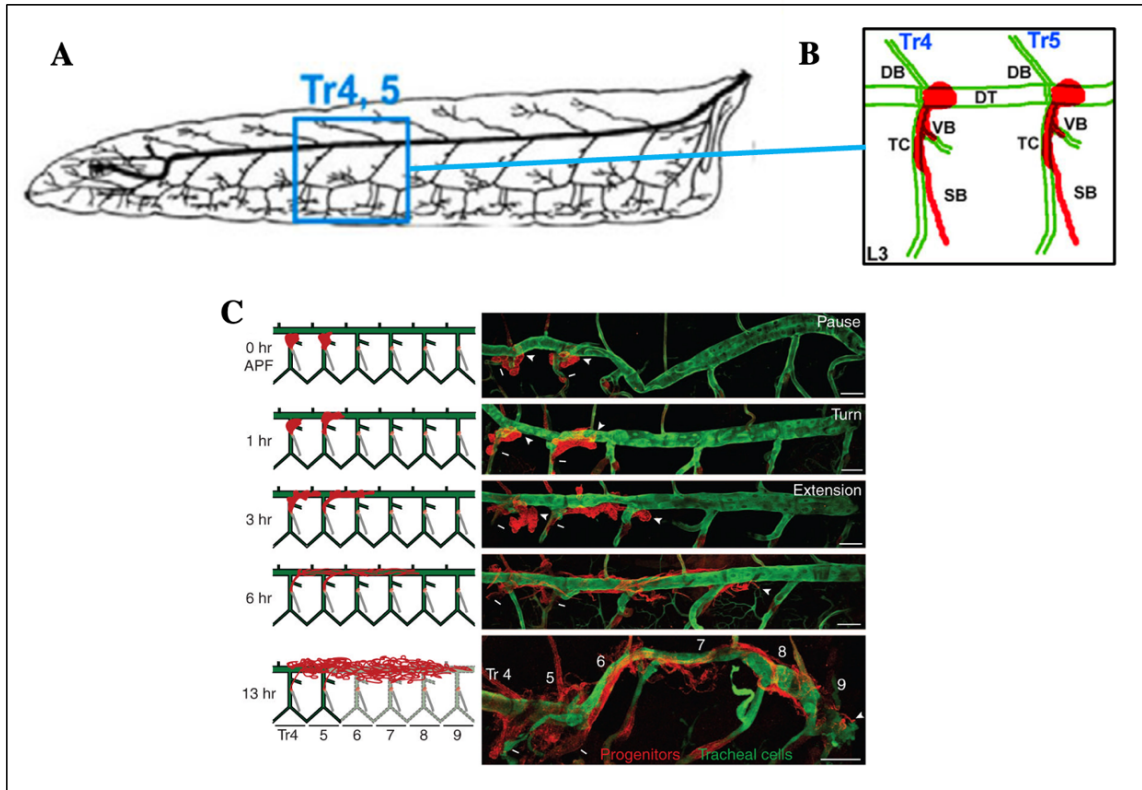


Fig. 4: A) Representación esquemática del sistema respiratorio de larva en estadio L3 en vista lateral. La caja azul señala los metámeros 4 y 5. B) Representación esquemática de las SB de los metámeros 4 y 5 en estadio L3 con los traqueoblastos representados en rojo DT: Tronco dorsal. DB: Rama dorsal. SB: Rama espiracular. TC: Rama transversal. VB: Rama visceral. Adaptado de Pitsouli y Perrimon, 2010. C) Esquemas y proyecciones del DT (Metámeros 4 a 9) en pupa de 0h, 1h, 3h, 6h y 13h. Los traqueoblastos (rojo) se van desplazando desde las SB a lo largo del DT. Las barras de escala indican 50  $\mu$ m. Adaptado de Chen y Krasnow, 2014.

### 3.3.2.2.- Progenitores Adultos Diferenciados (*Differentiated Adult Progenitors, DAPs*)

En el segundo segmento (Tr2) del DT, encontramos un tipo especial de células progenitoras. Son células que a pesar de estar formando parte estructural y funcional del sistema traqueal, no son poliploides como las que forman los otros metámeros. Estas células han evadido el endociclo, y permanecen diploides durante toda la fase larvaria, presentando además marcadores moleculares de progenitoras como BrC o *hdc* (Karim *et al.*, 1993; Weaver y White, 1995) (Fig. 5C). Son denominadas DAP (*Differentiated Adult Progenitors*), y son consideradas células progenitoras facultativas. Este tipo celular ha sido definido como una clase particular de células progenitoras que contribuyen a la estructura y función de un órgano bien desarrollado pero permanecen multipotentes, por lo que en caso necesario, pueden proliferar, y su progenie adquirir la identidad de diferentes tipos celulares del órgano (Weaver y Krasnow, 2008). Aunque algunas neuronas y células musculares de larva son conservadas en el estadio

adulto (Klapper, 2000; Williams y Truman, 2005), estas células traqueales son las únicas conocidas capaces de reentrar en el ciclo celular y generar nuevas células y tejidos, a pesar de estar diferenciadas. Al inicio de la metamorfosis recuperan sus capacidades de proliferar, esparcirse y diferenciarse en diversos tipos celulares traqueales, del mismo modo que los traqueoblastos, que por el contrario, han permanecido quiescentes (Guha y Kornberg, 2005, 2008; Weaver y Krasnow, 2008).

Al contrario que en las células larvarias en endociclo no proliferativas, en estas DAPs *fzr* está reprimido (Fig. 5B), mientras que si presentan marcadores moleculares propios de células en mitosis como *stg* (Djabrayan *et al.*, 2014), y se detecta la expresión de componentes habituales de los ciclos mitóticos como CycA y Ph3 (Sato *et al.*, 2008). Puesto que estas células están expuestas a las mismas señales nutricionales y hormonales que el resto de la tráquea, es necesaria la presencia de marcadores espaciales y temporales limitantes, para promover su activación sólo en su localización, y sólo a partir del estadio L3. Así, estos papeles están representados por Snoo y Dpp respectivamente (Djabrayan y Casanova, 2016) (Fig. 5D). Además, *hdc*, marcador de la identidad progenitora de estas células, también actúa confiriéndoles protección antes distintos tipos de estrés (Giannios y Casanova, 2021).

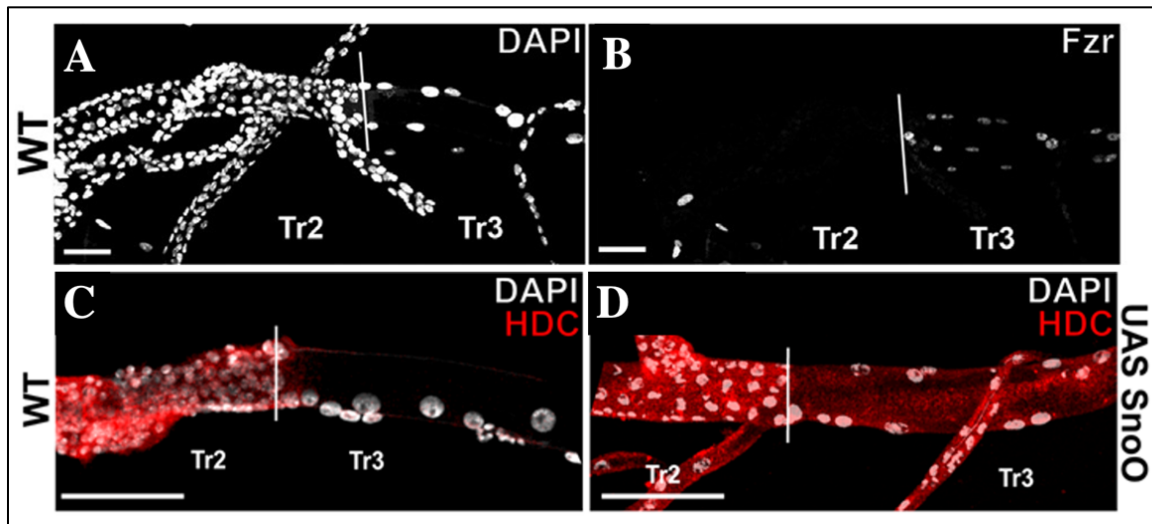


Fig. 5: A) Proyección de los metámeros Tr2 y Tr3 en estadio L3. Se muestran los núcleos marcados con DAPI. B) Proyección de los metámeros Tr2 y Tr3 en estadio L3 con marcaje para *fzr*. Las barras de escala indican 25  $\mu$ m. Adaptado de Djabrayan *et al.*, 2014. C) Proyección de los metámeros Tr2 y Tr3 en estadio L3 de WT con marcaje para *hdc*. D) Proyección de los metámeros Tr2 y Tr3 en estadio L3 con expresión ectópica de *hdc* en Tr3 al forzar la sobreexpresión de Snoo a lo largo del DT. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m. Adaptado de Djabrayan y Casanova, 2016.

Por tanto, al final del último estadio de larva, encontramos diferentes tipos celulares en la composición del sistema traqueal, que pese a estar sometidos a los mismos aportes

nutricionales y moleculares, responden de forma diferencial ante ellos. Por ejemplo, aunque la presencia de ecdisona es común a lo largo de la tráquea, la respuesta de cada población celular a la misma varía (Guha y Kornberg, 2008). Otro ejemplo sería la ruta de señalización de Hippo, que a través de su efector *Yorkie (Yki)*, provoca diferentes reacciones en cada población en función del ciclo celular. Mientras que la fosforilación de *Yki* en las DAPs incrementa el ratio de proliferación, en las células poliploides incrementa el grado de poliploidía (Djabrayan *et al.*, 2014). Además, debido a la diferencia de ciclos celulares, estas células presentan diferentes características metabólicas, definidas por variaciones en las rutas de dTOR e insulina entre otras.

#### **4.- Degeneración del sistema larvario traqueal durante la metamorfosis**

Durante la etapa de metamorfosis, se lleva a cabo una drástica remodelación de todos los tejidos del organismo de *Drosophila* para generar el cuerpo del adulto. El inicio de esta fase es determinado por un importante pulso de ecdisona que marca el inicio de toda la secuencia posterior de eventos morfogenéticos (Robertson, 1936). Además de procesos de proliferación y diferenciación para formar los nuevos sistemas, deben producirse eventos que conlleven la eliminación de forma controlada de los órganos obsoletos. Para ello, existen dos rutas principales de muerte celular: autofagia y apoptosis.

##### **4.1- La autofagia como vía de muerte celular**

La autofagia es un proceso evolutivamente conservado y requerido para mantener la homeostasis celular, protección frente al estrés, renovación celular y control de la proliferación (Kroemer *et al.*, 2010; Rodolfo *et al.*, 2016). Mediante este mecanismo catabólico, proteínas y otras moléculas orgánicas, así como orgánulos y diversos componentes del citoplasma son reciclados proporcionando una reserva de nutrientes y energía. Porciones del citoplasma son envueltas en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que al fusionarse con lisosomas, resultan en la degradación de su cargo (Kim y Klionsky, 2000). De esta forma, la autofagia presenta un papel determinante al promover la supervivencia celular mediante el reciclaje de material citoplasmático, pero también está fuertemente implicada en la degradación celular, donde los productos resultantes pueden ser utilizados como fuente de energía (Lum *et al.*, 2005). Existe en la actualidad un debate sobre este doble rol de la autofagia y como se

relacionan ambas funciones, y si son mutuamente consecuentes o conviven en equilibrio dependiente del contexto y los niveles, ya que aun genera controversia como este proceso conlleva la muerte celular (Denton y Kumar, 2018).

Los factores responsables del desarrollo de este proceso son las llamadas proteínas Atg (Autophagy-related), identificadas inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae*, pero con ortólogos en eucariotas superiores, incluyendo *Drosophila* y mamíferos (Tsukada y Ohsumi, 1993; Klionsky *et al.*, 2003). La autofagia puede dividirse en 4 pasos secuenciales: Iniciación, nucleación del autofagosoma, acoplamiento y fusión con el lisosoma, y degradación. Además, estos eventos pueden separarse en relación a las propiedades funcionales de las Atgs que llevan a cabo cada uno de ellos. En primer lugar, el complejo serina/treonina kinasa Atg1 y sus reguladores, Atg13, 17 y 101, responsables de la inducción del proceso (Kamada *et al.*, 2000). A continuación, para la formación de la membrana del fagosoma se requiere la fosforilación del fosfatidilinositol, en un paso que requiere la participación del complejo IIIPI3K, que incluye Atg6/Beclin1, Vps15 y Atg14 (Kametaka *et al.*, 1998). Las proteínas Atg8 y Atg12 son dos sistemas ubiquitin-like, que conjugados con otras Atgs como Atg7, Atg10, Atg5 y Atg16 son esenciales para la expansión del autofagosoma (Ichimura *et al.*, 2000). Por último, Atg9, junto con Atg2 y Atg18, se encargan del reciclaje de los lípidos y proteínas involucrados, además de Atg4, que facilita la retirada de Atg8 una vez formado el autofagolisosoma (Suzuki *et al.*, 2007; Ichimura *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2014) (Fig. 6).

La inactivación de alguno de los genes que codifican las proteínas Atg, como *atg1*, *atg13* o *atg8*, desemboca habitualmente en una reducción significativa de la actividad autofágica, y por consiguiente bloquea la destrucción de las células o tejidos que deben ser eliminados mediante este mecanismo, como el cuerpo graso o el intestino medio (Liu *et al.*, 2013; Denton *et al.*, 2009).

La proteína Atg8 es comúnmente usada para monitorear la actividad autofágica, puesto que es requerida en las etapas finales del proceso, indicando así que éste se encuentra activo (Klionsky *et al.*, 2012).

Además de las proteínas Atg, otro componente fundamental de esta ruta es Ref(2)P, ortólogo de p62/SQSTM1 en mamíferos, una proteína multidominio que actúa como receptor selectivo para el reconocimiento de cargos durante la autofagia (en adelante, dp62). Presenta un dominio de unión a Atg8, y otro de unión a ubiquitina (Pankiv *et al.*, 2007). Es requerida para la

agregación de proteínas ubiquitiniladas, por lo que va unida al cargo seleccionado para su destrucción en los lisosomas, y es degradada también durante el proceso (Nezis *et al.*, 2008).

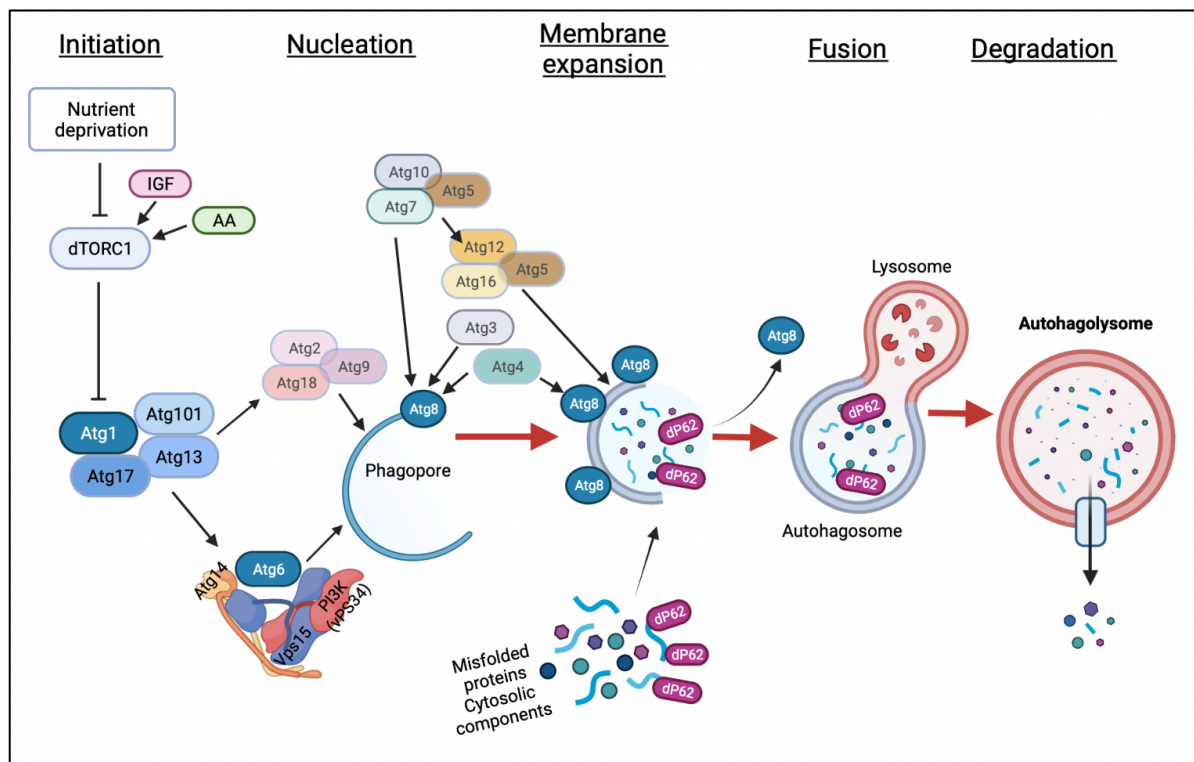


Fig. 6: Esquema de la ruta de la autofagia. El complejo iniciador, formado por Atg1, Atg13, Atg17 y Arg101, es regulado por dTORC1. El resto de proteínas atg se encargan de la formación de la membrana del fagosoma y la expansión de la misma. Atg8 suele encontrarse unido a la membrana del fagosoma, y dp62 unido a los agregados que van a ser degradados en el interior del fagolisosoma.

Puesto que dp62 se elimina del citoplasma principalmente de esta forma, los niveles de esta proteína usualmente se correlacionan inversamente con la degradación autofágica, y la pérdida de las proteínas Atg resulta en la acumulación de los agregados proteicos marcados para su eliminación, así como en un significativo incremento de agregados positivos en dp62. Por tanto, la cantidad de dp62 se considera inversamente correlacionada con la actividad autofágica (Klionsky *et al.*, 2012).

#### 4.1.1.- El papel de la autofagia durante la metamorfosis de *Drosophila*

Durante la metamorfosis de *Drosophila*, gran parte de los tejidos que formaban el cuerpo de la larva son eliminados y sustituidos por nuevos sistemas del organismo adulto. Todo este proceso se desarrolla en el interior de la pupa sin aporte externo de nutrientes, por lo que un mecanismo de reciclaje de moléculas y componentes celulares que conlleve obtención de energía resulta extremadamente útil. Pese al papel controvertido de la autofagia como inductor principal de la

muerte celular, su función ha demostrado ser esencial en la degradación de diversos órganos como el cuerpo graso, las glándulas salivares (SG) o el intestino medio (Liu *et al.*, 2013; Berry y Baehrecke, 2007; Denton *et al.*, 2009).

En el intestino medio, se ha descrito como la acción exclusiva de la autofagia es la responsable de la degradación de este órgano durante la metamorfosis, y que la alteración de la ruta mediante la inactivación de *atg1*, *atg2* o *atg18* provoca un severo retraso en su eliminación (Denton *et al.*, 2009). En contraste, en las SG la autofagia es necesaria para la degradación y su ausencia retrasa significativamente la eliminación de este tejido, pero la actividad apoptótica es requerida para completar el proceso, y sólo la inactivación conjunta de ambas rutas resulta en la persistencia de las SG durante la metamorfosis (Berry y Baehrecke, 2007).

#### **4.1.2.- Regulación de la autofagia**

Para iniciar la ruta de autofagia es necesaria la asociación entre Atg1 y Atg13, que es negativamente regulada a través de la ruta de dTOR. dTOR es una serina/treonina kinasa evolutivamente conservada, que actúa como principal controlador del crecimiento celular y metabolismo, y habitualmente promueve la progresión del ciclo celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Thomas y Hall, 1997). Cuando se encuentra asociada a RAPTOR formando el complejo TORC1, en condiciones de disponibilidad de nutrientes, provoca la hiperfosforilación de Atg1 y 13, impidiendo su unión y bloqueando la iniciación de la autofagia (Fig. 6). En condiciones de restricción de nutrientes u otra circunstancia represora de la actividad de dTOR, Atg13 es inmediatamente desfosforilado, permitiendo su unión a Atg1 y con ello la activación de la autofagia (Noda y Ohsumi, 1998; Kamada *et al.*, 2000; Hosokawa *et al.*, 2009).

En la larva de *Drosophila*, la restricción del aporte de aminoácidos detiene el crecimiento de los tejidos, y reduce la proliferación en las células imaginales (Barbet *et al.*, 1996). La inactivación de la ruta de dTOR resulta en una respuesta celular y fisiológica equivalente a la ausencia de nutrientes, estableciendo que esta ruta es requerida para el crecimiento de los organismos pluricelulares (Zhang *et al.*, 2000). Por tanto, la reducción de la actividad de dTOR actúa como indicador de una disminución en la disponibilidad de nutrientes intracelulares, por lo que la autofagia puede ser clave en estas condiciones para proveer los nutrientes y la energía necesarios para el adecuado metabolismo celular y la supervivencia. Al mismo tiempo, la



autofagia, a través de la actividad de Atg1, retroalimenta negativamente a dTOR, potenciando los efectos de esta situación (Scott *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se ha descrito el incremento de la actividad de TOR en respuesta a Insulina, otro sensor nutricional (Scott *et al.*, 1998). La señalización a través de Insulina ha demostrado ser un supresor de la autofagia, y la sobreexpresión de su receptor (InR) bloquea la activación de este proceso (Pfeifer, 1978; Scott *et al.*, 2004).

También se ha demostrado que la señalización a través de insulina y de ecdisona se regulan mutuamente de forma antagonista (Colombani *et al.*, 2005). Esta última, a través de su receptor EcR, es capaz de provocar la activación de los genes *atg*, induciendo la activación de la autofagia (Denton *et al.*, 2013; Nicolson *et al.*, 2015) (Fig. 7).

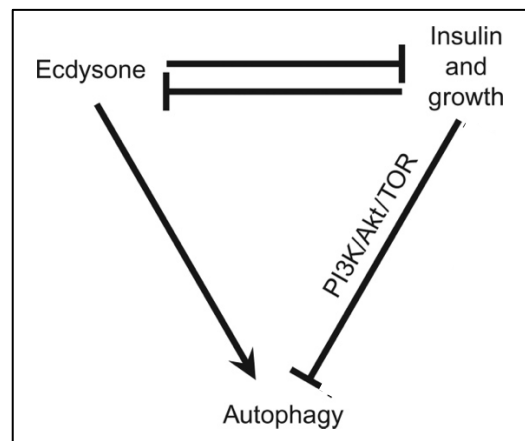


Fig. 7: Esquema de la relación entre ecdisona, autofagia y señalización a través de las rutas de insulina y TOR. Ecdisona e insulina tienen efectos opuestos sobre la autofagia; la ecdisona induce la autofagia mientras que la insulina la inhibe a través de TOR. Ecdisona e insulina además son antagonistas, sugiriendo que el equilibrio entre ambas hormonas debe ser requerido para la regulación de la autofagia. Un incremento en la ecdisona inhibe la señalización de insulina, liberando la inhibición de la insulina sobre la autofagia y permitiendo la actividad de ésta. Adaptado de Tracy y Baehrecke, 2014.

## 4.2- Apoptosis

La apoptosis es otra ruta de muerte celular conservada entre los metazoos, que se caracteriza por una orquestada fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, que son reconocidos y rápidamente eliminados. Este proceso es dependiente de caspasas, unas cistein-proteasas que se dividen entre iniciadoras y efectoras del proceso (Kumar, 2007). Existen al menos 7 caspasas descritas en *Drosophila*, siendo Drice (*Death related Ice-like caspase*), y Dcp1 (*Death caspase*

1) las efectoras y ejecutoras finales de la muerte celular. Drice y Dcp1 son activadas principalmente a través de la caspasa iniciadora Dronc (*Death regulator Nedd2-like*) (Chew *et al.*, 2004), que es inhibida mediante interacción directa por Diap1 (Kaiser *et al.*, 1998). Diap1 (*Death-associated inhibitor of apoptosis*) es una proteína inhibidora de la apoptosis, regulada por los principales factores proapoptóticos en *Drosophila*, codificados por los genes RHG, *Reaper*, *Hid* y *Grim*. Éstos actúan uniéndose a Diap1, iniciando su ubiquitinación y degradación, y permitiendo la activación de la apoptosis facilitando la liberación de Dronc (Wang *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2002). Además, existe una proteína procedente de baculovirus, p35, que al ser expresada ectópicamente en *Drosophila* bloquea la función de Drice y de Dcp1, impidiendo el normal desarrollo de la ruta apoptótica (Hay *et al.*, 1994) (Fig. 8).

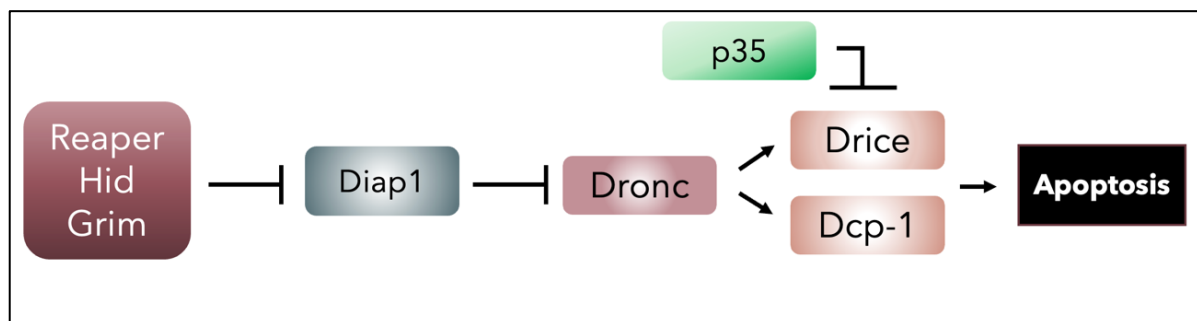


Fig. 8: Esquema de la ruta de apoptosis. *Reaper*, *Hid* y *Grim* inhiben la actividad de Diap1, inhibidor de Dronc, permitiendo la acción de Drice y Dcp1 que conducen a la ejecución de la apoptosis. La expresión de p35 bloquea la acción de Drice y Dcp1.

#### 4.2.1.- El papel de la apoptosis en la metamorfosis de *Drosophila*

La apoptosis resulta indispensable para la correcta eliminación de tejidos en diferentes contextos, y esto se hace especialmente notable durante el desarrollo de *Drosophila*, en particular durante la metamorfosis. Tanto en las glándulas salivares como en el cuerpo gordo, tras el reciclaje de nutrientes llevado a cabo por la autofagia, la apoptosis es la responsable de conducir finalmente a la muerte a las células que componen estos tejidos (Liu *et al.*, 2013; Berry y Baehrecke, 2007), y la inactivación de cualquiera de las rutas provoca un retraso significativo en la eliminación del órgano.

En el caso del sistema traqueal, estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron la implicación de la apoptosis en la degradación de este órgano durante la metamorfosis (Fraire-Zamora *et al.*, 2021). En este trabajo se propone un modelo de acortamiento y eliminación del DT en dos fases, mediado por la señalización a través de ecdisona. En respuesta a la liberación

de esta hormona tras la formación de la pupa, su receptor, EcR, induce la remodelación de la matriz apical extracelular (aECM) iniciando una reducción progresiva controlada de la longitud de la tráquea. Esto conduce a una inactivación del factor de transcripción *Yki*, que es traslocado del núcleo al citoplasma, impidiendo la inducción de su diana *Diap1*, inhibidor de *Dronc* y de las caspasas ejecutoras *Drice* y *Dcp1*. Al mismo tiempo, EcR induce la expresión del gen proapoptótico *reaper*, lo que genera una activación general de las caspasas a lo largo del DT, que conduce a la eliminación de los metámeros posteriores de la tráquea.

En este modelo, la inactivación del receptor de ecdisona previene la reducción del DT en el 100% de los casos, indicando el papel fundamental de esta hormona en la remodelación del sistema traqueal. Por el contrario, la inactivación de la caspasa *Drice* o de su inhibidor *Diap1* sólo impiden la eliminación de los metámeros posteriores en un 50% y 60% de los casos respectivamente, sugiriendo la actividad de algún sistema complementario para la degradación total de este tejido.

#### **4.2.2.- Regulación de la apoptosis y conexión con autofagia**

La apoptosis, al igual que la autofagia, funciona como un mecanismo para mantener la homeostasis de los tejidos, participando en la eliminación y renovación celular, por ejemplo, en eventos tales como la metamorfosis. De este modo, no resulta extraño que los genes implicados, tales como *Drice* o *Dronc* estén regulados por señales de estrés o de desarrollo, como la hormona ecdisona (Jiang *et al.*, 1997). La ruta de Hippo, a través de *Yki*, también actúa como regulador de este proceso, provocando una reducción en la transcripción de *Diap1*, activando la apoptosis (Fraire-Zamora *et al.*, 2021).

Se han demostrado interconexiones entre las rutas de muerte celular de apoptosis y autofagia en diferentes contextos. Las células expuestas a condiciones de estrés sufren una disminución en la concentración interna de metabolitos, por lo que la autofagia emerge como un mecanismo de reciclaje de componentes y energía que aumenta las posibilidades de supervivencia celular. Sin embargo, si las condiciones no mejoran, la apoptosis puede aparecer para facilitar la eliminación de la célula de forma controlada. En otros casos, como ocurre en algunos tejidos durante la metamorfosis, la célula está destinada a morir, y se da una situación de sinergia en la que la autofagia primero recluta energía, y posteriormente la apoptosis aparece para culminar la degradación. Estos dos procesos pueden retroalimentarse para actuar de manera coordinada, y células en proceso de autofagia activa muestran señales de aparición de apoptosis (Martin y Baehrecke, 2004). La sobreexpresión de *atg1* provoca la inducción de la apoptosis, mientras

que la inhibición de la apoptosis mediante la expresión ectópica de *p35* reduce a su vez la expresión de *atg1* (Scott *et al.*, 2007).

Por tanto, durante la metamorfosis, cuando toda una serie de eventos de degeneración, proliferación, diferenciación y morfogénesis deben ser coordinados escrupulosamente para llevar a cabo con eficacia y éxito la remodelación de todo el organismo, la actuación perfectamente calculada de estos mecanismos se revela como imprescindible.



## **OBJETIVOS**



## Objetivos

En esta tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- 1) Establecer un perfil de expresión génica diferencial entre las células progenitoras y no progenitoras del tronco dorsal del sistema traqueal de *Drosophila*.
- 2) Caracterizar la autofagia en el tronco dorsal del sistema traqueal de *Drosophila*.
- 3) Determinar la influencia de la autofagia en la eliminación del tronco dorsal del sistema traqueal larvario de *Drosophila* en la metamorfosis.
- 4) Análisis de la relación entre los niveles de autofagia y el grado de poliploidía de las células del tronco dorsal del sistema traqueal de *Drosophila*.
- 5) Análisis del efecto de distintos tipos de estrés en el tronco dorsal del sistema traqueal larvario de *Drosophila*.





# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## Materiales y métodos

### 1.- Cepas de *Drosophila*

Todas las cepas de *Drosophila* fueron mantenidas a 25°C en condiciones estándar. La cepa  $y^1w^{188}$  fue usada generalmente como genotipo control o Wild Type (WT). Los cromosomas balanceadores utilizados fueron CyO, TM3 o TM6, pudiendo estar marcados con LacZ o GFP.

Para experimentos de sobreexpresión o bloqueo mediante RNAi usamos el sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993), y con el objetivo de maximizar la expresión de los transgenes, los cruces fueron puestos a 29°C. Los *drivers* Gal4 usados fueron *bt*/Gal4 (*breathless*) y *trh*Gal4 (*trachealess*) para inducir la expresión en las células traqueales.

En las tablas 1-5 se muestra la lista y la descripción de las cepas utilizadas.

Tabla 1: Drivers, balanceadores y marcadores			
Cepa	Cromosoma	Descripción	Origen/Referencia
<i>bt</i> Gal4	II	Gal4 fusionado a promotor <i>bt</i>	Shiga <i>et al.</i> , 1996
<i>trh</i> Gal4	II	<i>Gal4</i> fusionado a promotor <i>trh</i>	BDSC 45071
<i>tub</i> Gal80ts	III	Gal80 ts fusionado a promotor <i>tubulina</i>	Cedido por M. Milán
If/CyO;MKRS/TM6	II, III	Balanceadores	Generado en el laboratorio
<i>bt</i> Gal4;UASDsRed	II, III	Gal4 fusionado a promotor <i>bt</i> ; combinado con el marcador DsRed bajo el control de UAS	Generado en el laboratorio
<i>bt</i> Gal4; <i>tub</i> Gal80ts	II, III	Gal4 fusionado a promotor <i>bt</i> y Gal80 ts fusionado a promotor <i>tubulina</i>	Generado en el laboratorio
<i>bt</i> Gal4;UASsrcGFP	II, III	Gal4 fusionado a promotor <i>bt</i> ; combinado con el marcador srcGFP bajo el control de UAS	Generado en el laboratorio

Tabla 2: Cepas relacionadas con el ciclo celular			
Cepa	Cromosoma	Descripción	Origen/Referencia
UASYki-S167A/TM6	III	Construcción expresando <i>Yki</i> con la serina 167 sustituida por alanina	BDSC 28818
CycAGFP	III	Ciclina A marcada con GFP	BDSC 64269

**Tabla 3: Cepas relacionadas con la ruta de apoptosis**

Cepa	Cromosoma	Descripción	Origen/Referencia
<b>UASp35</b>	III	Construcción expresando <i>p35</i> bajo el control de UAS	BDSC 5072
<b>UASmiRHG</b>	II	MicroRNA sintético contra <i>reaper</i> , <i>hid</i> y <i>grim</i> bajo el control de UAS	Siegrist <i>et al.</i> , 2010

**Tabla 4: Cepas relacionadas con la ruta de autofagia**

Cepa	Cromosoma	Descripción	Origen/Referencia
<b>UASAtg1RNAi/CyO</b>	II	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Atg1</i> bajo el control de UAS	BDSC 44034
<b>UASAtg1RNAi</b>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Atg1</i> bajo el control de UAS	BDSC 26731
<b>UASAtg8RNAi/CyO</b>	II	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Atg8</i> bajo el control de UAS	BDSC 80429
<b>UASAtg8RNAi/TM3</b>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Atg8</i> bajo el control de UAS	BDSC 28989
<b>UASAtg14RNAi</b>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Atg14</i> bajo el control de UAS	BDSC 55398
<b>UASAtg1</b>	III	Construcción expresando <i>Atg1</i> bajo el control de UAS	BDSC 51655
<b>Atg14(d13)/TM6</b>	III	Mutante nulo para <i>Atg14</i>	Cedido por G. Juhasz (Hegedús <i>et al.</i> , 2016)
<b>3xmCherryAtg8a</b>	X	Construcción expresando 3 moléculas de mCherry fusionadas a <i>Atg8</i>	Cedido por G. Juhasz (Denton <i>et al.</i> , 2012)

**Tabla 5: Cepas relacionadas con genes diferencialmente expresados en Tr2/Tr6**

Cepa	Cromosoma	Descripción	Origen/Referencia
<b>INDY</b>	III	Inserción P en el gen	BDSC 27901
<b>CG8630</b>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>CG8630</i> bajo el control de UAS	BDSC 65993
<b>UASCG30427RNAi/CyO</b>	II	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>CG30427</i> bajo el control de UAS	BDSC 58271
<b>Vha26</b>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Vha26</i> bajo el control de UAS	BDSC 38996
<b>Vha100-1</b>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Vha100-1</i> bajo el control de UAS	BDSC 26290

<i>Vha55</i>	II	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Vha55</i> bajo el control de UAS	BDSC 40884
<i>VhaAC39-1</i>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>VhaAC39-1</i> bajo el control de UAS	BDSC 35029
<i>Fili</i>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>Fili</i> bajo el control de UAS	BDSC 28568
<i>CngA</i>	III	Construcción expresando dsRNA para RNAi de <i>CngA</i> bajo el control de UAS	BDSC 26014

Tablas 1 a 5: Lista y descripción de las cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas

## 2.- MicroArrays

### 2.1.- Obtención de muestras

Para realizar los Microarrays se obtuvieron muestras de 6 individuos L3, de cada uno de los cuales se extrajeron Tr2 y Tr6, para realizar una comparación de la expresión diferencial entre células progenitoras (Tr2) y no progenitoras (Tr6). Como muestra de este segundo grupo se eligió el Tr6 por varias razones: estar suficientemente separado del Tr2 como para no arrastrar parte del mismo, no verse influido por posibles factores difusibles que pudieran extenderse fuera de los límites del Tr2, y por no poseer células progenitoras (traqueoblastos) activas en sus ramas secundarias al final del estadio de L3, como es el caso de del Tr4 y del Tr5, que pudieran incluirse por error en la muestra y afectar al resultado. Se realizó la disección de la tráquea en PBS 1x (ver apartado 5.1.1), se seccionaron los fragmentos elegidos, y se introdujeron inmediatamente en tampón de lisis (10 mM Tris HCl pH 7.4, 20 mM DTT, 0,5% SDS, 0,5 mg/ml Proteínasa K). En esta solución, se incubaron durante 15 minutos a 65° para facilitar la acción de la Proteínasa K y eliminar así las nucleasas, y transcurrido este tiempo se trasladaron rápidamente a hielo seco, para garantizar su inmediata congelación y preservar el RNA.

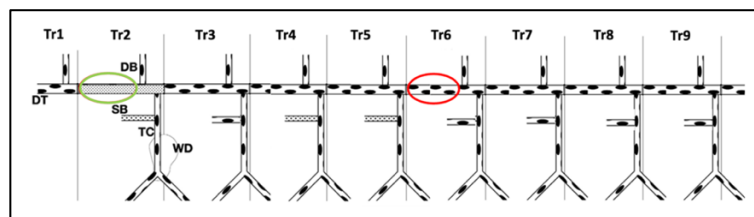


Fig. 9: Representación esquemática de la tráquea de larva L3 con las regiones del DT seleccionadas para el análisis de expresión marcadas: en verde, Tr2 como DAPs y en rojo, Tr6 como representante de células no progenitoras.

## 2.2.- Procesamiento de las muestras biológicas

A continuación, el RNA fue extraído usando perlas magnéticas, y su integridad fue analizada mediante un ensayo con Bioanalyzer. Para la síntesis de cDNA se usaron entre 1-3 ng de RNA, y se preparó una librería y se amplificó según el protocolo de Gonzalez *et al.*, 2010. El cDNA generado por transcripción reversa de cada muestra se añadió al mix de amplificación para la PCR, que se realizó con 25 ciclos (Ver Anexo 3). Una vez amplificado, el cDNA fue purificado mediante el kit PureLink Quick PCR Purification (Invitrogen), y se calculó su concentración usando el Nanodrop 1000 spectrophotometer. Por último, las muestras fueron sometidas a Chips de cDNA para analizar su expresión (Affymetrix GeneChip, Heber y Sick, 2006) en la facility de *Functional Genomics* del IRB.

## 2.3.- Análisis bioinformático de los resultados

Los resultados obtenidos fueron procesados y analizados por la facility de *Biostatistics* y *Bioinformatics* del IRB mediante los siguientes procedimientos:

### 1.- Preprocesamiento y control de calidad

- Normalización de las muestras siguiendo el protocolo de Irizarry *et al.*, 2003.
- Corrección a priori para las PCA de las réplicas biológicas

### 2.- Análisis de la expresión diferencial

- Test estadísticos Bayes-Shrinkage, incluyendo réplicas biológicas como covariables
- Ajuste de contrastes múltiples Benjamini-Yekutieli, 2005

### 3.- Análisis de enriquecimiento

- GSEA preclasificados (Gene Set Enrichment analysis) (Subramanian *et al.*, 2005)
- Broad Institute GenePattern (Reich *et al.*, 2006)
- Bioconductors' R package org.Hs.eg.db para los genes anotados de acuerdo a los términos GO marcados y las rutas Kegg (Carlson package version 2.14.0.)
- GO slim terms descargados de la web GO project (<http://geneontology.org/page/go-slim-and-subset-guide>)
- Todos los rangos máximos y mínimos construidos de acuerdo a los t-estadísticos

### 3.- qRT-PCR

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos mediante los arrays, se realizó una PCR de comprobación, usando cebadores de genes conocidos expresados predominantemente en células progenitoras o no progenitoras. Para aportar mayor fiabilidad, se utilizó cDNA procedente del RNA usado para los arrays, así como muestras nuevas de los mismos tejidos de tráquea de larva L3. Para ello se siguió el protocolo de disección que se describe en el apartado 5.1.1.

Una vez obtenidas las muestras de tejido, se realizó la extracción de RNA siguiendo el protocolo de Whisenant (Ver Anexo 4), para después eliminar el DNA genómico mediante el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN).

Por último, se obtuvo cDNA mediante transcripción reversa usando High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), y con el 480 LightCycler se realizó qPCR en tiempo real con 32 ciclos a 60°C. Los niveles de expresión de los genes seleccionados se normalizaron usando como referencia los niveles de mRNA de *actin42A*. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 6.

Metámero	Cebador	Secuencia (5'-- 3')
Tr2	<i>InR</i> Forward	AAGCGTGGGAAAATTAAGATGGA
Tr2	<i>InR</i> Reverse	GGCTGTCAACTGCTTCTACTG
Tr2	<i>hdc</i> Forward	CTCTCATCGCTGGCCCAATC
Tr2	<i>hdc</i> Reverse	GTGCGTCCCTCGTATTTAACCT
Tr6	<i>Atg8</i> Forward	CCCTGTACCAGGAACATCACG
Tr6	<i>Atg8</i> Reverse	GGCCATGCCGTAAACATTCT
Tr6	<i>Thor</i> Forward	TCCTGGAGGCACCAAACCTTATC
Tr6	<i>Thor</i> Reverse	GGAGCCACGGAGATTCTTCA
Tr2-Tr6	<i>Actina</i> Forward	GCGTCGGTCAATTCAATCTT
Tr2-Tr6	<i>Actina</i> Reverse	AAGCTGCAACCTCTTCGTC

Tabla 6: Lista de cebadores utilizados para la qRT-PCR

### 4.- Observación de embriones

#### 4.1.- Colección y decorionación de embriones

Para recoger embriones de estadios 13 a 15, pusimos los cruces de progenitores en nidos en placas de agar durante 18 horas a 29°C, para intensificar la expresión de los transgenes. Transcurrido este tiempo, se retiraron los adultos y se añadió lejía 100% a las placas,



manteniéndola durante dos minutos para provocar la decorionación de los embriones. Posteriormente, los recogimos de las placas con un pincel, los colocamos en filtros y los lavamos con Tritón 0,1%.

#### **4.2.- Observación *in vivo***

Para la observación de embriones *in vivo*, una vez decorionados y lavados se montaron directamente en un portaobjetos con Tritón 0,1% y se protegieron con un cubreobjetos para proceder a su análisis bajo microscopio.

#### **4.3.- Fijación y montaje**

Los embriones decorionados fueron trasladados a tubos Eppendorf de 1,5 ml y fijados durante 20 minutos en formaldehído al 4% en PBS 1x (0,1 M NaCl, 10mM tampón fosfato salino, pH 7,4) y Heptano 1:1 para generar aberturas en la membrana vitelina. Tras la fijación, se eliminó la fase inferior y se lavaron con metanol tres veces (para desvitelinizar y aumentar la fijación), agitando entre cada lavado y eliminándolo después. Por último, se montaron los embriones en Fluoromount-G (Southern biotech).

### **5.- Disección y preparación de tejidos para su observación**

Para la observación de tejidos de larva o de pupa al microscopio confocal, ya sea para observación directa o para marcaje inmunohistoquímico, es precisa la disección y fijación previa de los mismos. A continuación se describen los procedimientos.

#### **5.1.- Sistema traqueal y discos imaginales de larva**

##### **5.1.1.- Disección de larvas**

Para obtener la tráquea larval y los discos imaginales (usados como control interno de tejido), diseccionamos los individuos seleccionados de los estadios L2 o L3 en pocillos de cristal bajo observación en estereomicroscopio Leica MZ10F Fluo, en solución de tampón fosfato salino (PBS) 1X a temperatura ambiente. Para la disección, se seccionó el extremo más caudal del individuo mediante un corte bajo los espiráculos posteriores utilizando las tijeras (Spring scissors 14125, WPI), y se introdujeron unas pinzas de disección por las mandíbulas, mientras que con otras se fue tirando suavemente de la cutícula del animal, para dejar expuestos todos los órganos internos. Una vez evertida la larva, se eliminaron con las pinzas el cuerpo graso y otras estructuras que pudieran

dificultar la correcta absorción del fijador o los anticuerpos por la tráquea y los discos imaginales. La disección de pupas de menos de 3h apf se realizó del mismo modo que en larva.

### **5.1.2.- Fijación de tráquea de larvas**

Los individuos diseccionados fueron inmediatamente sumergidos en una solución de fijación de formaldehído al 4% (SIGMA), en tubos Eppendorf de 1,5 ml, a temperatura ambiente y agitación continua durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el fijador y se lavó la muestra con PBS 1x, agitándolo suavemente y retirándolo inmediatamente, repitiendo el lavado tres veces.

### **5.1.3.- Montaje directo de tráqueas de larvas**

En los casos que no se requirió marcaje con anticuerpos, como en muestras procedentes de cepas que ya incorporen el marcaje deseado (por ejemplo *srcGFP*, *DsRed* o *mCherry*), el montaje se realizó directamente tras lavar el fijador. Para ello, se colocaron los individuos diseccionados y fijados en pocillos de cristal con PBS 1x, se separaron las tráqueas y los discos de la cutícula mediante las pinzas de disección, y se montaron en portaobjetos de cristal en medio Vectashield con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Vector Laboratories). Se cubrieron con cubreobjetos de cristal de 22x40 mm y se sellaron los bordes.

### **5.1.4.- Incubación con anticuerpos (inmunohistoquímica)**

Las muestras que requerían marcaje con anticuerpos, tras eliminar el fijador, fueron mantenidas durante 1h en PBST-BSA 0,5% con agitación y a temperatura ambiente, para bloquear posibles uniones inespecíficas.

La incubación en anticuerpo primario se realizó a continuación, diluido en PBST-BSA 0,5%, durante toda la noche, en agitación y a 4°C. Posteriormente, se eliminó el anticuerpo lavando la muestra 3 veces durante 10 minutos con PBST-BSA 0,5%, para después incubarlo en anticuerpo secundario en oscuridad durante 2h, siempre en agitación y temperatura ambiente. Por último, se eliminaron restos del anticuerpo secundario mediante 2 lavados más de 10 min con PBST-BSA 0,5%, y se separaron las tráqueas y los discos de la cutícula en PBS 1x, para realizar el montaje en medio Vectashield con

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Vector Laboratories) en portaobjetos de cristal. Para los anticuerpos utilizados, ver Tabla 2.

## **5.2.- Marcaje específico para Lysotracker:**

Para la detección específica de lisosomas activos en las células traqueales de larva se utilizó el marcador Lysotracker, que requiere un protocolo específico.

Tras la disección de los individuos, se incubó el tejido traqueal directamente en una concentración de 0,5 nM en PBS, durante 3 minutos en oscuridad. Posteriormente se fijó durante 20 minutos y se montó en las mismas condiciones descritas previamente, pero la observación al microscopio se realizó inmediatamente (DeVorkin y Gorski, 2014).

## **5.3.- Sistema traqueal de pupa**

### ***5.3.1.- Disección de pupas 5h-7h apf***

Las pupas seleccionadas de 5-7h apf fueron diseccionadas también bajo observación en el mismo estereomicroscopio y en PBS 1x, pero siguiendo un método diferente debido a las características morfológicas de dicho estadio. Para ello y mediante las tijeras de disección, se practicó un corte justo bajo los espiráculos anteriores y otro bajo los posteriores, seccionándolos completamente, así como una incisión ventral o lateral, según la disposición de las tráqueas en cada animal, lo más grande posible, para facilitar al máximo la entrada del fijador. Cuando fue posible, por estas aberturas se eliminaron fragmentos de estructuras no deseadas como el cuerpo graso.

### ***5.3.2.- Fijación de tráquea de pupas***

Una vez realizadas las incisiones, se sumergieron las pupas en fijador del mismo modo que en larvas, pero incrementando el tiempo de fijación a 25 minutos (para pupas de 5h apf) o 40 minutos (para pupas de 7h apf).

### ***5.3.3.- Montaje directo de tráquea de pupas***

En los casos que no se requirió marcaje con anticuerpos, tras la fijación las muestras se colocaron de nuevo en pocillos de cristal con PBS 1x, y mediante las pinzas y las tijeras de disección, se eliminó la cutícula de la pupa y se extrajeron las tráqueas, que fueron montadas en el mismo medio Vectashield con DAPI.

Para el proceso de inmunohistoquímica en los experimentos que requerían marcaje con anticuerpos, se siguió el mismo protocolo que para larvas.

<b>Anticuerpos primarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen</b>
Anti-p62	p62	Rabbit	1:1000	Pircs et al., 2012
Anti-DL	Disc Large	Mouse	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-GFP	GFP	Goat	1:400	Tebu-bio Rockland
Anti-PH3	Phosphohystone 3	Rabbit	1:100	Werfen/Cell signalling technology

<b>Anticuerpos secundarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen</b>
Alexa 488	-	Donkey	1:500	Life Technologies
Alexa 555	-	Donkey	1:500	Life Technologies
Alexa 647	-	Donkey	1:500	Life Technologies

Tabla 7: Lista de anticuerpos utilizados en este proyecto

## 6.- Captura de imágenes

Para obtener las imágenes de embriones y de tráquea de larva y de pupa diseccionadas, usamos tres microscopios confocales diferentes según los requerimientos de cada experimento. En primer lugar, el Confocal Microscope Leica SPE con los objetivos HC PL APO 20x/0,70 CS y ACS APO 40x/1,15 Oil CS y filtros ultravioleta, verde, rojo y azul. También se utilizó el Spectral Confocal Microscope Leica SP5, con los objetivos HC PL APO 20x/0,70 CS y HCX PL APO 40x/1,25-0,75 Oil CS y los mismos filtros, así como el Spectral Confocal Microscope Zeiss LSM780+FLIM con los objetivos LD LCI PlanApo 25x 0.8 y Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27; todos pertenecientes a la *Advanced Digital Microscopy Core Facility* del IRB. Para la adquisición, en los ejes XY se seleccionó siempre 1024x1024, y las secciones en Z para tráqueas fueron de 0,5  $\mu\text{m}$ .

Los mismos parámetros de adquisición fueron usados para todos los análisis comparativos.

## **7.- Observación de tráquea de pupas *in vivo***

Para el seguimiento de la degradación de la tráquea de larva durante la metamorfosis, se seleccionaron las muestras y se tomaron imágenes de forma secuencial.

### **7.1.- Obtención de muestras**

Para obtener pupas del estadio deseado, las puestas de embriones fueron sincronizadas, dejando a los adultos reproducirse y depositar huevos durante 24 horas a 25°C, tras lo cual los adultos eran trasladados a un tubo nuevo y los tubos con embriones colocados a 29°C para incrementar el efecto del sistema de expresión Gal4/UAS. Estos tubos se sometieron a observación periódica, y los individuos fueron seleccionados justo en el momento de formación de la pupa (0h apf, *after pupal formation*), tras lo cual se colocaron en placas de cultivo vacías y se mantuvieron a 29°C entre fotos, que se realizaron en los tiempos 0h apf, 16h apf, 20h apf, 24h apf, 30h apf, 50h apf, 70h apf y 90h apf. Para optimizar las condiciones ambientales, se añadió a cada placa un fragmento de papel absorbente empapado en agua con el objetivo de mantener la humedad.

### **7.2.- Captura de imágenes de pupas *in vivo***

Las imágenes de pupas fueron tomadas usando un Macroscope Olympus Fluo MVX10, con objetivo Olympus MV PLAPO 1x y aumento de 1,6x, con luz blanca y fluorescencia roja, en calidad XY 1024X1067, de la *Advanced Digital Microscopy Core Facility* del Institute for Research in Biomedicine (IRB).

## **8.- Análisis de imágenes y estadística**

Para el tratamiento de las imágenes obtenidas se usaron diferentes softwares:

### **8.1.- Fiji (ImageJ)**

Fiji (ImageJ) (Schindelin *et al.*, 2012) fue utilizado para la visualización, el análisis y el montaje de las imágenes obtenidas mediante los diferentes microscopios confocales y

estereomicroscopio. Para las cuantificaciones se usaron proyecciones de las secciones ópticas de cada imagen.

### **8.1.1.- Cuantificación de contenido de DNA**

Para cuantificar la cantidad de DNA por núcleo se midió la intensidad de DAPI (Darzynkiewicz, 2011) con la herramienta *Measure>Integrated Density*, mediante una macro de Fiji propia (Ver Anexo 2). A los valores adquiridos para cada imagen se les restó el fondo usando la misma macro, para obtener los valores reales de la intensidad del núcleo (eliminando posibles artefactos provocados por quitina, etc). Para ello, se seleccionó y cuantificó un área equivalente de la misma imagen, y se restaron los valores.

Para obtener el número de ciclos de replicación de las células poliploides, los valores de intensidad de estas células se normalizaron con los valores de DNA células progenitoras, diploides, de discos imaginales.

### **8.1.2.- Cuantificación de dp62**

Para cuantificar la cantidad de dp62 por área como medida inversa de autofagia, se midió la intensidad de señal del anticuerpo (Waguri y Komatsu, 2009) mediante una macro de Fiji (Ver Anexo 2). Para ello, se escogió un área de cada metámero excluyendo ramas laterales que cruzaran el DT, se midió la intensidad de la señal y se dividió por el área seleccionada.

### **8.1.3.- Cuantificación de Atg8Cherry**

Para cuantificar Atg8 como medida de autofagia activa se usó otra macro de Fiji (Ver Anexo 2), que contaba el número de puntos de Atg8mCherry por unidad de área (Denton *et al.*, 2012).

## **8.2.- IMARIS**

Para corroborar los datos de contenido de DNA obtenidos mediante Fiji se usó ocasionalmente el software IMARIS (Oxford Instruments). Para ello, en visualización 3D, se usó la herramienta *Surfaces*, y se midió la intensidad de las mismas.

### **8.3.- Adobe Photoshop CC**

Algunas de las imágenes de pupas tomadas con luz blanca fueron tratadas mediante el software Adobe Photoshop CC, para unificar el tono de color, que en ocasiones podía variar por la disposición de la fuente de luz. Para ello, se modificaron los parámetros de brillo, contraste y saturación.

### **8.4.- Análisis de datos y estadística**

Los valores obtenidos a partir de las diferentes cuantificaciones de las imágenes fueron importados y tratados mediante el software GraphPad Prism 8.4.3, que se usó para realizar los análisis estadísticos y generar los gráficos. Las barras de error representadas muestran la desviación estándar de la media. Para los análisis estadísticos, se usó el test de Welch para corregir la varianza de distribución de muestras desiguales, y se hicieron comparaciones entre múltiples grupos mediante la Anova de Welch seguida del test de Dunnett T3. Para los análisis de correlación, se usó el Test de Pearson. Según estos test, las diferencias se consideraron significativas cuando  $Pvalue < 0,05$ . En los gráficos, la representación sigue el criterio  $*=Pvalue < 0,05$ ,  $**= Pvalue < 0,01$ ,  $***= Pvalue < 0,001$  y  $****= Pvalue < 0,0001$ .

El tamaño muestral para cada experimento fue de un mínimo de 4 individuos, preferentemente entre 5 y 10.

## **9.- Preparación de medios para inducción de estrés nutricional u oxidativo**

Para someter a las larvas de *Drosophila* a estrés nutricional, se seleccionaron las mismas en estadio L2, L3 temprano y L3 tardío, y se pusieron en viales previamente preparados con alimentación especial. Ésta se elaboró eliminando nutrientes clave como aminoácidos o glucosa, utilizando las siguientes recetas:

### **9.1.- Restricción nutricional de aminoácidos:**

Medio sin levadura “0% aa”

(Para 100ml)

- 3,12 g harina ecológica (TalComPinta)
- 0,72 g Agar (Condalab)
- 4,7 g D-glucosa (TalComPinta)
- 100ml H<sub>2</sub>O

Tras la esterilización del medio mediante autoclavado, se añadieron:

- 0,1 g nipagin (Metil 4 hidroxibenzoato) (SIGMA)
- 0,44 g Ácido propiónico (PanReac AppliChem)

Al medio sin levadura se le denominó “0% aa”, y se utilizó esta nominación para todos los medios nutricionales con restricción en el aporte de levadura. Para la preparación de medios con mayor porcentaje de aminoácidos, se siguió la misma receta anterior, pero añadiendo diferentes cantidades de levadura según el caso: “2,5% aa”: 0,1g levadura; “5% aa”: 0,3g levadura; “10% aa”: 0,6g levadura; y “30% aa”: 1,8g levadura.

### **9.2.- Restricción nutricional de carbohidratos:**

(Para 100ml)

- 3,12 g harina ecológica (TalComPinta)
- 0,72 g Agar (Condalab)
- 6,25 g levadura (TalComPinta)
- 100 ml H<sub>2</sub>O

Tras la esterilización del medio mediante autoclavado, se añadieron:

- 0,1 g nipagin (Metil 4 hidroxibenzoato) (SIGMA)
- 0,44 g Ácido propiónico (PanReac AppliChem)



### **9.3.- Inducción de estrés oxidativo por Paraquat**

Concentración utilizada de Paraquat: 100 mM

(Para 100 ml)

- 0,31 g harina ecológica (TalComPinta)
- 0,072 g Agar (Condalab)
- 0,62 g levadura (TalComPinta)
- 4,7 g D-glucosa (TalComPinta)
- 10 ml H<sub>2</sub>O

Tras la esterilización del medio mediante autoclavado, se añadieron:

- 0,1 g nipagin (Metil 4 hidroxibenzoato) (SIGMA)
- 0,44 g Ácido propiónico (PanReac AppliChem)
- 10 ul Paraquat 100 mM + 1ml colorante alimenticio

Las larvas se mantuvieron con estos diversos tipos de alimentación entre 3 y 14 días, y a 25°C o 29°C en función del experimento.

## **RESULTADOS**



## Resultados

### **Diferencias moleculares entre DAPs y células no progenitoras, y autofagia asociada a la poliploidía como promotora de la degradación de la tráquea de larva durante la metamorfosis**

El sistema respiratorio traqueal de la larva de *Drosophila* se compone de varios grupos de células, que, a pesar de realizar funciones similares durante esta fase de la vida del animal, presentan distintos perfiles de expresión génica y adquieren diferentes destinos durante el estadio de metamorfosis.

Para analizar estas diferencias, se realizó un análisis del perfil de expresión diferencial entre las células progenitoras diferenciadas (DAPs) y las no progenitoras mediante un microarray de cDNA. Los resultados obtenidos mostraron una amplia lista de genes diferencialmente expresados entre ambos grupos de células.

En base a estos resultados, se realizó un primer estudio de algunos de los genes con mayor expresión diferencial entre las dos muestras. A continuación, a partir de los datos del análisis GSEA, se seleccionaron conjuntos de genes que mostraban una presencia destacada en múltiples anotaciones referentes a las células no progenitoras, entre los que se encontraban genes relacionados con la ruta de autofagia.

A partir de este punto, se describe la caracterización de este proceso en el DT en estadio de larva y de pupa, y de su implicación en la degradación del sistema traqueal durante la metamorfosis.

Puesto que se ha demostrado que la apoptosis participa en la eliminación del sistema respiratorio de larva (Fraire-Zamora *et al.*, 2021), se realizó también un análisis de esta ruta en estadios avanzados de pupa.

En relación con los resultados relativos a la actividad autofágica en la tráquea, se exploró la relación existente entre los niveles de autofagia y el grado de poliploidía a lo largo de la rama principal del sistema traqueal.

De forma paralela, con el objetivo de inducir una mayor actividad autofágica en el sistema traqueal en estadio L3, se describe el efecto de someter a los animales a distintos tipos de

estrés nutricional, y los efectos encontrados en las DAPs como consecuencia de esta situación. Por último, se detalla cómo es posible revertir los fenotipos encontrados retornando a condiciones de nutrición estándar.

## **1.- Análisis de la expresión diferencial entre células progenitoras diferenciadas (DAPs) y células no progenitoras**

Con el objetivo de analizar el perfil genético diferencial entre las células progenitoras diferenciadas (DAPs) en la tráquea de la larva de *Drosophila*, y las células no progenitoras, se tomaron muestras del segundo metámero (Tr2), donde se localizan las DAPs, y del sexto (Tr6). Excepto el Tr2, todos los demás metámeros que forman el Tronco Dorsal (DT) del sistema respiratorio de la larva están compuestos por células poliploides no progenitoras, pero se eligió el Tr6 como representante de este grupo por cuestiones principalmente técnicas: estar lo suficientemente alejado del Tr2 como para no arrastrar parte del mismo durante la disección, y por no poseer células progenitoras (traqueoblastos) activas en sus ramas secundarias al final del estadio de L3 (como es el caso de del Tr4 y del Tr5), que pudieran incluirse por error en la muestra y afectar al resultado. Se realizó un microarray comparando ambos grupos (Tr2-DAPs y Tr6-no progenitoras), para detectar las diferencias de expresión de genes entre ambos y utilizar esta información como punto de partida. Los resultados obtenidos fueron procesados por el servicio de Bioinformática y Bioestadística del IRB.

### **1.1.- Genes diferencialmente expresados entre DAPs y células no progenitoras**

Inicialmente se llevó a cabo un preprocesamiento y control de calidad de los resultados, en los que se realizó la normalización de los datos y la corrección *a priori* del análisis de los Componentes Principales de las réplicas biológicas. En los procesos de normalización de los datos se incluyen los análisis de intensidad antes y después de la normalización, los resultados NUSE (*Normalized Unscaled Standard Error*), donde el grado de desviación de los valores de la media indica la calidad del procedimiento de análisis, y RLE (*Relative Log Expression*) cuya función es eliminar las variaciones indeseadas provocadas por factores técnicos que no tienen que ver con la variabilidad propia de la muestra biológica. Todos estos resultados, así como el análisis de Componentes Principales por grupo, individuo y muestra pueden consultarse en el Anexo 5.

A continuación se llevó a cabo el análisis de la expresión diferencial, y se seleccionaron los *probesets* (genes/productos de genes) más significativos, en función del valor FDR (*Fold Discovery Rate*). Establecimos el límite inicial en los datos que combinaban un FDR menor que

0,01 y FC (*Fold Change*) mayor que 2. Los genes que se encuentran dentro de este rango se muestran en la Fig. 10 (los datos completos se muestran en el Anexo 6).

Genes diferencialmente expresados en Tr2 respecto a Tr6		Genes diferencialmente expresados en Tr6 respecto a Tr2	
Gene symbol	Tr2 FC	Gene symbol	Tr6 FC
Cpr97Eb	32,2	CG30427	82,42
Fili	22,69	Acp1 / CG13796 / CG31904	32,82
DwilCG33993	13,63	CngA	24,62
CG10280	12,59	CG5866	19,08
CG8630	12,22	CG14095	17,93
Osi9	12,1	CG34120	12,52
Cpr64Ad	11,69	CG10663	8,73
CG8927	11,68	CG10481	6,96
nyo	9,57	CR43097	6,06
CG14566	9,46	CG15236	4,91
Cpr47Ec	9,28	CG1394	4,65
CycA	9,22	CG10898	4,03
CG15497 / Fer1	8,67	CG11779 / CG5835	3,89
drd	7,56	pgant5	3,57
Cdk1	6,46	CG42822	3,54
Cks30A	6,15	CG30463	3,15
CG3823	5,85	CG8738	3,12
pav	5,45	PGRP-SA	3,05
polo	5,28	DsimCG4607	2,98
sip2	5,28	Spn88Ea	2,96
shu	5,26	CG42788	2,78
tum	5,18	CG7896	2,51
pch2	4,38	Inos	2,38
Nnf1a	4,36	chinmo	2,32
Klp61F	4,21	snz	2,21
Pen	4,2	sgll	2,19
CG13042	4,18	Indy	2,11
CG9990	4,11		
mud	3,68		
sti	3,68		
CG7675	3,63		
nesd	3,51		
cmet	3,2		
sano	3,17		
fzy	3,16		
CG42342	3,04		
fru	2,6		
CG8173	2,42		
plum	2,35		
hoip / pins	2,25		
CG8478	2,11		
CG32982	2,03		
hubl / spaw	2,03		
HP4	2,01		

Fig. 10: Tabla de genes (*probesets*) diferencialmente expresados entre células del metámero Tr2 (DAPs) y células del metámero Tr6 (no progenitoras) con FDR<0,01 y FC>2.

En los resultados procedentes de la muestra de células progenitoras encontramos un enriquecimiento de genes relacionados con procesos referentes a distintos aspectos del ciclo mitótico, como la progresión del ciclo (*CycA*, *Cdk1*), su regulación (*polo*, *sti*), o su dinámica (*mud*, *cmet*).

En los resultados obtenidos a partir de la muestra de células no progenitoras, encontramos un enriquecimiento en genes relacionados con procesos variados como fagocitosis (*CG30427*), canales iónicos (*CngA*) o metabolismo y duración de la vida celular (*Indy*).

En ambos grupos se encontraron numerosos genes a los que no se ha asignado nombre en *Drosophila*, pero cuya estructura es conocida, y su función puede ser conocida, estar predicha o existir ortólogos en humanos. Aparecen anotados como “CG” (*protein coding genes*) o “CR” (*non protein coding genes*) en función de si codifican proteínas o no.

## **1.2.- Análisis de enriquecimiento de las muestras DAPs y células no progenitoras**

En el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA o *Gene Set Enrichment Analysis*) se utilizan bases de datos para la organización e interpretación de los datos sobre la expresión diferencial de los genes encontrados. En primer lugar, en la categoría de anotaciones Broad Hallmarks, se organizan los genes de acuerdo a los datos registrados en MSigDB (*Molecular Signature DataBase*). La categoría de anotaciones GO terms (*Gene Ontology*, donde se engloban Procesos Biológicos, Componentes Celulares, Funciones Moleculares y SLIM (recapitulación de los anteriores) organiza los resultados en base a la expresión diferencial coordinada de conjuntos anotados de genes, para facilitar la comprensión de funciones y procesos biológicos relevantes. Por último, en las anotaciones KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), se agrupan los genes en base a funciones y utilidades de alto nivel en los sistemas biológicos. En conjunto, estas bases de datos se utilizan para facilitar la interpretación de grandes grupos de datos genéticos y moleculares obtenidos en procesos de secuenciación o perfiles de expresión. Los resultados detallados pueden consultarse en el Anexo 7. Todos estos términos fueron examinados en busca de resultados que pudieran indicar procesos activos de forma diferencial entre los grupos de células progenitoras y no progenitoras.

En todos los conjuntos de anotaciones para DAPs encontramos procesos relacionados con el ciclo mitótico, como regulación del mismo y de los componentes que lo llevan a cabo incluyendo factores como el huso mitótico, los microtúbulos o la organización de los cromosomas. También encontramos elementos referentes a procesos básicos como la transcripción de proteínas, así como anotaciones relacionadas con una elevada actividad metabólica.

En los resultados de las anotaciones de la muestra de células no progenitoras (Tr6) se encontraron funciones muy variadas relacionadas con diversos tipos de metabolismo intermediario y homeostasis, pero detectamos de forma prominente anotaciones referentes a reciclaje de componentes celulares.

En la Fig. 11 se muestran las anotaciones SLIM para funciones y procesos diferencialmente expresados en Tr2 respecto a Tr6 y viceversa, representados en función del NES (*Normalized Enrichment Score*) de cada muestra. Las anotaciones presentadas en los gráficos son aquellas con valores de  $NES > 1$ .



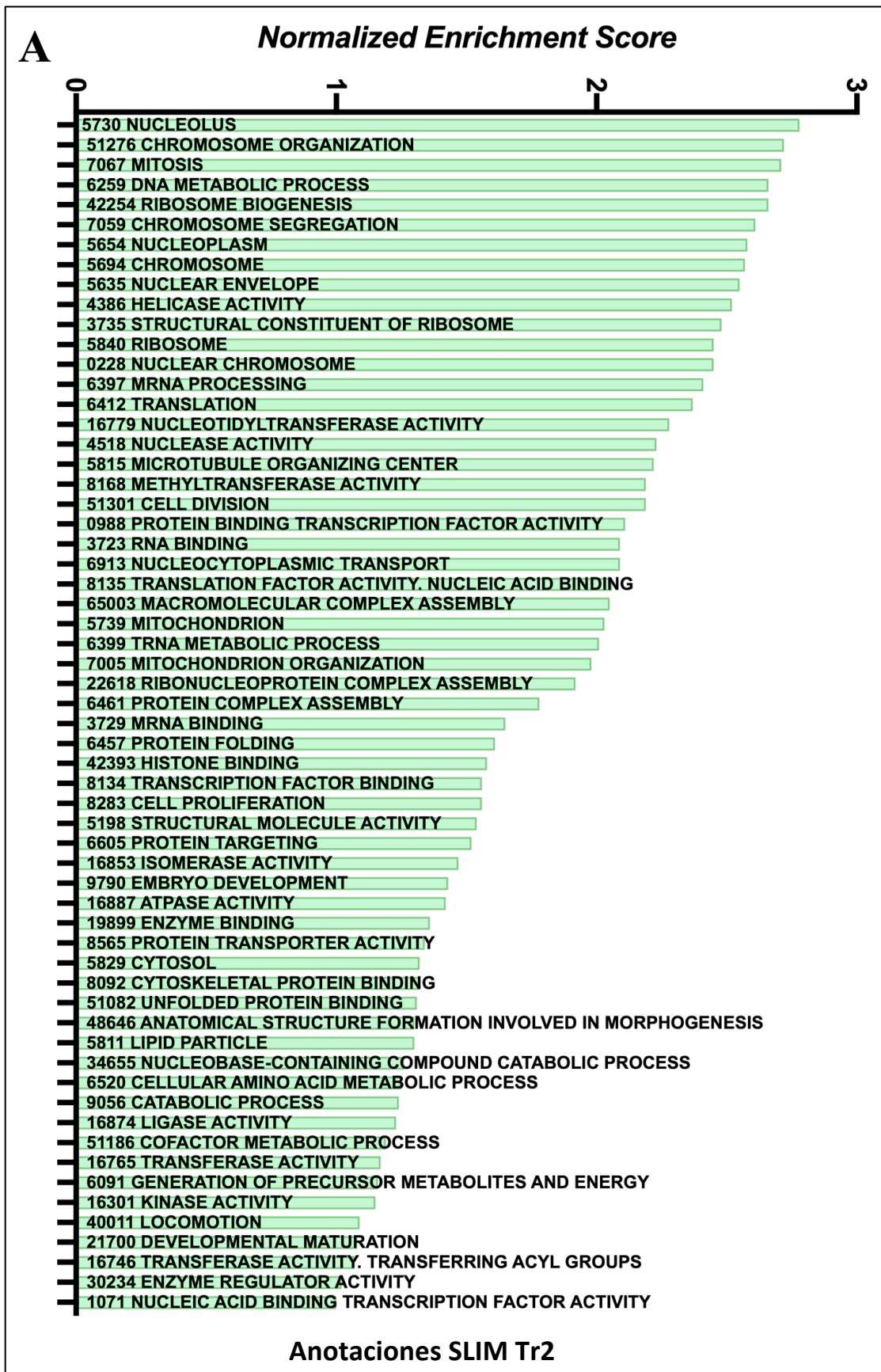


Fig. 11A: Gráfico de anotaciones SLIM de expresión diferencial en base a los valores de NES (*Normalized Enrichment Score*) para Tr2 (DAPs) respecto a Tr6 (células no progenitoras) con NES>1.



Fig. 11B: Gráficos de anotaciones SLIM de expresión diferencial en base a los valores de NES (*Normalized Enrichment Score*) para Tr6 (células no progenitoras) respecto a Tr2 (DAPs) con NES>1.

### 1.3.- Corroboración de los resultados de Arrays mediante qPCR

Para corroborar los resultados obtenidos en los arrays y asegurar que las muestras eran correctas y pertenecían a cada uno de los grupos respectivamente (DAPs y células no progenitoras), realizamos una qPCR usando el cDNA obtenido a partir del RNA extraído para los arrays de los tejidos seleccionados, así como material nuevo de los mismos tejidos de larva L3. Para esta qPCR elegimos genes cuya expresión diferencial ha sido ampliamente descrita en cada uno de los grupos de células. Para la muestra de células progenitoras (DAPs, del Tr2) se seleccionaron los genes *Insulin Receptor (InR)* y *hdc (headcase)* (Shim *et al.*, 2013, Giannios y Casanova, 2021), y correspondientes a la muestra de células no progenitoras (Tr6), se eligieron los genes *Atg8* y *Thor* (Miron *et al.*, 2001). Los resultados indicaron que efectivamente estos genes se encuentran regulados diferencialmente entre las dos muestras. Para *InR* y *hdc* existe una expresión diferencial mayor en el Tr2 con respecto al Tr6, y ocurre de forma opuesta para *Atg8* y *Thor* (Fig. 12).

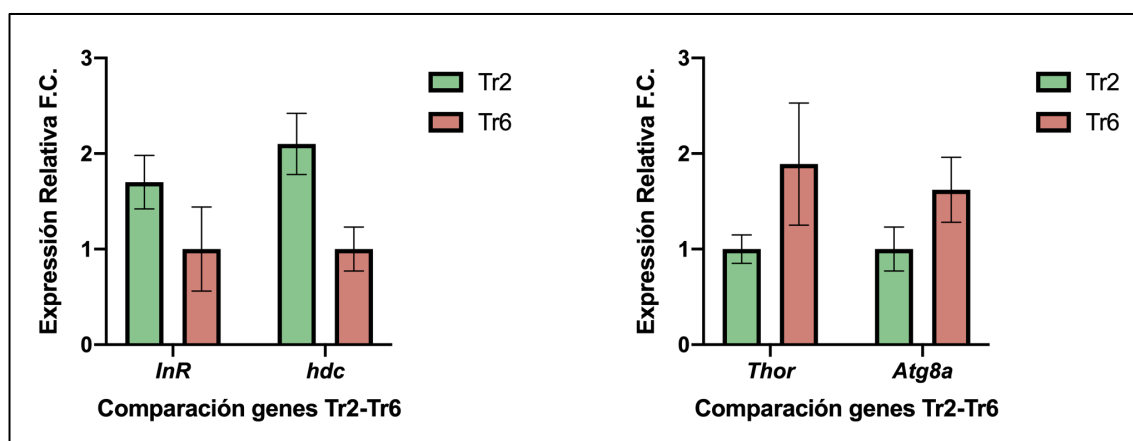


Fig. 12: Representación de los resultados obtenidos por qPCR de genes diferencialmente expresados en cada muestra. *InR* y *hdc* presentan un mayor FC en Tr2 (DAPs) respecto a Tr6, mientras que *Thor* y *Atg8a* presentan un mayor FC en Tr6 respecto a Tr2. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

## 2.- Estudio de genes con alta expresión diferencial entre células progenitoras y no progenitoras de la tráquea de larva de *Drosophila*

A partir del análisis de genes diferencialmente expresados entre DAPs y células no progenitoras (ver apartado 1.1), decidimos comenzar el estudio de los resultados mediante un cribado preliminar de genes seleccionados de cada muestra.

Elegimos algunos genes con alto FC en cada uno de los grupos, como *Indy*, *CG30427* o *CngA* para el Tr6, y *Fili* o *CG8630* de los resultados obtenidos para DAPs (Tr2).

Mediante el uso de mutantes, o RNAi y el sistema Gal4-UAS, inactivamos estos genes para examinar su efecto en el sistema traqueal de *Drosophila*, y analizar si era posible relacionarlos con procesos o funciones que estuvieran activos de forma diferencial entre células progenitoras y no progenitoras.

En la Figura 13 se presentan imágenes de los resultados para dos de los genes analizados, *Indy* y *CG30427*. En la Fig. 13A se muestran metámeros que contienen DAPs (en el Tr2) y células no progenitoras del DT (Tr3 y Tr4) en larvas mutantes para el gen *Indy* (no expresan el gen en ningún tejido).

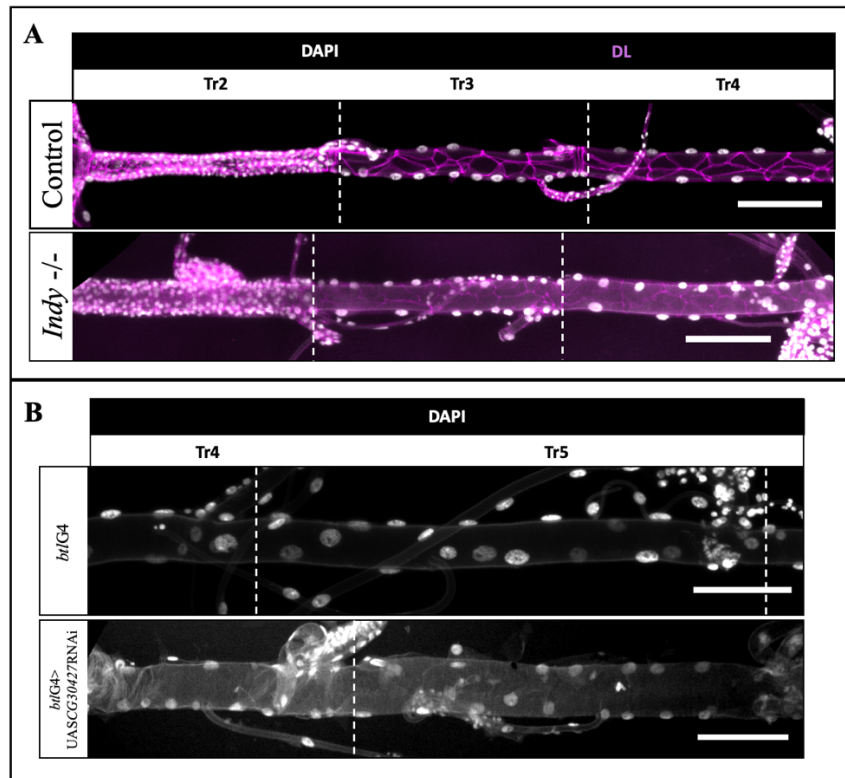


Fig. 13: Imágenes representativas de fenotipos en DT de L3 de genes seleccionados. A) Control y fenotipo de *Indy*<sup>-/-</sup>, metámeros Tr2 a Tr4. B) Control y fenotipo de UASCG30427RNAi, metámeros Tr4 y Tr5. Barras de escala 100um.

El gen *CG30427* se inactivó a lo largo de todo el DT, aunque en este caso se muestra sólo el detalle de dos metámeros que contienen células no progenitoras (Tr4 y Tr5) porque es en este grupo de células donde se da un enriquecimiento de la expresión del gen (Fig. 13B). En ninguno de los casos analizados se encontraron diferencias con el control en

cuanto a número de células o estructura del DT, ni en el grupo de DAPs ni en las células no progenitoras.

### **3.- Análisis de grupos de genes en base a los resultados GSEA**

Puesto que el análisis de la inactivación de genes con mayor FC de expresión diferencial entre células progenitoras y no progenitoras del cribado inicial no arrojó resultados significativos, decidimos identificar conjuntos de genes entre las anotaciones diferencialmente expresadas en cada muestra, para analizar el efecto de familias o rutas específicas en los dos grupos de células.

#### **3.1.- Estudio de ATPasas vacuolares con mayor expresión diferencial en células no progenitoras respecto a DAPs**

En base a los análisis GSEA, detectamos que en el primer conjunto de todas las anotaciones de genes con expresión enriquecida en la muestra de las células no progenitoras, se encontraban genes que codifican para diversas Vha, ATPasas vacuolares. Estas proteínas son bombas de protones que contribuyen a la acidificación de compartimentos celulares, y además presentan funciones relacionadas con la morfología y el desarrollo de las células traqueales (Francis y Ghabrial, 2015) En consecuencia, decidimos realizar un análisis de la inactivación de distintos genes de esta familia para observar sus efectos en las diferencias entre células progenitoras y no progenitoras en el DT.

En concreto, y teniendo en cuenta las herramientas disponibles, seleccionamos cepas de *Drosophila* que permitieran analizar el efecto de los genes que codifican para *Vha100*, *Vha55*, *VhaAC39* y *Vha26*, y usamos el sistema Gal4-UAS para inactivar dichos genes en el DT mediante el uso de RNAi. En la mayoría de los casos en los que inactivamos la actividad de estos genes no se observaron alteraciones morfológicas en el sistema traqueal en L3 (Figura 14), ni efectos sobre la viabilidad de los individuos, excepto para *Vha26*.

En el caso de la inactivación de *Vha26*, se observó una letalidad del 100% en los estadios iniciales de larva al activar la expresión del RNAi desde las etapas embrionarias, por lo que repetimos el experimento usando en esta ocasión *btlGal4;tubGal80ts*. Esta combinación permite una regulación más precisa, puesto que el Gal80ts está activo a la temperatura de 18°C y mantiene bloqueado el Gal4, mientras que a 29°C se inactiva

permitiendo la actividad del Gal4. Así, tras dejar a los progenitores (*btlGal4;tubGal80ts* x *UASVha26RNAi*) poner huevos durante 24h a 25°C, se les retiró de los viales y éstos se pusieron a 18°C durante tres días, hasta que los animales alcanzaban el estadio de L2, momento en el cual se pasaban a 29°C para activar el Gal4 y con ello la actividad del *UASVha26RNAi*. En el estadio L3 detectamos algunas alteraciones morfológicas como pequeñas variaciones en el tamaño y la forma de las células, pero tanto en las células poliploides como en las progenitoras del Tr2 (Fig. 14A'''), por lo que los efectos no se restringían a la población en la que este gen se encontraba diferencialmente expresado, y por tanto no resultaban significativos para nuestro objetivo.

Decidimos entonces buscar efectos previos en el estadio de embrión que pudieran conducir a la letalidad en larva y pudieran estar relacionados con alteraciones en el DT. Se analizaron embriones *in vivo* (datos no mostrados) y fijados de diversos estadios, aunque en ningún caso detectamos alteraciones evidentes en el sistema traqueal en comparación con el control que pudieran arrojar conclusiones sobre los efectos de este gen (Fig. 14B).

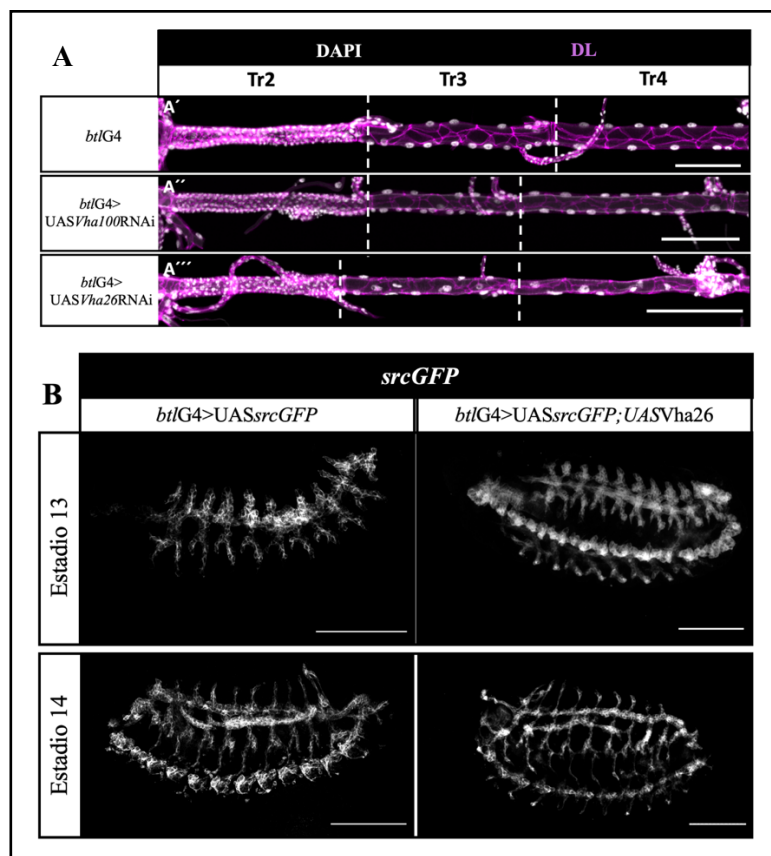


Fig. 14: A) Proyecciones de los metámeros anteriores (Tr2-Tr4) del DT en comparación con el control. En estadio L3. En A'', *btlGal4>UASVha100RNAi*, no se aprecian diferencias con respecto a la estructura o morfología de las células. En A''', *btlGal4>UASVha26RNAi*, se observan algunas alteraciones

morfológicas en los diferentes metámeros. B) Embriones fijados del genotipo *btlGal4>UASVha26RNAi* con el sistema traqueal marcado por *srcGFP*. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m.

### **3.2.- Autofagia regulada diferencialmente en células no progenitoras respecto a DAPs**

Continuando con el análisis de los resultados GSEA, encontramos diversas categorías que sugerían un cambio en el perfil metabólico en las células no progenitoras, así como actividades de reciclaje de componentes celulares (Fig. 11B), y detectamos un enriquecimiento en genes relacionados con la ruta de la autofagia.

Puesto que la expresión de este conjunto de genes se encontraba enriquecido en las células no progenitoras (Tr6), cuyo destino es desaparecer durante la fase de metamorfosis, y la autofagia puede conducir en algunos casos a muerte celular programada, teorizamos que podría existir una relación entre ambos hechos. Por ello, decidimos analizar los efectos de provocar alteraciones en esta ruta en los segmentos traqueales destinados a degradarse durante la metamorfosis.

## **4.- Autofagia diferencial en el sistema traqueal en estadio L3**

Decidimos empezar el análisis de la autofagia en tráquea estudiando su presencia y patrón de expresión en el estadio L3, con el objetivo de detectar diferencias entre los dos grupos de células que forman el DT.

### **4.1.- dp62 como marcador inverso de autofagia: patrón diferencial en el sistema traqueal**

Para analizar la presencia de autofagia en el DT en estadio L3 utilizamos un anticuerpo contra dp62, ampliamente utilizado como marcador inverso de autofagia. Dp62 es una proteína multidominio que actúa como receptor de cargos que van a ser degradados en el fagolisosoma, siendo a su vez eliminada en el proceso (Nezis *et al.*, 2008). Por lo tanto, los niveles de dp62 se correlacionan inversamente con los niveles de autofagia activa en un tejido (Komatsu *et al.*, 2006; Klionsky *et al.*, 2012).

De esta forma, se detectaron niveles de dp62 más elevados en Tr2, mientras que en el resto de metámeros, formados por células no progenitoras poliploides, el marcaje era significativamente menor (Fig. 15). Puesto que dp62 es un marcador inverso, esto indica que los niveles de autofagia son menores en las DAPs en Tr2 en relación con el resto de segmentos del DT. Esto coincide también con los resultados obtenidos mediante el microarray, puesto que dp62 presentaba una expresión diferencial mayor en las células no progenitoras.

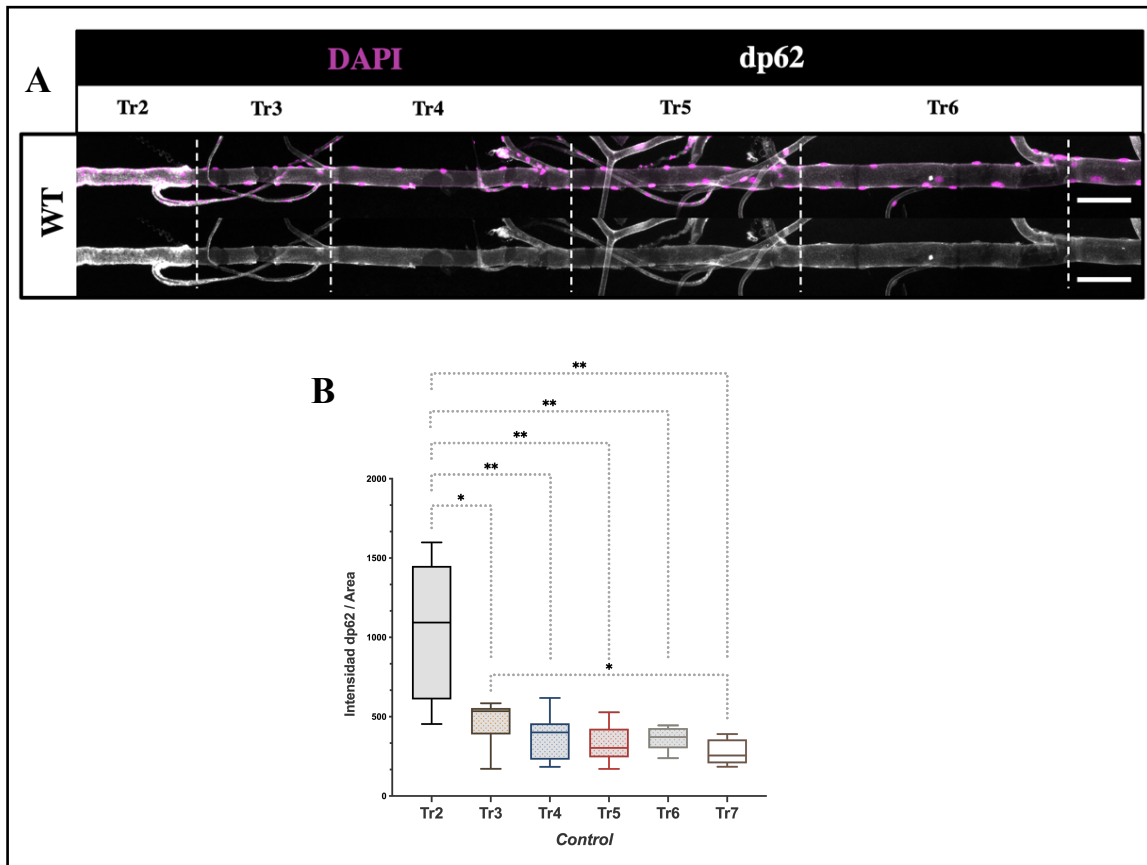


Fig. 15: A) Proyección del DT de L3 con marcaje anti-dp62. Se aprecia una mayor intensidad en Tr2 (DAPs) que en los metámeros Tr3—Tr9. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m. B) Gráfico de cuantificación de intensidad de dp62 por unidad de área. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  según análisis ANOVA de Welch seguido de test Dunnet T3.  $n = 10$ .

Sin embargo, es conveniente tener en cuenta varios factores en relación a las cuantificaciones de dp62. En primer lugar, al tratarse de un anticuerpo, siempre hay que establecer un umbral subjetivo para descartar el marcaje inespecífico de fondo. En segundo lugar, los diferentes tipos de análisis de la señal de dp62 pueden manifestar diferentes situaciones en función de la información obtenida (Pircs *et al.*, 2012). Por ejemplo en este caso, al medir la intensidad de la señal en las muestras, obtuvimos la



cantidad total de esta proteína en la célula, esté unida a cargos o no. Esto ofrece una visión general de la actividad autofágica, pero puede dar lugar a una sobreestimación, y no necesariamente indica que la correlación inversa con los niveles de autofagia sea directamente proporcional. Por ello, decidimos usar también otros métodos de detección de autofagia para corroborar estos resultados, como Atg8.

#### **4.2.- Atg8 como marcador directo de autofagia: incremento de los niveles a lo largo del DT**

La presencia de Atg8 se considera un marcador directo de la actividad autofágica, puesto que marca específicamente la proteína unida a fagosomas en fusión con lisosomas (Ichimura *et al.*, 2000), indicando la localización y cantidad exacta del proceso activo. En este caso, usamos una cepa en la que se ha insertado una construcción que codifica para mCherry fusionado a la proteína Atg8 (en adelante, Atg8Cherry). En concreto, examinamos la acumulación de dicha proteína en tráqueas diseccionadas de larva en estadio L3 y analizamos sus niveles relativos mediante la cuantificación de puntos luminiscentes por unidad de área (Denton *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos mostraron un menor marcaje en las células progenitoras del Tr2 en comparación con el resto de metámeros del DT, indicando una baja acumulación de Atg8. En los segmentos compuestos por células poliploides no progenitoras se detectó un incremento progresivo de la señal hacia el extremo posterior del DT, indicando una mayor acumulación de fagosomas en fusión con lisosomas, y por tanto, del proceso activo, en la región posterior de la tráquea. (Fig. 16). Estos resultados coinciden, de manera inversa, con los obtenidos mediante la cuantificación por dp62. Los resultados encontrados con ambos marcadores indican que la actividad autofágica es menor en el metámero diploide, y sugieren que en los metámeros poliploides, la actividad aumenta desde los más anteriores hacia los más posteriores.

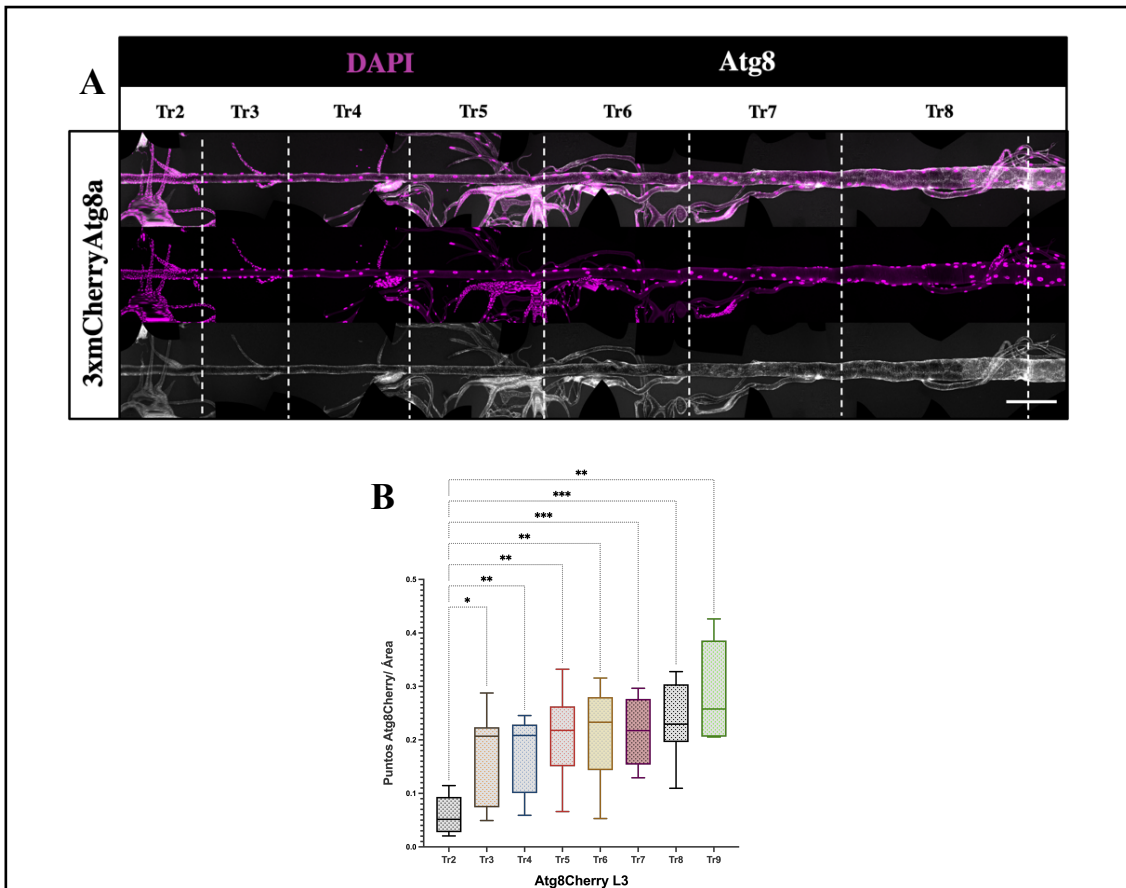


Fig. 16: A) Proyección del DT de L3 con el constructo 3xmCherryAtg8a (Atg8Cherry). En blanco, Atg8Cherry, cuyos niveles, mínimos en el Tr2, aumentan de forma progresiva desde el Tr3 al Tr9. La barra de escala es 100  $\mu$ m. B) Gráfico de cuantificación de puntos por unidad de área de Atg8Cherry en los metámeros Tr2-Tr9. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  según análisis ANOVA de Welch seguido de test Dunnett T3.  $n = 9$ .

De forma paralela a la detección de autofagia mediante el marcaje de dp62 y Atg8Cherry, también se utilizó el marcador Lysotracker en el DT de L3 con el mismo objetivo. Este marcador permite la detección y visualización de orgánulos ácidos en las células, y es especialmente útil en el caso de lisosomas. Los resultados preliminares con Lysotracker fueron similares a los descritos en los apartados superiores, esto es, una mayor actividad lisosomal en las células no progenitoras en comparación con las progenitoras del Tr2. Sin embargo, la observación apropiada de con este marcador requiere la visualización de las muestras inmediatamente tras el tratamiento, lo que conlleva diversos problemas técnicos y de gestión experimental, y puesto que los resultados eran similares a los obtenidos con dp62 y Atg8Cherry (cuya manipulación resulta más práctica), decidimos descartar un análisis detallado con Lysotracker.

## 5.- Análisis de la autofagia en el DT en L3

Tras determinar que existe un patrón diferencial de autofagia a lo largo del DT en estadio L3, y puesto que se ha demostrado que la autofagia es necesaria para la degradación de algunos tejidos larvarios, como el intestino medio o el cuerpo graso durante la metamorfosis, (Denton *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013), procedimos al análisis de los efectos de la alteración de este proceso en el sistema traqueal.

### 5.1.- Alteración en el patrón de autofagia en el DT: la actividad autofágica en tráquea es dependiente de los genes *atg*

Con el objetivo de analizar la implicación de las proteínas Atg y de la ruta de autofagia en el DT, procedimos a la inactivación de algunos de los genes que las codifican mediante RNAi y el sistema Gal4-UAS. Utilizamos cepas de *Drosophila* que expresaban dsRNA contra distintos genes *atg* en el sistema traqueal de la larva, así como mutantes que inactivan totalmente estos genes. En particular, examinamos el efecto de diversos componentes de la ruta: Atg1, que forma parte del complejo iniciador del proceso de autofagia (Kamada *et al.*, 2000), Atg14, que facilita la formación de la membrana del fagosoma (Kametaka *et al.*, 1998) y Atg8, implicada en la expansión de la membrana del autofagosoma (Ichimura *et al.*, 2000). Con este objetivo utilizamos el anticuerpo contra dp62 en el DT de los genotipos *btlGal4>UASAtg1RNAi*, *btlGal4>UASAtg8RNAi*, *btlGal4>UASAtg14RNAi*, *Atg14<sup>-/-</sup>* y *btlGal4>UASAtg1* en el estadio L3, en comparación con el control (Fig. 17).

En la muestra utilizada como control encontramos elevados niveles de dp62 en la región compuesta por células progenitoras diferenciadas (Tr2) en comparación con los metámeros compuestos por células no progenitoras (Tr3-Tr9), indicando bajos niveles de autofagia activa en las DAPs respecto al resto (Fig 17A). En los genotipos en los que se había alterado la ruta a través de la inactivación de alguno de los genes *atg*, los niveles de dp62 se homogeneizaban a lo largo del DT, asimilándose los encontrados en las regiones formadas por células no progenitoras poliploides a los detectados en el Tr2, sugiriendo una disminución de la autofagia en estos segmentos (Fig 17B-E). En la sobreexpresión de *atg1*, los niveles de dp62 también se homogeneizaban a lo largo del DT. En este caso, interpretamos los resultados de forma contraria: es posible que esta homogenización se deba a una reducción de los niveles de dp62 en el segundo metámero por un aumento de

la autofagia en el mismo, asimilándose al escaso marcaje detectado en los segmentos formados por células no progenitoras (Fig. 18F).

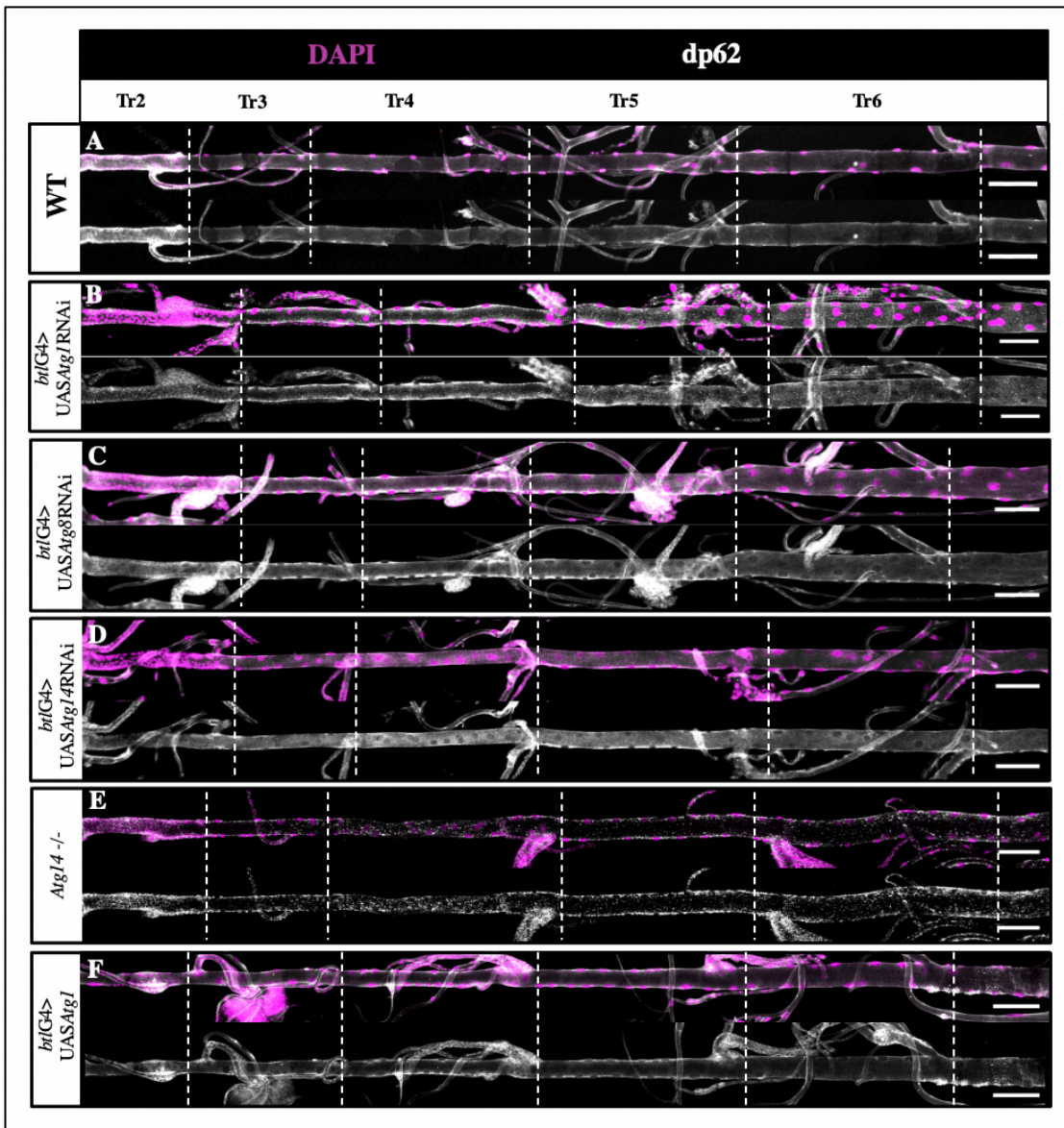


Fig. 17: Proyecciones del DT de L3 para diferentes genotipos. A) El fenotipo control muestra una mayor intensidad de la señal de dp62 en el Tr2 con respecto a los segmentos poliploides. B-F) En los fenotipos donde se haya alterada la expresión de alguno de los genes *Atg*, el patrón de expresión de dp62 es homogéneo a lo largo del DT. En aquellas imágenes que incluyen las SB de los metámeros 4 y 5, se puede apreciar también una mayor intensidad de señal en estos grupos de células, progenitoras indiferenciadas, que sobreviven durante la fase de metamorfosis para contribuir a la formación del sistema respiratorio del adulto. Barras de escala 100  $\mu$ m.

En la Fig. 18 se muestran las cuantificaciones de los niveles de intensidad de dp62 para cada metámero en el control y los diferentes genotipos analizados: *btlGal4>UASAtg1RNAi*, *btlGal4>UASAtg8RNAi*, *btlGal4>UASAtg14RNAi*, *Atg14-/-* y *btlGal4>UASAtg1*. En la Fig. 18A, en la cuantificación de los niveles del grupo control,

existe una diferencia significativa entre el Tr2 y el resto de metámeros de la tráquea. Esta diferencia se reduce drásticamente en los genotipos donde se ha alterado la ruta de la autofagia, inactivando o sobreexpresando alguno de los genes que codifican para las proteínas Atg.

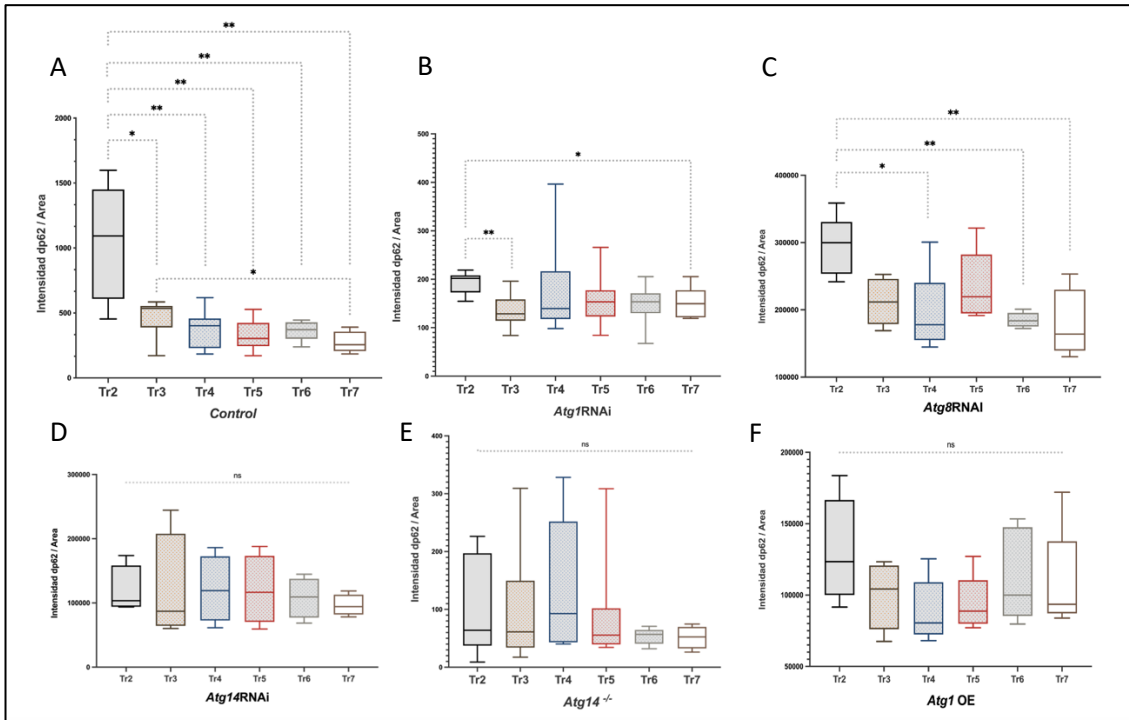


Fig. 18: Gráficos de intensidad de dp62 en los diferentes genotipos examinados. En el control se observa una diferencia significativa entre el Tr2 y los otros metámeros de células poliploides, que se reduce o desaparece en los otros casos. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.  $*$  =  $p < 0,05$ ,  $**$  =  $p < 0,01$  según análisis ANOVA de Welch seguido de test Dunnet T3.  $n = 10$  para cada muestra.

Estos resultados demostraron, en primer lugar, que la inactivación de los genes *atgs* mediante RNAi estaba funcionando, así como que el marcaje es específico y varía en función del nivel de autofagia en el DT. Además, consistente con resultados publicados (Denton *et al.*, 2009, Berry y Baehrecke, 2007) podíamos inactivar la autofagia en la tráquea mediante la interferencia en distintas proteínas del proceso. Y finalmente, que el control de los distintos niveles de autofagia en la tráquea se debe a la expresión traqueal de los genes *atg*.

## 6.- Efectos de la alteración de la autofagia en el sistema traqueal

En base a estos resultados y habiendo determinado que el patrón diferencial de autofagia en el DT depende de los genes *atg*, decidimos examinar el efecto de la alteración de estos genes sobre las células y la morfología de dicho tejido.

### 6.1.- Inactivación de genes de autofagia en L3

Para realizar este estudio, utilizamos de nuevo el sistema Gal4-UAS para inactivar los genes *atg1*, *atg8* y *atg14* en el DT de L3, y analizamos la morfología de la estructura (Fig. 19). En la mayoría de los casos no se encontraron efectos o alteraciones en el aspecto del tronco dorsal traqueal en el estadio L3. Ocasionalmente, en algunos individuos en que se había inactivado *atg1* o *atg8*, aparecen algunos fenotipos con variaciones en el número y tamaño de las células a lo largo del DT y alteraciones en la estructura general del tubo traqueal (Fig. 19B-C), que no produjeron efectos en el desarrollo habitual de este tejido y no se consideraron significativos.

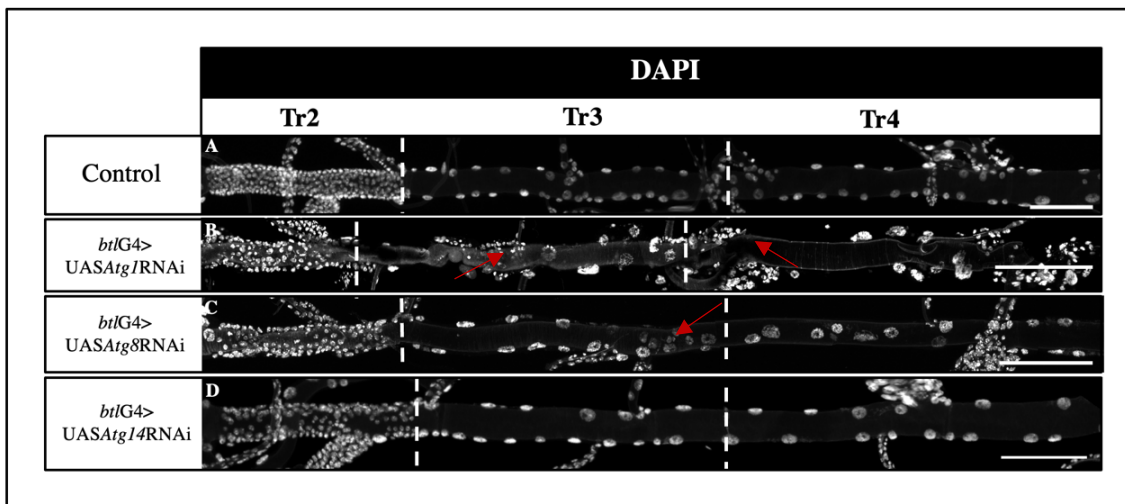


Fig. 19: Proyecciones del DT de L3 de inactivación de genes *atg* en comparación con el control. A) Control. En B) *btIG4>UASAtg1RNAi* y C) *btIG4>UASAtg8RNAi* las flechas rojas indican anomalías en el tamaño y la disposición habitual de las células a lo largo del DT. Barras de escala 100  $\mu$ m.

### 6.2.- La sobreexpresión de *Atg1* en el DT provoca la aparición de células morfológicamente alteradas en Tr2 y letalidad en la fase de metamorfosis

Además de la inactivación de genes que codifican para diversas proteínas Atgs, también decidimos analizar el efecto de incrementar la expresión de *atg1* en el sistema traqueal. Inicialmente utilizamos *btIG4* como conductor de la expresión del transgén *UASatg1*, para estudiar los efectos del incremento de la autofagia en el sistema respiratorio de la larva. Esto resultó letal en estadio L2, por lo que no pudimos analizar el sistema traqueal en el estadio L3. Consideramos que quizás a la temperatura de 29°C la expresión traqueal del transgén podía ser excesiva, y/o provocar efectos colaterales (*btIG4* también presenta expresión en el sistema nervioso) que condujeran a la letalidad, por lo que realizamos el

mismo experimento manteniendo los animales durante su desarrollo a temperaturas de 25°C y 18°C (a las que el Gal4 presenta menos actividad), pero en ambos casos se obtuvo el mismo resultado.

Decidimos entonces cambiar de *driver* y probamos con *TrhGal4*, pero aunque la letalidad disminuyó considerablemente, no se detectaron efectos visibles en la tráquea de L3 (Fig. 20B).

Finalmente, repetimos el experimento usando en esta ocasión *btlGal4;tubGal80ts*, para activar la expresión del RNAi a partir de etapas más tardías del desarrollo. Se permitió a los progenitores (*btlGal4;tubGal80ts* x *UASatg1*) poner huevos durante 24h a 25°C, y posteriormente los viales con embriones se dejaron a 18°C durante tres días, hasta que los animales alcanzaban el estadio de L2. En este momento se pasaban a 29°C para activar el Gal4, y con ello la sobreexpresión de *atg1*. Al examinar las larvas en L3, las células progenitoras del Tr2 presentaban una morfología aberrante y desestructurada, mostrando variaciones en el tamaño y forma habitual, así como en el número de células (Fig. 20C). También analizamos tráqueas de pupas de 5h apf (horas transcurridas tras la formación de la pupa, *after pupal formation*), ya que en estadios más avanzados de pupas, la letalidad resultó ser del 100%. En las pupas analizadas de 5h apf encontramos fenotipos similares a los encontrados en L3 (Fig. 20D).

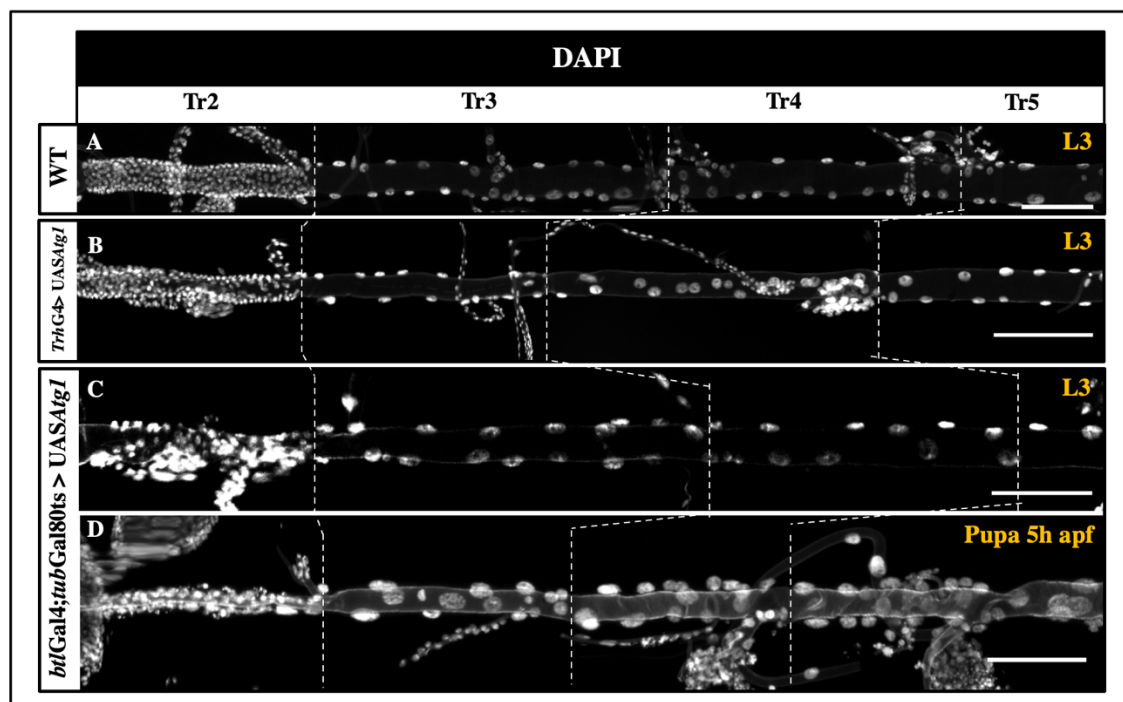


Fig. 20: Fenotipos de la sobreexpresión de *UASAtg1* en comparación con el control. A) Control. B) Sobreexpresión de *UASAtg1* mediante el *driver* *TrhGal4* en L3. C) Sobreexpresión de *UASAtg1* mediante el *driver* *btlGal4;tubGal80ts* en L3. D) Sobreexpresión de *UASAtg1* mediante el *driver* *btlGal4;tubGal80ts* en pupa de 5h apf. Barras de escala 100 um.

Los resultados encontrados al sobreexpresar *atg1* en el DT parecen indicar que el efecto de incrementar los niveles de autofagia conduce a la muerte de las células en el sistema traqueal, provocando de forma paralela la muerte del animal.

### 6.3.- La inactivación de la autofagia provoca un retraso en la desaparición de la tráquea larval durante la metamorfosis

Puesto que la inactivación de la autofagia no produjo efectos significativos en la morfología del DT en estadio de larva L3, decidimos extender el análisis a la fase de pupa. Para ello, y en primer lugar, caracterizamos el proceso de degradación de la tráquea larval en individuos WT durante la metamorfosis, para determinar en qué punto del desarrollo desaparece este tejido. Mediante el uso del marcador fluorescente DsRed, cuya expresión fue dirigida por el *driver btl*, y a partir de observación secuencial *in vivo*, determinamos que a las 30h apf ya no se observaban segmentos traqueales del DT en el abdomen. A partir de este momento, en ocasiones se detectaban células independientes marcadas, probablemente correspondientes al proceso de formación del sistema respiratorio del adulto (Fig. 21).

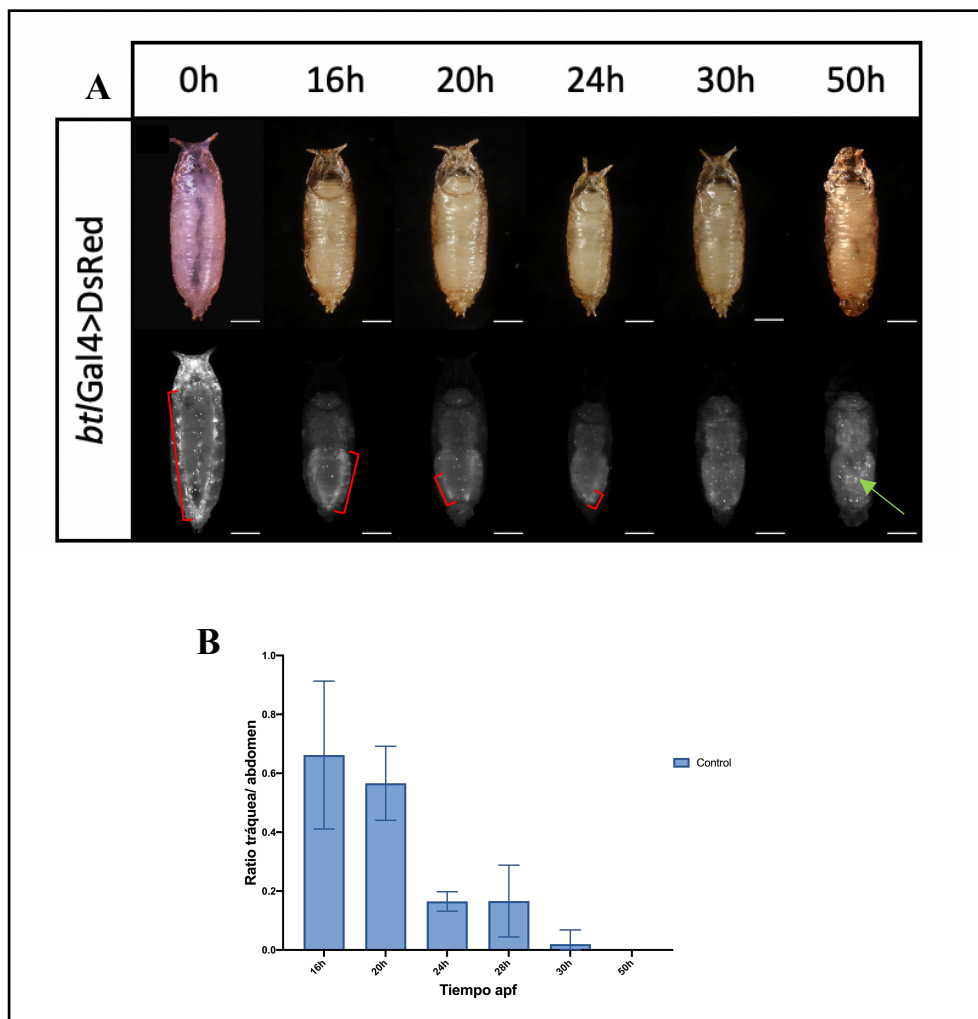


Fig. 21: A) Imágenes representativas de diferentes estadios de pupa a lo largo del proceso de metamorfosis. A partir de las 30h apf ya no se observan restos del DT en el abdomen. Los marcadores rojos señalan el DT en proceso de desaparición (se marca uno de cada par). La flecha verde señala células individuales,



probablemente correspondientes al proceso de formación del sistema respiratorio adulto. B) Gráfico de la proporción de tráquea larval presente en las distintas fases de la pupa en relación con la longitud del abdomen. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

A continuación se examinaron los diferentes genotipos en los que se había inactivado algún punto clave de la ruta de autofagia. Encontramos que en la inactivación tanto del gen *atg1* como del gen *atg8*, se producía un retraso en la degradación del DT durante la metamorfosis. Tanto a las 20h como a las 24h apf, la proporción de tráquea en el abdomen era mayor en estos fenotipos que en el control, y, su presencia continuaba siendo detectable más allá de las 30h apf, cuando en el control ya había desaparecido. En el caso de *atg1*, tras 50h apf aún quedaban restos visibles del DT en el abdomen (Fig. 22B), que habían desaparecido a las 70h apf (Fig. 23B). En los individuos con la expresión de *atg8* inactivada, se detectaba señal del DT más allá de las 70h apf (Fig. 22C, 23C). Al inactivar *atg1* y *atg8* de forma conjunta, la presencia de tráquea se extendía hasta más de 90h apf (Fig. 23D). En todos los casos, la letalidad fue del 100% de los individuos.

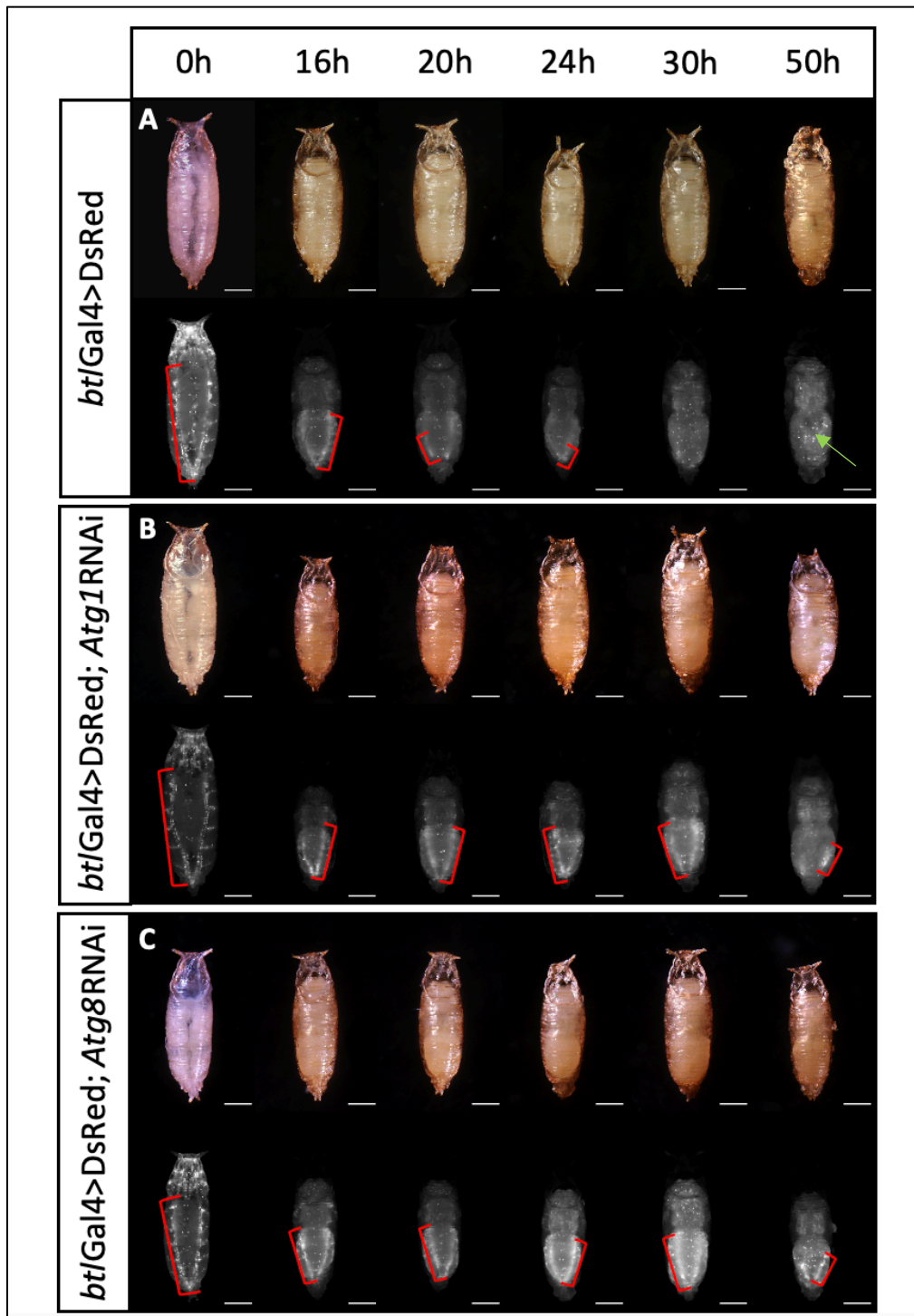


Fig. 22: Imágenes representativas de pupas en diferentes estadios para los distintos genotipos. A) Control. A las 30h apf ya no se observan restos visibles de la tráquea larval. En B) *bt/Gal4>UASAtg1RNAi* y C) *bt/Gal4>UASAtg8RNAi*, parte del DT sigue presente a las 50h apf. Los marcadores rojos señalan el DT remanente en el abdomen. La flecha verde señala células individuales, probablemente correspondientes al proceso de formación del sistema respiratorio adulto. Las barras de escala indican 500  $\mu$ m.

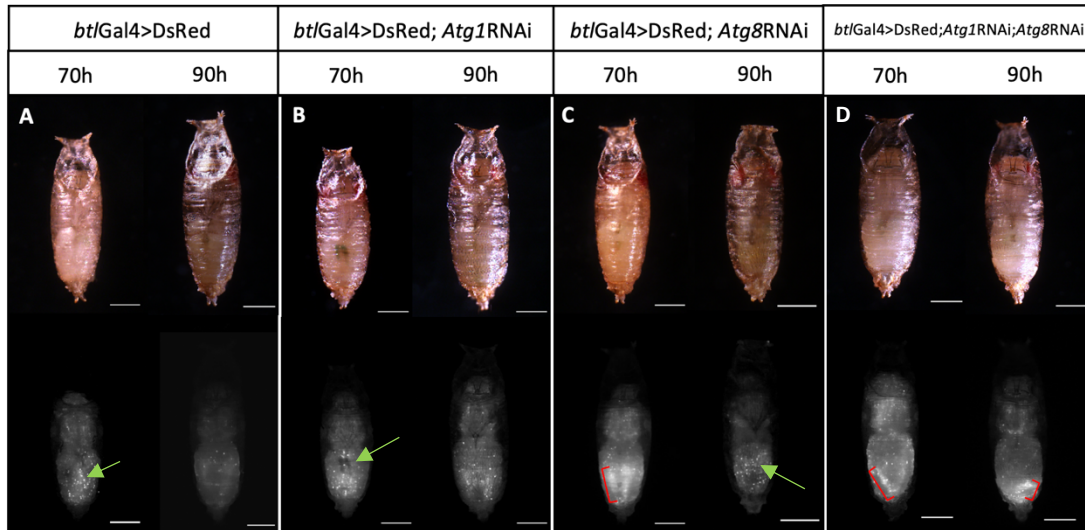


Fig. 23: Imágenes representativas de pupas para tiempos extremos. A) Control. A las 70h apf no se distinguen segmentos traqueales, más que células independientes, probablemente en proceso de formación del sistema respiratorio adulto. En B) *bt/Gal4>UASAtg1RNAi*, a las 70h apf ya no se aprecian segmentos traqueales, mientras que en C) *bt/Gal4>UASAtg8RNAi*, éstos resultan visibles hasta más allá de las 70h apf. D) La inactivación conjunta de los genes *atg1* y *atg8* resulta en una permanencia de la tráquea que se extiende hasta pasadas las 90h apf. Los marcadores rojos señalan el DT remanente en el abdomen. Las flechas verdes señalan células individuales, probablemente correspondientes al proceso de formación del sistema respiratorio adulto. Las barras de escala indican 500  $\mu$ m.

Ocasionalmente, encontramos algunos casos en que, tras la inactivación de *atg1* o *atg8*, aún se observaban restos de tráquea larval pasadas las 90h apf. En estos individuos, detectamos que mientras la cabeza y el tórax presentaban un adecuado desarrollo acorde con su estadio, el abdomen mostraba un aspecto correspondiente a estadios previos, como si no hubiera sido posible continuar la metamorfosis en esta región (Fig. 24).

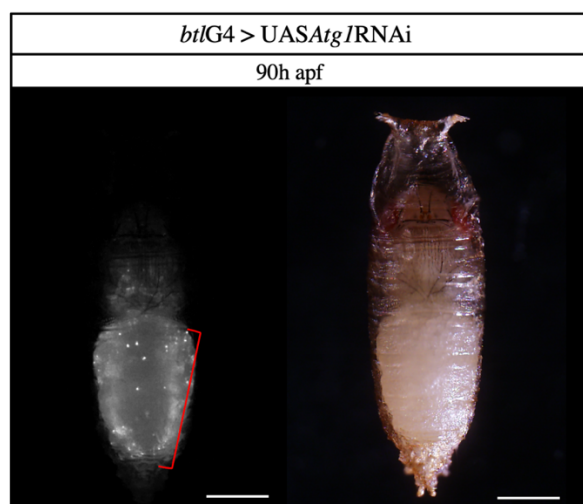


Fig. 24: Se muestra un tiempo apf de 90h para el genotipo *bt/Gal4>UASAtg1RNAi*, donde aún es patente la presencia del DT en el abdomen, que presenta un desarrollo deficiente para este estadio. El marcador rojo señala el DT remanente en el abdomen. Las barras de escala indican 500  $\mu$ m.

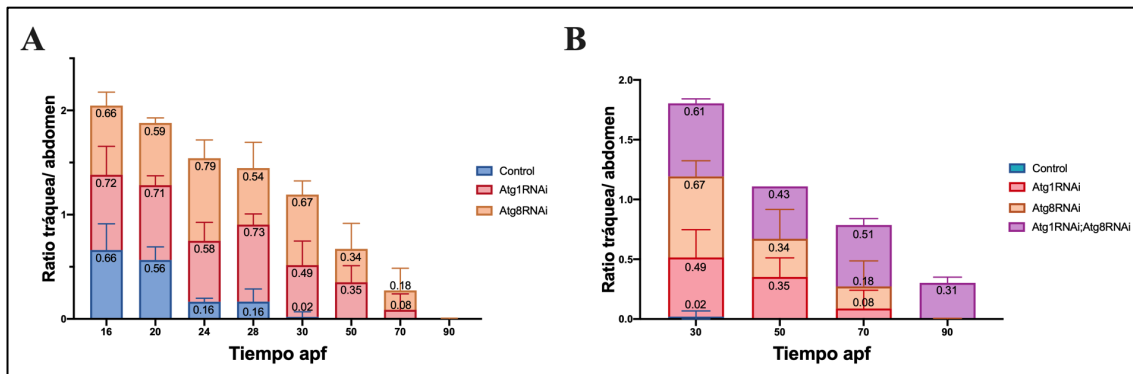


Fig. 25: Gráficos de la proporción de tráquea larval presente en las distintas fases de la pupa en relación con la longitud del abdomen. Los valores de cada genotipo de Ratio tráquea/ abdomen se encuentran apilados en el eje Y, por lo que la altura que alcanzan en dicho eje resulta del sumatorio de los valores de los conjuntos inferiores. A) En el control, pasadas 30h apf ya no hay señal visible del DT. Esto se extiende hasta las 70h apf en el caso de la inactivación de *atg1*, y hasta las 90h apf en la inactivación de *Atg8*. B) En la inactivación conjunta de *atg1* y *atg8*, el DT continúa siendo visible pasadas las 90h apf. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.  $n^{\text{control}} = 40$ ,  $n^{\text{atg1}} = 35$ ,  $n^{\text{atg8}} = 40$ ,  $n^{\text{atg1:atg8}} = 10$ .

En conjunto, los resultados de inactivar la autofagia en el DT mostraron un retraso significativo en la degradación de este tejido, revelando que la actividad autofágica es necesaria para desarrollar adecuadamente la histólisis del sistema traqueal. Sin embargo, en el caso de la inactivación de *atg1* o de *atg8*, el DT termina desapareciendo, o bien porque dicha inactivación no bloquea completamente la autofagia o bien porque la participación de otro proceso complementario puede acabar completando su eliminación. No pudimos comprobar el destino del DT en el caso de la inactivación simultánea de *atg1* y *atg8* porque en esta condición no encontramos individuos vivos después de las 90h apf.

## 7.- Implicación de la apoptosis en la degradación del DT

Durante la metamorfosis, gran parte de los tejidos que forman el cuerpo de la larva deben ser degradados para formar el organismo adulto. En este proceso, están implicados diversos tipos de muerte celular, siendo la autofagia y la apoptosis las más destacadas, y habiéndose descrito su participación imprescindible en la degeneración de diversos órganos como el intestino medio donde la autofagia es necesaria y suficiente para la degradación completa del tejido (Denton *et al.*, 2009). En otros tejidos como las glándulas salivares, se requiere la acción coordinada de autofagia y apoptosis (Berry y Baehrecke, 2007), mientras que la apoptosis es suficiente para la histólisis de los músculos abdominales (Zirin *et al.*, 2013).

Como se ha descrito en los apartados previos, al inactivar la autofagia en el DT existe un retraso significativo en la eliminación del sistema traqueal durante el desarrollo de la pupa, pero termina desapareciendo. Puesto que se ha descrito la presencia de apoptosis y su implicación en la degradación traqueal en fases iniciales de la metamorfosis (Fraire-

Zamora *et al.*, 2021), nos planteamos la posibilidad de analizar cómo la participación de ambos procesos podría ser necesaria para llevarlo a término.

Con este objetivo empezamos por generar una situación en que la inactivación de la apoptosis afectase la degradación del sistema traqueal durante la metamorfosis. Para ello, optamos, por un lado, por la inactivación conjunta de los genes promotores de apoptosis *Reaper*, *Hid* y *Grim* (RHG) y por otro lado, por la sobreexpresión del gen inhibidor de caspasas *p35* (Fig. 26).

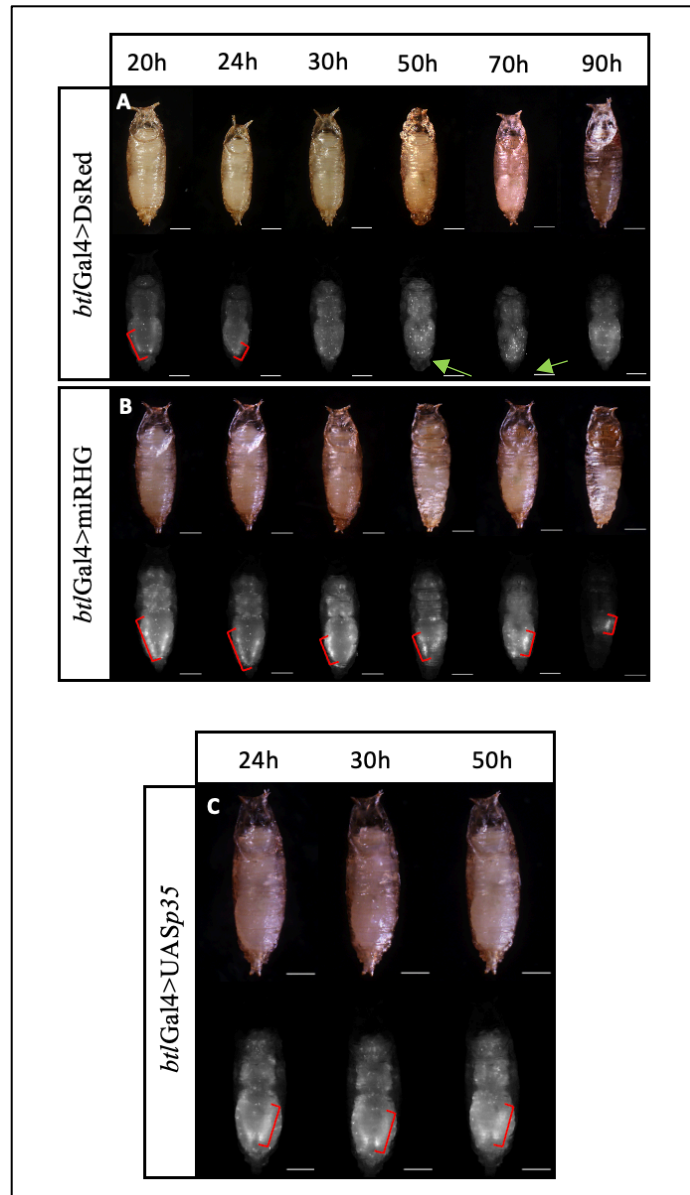


Fig. 26: Imágenes representativas de pupas a lo largo de la metamorfosis. A) Control. La tráquea larval deja de ser visible a las 30h apf. B) Fenotipos resultado de la inactivación de RHG. La tráquea persiste pasadas las 70h, siendo detectable incluso a las 90h apf. C) Fenotipos para la sobreexpresión de *p35*. A las 50h apf, aún quedan residuos del DT. Los marcadores rojos señalan el DT remanente en el abdomen. Las flechas verdes señalan células individuales, probablemente correspondientes al proceso de formación del sistema respiratorio adulto. Las barras de escala indican 500  $\mu$ m.

En ambos casos, detectamos una persistencia del DT en el abdomen más allá de las 30h apf, cuando ya había desaparecido totalmente en el control. Al inactivar RHG, aún se observó marcaje pasadas las 70h apf e incluso a 90h apf (Fig. 26B), pero pocos individuos alcanzaban este estadio y la mayoría moría en etapas previas de la metamorfosis. En el caso de *p35*, se detectaba marcaje hasta las 50h apf (Fig. 26C), y pasado este punto, la mayor parte de los individuos habían muerto. Tanto en la inactivación de RHG como en la sobreexpresión de *p35*, la letalidad durante la fase de pupa fue del 100% de los individuos.

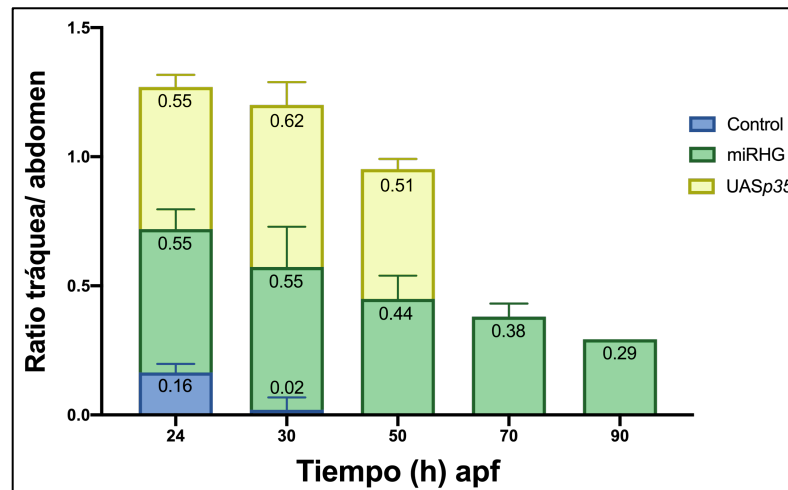


Fig. 27: Gráfico de la proporción de tráquea larval presente en las distintas fases de la pupa en relación con la longitud del abdomen. Los valores de Ratio tráquea/ abdomen se encuentran apilados en el eje Y, por lo que la altura que alcanzan en dicho eje resulta del sumatorio de los valores de los conjuntos inferiores. A) En el control, pasadas 30h apf ya no hay señal visible del DT. En el genotipo de inactivación de RHG, tras 90h apf aún se detecta señal del DT. En la sobreexpresión de *p35*, la tráquea persiste a las 50h apf, y después de este punto no quedan individuos vivos. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.  $n^{\text{control}} = 40$ ,  $n^{\text{miRHG}} = 25$ ,  $n^{\text{p35}} = 15$ .

Como ya se había demostrado en nuestro laboratorio mediante aproximaciones alternativas (Fraire-Zamora *et al.*, 2021), estos resultados indican que la apoptosis juega un papel determinante en la degradación del sistema traqueal, y que la inactivación de esta ruta resulta en un retraso significativo en la eliminación del DT respecto al control (ver discusión).

## 8.- Relación entre la autofagia y la poliploidía en el sistema traqueal

Como se ha descrito en la sección 4.2, el uso de Atg8Cherry como marcador de autofagia, nos permitió identificar un aumento progresivo de este proceso a lo largo del eje anteroposterior del DT en L3. (Fig. 16; Fig. 28A). Durante el análisis de los distintos fenotipos examinados para obtener estos resultados, detectamos además un aumento progresivo en este mismo eje anteroposterior del tamaño de los núcleos de las células

poliploides no progenitoras que componen los segmentos traqueales Tr3 a Tr9. En base a estas observaciones, hipotetizamos que podría existir una relación entre el grado de poliploidía en el DT y los niveles de autofagia y decidimos estudiar si era posible vincular ambos factores.

### 8.1.- Relación autofagia-poliploidía en L3: El incremento en el nivel de autofagia a lo largo del DT se correlaciona con el incremento en los niveles de poliploidía

Para examinar la relación entre el grado de autofagia y de poliploidía, procedimos a la cuantificación de los valores de contenido en DNA de los núcleos de las células que componen el DT mediante la cuantificación de la señal de DAPI. Efectivamente, usando los softwares Fiji e IMARIS, descubrimos que en el DT en el estadio L3 tardío, el grado de poliploidía va en aumento del Tr3 al Tr9 (el Tr10 habitualmente resulta destruido durante la disección de los animales), y que este incremento va desde unos dos ciclos extra de duplicación en los metámeros Tr3 a Tr5 (de 8C a 12C) hasta 4 ciclos extra (32C) en Tr9 (Fig. 28B). Estos resultados nos hicieron plantearnos la existencia de una posible relación entre el incremento en el contenido de DNA y el número de ciclos de replicación de las células poliploides no progenitoras, y el grado de autofagia creciente a lo largo del DT (Fig. 28C). El análisis de correlación demostró la correlación positiva entre ambos parámetros (Fig. 28D).

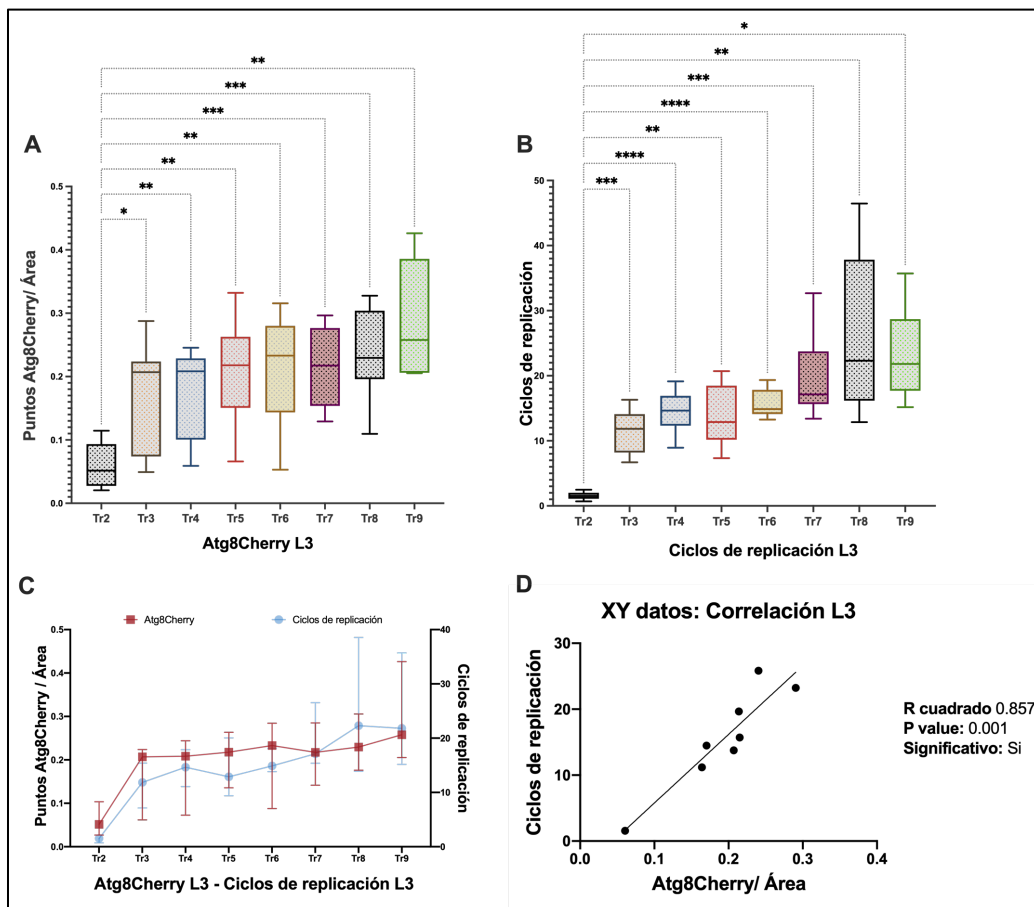


Fig. 28: A) Gráfico de cuantificación de puntos de Atg8Cherry a lo largo del DT en estadio L3. B) Valores de contenido en DNA (Ciclos de replicación) de las células de cada metámero en estadio L3. En A) y B) se

aprecia un incremento creciente desde los metámeros anteriores a los posteriores. \*=  $p < 0,05$ , \*\*=  $p < 0,01$ , \*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  según análisis ANOVA de Welch seguido de test Dunnet T3. n = 9. C) Gráfico de comparación entre puntos de Atg8Cherry y ciclos de replicación de las células en estadio L3. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media. D) Gráfico de correlación entre valores de puntos de Atg8Cherry y Ciclos de replicación. Se muestran los resultados del análisis, que indican una correlación positiva.

## 8.2.- Relación entre autofagia y poliploidía en la tráquea de pupa 7h apf

Los resultados expuestos nos permitieron demostrar la relación entre la autofagia en el DT en estado L3 y su degradación durante la metamorfosis en la pupa. A continuación, quisimos examinar la actividad autofágica en la fase de pupa, estadio en el que se produce la histólisis del DT. Para ello, se diseccionaron individuos de 7h apf, y se midieron los valores de Atg8Cherry y poliploidía en los diferentes metámeros.

Los resultados mostraron que en este estadio de pupa, la tendencia creciente de autofagia hacia el extremo posterior de la tráquea se mantenía (Fig. 29; Fig. 30A), y los niveles de DNA en las células también reflejaban un incremento progresivo en el mismo sentido (Fig. 30B), por lo que se mantiene la observación de que mayores grados de poliploidía están asociados con mayores niveles de autofagia (Fig. 30, C y D). Los resultados del análisis de correlación sostienen esta hipótesis. Además, al comparar los niveles de autofagia determinados por el marcador Atg8, encontramos que estos son mayores en pupa de 7h apf que en L3 (Fig. 30E), consistente con la idea que una alta actividad autofágica contribuye a la muerte de estas células durante la metamorfosis (ver discusión).

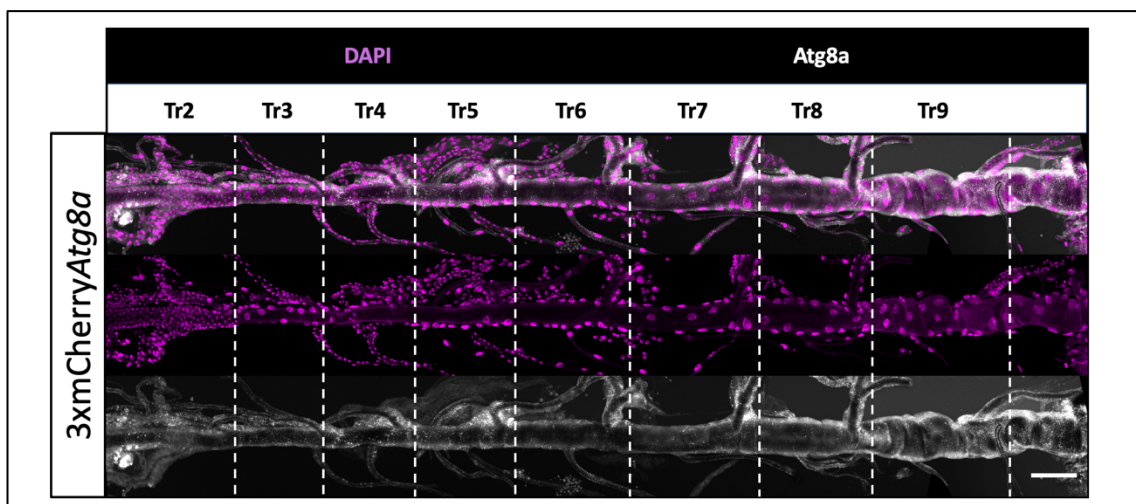


Fig. 29: Proyección de tráquea de pupa 7h apf con DAPI (magenta) y Atg8Cherry (gris). La señal de Atg8Cherry aumenta hacia los metámeros posteriores, así como el tamaño de los núcleos y su contenido en DNA. La barra de escala es 100 um.



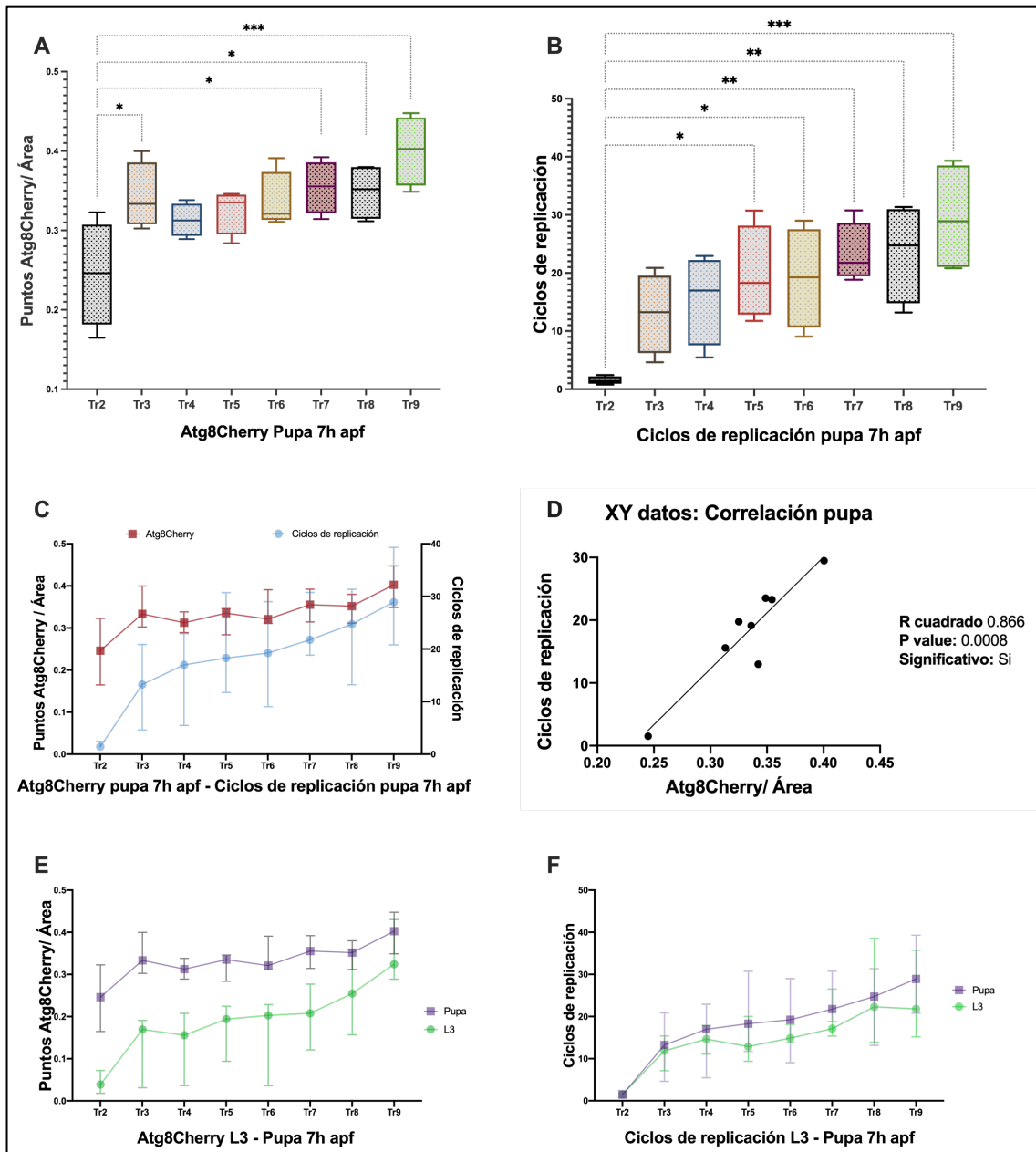


Fig. 30: A) Gráfico de cuantificación de puntos de Atg8Cherry en los distintos metámeros del DT en pupa 7h apf. B) Valores de Ciclos de replicación de las células de cada metámero en estadio de pupa 7h apf.  $*=p<0,05$ ,  $**=p<0,01$ ,  $***=p<0,001$  según análisis ANOVA de Welch seguido de test Dunnet T3.  $n = 4$ . C) Gráfico de comparación entre puntos de Atg8Cherry y contenido en DNA de las células en estadio de pupa 7h apf. D) Gráfico de correlación entre valores de puntos de Atg8Cherry y Ciclos de replicación. Se muestran los resultados del análisis, que indican una correlación positiva. E) Comparación del número de puntos de Atg8Cherry por área entre los estadios de L3 y pupa 7h apf. F) Comparación de los valores de contenido en DNA (Ciclos de replicación) entre los estadios de L3 y pupa 7h apf. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

### 8.3.- Los niveles de autofagia se incrementan al aumentar el grado de poliploidía

Con el objetivo de continuar explorando la relación entre el grado de autofagia y la poliploidía, proyectamos un experimento destinado a aumentar el número de ciclos de replicación de las células poliploides de la tráquea de larva para observar el efecto sobre la autofagia. Para ello, utilizamos la sobreexpresión de *yorkie* (*yki*), el gen que codifica para una proteína reguladora del ciclo celular que, una vez activada, entra en el núcleo y promueve una mayor actividad mitótica o de endociclo, según el ciclo activo en cada célula. La sobreexpresión de *yki* en la tráquea mediante el *driver* *bt1Gal4*, indujo una mayor proliferación en las células progenitoras diploides en el Tr2, que se encuentran en ciclo mitótico, y un mayor número de endociclos en las células poliploides de los otros metámeros.

En los DT de estas larvas detectamos que tanto en los niveles de autofagia como de contenido en DNA de las células, se mantenía una tendencia creciente anteroposterior a lo largo del DT (Fig. 31A). Al cuantificar los valores de Atg8Cherry de estos DT en comparación con los DT de los individuos control, detectamos valores muy superiores en los casos de sobreexpresión de *Yki* (Fig. 31C). Asimismo, al cuantificar los niveles de DNA en los núcleos de las células de las tráqueas de individuos con sobreexpresión de *yki*, encontramos efectivamente un incremento en el contenido de DNA en los metámeros Tr3 a Tr9 que llegaba incluso a duplicar los valores del control (Fig. 31D), indicativo de un aumento de ciclos de replicación. Estos resultados y el análisis de correlación (Fig. 31B) corroboran la observación de que los niveles de autofagia aumentan en relación al incremento de la ploidía de las células.

Cabe señalar que también observamos una elevación de los niveles de Atg8Cherry en las células de Tr2, células en ciclo mitótico y que mantienen su diploidía en estas condiciones (ver discusión).

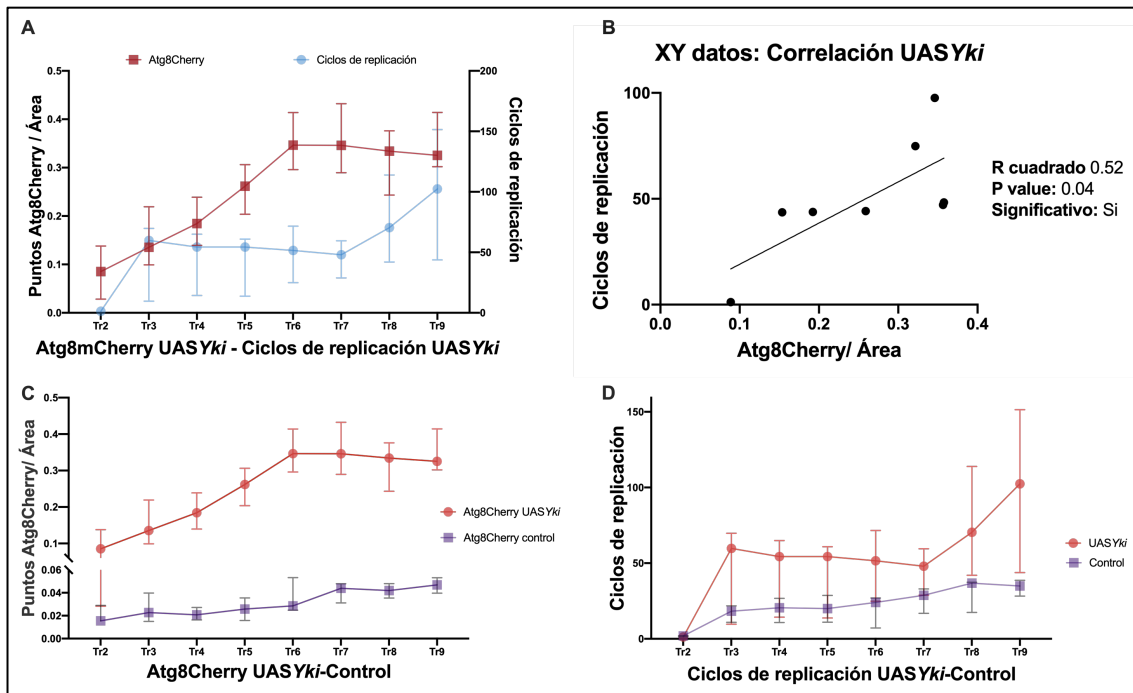


Fig. 31: A) Gráfico de comparación entre puntos de Atg8Cherry y ciclos de replicación de las células en estadio L3 para el genotipo de sobreexpresión de *Yki*. B) Gráfico de correlación entre valores de puntos de Atg8Cherry y Ciclos de replicación. Se muestran los resultados del análisis, que indican una correlación positiva.  $n = 5$ . C) Gráfico de comparación de la cantidad de puntos de Atg8Cherry en el control y en la sobreexpresión de *Yki*. D) Gráfico de comparación del número de ciclos de replicación de las células del DT en el control y en la sobreexpresión de *Yki*. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

## 9.- Efecto del estrés en la inducción de la autofagia en el sistema traqueal

Puesto que al inactivar la ruta de autofagia en la tráquea en condiciones nutricionales estándar no se detectaron fenotipos significativos en cuanto a la morfología en L3 del sistema respiratorio, decidimos someter a los individuos de estos genotipos a diversos tipos de estrés nutricional, ya que se ha demostrado que en estas condiciones se produce un incremento de la actividad autofágica (Hosokawa *et al.*, 2009). Además, puesto que se habían detectado diferencias en el perfil metabólico entre células progenitoras y no progenitoras, nos planteamos como las alteraciones en la nutrición habitual podían afectar a las células del DT.

### 9.1.- El estrés nutricional de aminoácidos provoca alteraciones en los niveles de autofagia en el DT en L3

Para analizar los efectos de la restricción de nutrientes sobre la autofagia en el DT de L3, en primer lugar optamos por una limitación del aporte de aminoácidos de forma directa, por lo que se eliminó la levadura en el medio, considerada la fuente principal (en adelante, medio 0% aa). Inicialmente se dejaba a los progenitores depositar los huevos directamente en viales con esta preparación, pero esto resultó en una letalidad total en los primeros estadios de larva en todos los genotipos, incluido el control. Por tanto, dejamos

crecer a los individuos en medios estándar hasta el estadio L2, momento en el que se seleccionaban las larvas y se pasaban al medio de restricción nutricional. En estas condiciones se permitió a las larvas continuar el desarrollo hasta alcanzar el estadio L3, para ser diseccionadas y analizadas.

Inicialmente, se comprobó que efectivamente, la restricción nutricional de aminoácidos provocaba una reducción de los niveles de dp62 en la tráquea de L3 en comparación con el control en condiciones de alimentación estándar (Fig. 32), indicando un aumento de la autofagia a lo largo del DT.

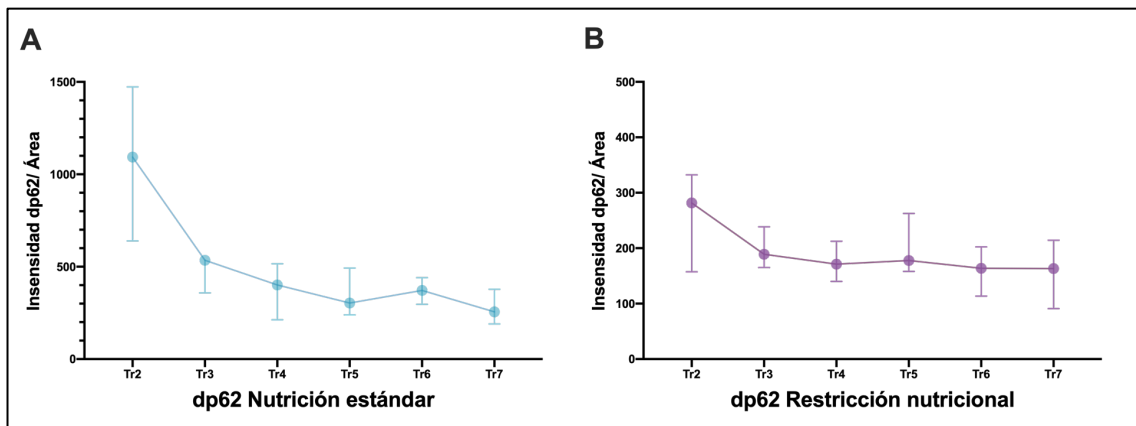


Fig. 32: A) Niveles de dp62 en larvas L3 en condiciones de nutrición estándar. B) Niveles de dp62 en larvas L3 en condiciones de estrés nutricional por restricción de aminoácidos. n = 5. En A, los niveles de dp62 en Tr2 duplican los niveles en el resto de metámeros, mientras que en condiciones de restricción nutricional de aminoácidos, esta diferencia se reduce considerablemente. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

## 9.2.- La inducción de estrés nutricional no muestra efectos fenotípicos al inactivar la autofagia en el DT en L3

En estas condiciones de restricción de aminoácidos, observamos que las larvas tardaban hasta 7 días en alcanzar el estadio L3, pudiendo permanecer como larvas hasta los 14 días. La tasa de letalidad era muy elevada, de hasta el 95% a 29°C y de hasta el 90% a 25°C. Menos de un 10% de los individuos alcanzaban la fase de pupa, y menos de un 1% (5% a 25°C) sobrevivían hasta el estadio adulto.

Al diseccionar y analizar el DT de larvas L3 en estas condiciones, no observamos diferencias morfológicas entre el control y los genotipos en los que se había inactivado la autofagia en el sistema respiratorio mediante RNAi (*btlGal4>UASAtg1RNAi*, *btlGal4>UASAtg8RNAi*, *btlGal4>UASAtg14RNAi*). En todos los casos, se detectó que las células progenitoras del Tr2 presentaban un núcleo de tamaño mayor que el habitual en condiciones estándar (Fig. 33).

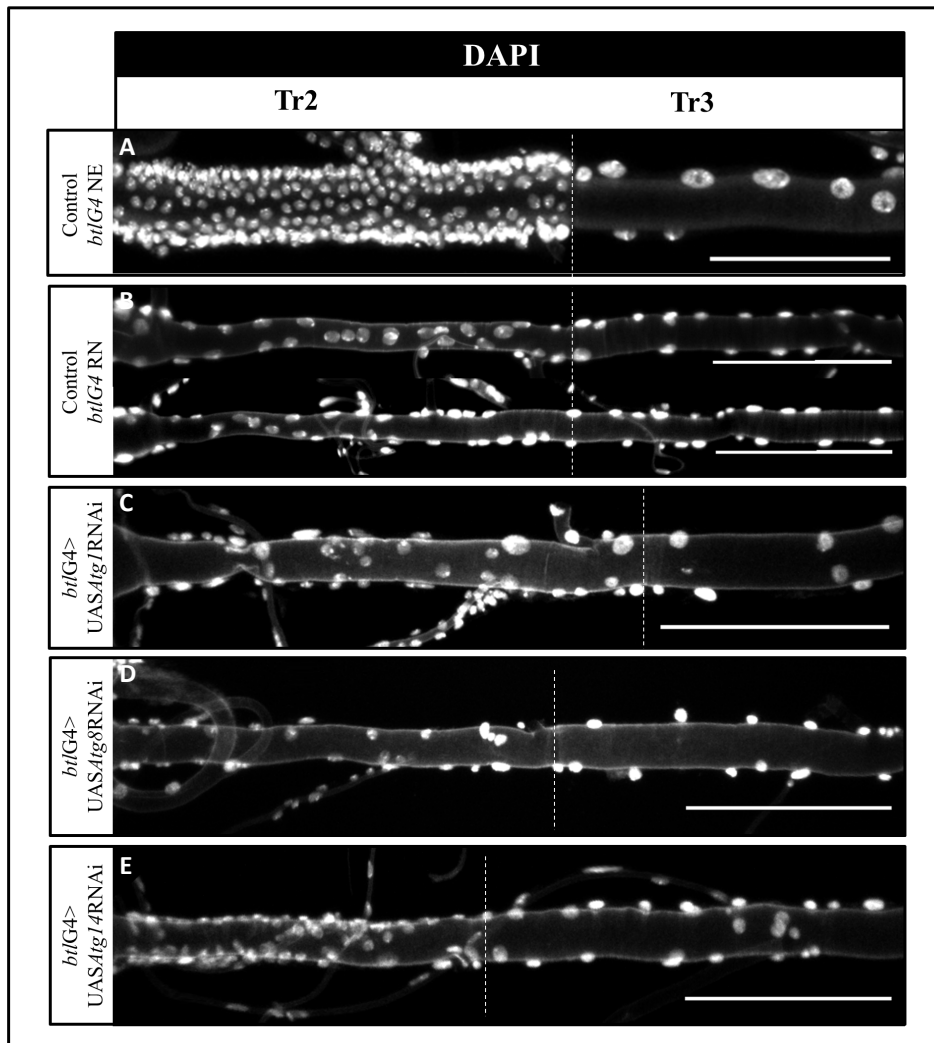


Fig. 33: Fenotipos en condiciones de restricción nutricional por aminoácidos. A) Control del DT de L3 en condiciones de nutrición estándar. B) Control en condiciones de restricción nutricional por aminoácidos. C)-E) Inactivación de los genes *atg1*, *atg8* y *atg14* en condiciones de restricción nutricional por aminoácidos. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m.

### 9.3.- Evaluación de distintos grados de estrés nutricional en L3

Tras detectar que la restricción nutricional con un aporte del 0% de levadura producía un incremento en el tamaño de los núcleos de las DAPs en el DT, quisimos seguir explorando esta situación. Esta posibilidad se veía limitada por la elevada tasa de mortalidad en larva, por lo que nos propusimos examinar diferentes grados de restricción nutricional. El objetivo era encontrar fenotipos similares pero con mayor supervivencia, para examinar el efecto en las células progenitoras traqueales, pero reduciendo el descenso sistémico de nutrientes y energía.

Para ello, probamos medios con distinto aporte de aminoácidos, repitiendo el mismo procedimiento de dejar crecer los animales en medio nutricional estándar, seleccionar las larvas en L2 y trasladarlas al medio restrictivo. Inicialmente añadimos un 30% de levadura al medio, pero se observó que, aunque la tasa de supervivencia se incrementaba

hasta el 90% y el retraso en la pupación se reducía hasta los 5 días, los efectos en el incremento de tamaño de las células del Tr2 desaparecían (Tabla 8, Fig. 34F), y los animales supervivientes presentaban una morfología del DT y desarrollo perfectamente normal. A continuación, se redujo el porcentaje de levadura al 10%. En estas condiciones, la viabilidad descendía al 70% y la pupación se retrasaba alrededor de 8 días, pero el fenotipo traqueal era prácticamente inexistente (Tabla 8, Fig. 34E). Por último, se probaron aportes de levadura del 2,5 y 5%. En estos casos, las tasas de supervivencia fueron del 40% y 60% respectivamente, y el tiempo en alcanzar la fase de pupa se mantenía en torno a 8 días. En ambos casos, las células diploides del Tr2 aparecían ocasionalmente más grandes, pero nunca al nivel de las condiciones de 0% aa (Tabla 8, Fig. 34C-D).

	Control NE	NR 0% aa	NR 2.5% aa	NR 5% aa	NR 10% aa	NR 30% aa
<b>Viabilidad</b>	100%	10%	40%	60%	70%	90%
<b>Retraso en pupación</b>	-	12 días	8 días	8 días	8 días	5 días
<b>Tamaño del núcleo</b>	Estándar	Mayor	Mayor en algunos casos	Mayor en muy pocos casos	Estándar con menos células	Estándar

Tabla 8: Diferentes porcentajes de aminoácidos en el medio y sus efectos en el desarrollo y las DAPs del Tr2.

Puesto que las condiciones estudiadas de distinto porcentaje de aporte de levadura al medio no nos permitieron obtener los efectos que buscábamos, continuamos analizando los animales en condiciones de 0% aa. Al examinar un mayor tamaño muestral de larvas L3 en condiciones de restricción nutricional 0% aa y realizar cuantificaciones del contenido en DNA de los núcleos de DAPs, mediante los softwares Fiji e IMARIS, detectamos que eran mayoritariamente 4C. Ésta es la condición habitual de las DAPs en L2, y al alcanzar L3 entran en mitosis para aumentar en número y reducir su contenido a 2C. Los resultados obtenidos mediante la restricción nutricional 0% aa indican que el efecto de esta condición en las DAPs es la inhibición de las nuevas mitosis que normalmente se dan en estadio L3.

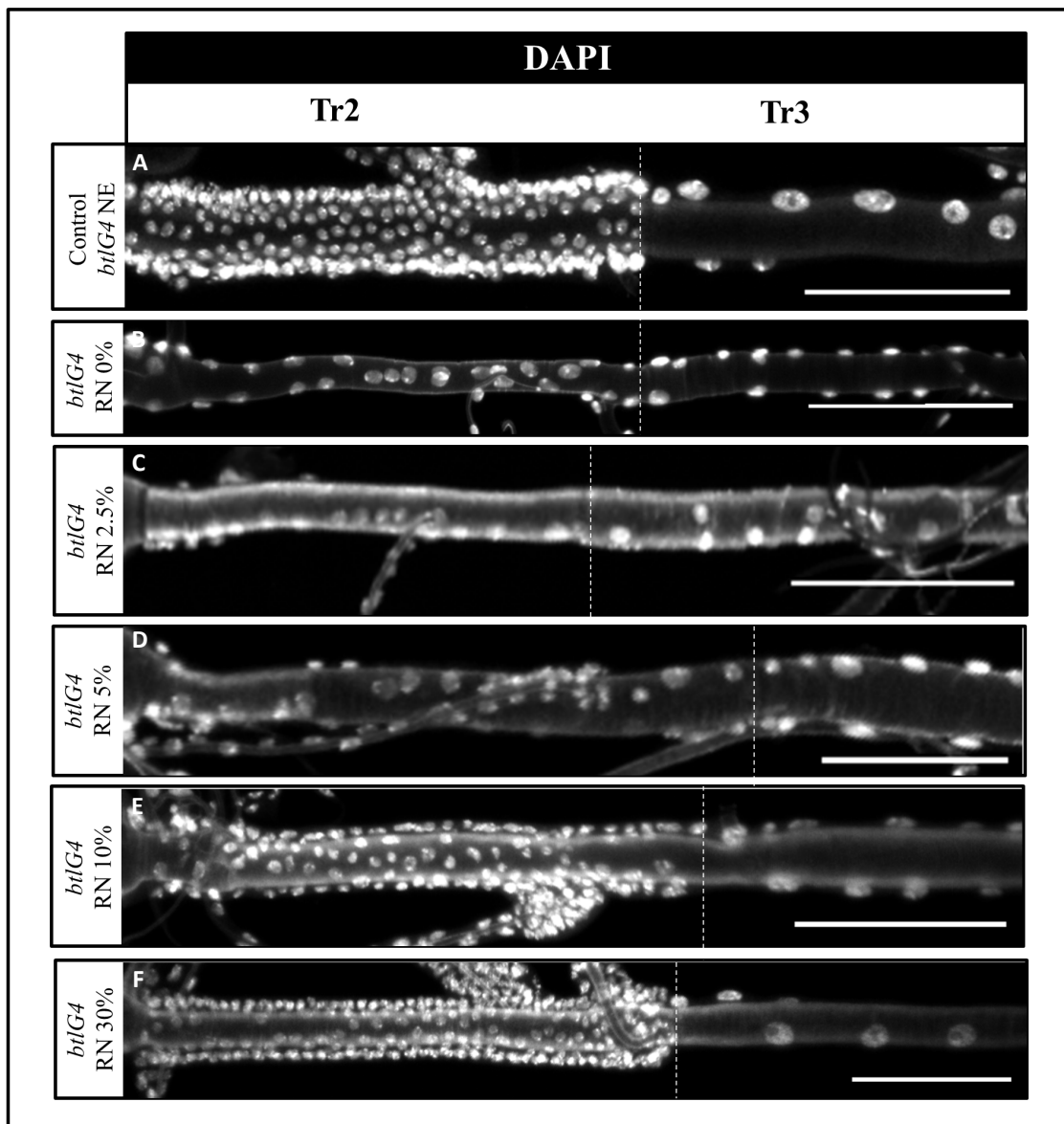


Fig. 34: Imágenes de los fenotipos de las DAPs del Tr2 en las diferentes condiciones nutricionales. A) Control del DT de L3 en condiciones de Nutrición Estándar. B) Restricción nutricional 0% levadura. Las DAPs presentan un incremento en el tamaño habitual del núcleo. C) Restricción nutricional 2.5% levadura. Algunas DAPs presentan un ligero incremento de tamaño del núcleo, pero no todas. D) Restricción nutricional 5% levadura. Pocas DAPs presentan un incremento de tamaño del núcleo E) Restricción nutricional 10% levadura. Aparecen menos células en el Tr2, pero todas muestran el tamaño habitual. F) Restricción nutricional 30% levadura. Fenotipo sin diferencias con el control. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m.

#### 9.4.-El fenotipo de inhibición de la mitosis en Tr2 se revierte al retornar a los animales a medios nutricionales estándar

Tras determinar que la restricción nutricional de aminoácidos provocaba una inhibición en la entrada en nuevas mitosis en las DAPs, nos planteamos si era posible la recuperación del ciclo habitual, así como la tasa de supervivencia retornando a las condiciones de

nutrición estándar. Para examinar esta hipótesis, los individuos en estadio L3 recuperados de medios con restricción nutricional 0% aa, tras pasar entre 10 y 14 días en estas condiciones, fueron devueltos a medios de alimentación estándar. Los resultados mostraron que tras 24h-48h en condiciones de nutrición habituales a 25°C, las células progenitoras entraban de nuevo en mitosis, alcanzaban la diploidía, y los animales formaban la pupa y proseguían con su desarrollo habitual, llegando al estadio adulto.

En la Fig. 35 se muestran las células diploides con marcaje para Ciclina A (CycA), implicada en la fase S del ciclo celular, y requerida para la adecuada progresión del mismo. Esta proteína, presente habitualmente en células en ciclo mitótico, desaparecía en condiciones de restricción nutricional de aminoácidos (Fig. 35B), y reaparecía cuando los animales eran devueltos a medios estándar (Fig. 35C).

Resultados similares se obtuvieron al realizar marcaje con fosfohistona 3 (Ph3), ampliamente usada para la detección de células en proceso de mitosis. En la Fig. 36A se aprecia la ausencia de células con señal de Ph3 inmediatamente tras retirar las larvas de los medios con restricción de aminoácidos (0h). Tras 6h en medio nutricional estándar aparece marcaje en células del Tr2 (Fig. 36B), así como pasadas 24h en este mismo medio (Fig. 36C).

Los resultados obtenidos mediante CycA y Ph3 indican que el retorno de los animales a medios de nutrición estándar permitía la recuperación del ciclo mitótico en las DAPs, continuando su desarrollo de manera habitual.



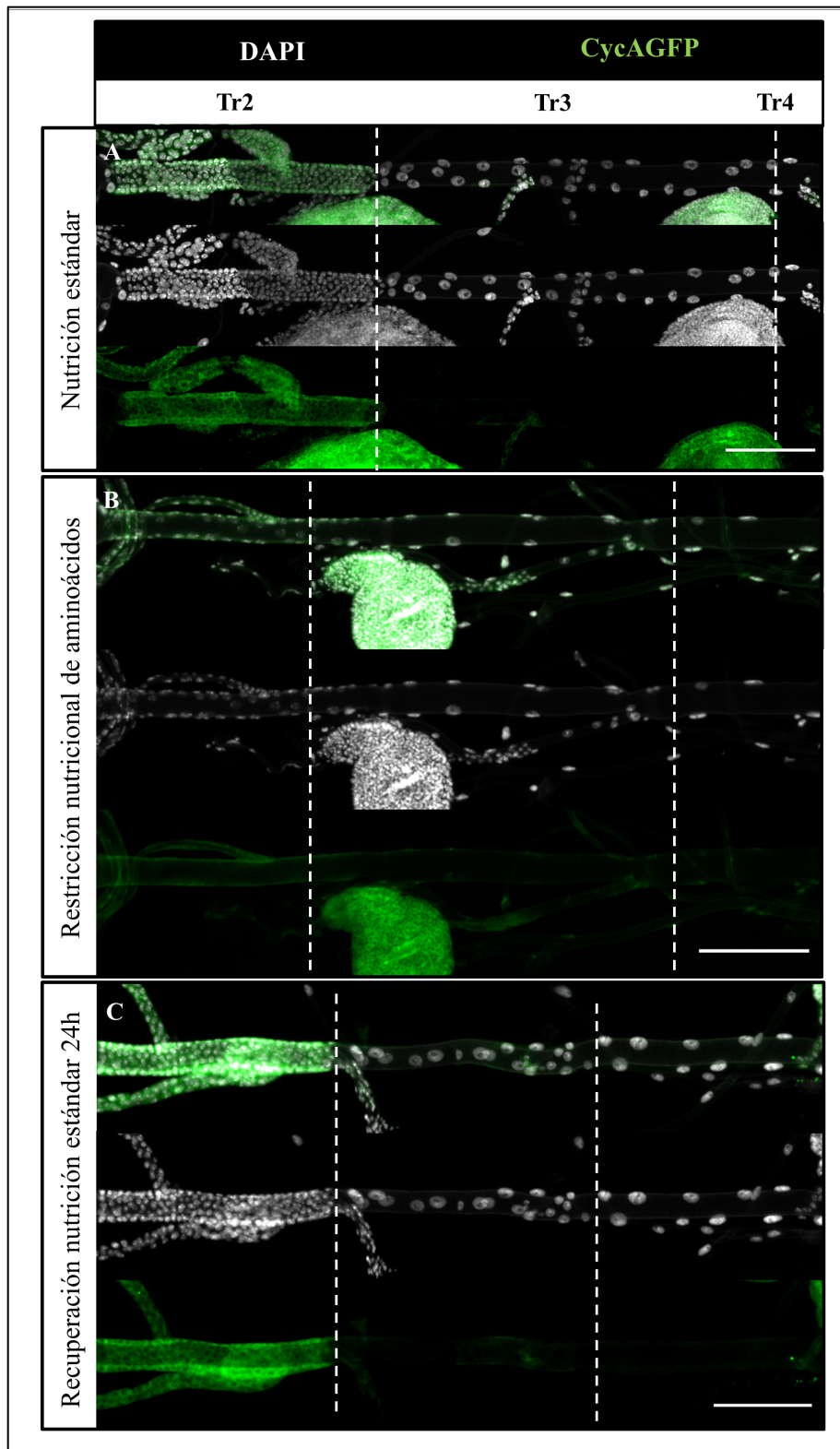


Fig. 35: Proyecciones de los metámeros anteriores del DT en estadio L3 con marcaje anti CycA. A) DT de L3 en condiciones de nutrición estándar. Se detecta la presencia de CycA en las DAPs y en los discos imaginales adyacentes (formados por células progenitoras no diferenciadas en ciclo mitótico) B) Marcaje anti CycA en el DT de L3 en condiciones de restricción nutricional de aminoácidos. No se observa señal en las DAPs, pero si en las células progenitoras indiferenciadas del disco imaginal. C) Marcaje anti CycA en el DT de L3 pasadas 24h tras haber sido devueltos a medios de nutrición estándar. Las DAPs recuperan el marcaje. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m.

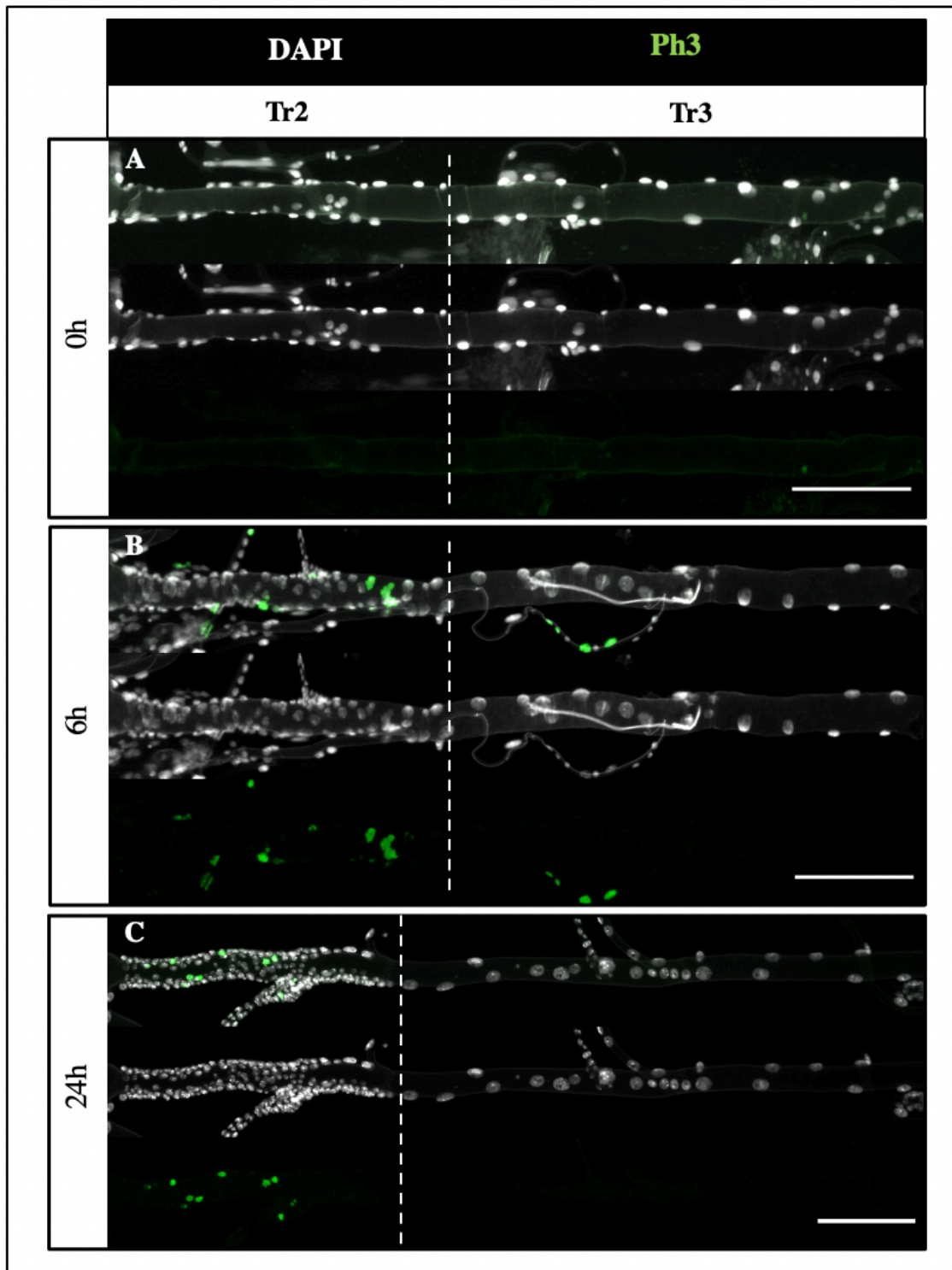


Fig. 36: Proyecciones de los metámeros anteriores del DT en estadio L3 con marcaje anti Ph3. A) DT de L3 en condiciones de restricción nutricional de aminoácidos. No aparecen células marcadas con Ph3. B) DT de L3 tras 6h en medio estándar tras la restricción nutricional de aminoácidos. Se detectan DAPs con marcaje para Ph3 en el Tr2. C) DT de L3 tras 24h en medio estándar tras la restricción nutricional de aminoácidos. Se detectan DAPs con marcaje para Ph3 en el Tr2. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m.

### 9.5.- El estrés nutricional de carbohidratos no provoca efectos en el sistema traqueal ni en la viabilidad de los individuos

Para continuar explorando como el estrés nutricional puede afectar las DAPs en el sistema traqueal, estudiamos también los efectos de la restricción de carbohidratos en el medio. Para ello seguimos el mismo procedimiento que con la restricción de aminoácidos, dejando a los animales crecer en condiciones estándar hasta L2, momento en el que se seleccionaban las larvas y se transferían a un medio sin aporte de glucosa. Al diseccionar y analizar larvas L3 crecidas en este medio, en ningún caso observamos efectos de ningún tipo sobre los individuos. Tanto el fenotipo traqueal (Fig. 37), como la viabilidad y los tiempos de pupación y metamorfosis se desarrollaron con normalidad indicando que la restricción nutricional de carbohidratos no provoca alteraciones en la morfología ni el ciclo mitótico habitual de las DAPs.

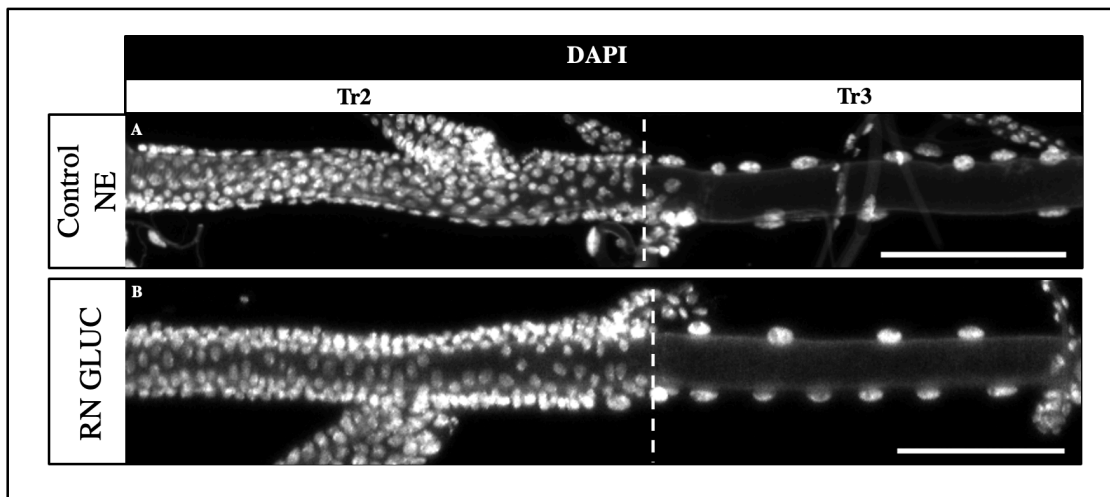


Fig. 37: A) Control del DT de L3 en condiciones de Nutrición Estándar. B) Fenotipo normal en condiciones de restricción nutricional de glucosa. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m.

### 9.6.- Búsqueda de alteraciones en las DAPs relacionados con el estrés oxidativo

Por último, nos planteamos la posibilidad de analizar los efectos de un estrés tóxico sobre la morfología y la actividad de las DAPs en estadio L3. Para realizar este estudio, se añadió al medio estándar de alimentación paraquat, un neurotóxico comúnmente utilizado en *Drosophila* para inducir estrés oxidativo (Parkes *et al.*, 1993; Rzezniczak *et al.*, 2011). Seguimos el mismo protocolo de permitir el crecimiento de los animales en medio estándar hasta L2, para después traspasarlos al medio con paraquat añadido. En estas condiciones, los individuos invertían el mismo tiempo que en condiciones estándar en alcanzar el estadio L3, y no mostraban alteraciones de ningún tipo en el fenotipo del DT (Fig. 38).

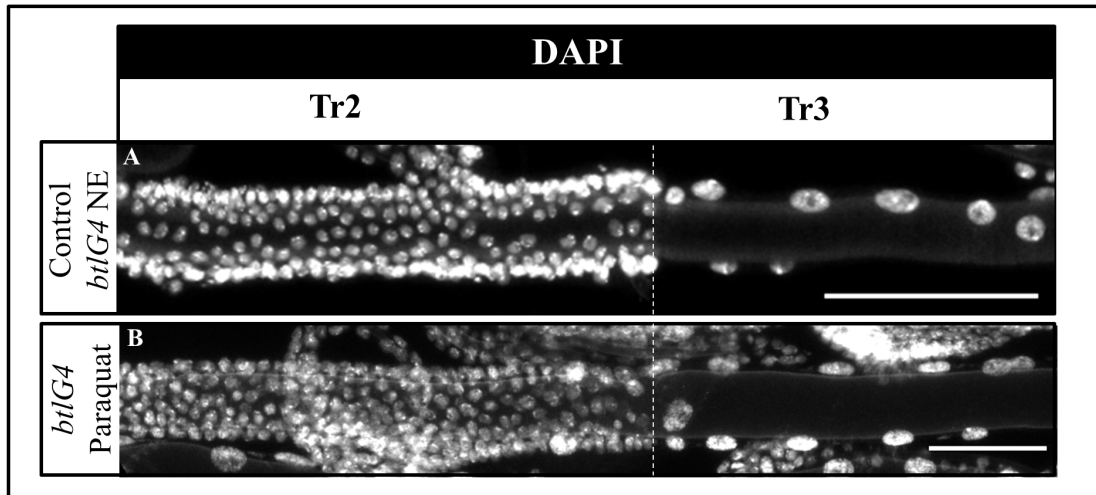


Fig. 38: A) Control del DT de L3 en condiciones de Nutrición Estándar. B) Fenotipo normal en L3 en medio de alimentación con paraquat. Las barras de escala indican 100  $\mu$ m.



## **DISCUSIÓN**



## **Discusión**

El objetivo inicial de este proyecto era detectar y caracterizar diferencias moleculares entre células progenitoras y no progenitoras en el sistema traqueal de la larva de *Drosophila*, que nos permitieran identificar procesos y funciones específicos de cada grupo. Para ello, realizamos un perfil de expresión génica diferencial entre ambas muestras, en cuyos resultados detectamos una ruta clave en las anotaciones referentes a las células destinadas a desaparecer durante la metamorfosis: la autofagia. Caracterizamos este proceso en el sistema traqueal tanto en larva en estadio L3 como en pupa, y las consecuencias de su inactivación para el correcto desarrollo del animal en la transición al estadio adulto. Al mismo tiempo, demostramos la correlación que existe entre los niveles de autofagia y el grado de poliploidía en las células de la tráquea. Por último, describimos como diferentes tipos de estrés afectan de forma diferente a las DAPs, y como estos efectos pueden ser reversibles restaurando las condiciones de nutrición estándar de los animales.

A continuación, ofreceremos una interpretación y discusión de los datos presentados en este proyecto.

### **1.- Perfil de expresión diferencial entre células traqueales**

A pesar de que es ampliamente conocido que los tejidos que componen el cuerpo de *Drosophila* en estadio de larva deben sufrir una reestructuración, y en muchos casos ser eliminados para dar paso a la construcción de los tejidos que forman el cuerpo del adulto, muchas etapas de este proceso siguen presentando numerosas incógnitas. La mayor parte de los tejidos adultos proceden de la proliferación de células progenitoras que permanecen indiferenciadas durante toda la vida de la larva, pero en algunos casos, existen células como las DAPs en la tráquea que, a pesar de estar diferenciadas, mantienen la capacidad de generar nuevas estructuras (Guha y Kornberg, 2005).

En base a las similitudes que presentan las DAPs de la tráquea con las células no progenitoras que las rodean y mueren durante la metamorfosis, el objetivo de realizar un análisis del perfil de expresión diferencial entre ambas fue detectar características genéticas que las distingan y procesos exclusivos de cada grupo.



En estos resultados, no es sorprendente que gran parte de las anotaciones referentes a las DAPs estuvieran relacionadas con el ciclo mitótico, puesto que estas células deben mantener su capacidad de división y proliferación en esta fase de L3 previa al inicio de la metamorfosis. Además, también encontramos múltiples referencias a vías metabólicas destinadas a la obtención de energía, como glucólisis o fosforilación oxidativa, indicando que presentan un metabolismo más activo que las células no progenitoras. En general, las células progenitoras muestran un delicado control metabólico (García-Prat *et al.*, 2017), por lo que los elevados requerimientos de energía de estas células podrían relacionarse con una elevada tasa de proliferación ya en este estadio previo a la metamorfosis.

Las anotaciones de expresión diferencial referentes a las células no progenitoras mostraban una alta cantidad de genes y procesos relativos a la acidificación de compartimentos celulares y el reciclaje de componentes (procesos relacionados con la autofagia). No se detectaron anotaciones relacionadas con el ciclo celular, la replicación o la producción de proteínas. Estos datos en conjunto pueden ser entendidos como indicaciones de que estas células no tienen un ciclo celular activo, presentan un metabolismo más bajo que las células progenitoras, y se encuentran en proceso de reciclaje y/o eliminación de metabolitos, proteínas y orgánulos. Dado el doble rol de la autofagia en supervivencia y en muerte celular, esto puede indicar tanto una forma económica de obtención extra de nutrientes, como una vía preparatoria para su degradación en etapas posteriores del desarrollo.

Una de las ventajas de la autofagia como forma de muerte celular programada es que permite un reciclaje previo de los componentes celulares, que además sirve como aporte de energía para las células adyacentes y colindantes, como pueden ser las células progenitoras (Lee *et al.*, 2009). Por ello, resulta bastante razonable el uso de esta ruta en la degradación de tejidos durante la metamorfosis, cuando el individuo se encuentra aislado de un aporte externo de nutrientes.

En el primer cribado de genes con alto nivel de expresión diferencial en células no progenitoras se analizaron genes relacionados en su mayoría con rutas de metabolismo intermediario y canales iónicos, y al inactivarlos no se detectaron efectos sobre la capacidad progenitora de estas células. Esto podría indicar que quizá los factores analizados o bien son redundantes en sus funciones, o bien no tienen relación con esta

capacidad progenitora, o en todo caso, que son colaterales y derivados de ella, pero no la causa de la misma.

## **2.- Autofagia como ruta de degradación de las células traqueales**

Durante la metamorfosis de *Drosophila*, cuando la mayor parte de los tejidos larvarios son eliminados y se forman los tejidos que compondrán el organismo adulto, el animal no recibe ningún aporte externo de energía, por lo que los recursos de que dispone son limitados. En este sentido, resulta muy coherente que órganos que actúan como reservas de nutrientes y energía como es el cuerpo graso, sean degradados mediante un sistema como la autofagia (Liu *et al.*, 2013), que facilita la reutilización de la energía acumulada y liberada durante el proceso. En otros órganos como las glándulas salivares, se requiere un mecanismo coordinado de colaboración entre autofagia y apoptosis, donde la primera inicia el proceso mediante el reciclaje y la eliminación de componentes, y la segunda lo culmina conduciendo a la muerte celular (Berry y Baehrecke, 2007).

Como se ha descrito en la introducción, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, ya se había demostrado la participación de la apoptosis en la degradación de la tráquea (Fraire-Zamora *et al.*, 2021), por lo que al detectar indicios de la activación de la autofagia en las células destinadas a desaparecer, decidimos comprobar cómo ambos procesos podían ser necesarios para la eliminación total de este órgano, y complementar el modelo propuesto.

## **3.- Caracterización de los niveles de autofagia a lo largo del DT**

La caracterización del patrón de la ruta de la autofagia a lo largo del DT arrojó resultados muy precisos: los niveles detectados en las DAPs eran significativamente menores, en contraste con los niveles que presentaban las células no progenitoras.

Esto fue comprobado por diversos métodos de cuantificación que concordaron con los resultados obtenidos en el análisis de expresión diferencial. dp62 es un marcador inverso ampliamente utilizado, pero cuyos resultados pueden ser interpretados de formas diferentes en función del método utilizado y de la cuantificación que se lleve a cabo. Por

ejemplo, se ha demostrado que los niveles de dp62 detectados mediante western blot (que en el caso de nuestro tejido presentaba numerosas dificultades técnicas) reflejan resultados similares a los de una aproximación inmunohistoquímica, que además, de hecho permite obtener una mayor cantidad y calidad de información si se analizan el número, el tamaño o la localización celular de los agregados. La detección puede realizarse utilizando un anticuerpo contra dp62, o mediante el uso de una cepa que porte una construcción que codifica un GFP unido a la proteína endógena. Esta opción tiene el inconveniente de que tiende a producir una alta cantidad de autoagregados que generan un incremento de falsos positivos, por lo que no se correlaciona de manera proporcional con la actividad autofágica (Pircs *et al.*, 2012).

En nuestro caso, nos decantamos por un análisis de la intensidad de la señal del anticuerpo, lo que incluye la cantidad de proteína unida a cargos y la cantidad libre en la célula. De esta forma se obtiene la cantidad total de la proteína, esté actuando activamente en la autofagia o no, por lo que se puede perder la exactitud de la correlación inversamente proporcional. Sin embargo, puesto que se ha descrito un incremento general de los niveles de dp62 en condiciones que favorecen la autofagia, como la restricción nutricional (Erdi *et al.*, 2012), este método de cuantificación ofrece una idea aproximada del estado de la ruta en la célula.

Aun así, los valores de autofagia encontrados en las DAPs en Tr2 en estadio L3 en comparación con el resto de metámeros del DT fueron suficientemente significativos como para establecer una diferencia en cuanto a la actividad del proceso.

Estos resultados fueron corroborados por el uso del marcador Atg8Cherry, que establece una vía de cuantificación más precisa de la actividad autofágica. En el caso de este marcador, que se encuentra unido a la membrana del fagosoma (Ichimura *et al.*, 2000), es habitual cuantificar el número de puntos encontrados por unidad de área, ya que estos actúan como una indicación del número de fagosomas activos (Denton *et al.*, 2012).

Los valores de la cantidad de puntos de Atg8Cherry a lo largo del DT mostraron de forma clara una diferencia significativa entre el Tr2, compuesto por DAPs, y el resto de los metámeros formados por células poliploides. Estos a su vez mostraban un aumento progresivo de este marcador hacia el extremo posterior.

Estos resultados permiten establecer un patrón claramente diferencial en cuanto a autofagia en las células traqueales durante el estadio previo a la metamorfosis. En las células no progenitoras, los niveles son significativamente mayores que en las progenitoras, lo que podría sugerir que la autofagia está actuando reciclando nutrientes para mantener a estas células en ausencia de otras vías metabólicas que requieren más energía, y/o quizá como preparación para su eliminación en etapas posteriores.

Los menores niveles de autofagia en DAPs en comparación con células no progenitoras quizás puedan explicarse a través de distintas hipótesis. En primer lugar, la presencia de *hdc* en las DAPs y su función como protección ante el estrés y los efectos de la ecdisona en la inducción de los procesos que ocurren durante la metamorfosis, en base a los resultados descritos por Giannios y Casanova (2021). Además, la inactivación de *hdc* provoca un incremento de la ruta de TOR, un conocido represor de la autofagia (Hosokawa *et al.*, 2009). Según los datos obtenidos en el análisis de expresión diferencial y diversas observaciones de laboratorio, estas células presentan unas necesidades metabólicas específicas, definidas por la presencia de componentes de la ruta de dTOR y de Insulina. En conjunto, estos datos sugieren la existencia de un delicado equilibrio entre *hdc*, dTOR y autofagia, que mantiene esta última en niveles basales enfocados a la supervivencia celular.

Otra explicación, no excluyente con la anterior, podría proceder de la diferencia entre el ciclo mitótico de las DAPs y el endociclo de las células no progenitoras. Diversos estudios han descrito un descenso de la actividad autofágica durante la mitosis, indicando que la interacción de las kinasas dependientes de ciclinas podría provocar la inactivación de diversos componentes de la ruta de autofagia (Eskelinen *et al.*, 2002; Furuya *et al.*, 2010). Esto podría actuar como mecanismo de protección de los componentes celulares durante el proceso de replicación y división del genoma.

#### **4.- Alteración de la actividad autofágica en el DT en L3**

Una vez caracterizada la actividad autofágica diferencial en el DT en L3, analizamos los efectos derivados de la alteración de este proceso. En primer lugar, para comprobar la eficacia de los RNAi utilizados, y confirmar, en base a estudios previos, que mediante la

manipulación de los genes *atg* era posible interferir en la ruta, analizamos el patrón de autofagia resultante de estas intervenciones.

Diversos estudios han demostrado que los genes *atg1*, *atg8* y *atg14*, resultan imprescindibles para el correcto desarrollo de este proceso en otros órganos ((Denton *et al.*, 2012; Berry y Baehrecke, 2007; Nagy *et al.*, 2018), por lo que decidimos explorar sus efectos en el sistema traqueal. Al medir mediante dp62 los niveles de autofagia resultantes de la inactivación o sobreexpresión de *atg1*, *atg8* y *atg14*, detectamos que se producía una alteración en el patrón habitual. En todos los casos, se reducían o desaparecían las diferencias entre el Tr2, formado por DAPs y los otros metámeros, asimilándose entre ellos los niveles de dp62 detectados. De estos resultados dedujimos que al inactivar la ruta de autofagia mediante la alteración de estos genes, los niveles de dp62 se incrementaban en los metámeros poliploides (o descendían en Tr2 a causa de la sobreexpresión de *atg1*), reflejando las variaciones en la actividad autofágica.

Sin embargo, la inactivación de los genes mencionados a lo largo del DT no parece tener efectos determinantes sobre la morfología de este sistema en estadio L3, ya que las escasas alteraciones morfológicas detectadas ocasionalmente (como variación en el tamaño de las células no progenitoras) no afectaron al sistema traqueal en este estadio. Por el contrario, la sobreexpresión de *atg1*, y con ello de la ruta, provocó alteraciones en la forma y un menor número de células en Tr2, que parecían sugerir procesos de muerte en las DAPs, y terminaban conduciendo a la muerte prematura del individuo.

Estos datos sugieren que la expresión de la autofagia en las células poliploides no progenitoras en el DT en L3 es una preparación para la fase posterior de metamorfosis, y no resultan afectadas por una reducción de los niveles de esta ruta en las últimas etapas de larva. Los datos también confirman que un exceso de autofagia conduce a la muerte celular, como se deduce al sobreactivarla en células progenitoras que en condiciones habituales sobreviven.

## **5.- Efectos durante la metamorfosis de la alteración de la autofagia en el DT**

Con el objetivo de determinar los efectos de la autofagia en el sistema traqueal durante el estadio de pupa, primero fue necesario caracterizar el patrón habitual de degradación de

este órgano larval. Los estudios previos realizados por Fraire-Zamora *et al.* (2021), habían mostrado una reducción de los metámeros posteriores en las primeras horas de la metamorfosis (3h-15h), pero no se extendían hasta la eliminación total del DT.

Para caracterizar la degradación del sistema respiratorio de larva, nosotros utilizamos un sistema de visualización *in vivo* del sistema traqueal marcado con DsRed, que permitía el seguimiento de las ramas principales durante la metamorfosis. Aunque resulta muy útil, este sistema tiene algunas limitaciones, como pueden ser la toxicidad del marcador o el hecho de que los metámeros anteriores se internalizan en el organismo a medida que avanza el proceso, por lo que se dificulta la visualización de los mismos.

A pesar de estas limitaciones, gracias a esta aproximación fue posible determinar que pasadas 24h tras la formación de la pupa, sólo son visibles reducidas secciones del DT, mientras que pasadas 30h, ya no se aprecia señal del sistema traqueal de larva. A partir de este momento, en tiempos de 50h, 70h y 90h apf, en ocasiones se detectaban puntos fluorescentes en el abdomen, probablemente debidos a nuevas células traqueales en proceso de formación del sistema respiratorio del adulto. Sin embargo, de momento no es posible caracterizar este proceso puesto que se desconocen marcadores que determinen específicamente la identidad adulta tras la diferenciación de estas células (proyecto en curso por el Dr. Furriols de nuestro laboratorio).

Para poder realizar un análisis comparativo entre diferentes genotipos e individuos, ideamos un método de cuantificación basado en la proporción de tráquea visible en el abdomen. Para ello, medimos la longitud de los segmentos traqueales apreciables en relación a la longitud total del abdomen, puesto que éste podía variar entre animales en función del tamaño de los mismos. Así pudimos establecer una determinación de la proporción comparable de residuos traqueales.

Conociendo el desarrollo temporal del proceso de degradación del DT en animales control, fue posible realizar el análisis de los fenotipos provocados por la inactivación de la autofagia a través de los genes *atg1* y *atg8*, lo que demostró un retraso en el tiempo de degradación habitual. Los resultados indicaron que la desaparición total de la señal no se producía hasta pasadas las 50h apf en la inactivación del gen *atg1* y pasadas las 70h apf en la inactivación del gen *atg8*. Puesto que ambos genes son claves para el adecuado progreso de la ruta de autofagia, no es posible determinar si estas diferencias son debidas

a la función de cada uno en la misma o a la distinta penetrancia del efecto del RNAi en cada caso. Al analizar la inactivación conjunta de ambos genes, la persistencia del DT se extendía pasadas las 90h apf, y no fue posible explorar la evolución más allá de este punto puesto que la letalidad a partir de este tiempo era del 100% de los individuos.

Las causas de esta letalidad no están claras, puesto que en los individuos en los que se había inactivado sólo *atg1* o *atg8*, tampoco se encontraron nunca adultos supervivientes, incluso en aquellos casos en los que el DT finalmente desaparecía.

Se establecieron varias hipótesis en relación con esta levada letalidad: en primer lugar, la toxicidad intrínseca del marcador DsRed, unida a la expresión de un elemento que impedía el normal desarrollo del individuo, como es la inactivación de la autofagia, podría estar resultando excesiva, tanto a nivel del sistema traqueal como del sistema nervioso, o por la combinación de ambos (el *driver* utilizado, *btl*, se expresa en los dos sistemas). Cuando este marcador es expresado en solitario, también existe un porcentaje de letalidad en la pupa, pero no sobrepasa el 20% de los individuos. Esto puede deberse a varios factores: la toxicidad de la proteína DsRed en la célula, o que el lugar de la inserción del transgén esté afectando alguna región del genoma de *Drosophila*, puesto que es letal en homocigosis. Por otro lado, la inactivación de los genes *atg* por si sola también produce una reducción en la tasa de supervivencia, pero en ninguno de los casos sobrepasa el 60%.

Otra posibilidad se planteó en base a las observaciones de pupas en tiempos avanzados de individuos con alguno de los genes de autofagia inactivados. En aquellos en los que no se llegaba a degradar el DT, el abdomen mostraba un evidente retraso en el desarrollo habitual para su estadio, a diferencia del tórax y la cabeza. Es posible que la persistencia del sistema traqueal de larva impidiera el desarrollo de estructuras adultas que completaran la metamorfosis. Si la eliminación de las estructuras larvianas es imprescindible para la construcción del sistema traqueal adulto, esto podría a su vez ser debido a varios motivos: en primer lugar, la degradación de las células no progenitoras mediante autofagia quizá implica el aprovechamiento de la energía liberada por éstas en el proceso. Si esto no se produce, tal vez las DAPs no dispongan de energía suficiente para su proliferación, diferenciación y construcción del nuevo sistema respiratorio del adulto, como ocurre por ejemplo en la degradación del cuerpo graso (Liu *et al.*, 2013). También existe la posibilidad de que quizá se requiera el espacio libre que deja el sistema

traqueal larval para ser ocupado por el sistema adulto, y la construcción de este no pueda realizarse por motivos puramente físicos.

Otra opción podría ser que la autofagia durante la fase de metamorfosis es necesaria en las células progenitoras para la construcción del sistema adulto. Existe evidencia de autofagia activa en células progenitoras como forma de control de calidad, homeostasis de la energía y preservación del estado metabólico (Levine y Kroemer, 2019). Al inactivarla en todo el DT, se ha bloqueado también en estas células, que podrían necesitarla para mantener la proliferación en situación de ausencia de nutrientes externos, o como medida de protección frente al estrés metamórfico del proceso.

La exploración de estas posibilidades resulta en un dilema complejo de resolver por los motivos mencionados: el marcador más eficaz para una observación prolongada y a través de la cutícula de la pupa, a pesar de su nivel de letalidad, ha demostrado ser DsRed, el *driver* más eficaz en el sistema traqueal presenta expresión también en el sistema nervioso, y no es posible la visualización del avance de las estructuras adultas por la falta de marcadores específicos para ello.

## **6.- Apoptosis en la degradación del sistema traqueal de larva durante la metamorfosis**

Puesto que la inactivación de los genes *atg1* o *atg8* de forma independiente mostraba finalmente la degradación traqueal en tiempos extremos de pupa (70h apf y 90h apf respectivamente), y los resultados previos obtenidos por Fraire-Zamora *et al.* (2021) demostraron que la apoptosis estaba interviniendo también en la eliminación del sistema respiratorio de larva, nos propusimos conectar ambos procesos. Se inactivó la ruta apoptótica en el DT y se analizaron tiempos extremos de pupa, comprobando que esto provocaba también un importante retraso en la degradación y corroborando los resultados de Fraire-Zamora *et al.* En base a otros estudios que muestran como la autofagia actúa en primer lugar facilitando la apoptosis (Berry y Baehrecke, 2007), y a la regulación bidireccional de ambas rutas (Scott *et al.*, 2007), teorizamos que en los casos de inactivación de la primera, la segunda sufre un retraso en su ejecución, y en los casos de inactivación de la apoptosis, la autofagia por sí sola no es capaz de completar este proceso, o lo haga con mucho retraso.



Hasta ahora, los datos muestran claramente la implicación de la autofagia en la degradación del sistema respiratorio larval durante la metamorfosis, excluyendo las DAPs pero provocando la eliminación de las células no progenitoras. El modelo propuesto hasta el momento sugiere la participación imprescindible de la autofagia para conducir de manera apropiada la histólisis del DT, de forma coordinada con la apoptosis, a diferencia del intestino medio (Denton *et al.*, 2009) y a semejanza de las glándulas salivares (Berry y Baehrecke, 2007). Una verificación de como autofagia y apoptosis participan de forma combinada en la histólisis del sistema traqueal de larva queda a la espera de futuros experimentos de inactivación conjunta de ambas rutas, que no han podido ser completados para la finalización de esta memoria de tesis.

## **7.- Autofagia diferencial ligada a la poliploidía en el sistema traqueal de *Drosophila***

De forma paralela al incremento de autofagia en las células no progenitoras desde los metámeros anteriores hacia los posteriores en el DT, se detectó asimismo un incremento en el grado de poliploidía de estas células en el mismo sentido. Tras analizar los resultados, descubrimos una correlación entre el grado de autofagia y poliploidía en el DT de L3, y que este mismo patrón se mantiene una vez iniciada la metamorfosis, en estadios de pupa temprana.

Para comprobar si esta relación entre los niveles de autofagia y poliploidía se mantenía al alterar el grado de ploidía de las células no progenitoras, sobreexpresamos *Yki* en el DT en estadio L3, para incrementar el número de ciclos de replicación en estas células. Mediante este experimento, comprobamos que efectivamente el grado de autofagia aumentaba según el marcador *Atg8Cherry*, y que la relación entre ambos parámetros se mantenía, mostrando el mismo patrón creciente anteroposterior. Esto nos permitió corroborar la afirmación de que existe una correlación entre los niveles de poliploidía y autofagia en las células del DT.

Este caso puede ser otro ejemplo del equilibrio en el doble rol de la autofagia en supervivencia y muerte celular. Células de mayor tamaño necesitan más cantidad de nutrientes para sobrevivir y mantener la actividad de replicación que requieren

continuados endociclos, al mismo tiempo que su degradación requiere una mayor actividad de reciclaje y eliminación al presentar un mayor tamaño y cantidad de metabolitos.

## **8.- Incremento de los niveles de autofagia en estadios iniciales de pupa**

Al medir los niveles de autofagia en estadios tempranos de pupa, detectamos un incremento con respecto al último estadio de larva, incluidas las células progenitoras en Tr2. Estos resultados pueden asimismo interpretarse en base al rol dual de la autofagia en función del tejido y del contexto. Por un lado, en los segmentos formados por células poliploides, un incremento en los niveles de autofagia resulta congruente con estadios previos a la muerte celular, puesto que una vez iniciada la metamorfosis, este sistema respiratorio ya no tiene ninguna funcionalidad y su degradación es inminente. Por tanto, posiblemente el grado de reciclaje y eliminación de componentes celulares se incrementa y acelera para facilitar la histólisis final del tejido, al mismo tiempo que provee de energía a las células circundantes, que se encuentran en proliferación para formar el sistema adulto y deben sobrevivir (DAPs y traqueoblastos).

Existe aún controversia sobre como la autofagia es capaz de conducir a la muerte de las células. Algunos estudios sugieren, en base a observaciones de grandes lisosomas y alteraciones en la morfología habitual del núcleo, la degradación masiva de los componentes celulares que termina imposibilitando la supervivencia (Denton *et al.*, 2018). Otro mecanismo propuesto es que la autofagia degrade factores de supervivencia específicos, lo que provoca la muerte a través de rutas dependientes de caspasas (Nezis *et al.*, 2010).

Por otro lado, el aumento de los niveles de autofagia en las DAPs en este estadio de pupa podría asociarse al rol de este proceso en la homeostasis celular y la supervivencia. Al reducirse radicalmente los niveles de nutrientes, se produce un descenso en la actividad de la ruta de TOR, lo que permite un incremento de los niveles de autofagia (Hosokawa *et al.*, 2009). Es posible que, en este caso, el incremento de la actividad autofágica sirva como proceso de obtención de energía, actuando a favor de la supervivencia celular, para el mantenimiento de estas células, su protección ante el estrés metamórfico y su proliferación en condiciones de privación de nutrientes externos (Lum *et al.*, 2005).

## 9.- Función dual de la autofagia

A pesar del ampliamente conocido rol de la autofagia en funciones relacionadas con la supervivencia celular, su papel biológico se extiende al nivel de organismo, por ejemplo facilitando el desarrollo mediante la degradación de estructuras que permitan la remodelación de los sistemas vitales. La muerte celular programada como forma controlada de eliminar estructuras obsoletas se ha observado no sólo en *Drosophila*, sino también en otros grupos de insectos que realizan metamorfosis.

La participación de la autofagia en estos procesos se ha revelado esencial por ejemplo e Lepidóteros, como *Bombix mori* o *Manduca sexta*. En estos animales, diversos escenarios ocurren de forma específica para cada tejido, como sucede en *Drosophila*. Se ha descrito como autofagia y apoptosis colaboran, de manera secuencial, en la degradación del intestino medio de *M. sexta* (Franzetti *et al.*, 2012) y la glándula de seda en *B. mori* (Montali *et al.*, 2017). En ambos casos, la autofagia se activa en primer lugar y resulta esencial para el mantenimiento de las células en las etapas iniciales de la metamorfosis, así como para la movilización de nutrientes almacenados y degradación de componentes citoplasmáticos que son absorbidos por las células circundantes para la construcción de los tejidos adultos, pero es la apoptosis la que finalmente conduce a la muerte celular. En cambio, en motoneuronas de *M. sexta*, la eliminación es directamente mediada exclusivamente por autofagia inducida por ecdisona (Kinch *et al.*, 2003), así como en el músculo intersegmental, donde la liberación de aminoácidos a través de este proceso actúa como fuente de nutrientes para la formación de tejido adulto (Schwartz, 2008). También en Himenópteros se han descrito casos de actuación secuencial y cooperativa de autofagia y apoptosis en la remodelación de estructuras durante la metamorfosis. En *Apis mellifera*, ambos procesos aparecen implicados en la degradación del intestino medio y las glándulas salivares (Zacarin, 2007), mientras que en *Melipona quadrifasciata*, la autofagia se revela como la principal responsable de la remodelación del cuerpo graso (Santos *et al.*, 2015). En Dípteros, donde la remodelación del sistema digestivo resulta esencial para el cambio en los requerimientos dietéticos de la larva al adulto, se ha demostrado la relación entre este proceso metamórfico y un incremento en la regulación transcripcional de los genes *atg*, señalando a la autofagia como conductora del proceso (Malta *et al.*, 2017).

Estos datos, procedentes de diversos órdenes de insectos, reflejan los resultados obtenidos hasta ahora en *Drosophila*, perteneciente al orden Dípteros, y la participación indispensable de la autofagia en procesos de muerte celular programada, así como el nivel de conservación de la maquinaria de la ruta. Además, de acuerdo con lo observado en *Drosophila*, el nivel de implicación de la autofagia en la muerte celular parece ser altamente específica de cada tejido. Esta especificidad se advierte también en cuanto al contexto fisiológico, ya que la línea divisoria entre la función de la autofagia en supervivencia y muerte celular parece mantenerse en un delicado equilibrio. En diversas situaciones se ha demostrado como la actividad autofágica es necesaria para mantener las condiciones adecuadas que permitan al tejido desarrollar las funciones requeridas, como en *B. mori* al inicio de la metamorfosis. En este caso, la glándula de la seda del estadio juvenil presenta una autofagia activa que permite a este órgano la proliferación en condiciones de limitación de nutrientes que posibilita la fabricación del capullo, pero en etapas posteriores, un incremento de los niveles termina eliminando el tejido en coordinación con apoptosis (Montali *et al.*, 2017).

En *Drosophila*, los niveles de autofagia en las DAPs en L3 son menores en comparación con las células no progenitoras, pero se incrementan al iniciarse el estadio de pupa. En esta fase, los niveles de energía se reducen con respecto a la larva por la supresión de la ingesta (Li *et al.*, 2022), pero es en este momento cuando se inician la remodelación de los tejidos y la morfogénesis. El hecho de que las células progenitoras de los insectos holometábolos inicien programas de división y proliferación celular cuando los animales dejan de alimentarse en la metamorfosis, parece invertir la relación normal entre la producción de energía y el crecimiento. Esto podría indicar que, una vez que se restringe el aporte externo de nutrientes, la autofagia inicia su función como mecanismo de reciclaje para aportar energía que permita la supervivencia de las células progenitoras.

Asimismo, al sobreexpresar *Yki* en el DT se detectaron mayores niveles de autofagia en Tr2 respecto al control. *Yki* también actúa como inductor de la proliferación en células en ciclo mitótico, y la cantidad de éstas en el Tr2 bajo estas condiciones era notablemente mayor que el control. Estas observaciones nos llevaron a plantearnos la posibilidad de que, quizá en este caso, la autofagia actúa de nuevo como mecanismo de protección de estas células para garantizar su supervivencia, ya que al incrementarse el número de las mismas, los recursos eran limitados para todas.

Estos resultados evidencian de nuevo el doble rol que presenta la autofagia tanto en supervivencia como en muerte celular. Esta ruta, altamente conservada evolutivamente, presenta múltiples funciones en desarrollo, respuesta al estrés, neurodegeneración, crecimiento celular, muerte celular y cáncer, y se sabe que promueve la supervivencia celular en condiciones de privación de nutrientes y estrés (Komatsu *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2011, Denton *et al.*, 2012). Se ha descrito como la autofagia resulta esencial para la supervivencia de células neuronales, y que una reducción de la ruta está implicada en la patogénesis de algunos trastornos neurodegenerativos (Komatsu *et al.*, 2006). En condiciones de crecimiento celular habitual, aparece autofagia en niveles basales, como ocurre en Tr2 en situaciones estándar, mientras que en condiciones limitantes de crecimiento, como en la sobreexpresión de *Yki*, aparece un incremento en la expresión de la ruta, en situaciones de inhibición por contacto, estrés metabólico o reducción de la disponibilidad de nutrientes. En estos casos, el aumento de la autofagia puede actuar como proceso de movilización de nutrientes almacenados o reciclaje de componentes para la obtención de energía, pero también puede provocar la muerte celular (Guo *et al.*, 2011).

Esta actividad dual es especialmente notable al estudiar el papel de la autofagia en algunas enfermedades, como en el desarrollo de tumores. En tumores resulta muy evidente la doble función de la autofagia, ya que en etapas iniciales, un aumento de los niveles ralentiza el crecimiento, mientras que cuando el tumor está bien establecido y hay condiciones limitantes de espacio y nutrientes, las células utilizan la función catabólica de la autofagia para mitigar el estrés y aumentar las posibilidades de supervivencia (Degenhardt *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2011; Katheder *et al.*, 2017).

## **10.- Efectos de la inducción del estrés en las DAPs**

Al inactivar distintos genes de la ruta de la autofagia en el DT en estadio L3, no se encontraron alteraciones determinantes en la morfología o la estructura del sistema respiratorio, salvo algunas pequeñas variaciones ocasionales en el tamaño y la disposición de las células. Puesto que se ha descrito el incremento de la autofagia en condiciones de estrés nutricional (Hosokawa *et al.*, 2009; Erdi *et al.*, 2012), intentamos forzar esta situación para observar los efectos en el sistema traqueal.

Decidimos empezar con una restricción del aporte de aminoácidos a través de levadura en la dieta. Inicialmente comprobamos que los niveles de autofagia se incrementaban en todo el DT ya en el genotipo control, pero al compararlo con genotipos en los que se había inactivado algún gen de la ruta autofágica, no observamos diferencias morfológicas ni estructurales entre ellos. Lo que nos llamó la atención fue que en todos los genotipos se producía la misma alteración en las células progenitoras del Tr2: el tamaño de los núcleos se incrementaba al mismo tiempo que su número se reducía drásticamente. Quisimos explorar estos efectos, pero la tasa de letalidad era extremadamente alta, lo que reducía considerablemente el número de individuos disponibles para realizar análisis en ellos.

Para aumentar la tasa de supervivencia de los animales, probamos distintas cantidades de aporte de aminoácidos en la dieta, pero ninguna provocó los mismos efectos que habíamos observado al eliminar completamente la levadura.

Al cuantificar el contenido en DNA de las DAPs en L3 tras pasar 7-10 días en condiciones de aporte externo nulo de aminoácidos, detectamos que presentaban un valor de 4C. Esto es lo habitual en estadio L2, por lo que dedujimos que estas células interrumpían su ciclo mitótico al encontrarse en estas condiciones de restricción nutricional. Previamente se han descrito situaciones similares, en las que la ausencia de nutrientes, de forma directa o a través de la inactivación de la ruta de TOR, interrumpe el ciclo mitótico y hace entrar a las células en estado G0 (Barbet *et al.*, 1996), aunque estudios recientes han mostrado que una inhibición parcial mantiene la progresión del ciclo con una reducción del tamaño celular (Wu *et al.*, 2007). TOR actúa como sensor de la disponibilidad de nutrientes, especialmente aminoácidos (Sancak *et al.*, 2008), que a través de la activación de síntesis de proteínas permite la progresión de las fases del ciclo (Barbet *et al.*, 1996). Si se detiene esta síntesis de proteínas debido a la ausencia de nutrientes disponibles para ello, el ciclo se interrumpe. Esto nos hizo suponer que la baja disponibilidad de aminoácidos en el medio impide la actividad habitual de dTOR en las DAPs, deteniendo su división al entrar en L3 y manteniéndolas en un estado quiescente, sin poder dividirse para reducir su contenido en DNA y así además aumentar el número de células en Tr2.

A partir de aquí, nos planteamos si era posible una recuperación del ciclo mitótico en las DAPs al retornar a las condiciones de nutrición estándar. Para comprobarlo, seleccionamos larvas L3 que habían alcanzado este estadio en medios 0% aa, y fueron devueltas a condiciones nutricionales estándar. Mediante cuantificación del contenido en

DNA, y marcadores de mitosis como Ph3 y CycA, detectamos que estas DAPs conservaban la capacidad de reentrar en mitosis y así continuar con su desarrollo habitual en un periodo de entre 24h-48h. Esto corrobora que al recuperar las condiciones de disponibilidad de nutrientes en las DAPs, la ruta de dTOR se activa de nuevo y permite la progresión del ciclo mitótico (Britton y Edgar, 1998).

En base a estos resultados, quisimos comprobar si estos efectos en las DAPs se reproducían a través de otras modificaciones del medio nutricional habitual. Puesto que se ha demostrado que la insulina juega un papel similar a la ruta de dTOR en el control del ciclo celular (Brogiolo *et al.*, 2001), y que el receptor de insulina está regulado diferencialmente en estas células con respecto a las no progenitoras, decidimos analizar el efecto de reducir los carbohidratos en el medio. Para ello, eliminamos el aporte de glucosa, pero esto no pareció afectar a las células del DT, que no mostraron variaciones en la morfología, el tamaño, ni el desarrollo habitual del sistema respiratorio. Sin embargo, si que aparecieron efectos de inhibición de la mitosis en las DAPS al inactivar el receptor de Insulina en la tráquea (datos no mostrados). Es posible que esto se deba a que los animales son capaces de extraer carbohidratos suficientes de la levadura, el agar o incluso mediante canibalismo entre los individuos expuestos a estas condiciones (Vijendravarma *et al.*, 2013). Al inactivar el receptor, en cambio, se inactiva la ruta, afectando de esta forma también a la regulación de la ruta de dTOR y otros elementos metabólicos que conllevan los efectos mencionados (Scott *et al.*, 1998).

Por último, quisimos analizar los efectos de añadir estrés oxidativo al desarrollo de las células progenitoras, mediante el uso de paraquat. El efecto de este tipo de estrés parece ser dependiente del contexto, y un exceso puede producir una excesiva proliferación (Chen *et al.*, 2021), pero a pesar de usar concentraciones máximas de paraquat en el medio, no se detectaron efectos sobre las DAPs ni el sistema traqueal. Estos resultados sugieren que debe existir en estas células un sistema de protección altamente eficaz contra esta situación.

## Observaciones finales

De los resultados obtenidos en este proyecto se extraen dos conclusiones clave: que existe un patrón diferencial de autofagia en el sistema traqueal que determina el destino de este tejido durante la metamorfosis, y que este patrón está ligado al grado de poliploidía de las células que lo componen. Estas conclusiones se sustentan en las siguientes observaciones: 1) las DAPs y las células no progenitoras presentan diferencias significativas en los niveles de autofagia en el último estadio larval y en las primeras fases de pupa. 2) La inactivación de la ruta de la autofagia en el DT provoca un retraso en su degradación durante la metamorfosis. 3) Las variaciones en el grado de poliploidía de las células no progenitoras conllevan variaciones en el grado de autofagia.

En base a nuestros resultados, proponemos un papel determinante de la autofagia como complemento al modelo de degradación del sistema traqueal de Fraire-Zamora *et al.*, (2021) durante la metamorfosis de *Drosophila*, en un proceso necesario para permitir la remodelación del organismo y la formación de los tejidos adultos.





## **CONCLUSIONES**



## Conclusiones

1. Existe un perfil de expresión génica diferencial entre las células progenitoras del segundo metámero y las células no progenitoras del sexto metámero del tronco dorsal del sistema traqueal de *Drosophila* en el tercer estadio larvario, que afecta procesos relacionados con el ciclo mitótico y la proliferación celular, el metabolismo y la autofagia.
2. Genes que codifican para diversos componentes de la ruta de autofagia presentan una menor expresión en las células progenitoras del segundo metámero con respecto a las equivalentes no progenitoras del sexto metámero del tronco dorsal.
3. Las proteínas Atg8 y dp62 presentan una acumulación diferencial a lo largo del tronco dorsal en el tercer estadio larvario, consistente con unos niveles de autofagia menores en el segundo metámero que en el resto de metámeros del tronco dorsal.
4. Entre las células poliploides no progenitoras de los metámeros del tronco dorsal, la autofagia incrementa de forma progresiva hacia el extremo posterior tanto en el tercer estadio larvario como en la pupa, coincidiendo con un mayor grado de poliploidía.
5. El aumento experimental del grado de poliploidía confirma la correlación entre un mayor grado de poliploidía y un mayor nivel de autofagia.
6. La inactivación de la ruta de autofagia en el sistema traqueal resulta en una homogenización de los niveles de dp62 a lo largo del tronco dorsal en el tercer estadio larvario.
7. La alteración de la autofagia en el sistema traqueal mediante la inactivación de alguno de los componentes de la ruta como *atg1*, *atg8* o *atg14*, no presenta efectos significativos en la estructura del tronco dorsal en el tercer estadio larvario.
8. La sobreexpresión de *atg1* en el tronco dorsal en el tercer estadio larvario provoca la muerte de las células progenitoras y es letal durante el estadio de pupa.
9. La inactivación de la ruta de autofagia en el sistema traqueal provoca un retraso en la degradación del tronco dorsal durante la metamorfosis, y la persistencia del tronco dorsal en estadios avanzados de pupa está asociada con un desarrollo defectuoso del abdomen adulto.
10. La restricción nutricional de aminoácidos induce una inhibición del ciclo mitótico de las células progenitoras, que se reactiva al retornar a condiciones nutricionales estándar.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Arias, A.M. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. *Methods Mol. Biol.* 2008, 420, 1–25.
- Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell.* 1996 Jan;7(1):25-42.
- Benjamini and Yekutieli. "The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency." *Ann. Statist.* 2001. 29 (4) 1165- 1188.
- Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell.* 2007 Dec 14;131(6):1137-48.
- Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993 Jun;118(2):401-15.
- Britton JS, Edgar BA. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development.* 1998 Jun;125(11):2149-58.
- Brogio W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol.* 2001 Feb 20;11(4):213-21.
- Carlson M. *org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human*. R package version 2.14.0.
- Chang YY, Neufeld TP. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol Biol Cell.* 2009 Apr;20(7):2004-14.
- Chen F, Krasnow MA. Progenitor outgrowth from the niche in *Drosophila* trachea is guided by FGF from decaying branches. *Science.* 2014 Jan 10;343(6167):186-9. .
- Chew SK, Akdemir F, Chen P, Lu WJ, Mills K, Daish T, Kumar S, Rodriguez A, Abrams JM. The apical caspase dronc governs programmed and unprogrammed cell death in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2004 Dec;7(6):897-907.
- Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin-Villemant C, Antoniewski C, et al. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science.* 2005; 310:667–670.
- Darzynkiewicz Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. *Curr Protoc Cytom.* 2011 Apr;Chapter 7:Unit 7.2.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, G elinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006 Jul;10(1):51-64.



- Denton D, Aung-Htut MT, Lorensuhewa N, Nicolson S, Zhu W, Mills K, Cakouros D, Bergmann A, Kumar S. UTX coordinates steroid hormone-mediated autophagy and cell death. *Nat Commun.* 2013 4:2916.
- Denton D, Chang TK, Nicolson S, Shrivage B, Simin R, Baehrecke EH, Kumar S. Relationship between growth arrest and autophagy in midgut programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 2012 Aug;19(8):1299-307.
- Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* 2019 Mar;26(4):605-616.
- Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol.* 2009 Nov 3;19(20):1741-6.
- Denton D, Xu T, Dayan S, Nicolson S, Kumar S. Dpp regulates autophagy-dependent midgut removal and signals to block ecdysone production. *Cell Death Differ.* 2019 Mar;26(4):763-778.
- DeVorkin L, Gorski SM. LysoTracker staining to aid in monitoring autophagy in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Sep 2;2014(9):951-8.
- Djabrayan NJ, Casanova J. Snoo and Dpp act as spatial and temporal regulators respectively of adult progenitor cells in the *Drosophila* trachea. *PLoS Genet.* 2016 Mar 4;12(3):e1005909.
- Djabrayan NJ, Cruz J, de Miguel C, Franch-Marro X, Casanova J. Specification of differentiated adult progenitors via inhibition of endocycle entry in the *Drosophila* trachea. *Cell Rep.* 2014; 9(3):859–65.
- Erdi B, Nagy P, Zvara A, Varga A, Piracs K, Ménesi D, Puskás LG, Juhász G. Loss of the starvation-induced gene *Rack1* leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy.* 2012 Jul 1;8(7):1124-35.
- Eskelinen E-L, Prescott AR, Cooper J, Brachmann SM, Wang L, Tang X, et al. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic* (2002) 3:878–93.
- Faisal MN, Hoffmann J, El-Kholy S, Kallsen K, Wagner C, Bruchhaus I, Fink C, Roeder T. Transcriptional regionalization of the fruit fly's airway epithelium. *PLoS One.* 2014 Jul 14;9(7):e102534.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 2014 Jan;24(1):24-41.
- Fraire-Zamora JJ, Tosi S, Solon J, Casanova J. Control of hormone-driven organ disassembly by ECM remodeling and Yorkie-dependent apoptosis. *Curr Biol.* 2021 Dec 6;31(23):5261-5273.e4.

- Francis D, Ghabrial AS. Compensatory branching morphogenesis of stalk cells in the *Drosophila* trachea. *Development*. 2015 Jun 1;142(11):2048-57.
- Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, Xie K, Deng XJ, Li JP, Li QR, Yang WY, Zeng WN, Casartelli M, Deng HM, Cappellosza S, Grimaldi A, Xia Q, Feng Q, Cao Y, Tettamanti G. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*. 2012 Mar;17(3):305-24.
- Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, Shen Y, Rameh L, Yankner B, Tsai LH, Yuan J. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol Cell*. 2010 May 28;38(4):500-11.
- García-Prat L, Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Proteostatic and Metabolic Control of Stemness. *Cell Stem Cell*. 2017 May 4;20(5):593-608.
- Giannios P, Casanova J. Systemic and local effect of the *Drosophila* headcase gene and its role in stress protection of Adult Progenitor Cells. *PLoS Genet*. 2021 Feb 8;17(2):e1009362.
- Gonzalez-Roca E, Garcia-Albéniz X, Rodriguez-Mulero S, Gomis RR, Kornacker K, Auer H. Accurate expression profiling of very small cell populations. *PLoS One*. 2010 Dec 28;5(12):e14418.
- Guha A, Kornberg TB. Tracheal branch repopulation precedes induction of the *Drosophila* dorsal air sac primordium. *Dev Biol*. 2005 Nov 1;287(1):192-200.
- Guha A, Lin L, Kornberg TB. Organ renewal and cell divisions by differentiated cells in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 5;105(31):10832-6.
- Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JM, Karantza V, Collier HA, Dipaola RS, Gelinias C, Rabinowitz JD, White E. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2011 Mar 1;25(5):460-70.
- Harnish, J.M.; Link,N.; Yamamoto, S. *Drosophila* as a Model for Infectious Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 2724.
- Hay BA, Wolff T, Rubin GM. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development*. 1994 Aug;120(8):2121-9.
- Hayashi S, Kondo T. Development and Function of the *Drosophila* Tracheal System. *Genetics*. 2018 Jun;209(2):367-380.
- Heber S, Sick B. Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. *OMICS*. 2006 Fall;10(3):358-68.

- Hegedűs K, Takáts S, Boda A, Jipa A, Nagy P, Varga K, Kovács AL, Juhász G. The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Mol Biol Cell*. 2016 Oct 15;27(20):3132-3142.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2009 Apr;20(7):1981-91.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000 Nov 23;408(6811):488-92.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003 Apr;4(2):249-64.
- Jennings, B. H. '*Drosophila*-a versatile model in biology & medicine', *Materials Today*, 2011, 14(5), pp. 190–195.
- Jiang C, Baehrecke EH, Thummel CS. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development*. 1997 Nov;124(22):4673-83.
- Kaiser WJ, Vucic D, Miller LK. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis DIAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE. *FEBS Lett*. 1998 Nov 27;440(1-2):243-8.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*. 2000 Sep 18;150(6):1507-13.
- Kametaka S, Okano T, Ohsumi M, Ohsumi Y. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998 Aug 28;273(35):22284-91.
- Karim FD, Guild GM, Thummel CS. The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development*. 1993 Jul;118(3):977-88.
- Katheder NS, Khezri R, O'Farrell F, Schultz SW, Jain A, Rahman MM, Schink KO, Theodossiou TA, Johansen T, Juhász G, Bilder D, Brech A, Stenmark H, Rusten TE. Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature*. 2017 Jan 19;541(7637):417-420.
- Kim J, Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69:303-42.

- Kinch G, Hoffman KL, Rodrigues EM, Zee MC, Weeks JC. Steroid-triggered programmed cell death of a motoneuron is autophagic and involves structural changes in mitochondria. *J Comp Neurol*. 2003 Mar 17;457(4):384-403.
- Klapper R. The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech Dev*. 2000 Jul;95(1-2):47-54.
- Klionsky, Abdalla, Abeliovich, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445-544.
- Klionsky, D.J.; Cregg, J.M.; Dunn, W.A., Jr.; Emr, S.D.; Sakai, Y.; Sandoval, I.V.; Sibirny, A.; Subramani, S.; Thumm, M.; Veenhuis, M.; et al. Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Dev. Cell* 2003, 5, 539–545.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006 Jun 15;441(7095):880-4.
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol*. 2000 Dec;3(6):488-92.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):280-93.
- Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):32-43.
- Lee G, Park JH. Programmed cell death reshapes the central nervous system during metamorphosis in insects. *Curr Opin Insect Sci*. 2021 Feb;43:39-45.
- Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev*. 2009 Nov 1;23(21):2461-77.
- Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*. 2019 Jan 10;176(1-2):11-42.
- Li Y, Dong P, Yang Y, Guo T, Zhao Q, Miao D, Li H, Lu T, Xia F, Lyu J, Ma J, Kornberg TB, Zhang Q, Huang H. Metabolic control of progenitor cell propagation during *Drosophila* tracheal remodeling. *Nat Commun*. 2022 May 20;13(1):2817.
- Liu H, Jia Q, Tettamanti G, Li S. Balancing crosstalk between 20-hydroxyecdysone-induced autophagy and caspase activity in the fat body during *Drosophila* larval-prepupal transition. *Insect Biochem Mol Biol*. 2013 Nov;43(11):1068-78.
- Loganathan, R., Cheng, Y. L. and Andrew, D. J. Organogenesis of the *Drosophila* respiratory system', *Organogenetic Gene Networks*, 2016 pp. 151–211.
- Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jun;6(6):439-48.

- Malta J, Heerman M, Weng JL, Fernandes KM, Martins GF, Ramalho-Ortigão M. Midgut morphological changes and autophagy during metamorphosis in sand flies. *Cell Tissue Res.* 2017 Jun;368(3):513-529. doi: 10.1007/s00441-017-2586-z. Epub 2017 Mar 11. PMID: 28285352.
- Manning, G. and Krasnow, M. A. 'Development of the *Drosophila* tracheal system', in Bate, M. and Arias, M. (eds) *The Development of Drosophila melanogaster*. 1993 Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 609–686.
- Martin DN, Baehrecke EH. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development.* 2004 Jan;131(2):275-84.
- Miron M, Verdú J, Lachance PE, Birnbaum MJ, Lasko PF, Sonenberg N. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 2001 Jun;3(6):596-601.
- Montali A, Romanelli D, Cappellozza S, Grimaldi A, de Eguileor M, Tettamanti G. Timing of autophagy and apoptosis during posterior silk gland degeneration in *Bombyx mori*. *Arthropod Struct Dev.* 2017 Jul;46(4):518-528.
- Morgan DO. 2007. *The cell cycle: Principles of control*. New Science Press, London.
- Nagy P, Sándor GO, Juhász G. Autophagy maintains stem cells and intestinal homeostasis in *Drosophila*. *Sci Rep.* 2018 Mar 15;8(1):4644.
- Nezis IP, Shrivage BV, Sagona AP, Lamark T, Bjørkøy G, Johansen T, Rusten TE, Brech A, Baehrecke EH, Stenmark H. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J Cell Biol.* 2010 Aug 23;190(4):523-31.
- Nezis IP, Simonsen A, Sagona AP, Finley K, Gaumer S, Contamine D, Rusten TE, Stenmark H, Brech A. Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J Cell Biol* 2008; 180:1065-71.
- Nicolson S, Denton D, Kumar S. Ecdysone-mediated programmed cell death in *Drosophila*. *Int J Dev Biol.* 2015;59(1-3):23-32.
- Pankiv, T. H. Clausen, T. Lamark et al.. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, no. 33, pp. 24131–24145.
- Parkes TL, Hilliker AJ, Phillips JP. Genetic and biochemical analysis of glutathione-S-transferase in the oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*. *Genome.* 1993 Dec;36(6):1007-14.

- Pfeifer U. Inhibition by insulin of the formation of autophagic vacuoles in rat liver. A morphometric approach to the kinetics of intracellular degradation by autophagy. *J Cell Biol.* 1978 Jul;78(1):152-67.
- Pircs, P. Nagy, A. Varga et al., “Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*,” *PLoS ONE*, 2012. vol. 7, no. 8, Article ID e44214.
- Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov JP. GenePattern 2.0. *Nat Genet.* 2006 May;38(5):500-1.
- Robertson, C.W. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. *J. Morphol.* 1936, 59, 351–399.
- Rodolfo, C., Di Bartolomeo, S. & Cecconi, F. Autophagy in stem and progenitor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016 73, 475–496
- Rzezniczak TZ, Douglas LA, Watterson JH, Merritt TJ. Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. *Anal Biochem.* 2011 Dec 15;419(2):345-7.
- Samakovlis C, Manning G, Steneberg P, Hacoheh N, Cantera R, Krasnow MA. Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development.* 1996 Nov;122(11):3531-6.
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science.* 2008 Jun 13;320(5882):1496-501.
- Santos DE, Azevedo DO, Campos LA, Zanuncio JC, Serrão JE. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma.* 2015 Mar;252(2):619-27.
- Sato M, Kitada Y, Tabata T. Larval cells become imaginal cells under the control of homothorax prior to metamorphosis in the *Drosophila* tracheal system. *Dev Biol.* 2008 Jun 15;318(2):247-57.
- Sato M, Kornberg TB. FGF is an essential mitogen and chemoattractant for the air sacs of the *drosophila* tracheal system. *Dev Cell.* 2002 Aug;3(2):195-207.
- Schaeffer V, Althausen C, Shcherbata HR, Deng WM, Ruohola-Baker H. Notch-dependent Fizzy-related/Hec1/Cdh1 expression is required for the mitotic-to-endocycle transition in *Drosophila* follicle cells. *Curr Biol.* 2004 Apr 6;14(7):630-6.

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676-82.
- Scholl,A.;Ndoja,I.;Jiang, L. *Drosophila* Trachea as a Novel Model of COPD. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22,12730.
- Schwartz LM. Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. *Cell Death Differ*. 2008 Jul;15(7):1163-9.
- Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7772-7.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*. 2007 Jan 9;17(1):1-11.
- Scott, R.C.; Schuldiner, O.; Neufeld, T.P. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell* 2004, 7, 167–178.
- Shim J, Gururaja-Rao S, Banerjee U. Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development*. 2013 Dec;140(23):4647-56.
- Siegrist SE, Haque NS, Chen CH, Hay BA, Hariharan IK. Inactivation of both Foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2010 Apr 13;20(7):643-8.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50.
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*. 2007 Feb;12(2):209-18.
- T. Noda, Y. Ohsumi, Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast, *J. Biol. Chem*. 1998 273 (7) 3963–3966.
- Thomas G, Hall MN. TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Dec;9(6):782-7.
- Tsukada, M.; Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1993, 333, 169–174.

- Vijendravarma RK, Narasimha S, Kawecki TJ. Predatory cannibalism in *Drosophila melanogaster* larvae. *Nat Commun.* 2013;4:1789.
- Waguri S, Komatsu M, Chapter 9 Biochemical and Morphological. Detection of Inclusion Bodies in Autophagy-Deficient Mice, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 453, 2009, 181-196,
- Wang SL, Hawkins CJ, Yoo SJ, Müller HA, Hay BA. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell.* 1999 Aug 20;98(4):453-63.
- Weaver M, Krasnow MA. Dual origin of tissue-specific progenitor cells in *Drosophila* tracheal remodeling. *Science.* 2008; 321(5895):1496–9.
- Weaver TA, White RA. headcase, an imaginal specific gene required for adult morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development.* 1995 Dec;121(12):4149-60.
- Whitten, J. The post-embryonic development of the tracheal system in *Drosophila melanogaster* (ed. T. Wright). New York: Academic Press. 1980
- Wigglesworth, V. B. *The Principles of Insect Physiology.* 1972
- Williams DW, Truman JW. Remodeling dendrites during insect metamorphosis. *J Neurobiol.* 2005 Jul;64(1):24-33.
- Wu MY, Cully M, Andersen D, Leever SJ. Insulin delays the progression of *Drosophila* cells through G2/M by activating the dTOR/dRaptor complex. *EMBO J.* 2007 Jan 24;26(2):371-9.
- Yoo SJ, Huh JR, Muro I, Yu H, Wang L, Wang SL, Feldman RM, Clem RJ, Müller HA, Hay BA. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol.* 2002 Jun;4(6):416-24.
- Zacarin EC. Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Autophagy.* 2007 Sep-Oct;3(5):516-8.
- Zhang, H., Stallock, J.P., Ng, J.C., Reinhard, C., and Neufeld, T.P. (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.* 14, 2712–2724.
- Zirin J, Cheng D, Dhanyasi N, Cho J, Dura JM, Vijayraghavan K, Perrimon N. Ecdysone signaling at metamorphosis triggers apoptosis of *Drosophila* abdominal muscles. *Dev Biol.* 2013 Nov 15;383(2):275-84.





## **Anexos**



## **Anexos**

### **Anexo 1: Lista de abreviaturas**

Aa: aminoácidos

apf: *after pupal formation* (después de la formación de la pupa)

Atg: *Autophagy related proteins* (proteínas relacionadas con autofagia)

*btl*: *breathless* (gen)

DAPs: *Differentiated Adult Progenitors* (Progenitores Adultos Diferenciados)

dp62: *Drosophila* p62

DT: *Dorsal Trunk* (Tronco Dorsal)

FC: *Fold Change*

Fig.: Figura

GFP: *Green Fluorescent protein* (Proteína verde fluorescente)

L2: Segundo estadio de larva

L3: Tercer estadio de larva

NE: Nutrición estándar

RN: Restricción nutricional

SB: *Espiracular Branch* (Ramas espiraculares)

SG: *Salivary Gland* (Glándulas salivares)

TC: *Transverse Connective* (Rama transversal)

Tr2-Tr9: Segmentos traqueales/Metámeros 2 a 9

*trh*: *tracheless* (gen)

WT: *Wild Type* (Fenotipo salvaje)

## Anexo 2: Macros creadas para Fiji

### 2.1.- Cuantificación de DAPI (para contenido de DNA por núcleo)

```
////////////////////////////////////  
// Name:      DAPI meassuring  
// Author:    Bea Pino  
// Date:      10/11/2021  
// Version:   1.0  
//  
// Usage: Open image stack, run macro, follow instructions  
////////////////////////////////////  
run("Z Project...", "projection=[Sum Slices]");  
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");  
waitForUser("Draw region");  
run("Measure");  
waitForUser("Draw region");  
run("Measure");  
waitForUser("Draw region");  
run("Measure");  
waitForUser("Draw region");  
run("Measure");
```

### 2.2.- Cuantificación de fondo (para eliminar fondo de núcleos)

```
////////////////////////////////////  
// Name:      Background meassuring  
// Author:    Bea Pino  
// Date:      12/11/2021  
// Version:   1.0  
//  
// Usage: Open image stack, run macro, follow instructions  
////////////////////////////////////  
run("Z Project...", "projection=[Sum Slices]");  
run("Enhance Contrast", "saturated=1");  
makeOval(391, 459, 69, 56);  
waitForUser("Specify...");  
run("Measure");  
waitForUser("makeOval...");  
run("Measure");  
waitForUser("makeOval...");  
run("Measure");  
waitForUser("makeOval...");  
run("Measure");  
waitForUser("makeOval...");  
run("Measure");
```

### 2.3.- Cuantificación de dp62

```
////////////////////////////////////  
// Name:      Intensity meassuring  
// Author:    Bea Pino  
// Date:      12/11/2021  
// Version:   1.0  
//  
// Usage: Open image stack, run macro, follow instructions  
////////////////////////////////////  
run("Z Project...", "projection=[Sum Slices]");  
setSlice(3);  
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");  
waitForUser("Draw region");  
run("Measure");
```

### 2.4.- Cuantificación de puntos de Atg8

```
////////////////////////////////////  
// Name:      Spots quantification  
// Author:    Sebastien Tosi  
// Date:      Nov/2021  
// Version:   2.0  
// Usage: Open image stack, run macro, follow instructions  
////////////////////////////////////  
if(isOpen("ROI Manager"))  
{  
    selectWindow("ROI Manager");  
    run("Close");  
}  
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");  
setSlice(2);  
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");  
waitForUser("Draw region");  
getStatistics(area);  
roiManager("Add");  
roiManager("Show All without labels");  
roiManager("Select", 0);  
run("Find Maxima...");  
Roi.getCoordinates(xpoints, ypoints);  
NCounts = lengthOf(xpoints);  
print(getTitle());  
print("Number of dots: "+d2s(NCounts,0)+" in "+d2s(area,1)+"um^2 (Density:  
"+d2s(NCounts/area,6)+"/um^2)");
```

## Anexo 3: RNA ISOLATION & cDNA AMPLIFICATION REPORT (de *Functional Genomics* IRB Facility)

### Samples

Sample ID	Sample Name
206 2018	2.1
207 2018	6.1
208 2018	2.2
209 2018	6.2
210 2018	2.3
211 2018	6.3
212 2018	2.4
213 2018	6.4
214 2018	2.5
215 2018	6.5
216 2018	2.6
217 2018	6.6
218 2018	2.7
219 2018	6.7
220 2018	2.8
221 2018	6.8

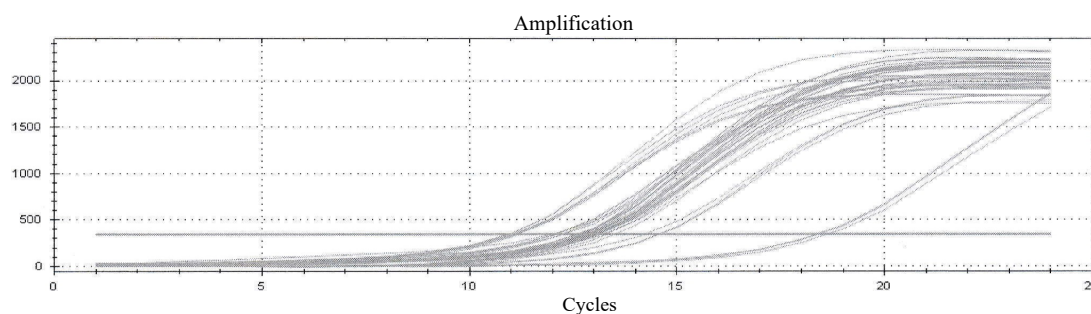
### Processing

RNA was isolated from one piece trachea portion using magnetic beads.

RNA integrity was checked using Bioanalyzer picoassay, and post analysis, decided to proceed with 12 samples.

For cDNA synthesis was used approximately from 1-3 ng RNA, library preparation and amplification were performed as described by Gonzalez *et al.*, 2010. The cDNA generated by reverse transcription from each sample is added to an amplification mix and the cDNA:mix is divided in 3 equivalent parts for PCR amplification. A sample without RNA, sample 0, has been included in the amplification experiment.

Amplification was performed for 25 cycles.



Threshold setting: 345.05	C(t) mean
206 2018	11.07
207 2018	12.13
208 2018	11.04
209 2018	14.45
210 2018	12.63
211 2018	12.63
212 2018	12.68
213 2018	13.10
214 2018	13.22
215 2018	13.01
218 2018	12.92
219 2018	12.74
Zero	18.46

Subsequently, cDNA was purified on PureLink Quick PCR Purification Kit (Invitrogen) and eluted in 40 ul. cDNA concentration was determined using the Nanodrop 1000 spectrophotometer.

#### **Yield after amplification**

<b>Sample ID</b>	<b>Sample name</b>	<b>cDNA Concentration (ng/ul)</b>	<b>cDNA yield (ug) in 34 ul</b>
206 2018	2.1	325.62	11.1
207 2018	6.1	302.29	10.3
208 2018	2.2	314.82	10.7
209 2018	6.2	221.88	7.5
210 2018	2.3	275.23	9.4
211 2018	6.3	261.86	8.9
212 2018	2.4	275.05	9.4
213 2018	6.4	281.75	9.6
214 2018	2.5	265.28	9.0
215 2018	6.5	269.29	9.2
218 2018	2.7	258.62	8.8
219 2018	6.7	288.16	9.8
Zero	Zero	41.26	1.4



## **Anexo 4: Protocolo de extracción de RNA de larvas (Thomas Whitenant)**

### **Tissue Harvest**

\*\*Whatever the method of storage when harvesting, it is CRUCIAL that the tissue be stored immediately following sacrifice and extraction!!

Snap Freezing in Liquid Nitrogen:

- 1) Following immersion, keep the tissue in the Nitrogen until the procedure is completed.
- 2) Upon completion of the harvest procedure, transfer the tissues to empty falcon tubes stored on dry ice.
- 3) Keep the tissue frozen until the homogenization procedure is ready to be performed.

Immersion in RNA Later:

- 1) Upon extraction from the animal, immediately slice the tissue into pieces no wider than 0.5cm and drop into RNA Later. (The volume of RNA Later should be at least ten times the volume of tissue)
- 2) Store the tissue (until homogenization) according to the following: Initially - overnight at 2-8 C, Then – indefinitely < -20 C, up to four weeks at 2-8 C, up to 7 days at 2-8 C, up to 1 day at 37 C.

\*For cultures of cells, pellet out of growth media, wash 3 X PBS, and resuspend in RNA

Later. (Do Not Freeze!)

### **Homogenization**

- 1) For tissues that are snap frozen or slightly in excess, the homogenization of the tissue should be done by mortar and pestle (cooled to temp in a liquid nitrogen bath).
- 2) At the same time, transfer at least 1mL TRIZOL / 100mg tissue to be homogenized into a falcon tube.
- 3) Transfer the tissue to the pestle and grind until a layer of very fine dust is all that is left.
- 4) Use an RNase free spatula to transfer the dust to the TRIZOL solution. Be sure to get as much dust as possible.
- 5) Vortex mixture thoroughly.

\*For tissues that are very small or highly precious, a hand-held tissue grinder is recommended. The homogenization is performed in the presence of the 1mL TRIZOL /

100mg tissue until the tissue is completely dissolved in solution.

\*For cultures of cells (suspended in solution), quantify, pellet the cells, and resuspend in TRIZOL at a volume of  $5 \times 10^6$  cells / 1mL TRIZOL.

6) Once homogenized, aliquot the solution to eppendorf tubes and leave in TRIZOL at room temp for five minutes.

### **Phase Separation**

7) Add 200ul chloroform / 1mL TRIZOL (originally used), vortex for 15 seconds, and leave at room temp for 2-3 minutes.

8) Centrifuge samples at 12,000g for 15 minutes at 2-8 C.

### **RNA Precipitation**

9) Following centrifugation, there will be three phases visible within the tube. Transfer the aqueous phase (top) to a fresh tube, being careful not to contaminate the solution with the other phases. Contamination will be obvious by the presence of any flakes or unclear liquid.

10) Add 500ul isopropanol / 1mL TRIZOL (originally used) to the new tube and incubate at room temp for 10 minutes.

11) Centrifuge samples at 12,000g for 10 minutes at 2-8 C. RNA Wash and Resuspension

12) Following centrifugation, remove the supernatant.

13) Wash RNA pellet with 80% EtOH / 1ml TRIZOL (originally used) and vortex.

14) Centrifuge samples at 7,500g for 5 minutes at 2-8 C.

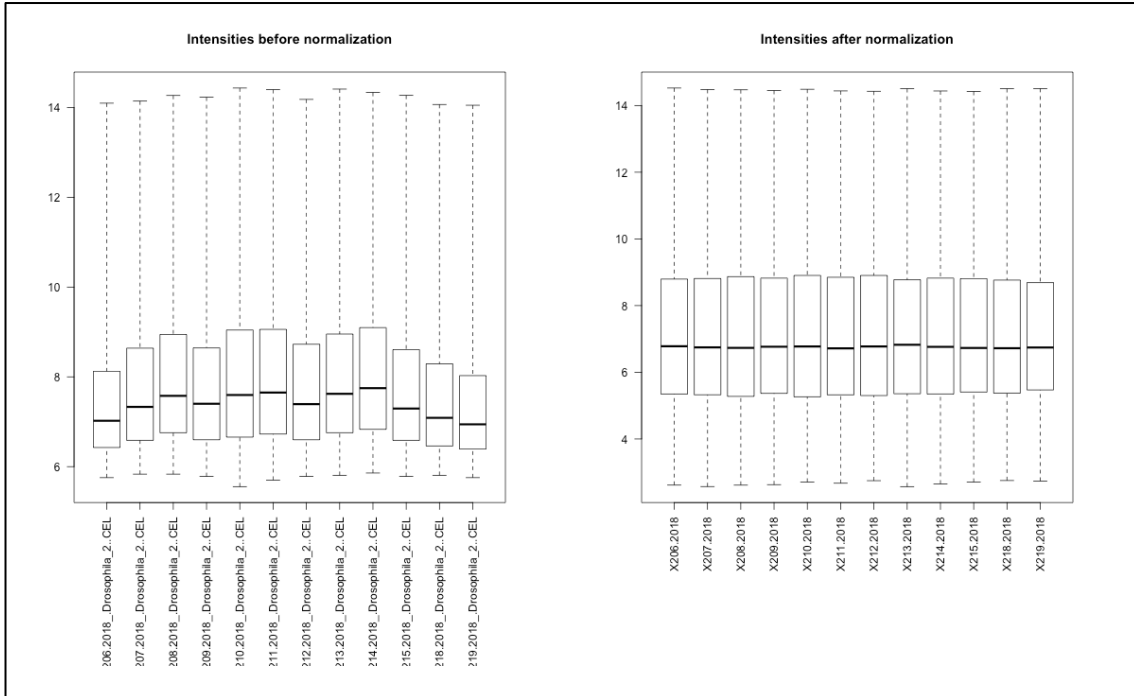
15) Remove supernatant. Allow remaining EtOH to air dry for 2-3 minutes.

16) Transfer tubes to 70 C heat block and let sit for 2-3 minutes.

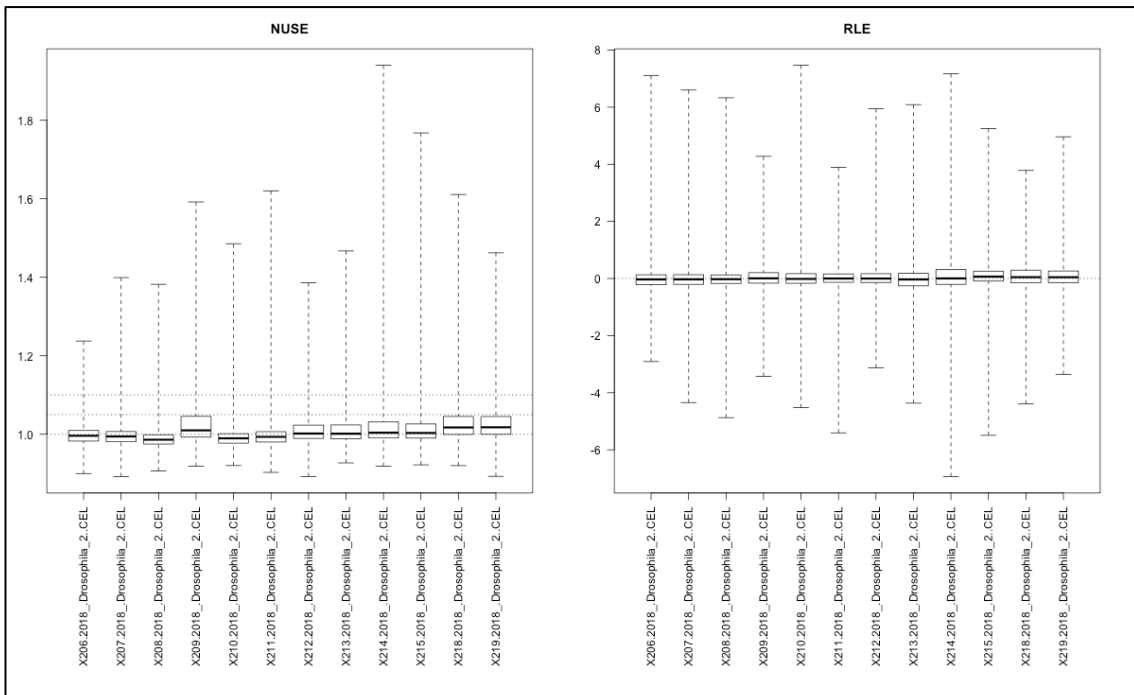
17) Redissolve the pellet in 81ul of DEPC water.

# Anexo 5: Preprocesamiento bioinformático de muestras de Arrays

## 5.1.- Intensidades entre muestras antes y después de la normalización



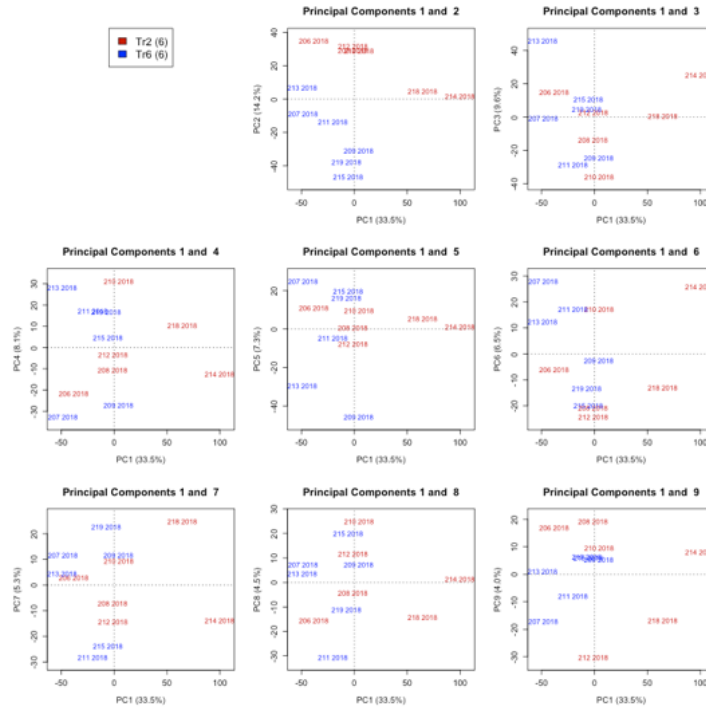
## 5.2.- NUSE Y RLE



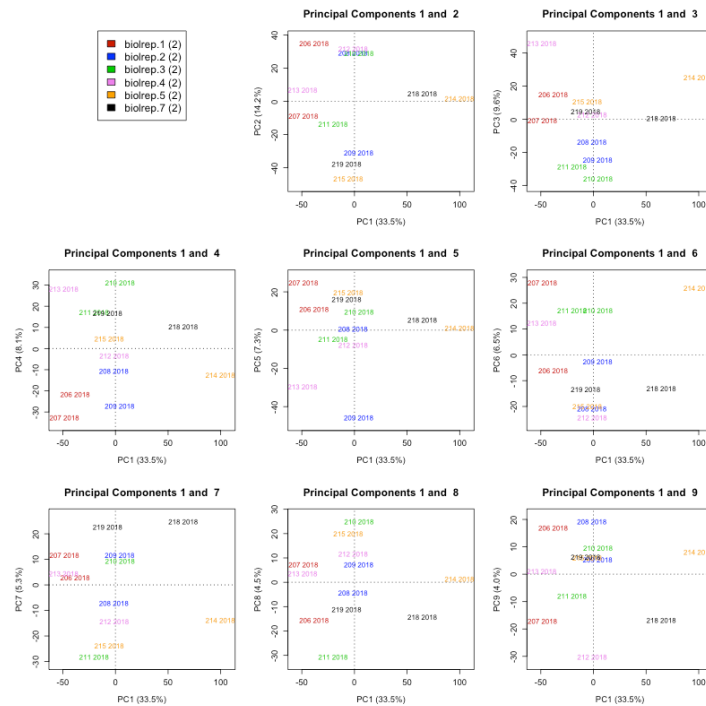
### 5.3.- Análisis de Componentes Principales

#### 5.3.1.- Componentes Principales preajuste

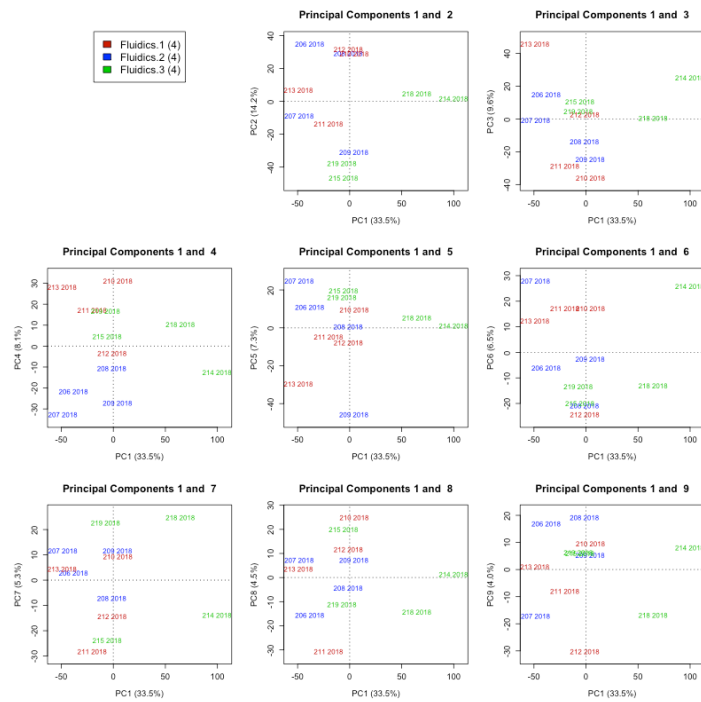
5.3.1.1.- Análisis de Componentes Principales por grupo: Tr2 (DAPs) – Tr6 (Células no progenitoras)



5.3.1.2.- Análisis de componentes principales por larva: réplicas biológicas

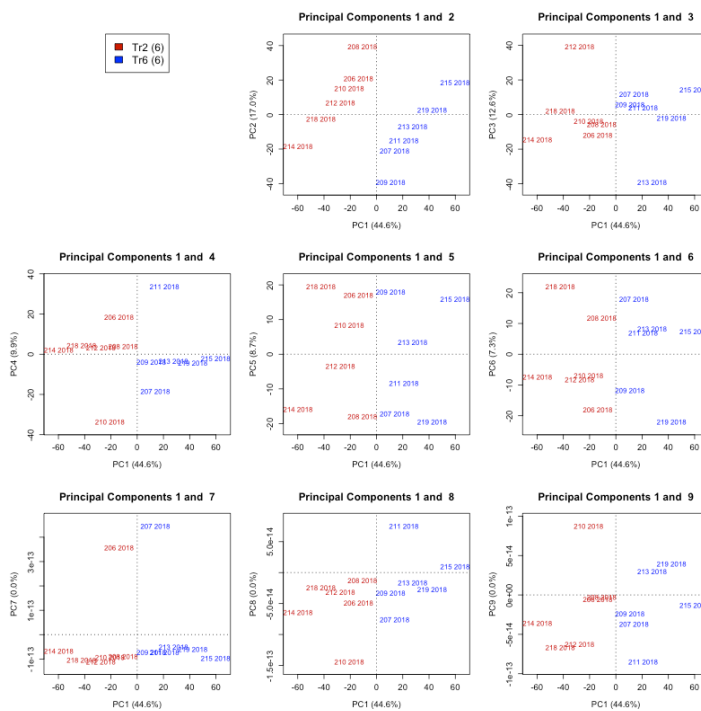


### 5.3.1.3.- Análisis de componentes principales por set de análisis

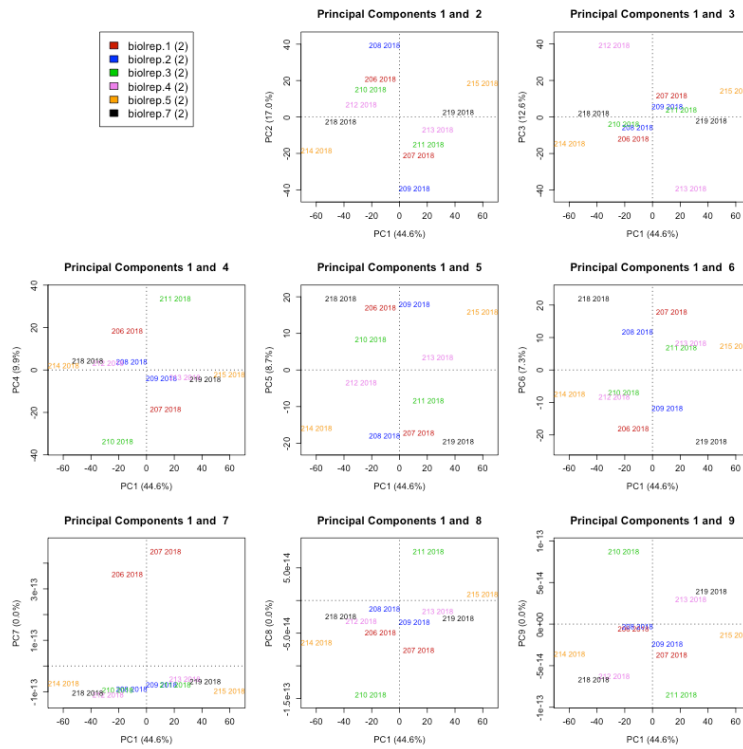


### 5.3.2.- Componentes Principales ajustados a las réplicas biológicas

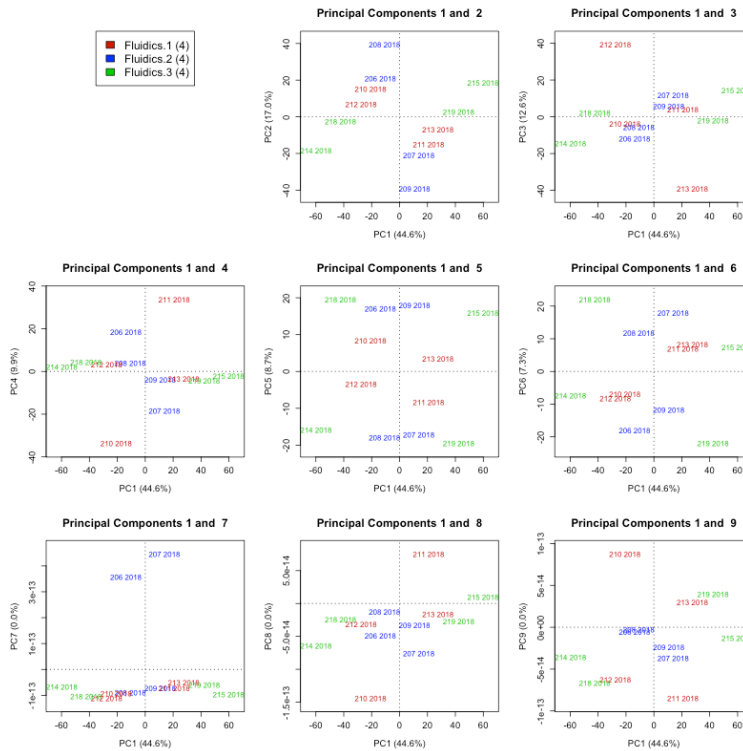
5.3.2.1.- Análisis de Componentes Principales por grupo: Tr2 (DAPs) – Tr6 (Células no progenitoras)



### 5.3.2.2.- Análisis de componentes principales por larva: réplicas biológicas



### 5.3.2.3.- Análisis de componentes principales por set de análisis



Anexo 6: *Probesets* diferencialmente expresados entre los grupos Tr2 y Tr6

Gene symbol	Entrez Gene	Gene title	Chromosomal location	Global mean	Global SD	Tr2 mean	Tr6 mean	Tr2-Tr6 FC	Tr6-Tr2 Pvalue	Tr6-Tr2 FDR
Cpr97Eb	43259	Cuticular protein 97Eb	chr97E2-97E2	9.348	2.741	11,85	6,84	-32,2	8,16E-02	0,00661422
Cpr97Ea	43258	Cuticular protein 97Ea	chr97E1-97E2	7.853	2.512	10,21	5,49	-26,37	1,01E-03	0,00096137
Fili	5740472	Fish-lips	chr58A3-58A4	8.643	2.438	10,89	6,39	-22,69	5,11E-03	0,00172571
Fili	5740472	Fish-lips	chr58A3-58A4	10.692	2.142	12,62	8,77	-14,38	1,87E-01	0,00824811
CG33993 /DwilCG33993	3885637	CG33993 gene product from transcript CG33993-RA	chr65A1-65A1	10.085	2.055	11,97	8,2	-13,63	7,75E-03	0,00197327
CG10280	40740	CG10280 gene product from transcript CG10280-RA	chr83D2-83D2	8.292	2.122	10,12	6,47	-12,59	2,06E-01	0,00866767
CG8630	41629	CG8630 gene product from transcript CG8630-RA	chr87E3-87E4	8.690	1.984	10,5	6,88	-12,22	3,50E-02	0,00349244
Osi9	40763	Osi9	chr83E2-83E2	8.244	2.028	10,04	6,45	-12,1	2,06E-02	0,00260151
Cpr64Ad	38511	Cuticular protein 64Ad	chr64A10-64A10	10.802	1.968	12,58	9,03	-11,69	1,34E-02	0,00253849
CG8927	41964	CG8927 gene product from transcript CG8927-RB	chr89B6-89B7	10.117	2.038	11,89	8,34	-11,68	1,07E-01	0,00750557
nyo	43716	nyobe	chr100C4-100C6	6.566	1.828	8,2	4,94	-9,57	1,79E-02	0,00254368
CG14566	40421	CG14566 gene product from transcript CG14566-RB	chr78E6-78E6	11.340	1.759	12,96	9,72	-9,46	8,33E-03	0,00197327
Cpr47Ec	36191	Cuticular protein 47Ec	chr47E3-47E3	9.182	1.794	10,79	7,58	-9,28	1,21E-01	0,00750557
CycA	39340	Cyclin A	chr68E1-68E1	9.775	1.747	11,38	8,17	-9,22	2,33E-02	0,00276305
CG15497 / Fer1	42552 / 2768661	CG15497 gene product from transcript CG15497-RA / 48 related 1	chr84C5-84C6 / chr93F2-93F2	6.522	1.799	8,08	4,96	-8,67	2,45E-01	0,00972898
drd	318102	drop dead	chr13A12-13B	9.658	1.730	11,12	8,2	-7,56	6,81E-01	0,01573096
Cdk1	34411	Cyclin-dependent kinase 1	chr31D11-31D11	9.201	1.503	10,55	7,86	-6,46	1,36E-01	0,00750557
Cks30A	34250	Cyclin-dependent kinase subunit 30A	chr30A8-30A8  2-32 cM	7.062	1.590	8,37	5,75	-6,15	4,66E-01	0,01310058
CG3823	31573	CG3823 gene product from transcript CG3823-RA	chr5E7-5E8	7.733	1.556	9,01	6,46	-5,85	3,99E-01	0,0119903
CG33993 /DwilCG33993	3885637	CG33993 gene product from transcript CG33993-RA	chr65A1-65A1	7.249	1.459	8,51	5,99	-5,74	5,80E-01	0,01409312
pav	38515	pavarotti	chr64A10-64A11	8.378	1.413	9,6	7,15	-5,45	1,54E-01	0,00750557
polo	40232	CG12306 gene product from transcript CG12306-RA	chr77B2-77B3  3-46 cM	6.443	1.397	7,64	5,24	-5,28	1,16E-01	0,00750557
sip2	33979	septin interacting protein 2	chr27C7-27C7	7.816	1.363	9,02	6,62	-5,28	5,17E-01	0,01341986
shu	45360	shutdown	chr60A3-60A3  2-105 cM	6.838	1.360	8,04	5,64	-5,26	3,17E-01	0,01113114
tum	36538	tumbleweed	chr49C-50C6	8.403	1.313	9,59	7,22	-5,18	1,46E-01	0,00750557
pch2	41013	CG31453 gene product from transcript CG31453-RB	chr85A3-85A3	8.723	1.255	9,79	7,66	-4,38	3,94E-01	0,0119903
Nnf1a	37325	CG13434 gene product from transcript CG13434-RA	chr57A6-57A6	8.593	1.218	9,66	7,53	-4,36	1,18E-01	0,00750557
Klp61F	38135	Kinesin-like protein at 61F	chr61F4-61F4	7.960	1.167	9	6,92	-4,21	1,91E-01	0,00824811
Pen	34338	Pendulin	chr31A1-31A2	10.381	1.177	11,42	9,35	-4,2	6,72E-02	0,00606199
CG13042	39798	CG13042 gene product from transcript CG13042-RA	chr72E1-72E1	8.266	1.140	9,3	7,24	-4,18	1,51E-01	0,00750557
CG9990	43391	CG9990 gene product from transcript CG9990-RA	chr98E1-98E2	9.797	1.249	10,82	8,78	-4,11	5,93E-01	0,01422194
mud	44839	mushroom body defect	chr12E5-12E6  1-50 cM	7.029	1.070	7,97	6,09	-3,68	5,40E-02	0,00511319
sti	39429	sticky	chr69C4-69C4  3-36,8 cM	5.899	1.060	6,84	4,96	-3,68	4,23E-01	0,0123208
CG7675	42211	CG7675 gene product from transcript CG7675-RC	chr91A4-91A4	10.550	1.120	11,48	9,62	-3,63	1,42E-01	0,00750557
nesd	35298	nessun dorma	chr38B6-38B6	8.752	1.011	9,66	7,85	-3,51	1,74E-01	0,00806109
cmct	53561	CENP-meta	chr32E2-32E2	6.580	0,995	7,42	5,74	-3,2	4,19E-01	0,0123208
sano	37185	serrano	chr55F8-56A1	9.340	1.059	10,17	8,51	-3,17	4,60E-01	0,01310058
fzy	34968	fizzy	chr35F1-35F1  2-51 cM	8.191	0,938	9,02	7,36	-3,16	4,77E-01	0,01310058
CG42342	7354466	CG42342 gene product from transcript CG42342-RH	chr89B20-89B20	9.042	1.029	9,84	8,24	-3,04	1,58E-01	0,00750557

Gene symbol	Entrez Gene	Gene title	Chromosomal location	Global mean	Global SD	Tr2 mean	Tr6 mean	Tr2-Tr6 FC	Tr6-Tr2 Pvalue	Tr6-Tr2 FDR
fru	42226	fruitless	chr91A6-91B3	9.404	0.981	10,09	8,71	-2,6	1,91E-01	0,00824811
CG8173	32753	CG8173 gene product from transcript CG8173-RA	chr16C1-16C1	7.271	0,751	7,91	6,63	-2,42	1,27E-01	0,00750557
plum	43197	CG6490 gene product from transcript CG6490-RD	chr97B4-97B9	7.140	0,718	7,76	6,52	-2,35	2,76E-01	0,0104467
hoip / pins	44173 / 53569	hoi-polloi /// partner of inscuteable	chr30C5-30C5 / chr98A8-98A8	10.781	0,801	11,37	10,2	-2,25	7,68E-02	0,00661422
CG8478	41194	CG8478 gene product from transcript CG8478-RB	chr85E7-85E8	7.426	0,694	7,96	6,89	-2,11	3,47E-01	0,01166994
CG32982	34237	CG32982 gene product from transcript CG32982-RF	chr30A2-30A2	8.509	0,602	9,02	8	-2,03	2,49E-01	0,00972898
hubl / spaw	246567 / 246568	hug-bell /// spacewatch	chr44C4-44C4	6.064	0,7	6,57	5,55	-2,03	6,34E-01	0,0148441
HP4	38887	Heterochromatin protein 4	chr66A21-66A21	9.919	0,59	10,42	9,42	-2,01	3,92E-01	0,0119903
Indy	40049	I'm not dead yet	chr75E1-75E2	8.893	0,609	8,36	9,43	2,11	5,69E-01	0,01401075
sgll	40925	sugarlethal	chr84E1-84E1	10.868	0,632	10,3	11,43	2,19	5,13E-01	0,01341986
snz	31704	snazarus	chr7C2-7C3	8.926	0,644	8,35	9,5	2,21	5,50E-01	0,01378013
chinmo	33343	Chronologically inappropriate morphogenesis	chr22A5-22B1	7.382	0,982	6,77	7,99	2,32	5,53E-01	0,01378013
Inos	35671	CG11143 gene product from transcript CG11143-RA	chr43C3-43C3	9.255	0,684	8,63	9,88	2,38	5,47E-01	0,01378013
CG7896	43552	CG7896 gene product from transcript CG7896-RA	chr99D1-99D1	10.401	0,778	9,74	11,06	2,51	2,13E-01	0,00879133
CG42788	41817	CG42788 gene product from transcript CG42788-RC	chr88E1-88E2	8.428	0,845	7,69	9,17	2,78	3,65E-01	0,01172727
Spn88Ea	49804	Serpin 88Ea	chr88E3-88E3	12.049	0,856	11,27	12,83	2,96	2,92E-01	0,01065303
CG4607 / DsimCG4607	31653	CG4607 gene product from transcript CG4607-RA	chr6F1-6F3	6.968	0,984	6,18	7,76	2,98	3,55E-01	0,01166994
PGRP-SA	32099	Peptidoglycan recognition protein SA	chr10C6-10C6	9.204	1.247	8,4	10,01	3,05	3,20E-02	0,00336567
CG8738	35855	CG8738 gene product from transcript CG8738-RA	chr44E2-44E2	8.597	1.116	7,78	9,42	3,12	2,52E-01	0,00972898
CG30463	246627	CG30463 gene product from transcript CG30463-RA	chr53D1-53D4	8.055	0,919	7,23	8,88	3,15	3,75E-01	0,01183573
CG42822	10178916	CG42822 gene product from transcript CG42822-RA	chr90A6-90A6	7.297	1.000	6,39	8,21	3,54	1,57E-01	0,00750557
pgant5	326151	polypeptide GalNAc transferase 5	chr25C4-25C6	10.281	1.041	9,36	11,2	3,57	1,53E-02	0,00254368
CG11779 / CG5835 / DpbpCG5835	42296	CG5835 gene product from transcript CG5835-RA	chr91F4-91F4	10.390	1.099	9,41	11,37	3,89	8,38E-02	0,00661422
CG10898	41384	CG10898 gene product from transcript CG10898-RA	chr86E10-86E10	9.253	1.153	8,25	10,26	4,03	4,77E-01	0,01310058
CG1394	32059	CG1394 gene product from transcript CG1394-RB	chr10A10-10A10	7.023	1.243	5,91	8,13	4,65	3,05E-01	0,01090054
CG15236	35595	CG15236 gene product from transcript CG15236-RA	chr42D4-42D6	7.054	1.262	5,91	8,2	4,91	4,59E-03	0,00172571
CR43097	12798019	ncRNA	chr38A7-38A7	7.753	1.541	6,45	9,05	6,06	6,90E-01	0,01573096
CG10481	35273	CG10481 gene product from transcript CG10481-RB	chr38A6-38A6	7.010	1.677	5,61	8,41	6,96	1,75E-02	0,00254368
CG10663	39421	CG10663 gene product from transcript CG10663-RD	chr69C2-69C2	9.824	1.687	8,26	11,39	8,73	1,88E-02	0,00254368
CngA	36806	Cyclic nucleotide-gated ion channel subunit A	chr53A2-53A2	9.423	1.717	7,81	11,04	9,35	1,10E-02	0,0023264
CG34120	318066	CG34120 gene product from transcript CG34120-RE	chr19F1-19F1	10.061	2.055	8,25	11,87	12,33	3,57E-01	0,01166994
CG34120	318066	CG34120 gene product from transcript CG34120-RE	chr19F1-19F1	10.232	2.075	8,41	12,06	12,52	3,51E-01	0,01166994
CG30427	37986	CG30427 gene product from transcript CG30427-RC	chr60E5-60E5	8.302	2.105	6,37	10,24	14,62	2,61E-03	0,00164602
CG14095	40112	CG14095 gene product from transcript CG14095-RA	chr76B3-76B3	10.169	2.304	8,09	12,25	17,93	2,64E-02	0,00294407
CG30427	37986	CG30427 gene product from transcript CG30427-RC	chr60E5-60E5	9.958	2.357	7,83	12,08	19,05	2,87E-01	0,01065303
CG5866	42097	CG5866 gene product from transcript CG5866-RB	chr90A6-90A6	7.845	2.326	5,72	9,97	19,08	1,50E-01	0,00750557
CngA	36806	Cyclic nucleotide-gated ion channel subunit A	chr53A2-53A2	9.971	2.435	7,66	12,28	24,62	3,42E-04	0,00064809
Acp1 / CG13796 / CG31904	34052 / 319016	Adult cuticle protein 1 / CG31904 gene product from transcript CG31904-RD	chr28C2-28C2	8.936	2.753	6,42	11,45	32,82	1,23E-01	0,00750557
CG30427	37986	CG30427 gene product from transcript CG30427-RC	chr60E5-60E5	7.164	3.377	3,98	10,35	82,42	5,46E-03	0,00172571



### Anexo 7: Tablas GSEA.

Se muestran las anotaciones para Tr2 (DAPs) y Tr6 (Células no progenitoras) con FDR<0,05, excepto para GO Biological processes, que se muestran sólo las anotaciones con FDR<0,01.

BROAD HALLMARKS Tr2	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
E2F TARGETS	154	-0,730	-3,078	0,000	0,000	0,000	1215
G2M CHECKPOINT	161	-0,700	-2,938	0,000	0,000	0,000	1226
MYC TARGETS V1	205	-0,620	-2,728	0,000	0,000	0,000	1724
MYC TARGETS V2	52	-0,660	-2,267	0,000	0,000	0,000	2820
MITOTIC SPINDLE	146	-0,510	-2,117	0,000	0,000	0,000	1510
DNA REPAIR	110	-0,520	-2,082	0,000	0,000	0,000	1979
WNT BETA CATENIN SIGNALING	27	-0,570	-1,742	0,009	0,004	0,044	2092
MTORC1 SIGNALING	169	-0,400	-1,702	0,000	0,006	0,071	1919
UNFOLDED PROTEIN RESPONSE	95	-0,430	-1,658	0,003	0,009	0,115	2194

BROAD HALLMARK Tr6	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
COAGULATION	110	0,411	1,836	0,000	0,004	0,005	1864
EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION	114	0,422	1,873	0,000	0,005	0,003	3571
KRAS SIGNALING UP	104	0,374	1,62	0,003	0,033	0,057	1003
BILE ACID METABOLISM	77	0,377	1,536	0,006	0,035	0,133	1793
ALLOGRAFT REJECTION	72	0,375	1,544	0,005	0,037	0,123	1492
INFLAMMATORY RESPONSE	90	0,359	1,551	0,003	0,042	0,118	3577
UV RESPONSE DN	106	0,341	1,497	0,012	0,047	0,192	1892
IL6 JAK STAT3 SIGNALING	26	0,484	1,568	0,025	0,048	0,109	1995

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0007051 SPINDLE ORGANIZATION	212	-0,636	-2,803	0,000	0,000	0,000	1502
GO0007052 MITOTIC SPINDLE ORGANIZATION	184	-0,653	-2,781	0,000	0,000	0,000	1809
GO0010564 REGULATION OF CELL CYCLE PROCESS	169	-0,657	-2,759	0,000	0,000	0,000	2292
GO0007067 MITOSIS	173	-0,636	-2,730	0,000	0,000	0,000	2255
GO0007346 REGULATION OF MITOTIC CELL CYCLE	177	-0,633	-2,719	0,000	0,000	0,000	2292
GO0051276 CHROMOSOME ORGANIZATION	286	-0,605	-2,719	0,000	0,000	0,000	3069
GO0000278 MITOTIC CELL CYCLE	451	-0,573	-2,687	0,000	0,000	0,000	2318
GO0042254 RIBOSOME BIOGENESIS	60	-0,733	-2,684	0,000	0,000	0,000	1593
GO0000280 NUCLEAR DIVISION	178	-0,623	-2,677	0,000	0,000	0,000	2255
GO1901987 REGULATION OF CELL CYCLE PHASE TRANSITION	126	-0,662	-2,676	0,000	0,000	0,000	2292
GO1901990 REGULATION OF MITOTIC CELL CYCLE PHASE TRANSITION	114	-0,661	-2,662	0,000	0,000	0,000	2292
GO0048285 ORGANELLE FISSION	187	-0,608	-2,649	0,000	0,000	0,000	1823
GO0006259 DNA METABOLIC PROCESS	245	-0,599	-2,648	0,000	0,000	0,000	2724
GO0051726 REGULATION OF CELL CYCLE	279	-0,580	-2,633	0,000	0,000	0,000	2292
GO0044770 CELL CYCLE PHASE TRANSITION	140	-0,638	-2,630	0,000	0,000	0,000	2292
GO0006396 RNA PROCESSING	337	-0,578	-2,604	0,000	0,000	0,000	2801
GO0044772 MITOTIC CELL CYCLE PHASE TRANSITION	124	-0,641	-2,595	0,000	0,000	0,000	2292
GO0007059 CHROMOSOME SEGREGATION	122	-0,637	-2,580	0,000	0,000	0,000	1638
GO0000070 MITOTIC SISTER CHROMATID SEGREGATION	60	-0,707	-2,579	0,000	0,000	0,000	2313
GO0000819 SISTER CHROMATID SEGREGATION	61	-0,699	-2,576	0,000	0,000	0,000	2313
GO0010948 NEGATIVE REGULATION OF CELL CYCLE PROCESS	105	-0,633	-2,529	0,000	0,000	0,000	2292

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0022613 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX BIOGENESIS	92	-0,643	-2,522	0,000	0,000	0,000	1762
GO0000075 CELL CYCLE CHECKPOINT	88	-0,647	-2,520	0,000	0,000	0,000	2292
GO1901988 NEGATIVE REGULATION OF CELL CYCLE PHASE TRANSITION	101	-0,635	-2,508	0,000	0,000	0,000	2292
GO0000226 MICROTUBULE CYTOSKELETON ORGANIZATION	342	-0,552	-2,504	0,000	0,000	0,000	1510
GO0071103 DNA CONFORMATION CHANGE	69	-0,676	-2,502	0,000	0,000	0,000	1762
GO0006260 DNA REPLICATION	78	-0,652	-2,500	0,000	0,000	0,000	2879
GO1901991 NEGATIVE REGULATION OF MITOTIC CELL CYCLE PHASE TRANSITION	89	-0,632	-2,493	0,000	0,000	0,000	2292
GO0034660 NCRNA METABOLIC PROCESS	114	-0,615	-2,472	0,000	0,000	0,000	3006
GO0031570 DNA INTEGRITY CHECKPOINT	74	-0,645	-2,460	0,000	0,000	0,000	2292
GO0007088 REGULATION OF MITOSIS	55	-0,696	-2,460	0,000	0,000	0,000	2255
GO0051783 REGULATION OF NUCLEAR DIVISION	55	-0,696	-2,457	0,000	0,000	0,000	2255
GO0034470 NCRNA PROCESSING	77	-0,647	-2,453	0,000	0,000	0,000	2860
GO0006261 DNA-DEPENDENT DNA REPLICATION	49	-0,701	-2,453	0,000	0,000	0,000	2879
GO0006323 DNA PACKAGING	60	-0,681	-2,452	0,000	0,000	0,000	1762
GO0000077 DNA DAMAGE CHECKPOINT	71	-0,647	-2,451	0,000	0,000	0,000	2292
GO0071824 PROTEIN-DNA COMPLEX SUBUNIT ORGANIZATION	49	-0,702	-2,446	0,000	0,000	0,000	1743
GO0007093 MITOTIC CELL CYCLE CHECKPOINT	76	-0,644	-2,439	0,000	0,000	0,000	2292
GO0051297 CENTROSOME ORGANIZATION	110	-0,611	-2,418	0,000	0,000	0,000	1812
GO0031023 MICROTUBULE ORGANIZING CENTER ORGANIZATION	114	-0,606	-2,413	0,000	0,000	0,000	1812
GO0043933 MACROMOLECULAR COMPLEX SUBUNIT ORGANIZATION	493	-0,510	-2,411	0,000	0,000	0,000	1819

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0006397 MRNA PROCESSING	246	-0,541	-2,389	0,000	0,000	0,000	2801
GO0006364 RRNA PROCESSING	32	-0,741	-2,375	0,000	0,000	0,000	2695
GO0008380 RNA SPLICING	203	-0,545	-2,374	0,000	0,000	0,000	2801
GO0006412 TRANSLATION	306	-0,521	-2,374	0,000	0,000	0,000	3283
GO0006974 RESPONSE TO DNA DAMAGE STIMULUS	232	-0,539	-2,373	0,000	0,000	0,000	2547
GO0051303 ESTABLISHMENT OF CHROMOSOME LOCALIZATION	17	-0,870	-2,373	0,000	0,000	0,000	575
GO0065004 PROTEIN-DNA COMPLEX ASSEMBLY	33	-0,738	-2,372	0,000	0,000	0,000	1743
GO0051310 METAPHASE PLATE CONGRESSION	16	-0,861	-2,371	0,000	0,000	0,000	575
GO0016072 RRNA METABOLIC PROCESS	34	-0,744	-2,366	0,000	0,000	0,000	2695
GO0016071 MRNA METABOLIC PROCESS	263	-0,527	-2,365	0,000	0,000	0,000	2731
GO0050000 CHROMOSOME LOCALIZATION	17	-0,870	-2,361	0,000	0,000	0,000	575
GO0006281 DNA REPAIR	96	-0,592	-2,355	0,000	0,000	0,000	2523
GO0000375 RNA SPLICING, VIA TRANSESTERIFICATION REACTIONS	197	-0,542	-2,354	0,000	0,000	0,000	2801
GO0007098 CENTROSOME CYCLE	86	-0,602	-2,341	0,000	0,000	0,000	1812
GO0000377 RNA SPLICING, VIA TRANSESTERIFICATION REACTIONS WITH BULGED ADENOSINE AS NUCLEOPHILE	196	-0,541	-2,341	0,000	0,000	0,000	2801
GO0044773 MITOTIC DNA DAMAGE CHECKPOINT	63	-0,631	-2,339	0,000	0,000	0,000	3291
GO0044774 MITOTIC DNA INTEGRITY CHECKPOINT	64	-0,634	-2,333	0,000	0,000	0,000	2292
GO0000398 MRNA SPLICING, VIA SPLICEOSOME	196	-0,541	-2,332	0,000	0,000	0,000	2801
GO0030261 CHROMOSOME CONDENSATION	37	-0,709	-2,326	0,000	0,000	0,000	1378
GO0007017 MICROTUBULE-BASED PROCESS	426	-0,496	-2,324	0,000	0,000	0,000	1647
GO0006325 CHROMATIN ORGANIZATION	158	-0,552	-2,318	0,000	0,000	0,000	3061

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0009451 RNA MODIFICATION	35	-0,711	-2,314	0,000	0,000	0,000	2730
GO0051321 MEIOTIC CELL CYCLE	157	-0,548	-2,306	0,000	0,000	0,000	1929
GO0007095 MITOTIC G2 DNA DAMAGE CHECKPOINT	60	-0,635	-2,301	0,000	0,000	0,000	3291
GO0031572 G2 DNA DAMAGE CHECKPOINT	61	-0,638	-2,294	0,000	0,000	0,000	3291
GO0022403 CELL CYCLE PHASE	57	-0,638	-2,287	0,000	0,000	0,000	2588
GO0000279 M PHASE	25	-0,758	-2,282	0,000	0,000	0,000	1638
GO0051298 CENTROSOME DUPLICATION	76	-0,598	-2,276	0,000	0,000	0,000	1812
GO0071822 PROTEIN COMPLEX SUBUNIT ORGANIZATION	414	-0,488	-2,270	0,000	0,000	0,001	1502
GO0033043 REGULATION OF ORGANELLE ORGANIZATION	154	-0,537	-2,259	0,000	0,000	0,001	2255
GO0000910 CYTOKINESIS	80	-0,584	-2,237	0,000	0,000	0,001	1416
GO0007126 MEIOSIS	140	-0,539	-2,233	0,000	0,000	0,001	1929
GO0051225 SPINDLE ASSEMBLY	45	-0,649	-2,223	0,000	0,000	0,001	1255
GO0007091 METAPHASE/ANAPHASE TRANSITION OF MITOTIC CELL CYCLE	23	-0,758	-2,218	0,000	0,000	0,001	2255
GO0030071 REGULATION OF MITOTIC METAPHASE/ANAPHASE TRANSITION	24	-0,743	-2,217	0,000	0,000	0,001	2255
GO0044784 METAPHASE/ANAPHASE TRANSITION OF CELL CYCLE	23	-0,758	-2,215	0,000	0,000	0,002	2255
GO0007143 FEMALE MEIOSIS	63	-0,604	-2,213	0,000	0,000	0,002	1607
GO0007127 MEIOSIS I	60	-0,607	-2,203	0,000	0,000	0,003	1883
GO0032259 METHYLATION	62	-0,598	-2,201	0,000	0,000	0,003	3189
GO1902099 REGULATION OF METAPHASE/ANAPHASE TRANSITION OF CELL CYCLE	24	-0,743	-2,200	0,000	0,000	0,003	2255
GO0051301 CELL DIVISION	190	-0,507	-2,194	0,000	0,000	0,003	1477

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0031122 CYTOPLASMIC MICROTUBULE ORGANIZATION	18	-0,794	-2,179	0,000	0,000	0,003	1809
GO0016568 CHROMATIN MODIFICATION	114	-0,535	-2,174	0,000	0,000	0,003	3189
GO0006333 CHROMATIN ASSEMBLY OR DISASSEMBLY	28	-0,699	-2,161	0,000	0,000	0,004	1972
GO0007076 MITOTIC CHROMOSOME CONDENSATION	19	-0,756	-2,151	0,000	0,000	0,006	571
GO0006997 NUCLEUS ORGANIZATION	39	-0,640	-2,145	0,000	0,000	0,008	1471
GO0044786 CELL CYCLE DNA REPLICATION	23	-0,732	-2,144	0,000	0,000	0,008	2723
GO0016570 HISTONE MODIFICATION	81	-0,556	-2,140	0,000	0,000	0,010	3189
GO0045132 MEIOTIC CHROMOSOME SEGREGATION	48	-0,605	-2,127	0,000	0,000	0,012	1607
GO0016569 COVALENT CHROMATIN MODIFICATION	81	-0,556	-2,121	0,000	0,000	0,015	3189
GO0035186 SYNCYTIAL BLASTODERM MITOTIC CELL CYCLE	21	-0,740	-2,120	0,000	0,000	0,015	1378
GO0006913 NUCLEOCYTOPLASMIC TRANSPORT	97	-0,533	-2,118	0,000	0,000	0,015	1607
GO0033301 CELL CYCLE COMPRISING MITOSIS WITHOUT CYTOKINESIS	24	-0,708	-2,101	0,000	0,000	0,019	1378
GO0000212 MEIOTIC SPINDLE ORGANIZATION	28	-0,675	-2,088	0,000	0,000	0,023	1804
GO0051169 NUCLEAR TRANSPORT	97	-0,533	-2,086	0,000	0,000	0,024	1607
GO0006310 DNA RECOMBINATION	53	-0,601	-2,084	0,000	0,000	0,025	2330
GO0090306 SPINDLE ASSEMBLY INVOLVED IN MEIOSIS	18	-0,740	-2,082	0,000	0,000	0,025	1255
GO0051098 REGULATION OF BINDING	15	-0,786	-2,081	0,000	0,000	0,026	1027
GO0043414 MACROMOLECULE METHYLATION	54	-0,586	-2,080	0,000	0,000	0,027	3733
GO0000086 G2/M TRANSITION OF MITOTIC CELL CYCLE	17	-0,752	-2,062	0,000	0,000	0,039	1287

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0006367 TRANSCRIPTION INITIATION FROM RNA POLYMERASE II PROMOTER	65	-0,563	-2,062	0,000	0,000	0,039	2893
GO0065003 MACROMOLECULAR COMPLEX ASSEMBLY	220	-0,471	-2,059	0,000	0,000	0,039	1819
GO0051784 NEGATIVE REGULATION OF NUCLEAR DIVISION	16	-0,753	-2,052	0,000	0,000	0,042	2004
GO0045448 MITOTIC CELL CYCLE, EMBRYONIC	33	-0,637	-2,049	0,000	0,000	0,044	3069
GO0006399 TRNA METABOLIC PROCESS	61	-0,557	-2,047	0,000	0,000	0,048	3404
GO0033044 REGULATION OF CHROMOSOME ORGANIZATION	23	-0,682	-2,036	0,000	0,001	0,065	2235
GO0070507 REGULATION OF MICROTUBULE CYTOSKELETON ORGANIZATION	32	-0,634	-2,030	0,000	0,001	0,071	1180
GO0034728 NUCLEOSOME ORGANIZATION	25	-0,666	-2,029	0,000	0,001	0,074	1618
GO0045839 NEGATIVE REGULATION OF MITOSIS	16	-0,753	-2,026	0,000	0,001	0,078	2004
GO0007131 RECIPROCAL MEIOTIC RECOMBINATION	26	-0,662	-2,022	0,000	0,001	0,083	1378
GO0051322 ANAPHASE	16	-0,759	-2,013	0,000	0,001	0,089	1638
GO0016458 GENE SILENCING	116	-0,494	-2,010	0,000	0,001	0,094	3046
GO0007062 SISTER CHROMATID COHESION	22	-0,696	-2,007	0,000	0,001	0,097	2872
GO0090305 NUCLEIC ACID PHOSPHODIESTER BOND HYDROLYSIS	27	-0,653	-2,004	0,000	0,001	0,098	2695
GO0051168 NUCLEAR EXPORT	39	-0,602	-2,004	0,002	0,001	0,099	1559
GO0032506 CYTOKINETIC PROCESS	24	-0,672	-1,995	0,002	0,001	0,121	268
GO0006405 RNA EXPORT FROM NUCLEUS	27	-0,645	-1,985	0,000	0,001	0,138	1559
GO0034622 CELLULAR MACROMOLECULAR COMPLEX ASSEMBLY	154	-0,473	-1,983	0,000	0,001	0,142	3153
GO0031497 CHROMATIN ASSEMBLY	23	-0,673	-1,981	0,000	0,001	0,145	3023

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0045814 NEGATIVE REGULATION OF GENE EXPRESSION, EPIGENETIC	65	-0,533	-1,979	0,000	0,001	0,152	3046
GO0033554 CELLULAR RESPONSE TO STRESS	377	-0,424	-1,977	0,000	0,001	0,155	2547
GO0007005 MITOCHONDRION ORGANIZATION	93	-0,507	-1,972	0,000	0,001	0,167	3137
GO0008213 PROTEIN ALKYLATION	43	-0,583	-1,972	0,000	0,001	0,167	2235
GO0006406 MRNA EXPORT FROM NUCLEUS	23	-0,672	-1,972	0,000	0,001	0,167	1559
GO0006479 PROTEIN METHYLATION	43	-0,583	-1,970	0,000	0,001	0,171	2235
GO0007135 MEIOSIS II	15	-0,734	-1,968	0,000	0,001	0,178	753
GO0042023 DNA ENDOREDUPPLICATION	17	-0,710	-1,967	0,003	0,001	0,181	2723
GO0040029 REGULATION OF GENE EXPRESSION, EPIGENETIC	116	-0,495	-1,964	0,000	0,002	0,184	3284
GO0006342 CHROMATIN SILENCING	64	-0,536	-1,960	0,000	0,002	0,190	3046
GO0016571 HISTONE METHYLATION	34	-0,603	-1,959	0,000	0,002	0,192	3880
GO0035825 RECIPROCAL DNA RECOMBINATION	26	-0,662	-1,957	0,000	0,002	0,196	1378
GO0071826 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX SUBUNIT ORGANIZATION	41	-0,579	-1,952	0,000	0,002	0,212	3391
GO0030717 KARYOSOME FORMATION	22	-0,665	-1,943	0,000	0,002	0,230	2237
GO0006338 CHROMATIN REMODELING	52	-0,544	-1,931	0,000	0,002	0,272	1724
GO0022618 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX ASSEMBLY	36	-0,584	-1,928	0,000	0,002	0,276	3553
GO0007099 CENTRIOLE REPLICATION	20	-0,663	-1,927	0,000	0,002	0,280	2928
GO0032886 REGULATION OF MICROTUBULE-BASED PROCESS	37	-0,587	-1,925	0,000	0,002	0,286	1180
GO0008033 TRNA PROCESSING	29	-0,622	-1,917	0,000	0,003	0,313	3404
GO0034504 PROTEIN LOCALIZATION TO NUCLEUS	65	-0,511	-1,905	0,000	0,003	0,349	1607



GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0006352 DNA-DEPENDENT TRANSCRIPTION, INITIATION	72	-0,501	-1,898	0,000	0,003	0,377	2893
GO0000079 REGULATION OF CYCLIN-DEPENDENT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASE ACTIVITY	16	-0,713	-1,886	0,000	0,004	0,427	2287
GO0006277 DNA AMPLIFICATION	17	-0,678	-1,873	0,002	0,004	0,483	2876
GO0030010 ESTABLISHMENT OF CELL POLARITY	29	-0,604	-1,860	0,000	0,005	0,553	1239
GO0000912 ASSEMBLY OF ACTOMYOSIN APPARATUS INVOLVED IN CYTOKINESIS	17	-0,680	-1,860	0,002	0,005	0,554	268
GO0000915 CYTOKINESIS, ACTOMYOSIN CONTRACTILE RING ASSEMBLY	17	-0,680	-1,856	0,002	0,005	0,575	268
GO1901992 POSITIVE REGULATION OF MITOTIC CELL CYCLE PHASE TRANSITION	15	-0,689	-1,848	0,005	0,006	0,613	2285
GO0017145 STEM CELL DIVISION	73	-0,494	-1,835	0,000	0,007	0,673	2046
GO0010639 NEGATIVE REGULATION OF ORGANELLE ORGANIZATION	46	-0,533	-1,830	0,003	0,007	0,689	2144
GO0006606 PROTEIN IMPORT INTO NUCLEUS	61	-0,505	-1,829	0,002	0,007	0,695	1607
GO0051170 NUCLEAR IMPORT	61	-0,505	-1,828	0,003	0,007	0,700	1607
GO0051052 REGULATION OF DNA METABOLIC PROCESS	32	-0,561	-1,828	0,003	0,007	0,700	1724
GO0008356 ASYMMETRIC CELL DIVISION	67	-0,497	-1,826	0,000	0,008	0,715	2091
GO0071897 DNA BIOSYNTHETIC PROCESS	24	-0,610	-1,825	0,000	0,008	0,720	1843
GO0045934 NEGATIVE REGULATION OF NUCLEOBASE-CONTAINING COMPOUND METABOLIC PROCESS	261	-0,407	-1,825	0,000	0,008	0,721	2235
GO0097190 APOPTOTIC SIGNALING PATHWAY	16	-0,674	-1,821	0,007	0,008	0,734	950
GO0016318 OMMATIDIAL ROTATION	27	-0,590	-1,820	0,005	0,008	0,736	1052
GO0051172 NEGATIVE REGULATION OF NITROGEN COMPOUND METABOLIC PROCESS	263	-0,406	-1,820	0,000	0,008	0,737	2235

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0070983 DENDRITE GUIDANCE	17	-0,662	-1,818	0,005	0,008	0,746	791
GO0007307 EGGSHELL CHORION GENE AMPLIFICATION	15	-0,687	-1,814	0,002	0,008	0,762	2667
GO0032543 MITOCHONDRIAL TRANSLATION	16	-0,684	-1,813	0,002	0,008	0,766	3058
GO0032200 TELOMERE ORGANIZATION	18	-0,654	-1,813	0,003	0,008	0,766	3908
GO0044744 PROTEIN TARGETING TO NUCLEUS	61	-0,505	-1,812	0,000	0,008	0,769	1607
GO0000723 TELOMERE MAINTENANCE	18	-0,654	-1,810	0,007	0,008	0,773	3908
GO0034968 HISTONE LYSINE METHYLATION	30	-0,573	-1,804	0,000	0,009	0,796	3880

GO BIOLOGICAL PROCESSES Tr6	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0015991 ATP HYDROLYSIS COUPLED PROTON TRANSPORT	34	0,73	2,55	0	0	0	963
GO0015988 ENERGY COUPLED PROTON TRANSMEMBRANE TRANSPORT, AGAINST ELECTROCHEMICAL GRADIENT	34	0,73	2,523	0	0	0	963
GO0006818 HYDROGEN TRANSPORT	43	0,655	2,394	0	0	0	2046
GO0015992 PROTON TRANSPORT	43	0,655	2,378	0	0	0	2046
GO0008063 TOLL SIGNALING PATHWAY	46	0,614	2,359	0	0	0	1788
GO0015672 MONOVALENT INORGANIC CATION TRANSPORT	117	0,512	2,295	0	0,001	0,003	2046
GO0008592 REGULATION OF TOLL SIGNALING PATHWAY	16	0,763	2,154	0	0,003	0,021	1623
GO0007475 APPPOSITION OF DORSAL AND VENTRAL IMAGINAL DISC-DERIVED WING SURFACES	17	0,722	2,117	0	0,006	0,044	2729
GO0006812 CATION TRANSPORT	195	0,437	2,08	0	0,008	0,073	2131
GO0050801 ION HOMEOSTASIS	58	0,498	1,965	0,003	0,033	0,273	2774
GO0006811 ION TRANSPORT	299	0,376	1,942	0	0,038	0,333	2161
GO0006873 CELLULAR ION HOMEOSTASIS	47	0,506	1,917	0,003	0,047	0,431	2765

GO CELULAR COMPONENT Tr2	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0031981 NUCLEAR LUMEN	437	-0,616	-2,886	0,000	0,000	0,000	3061
GO0005730 NUCLEOLUS	78	-0,729	-2,771	0,000	0,000	0,000	1736
GO0000313 ORGANELLAR RIBOSOME	73	-0,733	-2,762	0,000	0,000	0,000	1816
GO0005761 MITOCHONDRIAL RIBOSOME	73	-0,733	-2,716	0,000	0,000	0,000	1816
GO0030529 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX	411	-0,574	-2,673	0,000	0,000	0,000	2853
GO0000775 CHROMOSOME, CENTROMERIC REGION	47	-0,762	-2,648	0,000	0,000	0,000	1180
GO0044427 CHROMOSOMAL PART	248	-0,584	-2,585	0,000	0,000	0,000	2880
GO0005694 CHROMOSOME	326	-0,566	-2,582	0,000	0,000	0,000	3045
GO0071011 PRECATALYTIC SPLICEOSOME	127	-0,626	-2,576	0,000	0,000	0,000	2801
GO0005819 SPINDLE	78	-0,674	-2,560	0,000	0,000	0,000	1644
GO0005654 NUCLEOPLASM	279	-0,569	-2,556	0,000	0,000	0,000	2506
GO0044451 NUCLEOPLASM PART	254	-0,572	-2,550	0,000	0,000	0,000	3061
GO0005635 NUCLEAR ENVELOPE	76	-0,672	-2,540	0,000	0,000	0,000	1489
GO0005643 NUCLEAR PORE	41	-0,743	-2,532	0,000	0,000	0,000	1489
GO0000315 ORGANELLAR LARGE RIBOSOMAL SUBUNIT	45	-0,731	-2,531	0,000	0,000	0,000	2278
GO0046930 PORE COMPLEX	41	-0,743	-2,505	0,000	0,000	0,000	1489
GO0044391 RIBOSOMAL SUBUNIT	153	-0,592	-2,504	0,000	0,000	0,000	2583
GO0000793 CONDENSED CHROMOSOME	41	-0,756	-2,489	0,000	0,000	0,000	1607
GO0071013 CATALYTIC STEP 2 SPLICEOSOME	106	-0,621	-2,488	0,000	0,000	0,000	2801
GO0005762 MITOCHONDRIAL LARGE RIBOSOMAL SUBUNIT	45	-0,731	-2,470	0,000	0,000	0,000	2278
GO0000228 NUCLEAR CHROMOSOME	109	-0,611	-2,465	0,000	0,000	0,000	3306
GO0030880 RNA POLYMERASE COMPLEX	81	-0,650	-2,461	0,000	0,000	0,000	2860
GO0055029 NUCLEAR DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE COMPLEX	81	-0,650	-2,456	0,000	0,000	0,000	2860

GO CELULAR COMPONENT Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0000428 DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE COMPLEX	81	-0,650	-2,456	0,000	0,000	0,000	2860
GO0005840 RIBOSOME	159	-0,584	-2,452	0,000	0,000	0,000	2583
GO0000776 KINETOCHORE	30	-0,780	-2,451	0,000	0,000	0,000	1180
GO0005681 SPLICEOSOMAL COMPLEX	151	-0,584	-2,445	0,000	0,000	0,000	2801
GO0030532 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX	57	-0,677	-2,429	0,000	0,000	0,000	2731
GO0044454 NUCLEAR CHROMOSOME PART	88	-0,624	-2,416	0,000	0,000	0,000	3306
GO0005759 MITOCHONDRIAL MATRIX	136	-0,577	-2,387	0,000	0,000	0,000	1816
GO0015630 MICROTUBULE CYTOSKELETON	394	-0,517	-2,384	0,000	0,000	0,000	2315
GO0000314 ORGANELLAR SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT	30	-0,748	-2,366	0,000	0,000	0,000	1731
GO0005763 MITOCHONDRIAL SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT	30	-0,748	-2,360	0,000	0,000	0,000	1731
GO0015934 LARGE RIBOSOMAL SUBUNIT	99	-0,590	-2,356	0,000	0,000	0,000	2561
GO0005875 MICROTUBULE ASSOCIATED COMPLEX	291	-0,517	-2,326	0,000	0,000	0,000	2176
GO0005813 CENTROSOME	76	-0,605	-2,296	0,000	0,000	0,000	1487
GO0015935 SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT	58	-0,627	-2,284	0,000	0,000	0,000	2738
GO0005815 MICROTUBULE ORGANIZING CENTER	84	-0,590	-2,265	0,000	0,000	0,000	2251
GO0016591 DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE II, HOLOENZYME	69	-0,606	-2,264	0,000	0,000	0,000	2983
GO0000785 CHROMATIN	126	-0,545	-2,232	0,000	0,000	0,000	3045
GO0030496 MIDBODY	16	-0,814	-2,224	0,000	0,000	0,000	427
GO0044430 CYTOSKELETAL PART	459	-0,471	-2,222	0,000	0,000	0,000	2190
GO0032993 PROTEIN-DNA COMPLEX	26	-0,724	-2,212	0,000	0,000	0,000	1357
GO0044429 MITOCHONDRIAL PART	257	-0,485	-2,169	0,000	0,000	0,000	2596
GO0005874 MICROTUBULE	53	-0,597	-2,139	0,000	0,000	0,000	1638

GO CELULAR COMPONENT Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0031967 ORGANELLE ENVELOPE	200	-0,489	-2,127	0,000	0,000	0,000	2487
GO0005700 POLYTENE CHROMOSOME	127	-0,524	-2,122	0,000	0,000	0,000	2752
GO0031975 ENVELOPE	201	-0,488	-2,109	0,000	0,000	0,001	2487
GO0005871 KINESIN COMPLEX	26	-0,684	-2,094	0,000	0,000	0,001	427
GO0017053 TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR COMPLEX	16	-0,770	-2,078	0,000	0,000	0,001	2293
GO0010369 CHROMOCENTER	16	-0,766	-2,077	0,000	0,000	0,001	1923
GO0000123 HISTONE ACETYLTRANSFERASE COMPLEX	46	-0,598	-2,075	0,000	0,000	0,001	3561
GO0000790 NUCLEAR CHROMATIN	54	-0,583	-2,065	0,000	0,000	0,002	3226
GO0072686 MITOTIC SPINDLE	16	-0,766	-2,047	0,000	0,000	0,005	2004
GO0000794 CONDENSED NUCLEAR CHROMOSOME	18	-0,742	-2,045	0,000	0,000	0,005	1607
GO0000791 EUCHROMATIN	17	-0,727	-2,034	0,000	0,000	0,006	1724
GO0005739 MITOCHONDRION	398	-0,439	-2,032	0,000	0,000	0,007	2781
GO0044798 NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR COMPLEX	57	-0,565	-2,026	0,000	0,000	0,008	2834
GO0005657 REPLICATION FORK	17	-0,732	-2,018	0,000	0,000	0,010	2724
GO0012505 ENDOMEMBRANE SYSTEM	162	-0,477	-2,003	0,000	0,000	0,015	1610
GO0000792 HETEROCHROMATIN	23	-0,678	-1,991	0,000	0,000	0,020	2880
GO0005703 POLYTENE CHROMOSOME PUFF	27	-0,631	-1,957	0,000	0,001	0,032	1866
GO0031519 PCG PROTEIN COMPLEX	20	-0,664	-1,917	0,003	0,001	0,048	3043
GO0070603 SWI/SNF SUPERFAMILY-TYPE COMPLEX	28	-0,616	-1,883	0,002	0,001	0,077	3165
GO0031461 CULLIN-RING UBIQUITIN LIGASE COMPLEX	24	-0,607	-1,852	0,003	0,002	0,110	2986
GO0005876 SPINDLE MICROTUBULE	24	-0,618	-1,840	0,000	0,002	0,124	1103
GO0034708 METHYLTRANSFERASE COMPLEX	23	-0,622	-1,834	0,000	0,002	0,140	3880
GO0000151 UBIQUITIN LIGASE COMPLEX	37	-0,550	-1,817	0,000	0,003	0,167	2986
GO0005669 TRANSCRIPTION FACTOR TFIID COMPLEX	24	-0,600	-1,816	0,004	0,003	0,168	2276

<b>GO CELULAR COMPONENT Tr2 (cont.)</b>	<b>SIZE</b>	<b>ES</b>	<b>NES</b>	<b>NOM p-val</b>	<b>FDR q-val</b>	<b>FWER p-val</b>	<b>RANK AT MAX</b>
<b>GO0044448 CELL CORTEX PART</b>	44	-0,530	-1,813	0,000	0,003	0,174	488
<b>GO0044450 MICROTUBULE ORGANIZING CENTER PART</b>	35	-0,553	-1,798	0,000	0,004	0,224	3061
<b>GO0005814 CENTRIOLE</b>	19	-0,647	-1,791	0,008	0,004	0,233	2928
<b>GO0005705 POLYTENE CHROMOSOME INTERBAND</b>	24	-0,585	-1,779	0,005	0,004	0,257	1391
<b>GO0019866 ORGANELLE INNER MEMBRANE</b>	84	-0,466	-1,777	0,000	0,004	0,261	2694
<b>GO0035097 HISTONE METHYLTRANSFERASE COMPLEX</b>	22	-0,614	-1,773	0,003	0,004	0,270	3880
<b>GO0000922 SPINDLE POLE</b>	22	-0,599	-1,742	0,010	0,006	0,381	1638
<b>GO0045495 POLE PLASM</b>	25	-0,583	-1,739	0,005	0,006	0,390	2632
<b>GO0044445 CYTOSOLIC PART</b>	110	-0,431	-1,735	0,000	0,006	0,398	5179
<b>GO0034399 NUCLEAR PERIPHERY</b>	20	-0,602	-1,726	0,009	0,007	0,431	1315
<b>GO0022626 CYTOSOLIC RIBOSOME</b>	82	-0,453	-1,706	0,003	0,008	0,496	5453
<b>GO0044455 MITOCHONDRIAL MEMBRANE PART</b>	46	-0,494	-1,700	0,007	0,009	0,523	2694
<b>GO0031966 MITOCHONDRIAL MEMBRANE</b>	101	-0,418	-1,694	0,000	0,009	0,544	2694
<b>GO0031965 NUCLEAR MEMBRANE</b>	17	-0,609	-1,652	0,018	0,014	0,700	1315
<b>GO0005743 MITOCHONDRIAL INNER MEMBRANE</b>	78	-0,429	-1,616	0,003	0,019	0,808	2694
<b>GO0005667 TRANSCRIPTION FACTOR COMPLEX</b>	108	-0,403	-1,613	0,004	0,020	0,820	2514
<b>GO0035770 RIBONUCLEOPROTEIN GRANULE</b>	28	-0,522	-1,599	0,015	0,022	0,851	3630
<b>GO0043186 P GRANULE</b>	18	-0,574	-1,582	0,021	0,025	0,890	2111
<b>GO0035327 TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN</b>	21	-0,547	-1,568	0,034	0,028	0,925	904
<b>GO0000124 SAGA COMPLEX</b>	16	-0,585	-1,568	0,028	0,027	0,928	4069
<b>GO0070461 SAGA-TYPE COMPLEX</b>	16	-0,585	-1,566	0,039	0,028	0,931	4069
<b>GO0005938 CELL CORTEX</b>	92	-0,397	-1,558	0,011	0,029	0,940	488
<b>GO0016604 NUCLEAR BODY</b>	27	-0,489	-1,519	0,038	0,039	0,974	3557
<b>GO0008023 TRANSCRIPTION ELONGATION FACTOR COMPLEX</b>	26	-0,490	-1,497	0,055	0,046	0,987	2485

<b>GO CELULAR COMPONENT Tr6</b>	<b>SIZE</b>	<b>ES</b>	<b>NES</b>	<b>NOM p-val</b>	<b>FDR q-val</b>	<b>FWER p-val</b>	<b>RANK AT MAX</b>
<b>GO0005773 VACUOLE</b>	62	0,671	2,709	0,000	0,000	0,000	2046
<b>GO0044437 VACUOLAR PART</b>	39	0,737	2,678	0,000	0,000	0,000	2046
<b>GO0005774 VACUOLAR MEMBRANE</b>	39	0,737	2,654	0,000	0,000	0,000	2046
<b>GO0033176 PROTON-TRANSPORTING V-TYPE ATPASE COMPLEX</b>	35	0,727	2,56	0,000	0,000	0,000	963
<b>GO0016471 VACUOLAR PROTON-TRANSPORTING V-TYPE ATPASE COMPLEX</b>	31	0,741	2,518	0,000	0,000	0,000	2046
<b>GO0016469 PROTON-TRANSPORTING TWO-SECTOR ATPASE COMPLEX</b>	40	0,661	2,419	0,000	0,000	0,000	963
<b>GO0033180 PROTON-TRANSPORTING V-TYPE ATPASE, V1 DOMAIN</b>	16	0,835	2,4	0,000	0,000	0,000	250
<b>GO0033178 PROTON-TRANSPORTING TWO-SECTOR ATPASE COMPLEX, CATALYTIC DOMAIN</b>	18	0,79	2,383	0,000	0,000	0,000	250
<b>GO0033177 PROTON-TRANSPORTING TWO-SECTOR ATPASE COMPLEX, PROTON-TRANSPORTING DOMAIN</b>	20	0,691	2,115	0,000	0,001	0,012	2258
<b>GO0000220 VACUOLAR PROTON-TRANSPORTING V-TYPE ATPASE, V0 DOMAIN</b>	16	0,722	2,114	0,000	0,001	0,012	2046
<b>GO0033179 PROTON-TRANSPORTING V-TYPE ATPASE, V0 DOMAIN</b>	18	0,705	2,021	0,000	0,002	0,024	2046
<b>GO0000323 LYTIC VACUOLE</b>	26	0,541	1,767	0,007	0,031	0,322	1612
<b>GO0005764 LYSOSOME</b>	26	0,541	1,748	0,004	0,033	0,356	1612

GO MOLECULAR FUNCTION Tr2	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0004386 HELICASE ACTIVITY	99	-0,642	-2,502	0,000	0,000	0,000	1717
GO0003735 STRUCTURAL CONSTITUENT OF RIBOSOME	156	-0,588	-2,465	0,000	0,000	0,000	2583
GO0008026 ATP-DEPENDENT HELICASE ACTIVITY	72	-0,637	-2,408	0,000	0,000	0,000	2252
GO0070035 PURINE NTP-DEPENDENT HELICASE ACTIVITY	72	-0,637	-2,407	0,000	0,000	0,000	2252
GO0003899 DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ACTIVITY	28	-0,774	-2,379	0,000	0,000	0,000	1357
GO0003678 DNA HELICASE ACTIVITY	39	-0,715	-2,370	0,000	0,000	0,000	1588
GO0034062 RNA POLYMERASE ACTIVITY	28	-0,774	-2,342	0,000	0,000	0,000	1357
GO0016779 NUCLEOTIDYLTRANSFERASE ACTIVITY	68	-0,621	-2,293	0,000	0,000	0,000	1357
GO0004518 NUCLEASE ACTIVITY	73	-0,591	-2,239	0,000	0,000	0,000	2946
GO0016741 TRANSFERASE ACTIVITY, TRANSFERRING ONE-CARBON GROUPS	83	-0,575	-2,191	0,000	0,000	0,001	2235
GO0004004 ATP-DEPENDENT RNA HELICASE ACTIVITY	34	-0,667	-2,177	0,000	0,000	0,001	2124
GO0004540 RIBONUCLEASE ACTIVITY	38	-0,651	-2,171	0,000	0,000	0,001	2934
GO0008168 METHYLTRANSFERASE ACTIVITY	81	-0,575	-2,166	0,000	0,000	0,001	2235
GO0003724 RNA HELICASE ACTIVITY	40	-0,644	-2,165	0,000	0,000	0,001	2252
GO0008094 DNA-DEPENDENT ATPASE ACTIVITY	42	-0,624	-2,132	0,000	0,000	0,003	2999
GO0008186 RNA-DEPENDENT ATPASE ACTIVITY	34	-0,667	-2,132	0,000	0,000	0,003	2124
GO0003723 RNA BINDING	356	-0,457	-2,112	0,000	0,000	0,004	3025
GO0000988 PROTEIN BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY	113	-0,521	-2,097	0,000	0,000	0,008	3000
GO0016796 EXONUCLEASE ACTIVITY, ACTIVE WITH EITHER RIBO- OR DEOXYRIBONUCLEIC ACIDS AND PRODUCING 5'-PHOSPHOMONOESTERS	22	-0,726	-2,092	0,000	0,001	0,009	2934
GO0008135 TRANSLATION FACTOR ACTIVITY, NUCLEIC ACID BINDING	65	-0,553	-2,032	0,000	0,001	0,015	2932
GO0003684 DAMAGED DNA BINDING	18	-0,725	-2,029	0,000	0,001	0,015	2523



GO MOLECULAR FUNCTION Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0008408 3'-5' EXONUCLEASE ACTIVITY	23	-0,694	-2,029	0,000	0,001	0,015	1718
GO0016896 EXORIBONUCLEASE ACTIVITY, PRODUCING 5'-PHOSPHOMONOESTERS	16	-0,735	-2,018	0,000	0,001	0,018	2396
GO0000989 TRANSCRIPTION FACTOR BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY	104	-0,506	-2,002	0,000	0,002	0,030	3000
GO0004527 EXONUCLEASE ACTIVITY	31	-0,633	-1,965	0,000	0,002	0,057	2728
GO0004532 EXORIBONUCLEASE ACTIVITY	16	-0,735	-1,960	0,000	0,002	0,060	2396
GO0003682 CHROMATIN BINDING	103	-0,490	-1,953	0,001	0,002	0,065	2469
GO0015631 TUBULIN BINDING	95	-0,496	-1,951	0,000	0,002	0,065	1333
GO0043138 3'-5' DNA HELICASE ACTIVITY	16	-0,716	-1,951	0,000	0,002	0,065	1219
GO0008017 MICROTUBULE BINDING	90	-0,499	-1,944	0,000	0,002	0,076	1333
GO0003712 TRANSCRIPTION COFACTOR ACTIVITY	99	-0,491	-1,938	0,000	0,002	0,081	3000
GO0004003 ATP-DEPENDENT DNA HELICASE ACTIVITY	24	-0,634	-1,922	0,000	0,003	0,093	1588
GO0003697 SINGLE-STRANDED DNA BINDING	16	-0,708	-1,879	0,000	0,005	0,165	1598
GO0043566 STRUCTURE-SPECIFIC DNA BINDING	53	-0,526	-1,870	0,000	0,005	0,183	1743
GO0003743 TRANSLATION INITIATION FACTOR ACTIVITY	48	-0,544	-1,854	0,002	0,006	0,209	2932
GO0034061 DNA POLYMERASE ACTIVITY	17	-0,666	-1,848	0,003	0,006	0,226	2724
GO0004519 ENDONUCLEASE ACTIVITY	38	-0,574	-1,846	0,000	0,006	0,231	2788
GO0016538 CYCLIN-DEPENDENT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASE REGULATOR ACTIVITY	17	-0,674	-1,834	0,004	0,007	0,257	2620
GO0003887 DNA-DIRECTED DNA POLYMERASE ACTIVITY	16	-0,676	-1,829	0,000	0,007	0,268	2724
GO0001076 RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION FACTOR BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY	48	-0,515	-1,813	0,000	0,009	0,315	2893
GO0008173 RNA METHYLTRANSFERASE ACTIVITY	19	-0,651	-1,778	0,005	0,013	0,427	2730
GO0008757 S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE ACTIVITY	48	-0,500	-1,750	0,005	0,017	0,536	2235

GO MOLECULAR FUNCTION Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0003777 MICROTUBULE MOTOR ACTIVITY	45	-0,510	-1,748	0,005	0,017	0,539	1180
GO0003690 DOUBLE-STRANDED DNA BINDING	24	-0,580	-1,743	0,004	0,017	0,554	911
GO0016859 CIS-TRANS ISOMERASE ACTIVITY	29	-0,556	-1,738	0,008	0,018	0,576	2806
GO0003755 PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE ACTIVITY	26	-0,571	-1,728	0,007	0,020	0,613	2806
GO0019887 PROTEIN KINASE REGULATOR ACTIVITY	38	-0,522	-1,723	0,003	0,020	0,633	2791
GO0004521 ENDORIBONUCLEASE ACTIVITY	20	-0,596	-1,717	0,020	0,021	0,659	2788
GO0016893 ENDONUCLEASE ACTIVITY, ACTIVE WITH EITHER RIBO- OR DEOXYRIBONUCLEIC ACIDS AND PRODUCING 5'-PHOSPHOMONOESTERS	16	-0,619	-1,686	0,012	0,028	0,778	2788
GO0004402 HISTONE ACETYLTRANSFERASE ACTIVITY	20	-0,586	-1,678	0,015	0,030	0,799	3000
GO0001075 RNA POLYMERASE II CORE PROMOTER SEQUENCE-SPECIFIC DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY INVOLVED IN PREINITIATION COMPLEX ASSEMBLY	19	-0,599	-1,675	0,012	0,030	0,811	2276
GO0019205 NUCLEOBASE-CONTAINING COMPOUND KINASE ACTIVITY	25	-0,558	-1,675	0,021	0,029	0,811	1278
GO0003729 MRNA BINDING	165	-0,391	-1,658	0,000	0,034	0,851	2445
GO0000983 RNA POLYMERASE II CORE PROMOTER SEQUENCE-SPECIFIC DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY	20	-0,579	-1,657	0,023	0,034	0,854	2276
GO0019207 KINASE REGULATOR ACTIVITY	41	-0,495	-1,653	0,008	0,034	0,861	2620
GO0008276 PROTEIN METHYLTRANSFERASE ACTIVITY	28	-0,527	-1,648	0,012	0,035	0,876	2235
GO0022884 MACROMOLECULE TRANSMEMBRANE TRANSPORTER ACTIVITY	30	-0,525	-1,647	0,012	0,035	0,879	3205
GO0016410 N-ACYLTRANSFERASE ACTIVITY	47	-0,469	-1,642	0,005	0,036	0,892	3000
GO0019901 PROTEIN KINASE BINDING	31	-0,519	-1,641	0,014	0,036	0,892	3137

GO MOLECULAR FUNCTION Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0003713 TRANSCRIPTION COACTIVATOR ACTIVITY	44	-0,486	-1,640	0,007	0,036	0,900	3000
GO0003714 TRANSCRIPTION COREPRESSOR ACTIVITY	22	-0,565	-1,634	0,017	0,037	0,919	2405
GO0008320 PROTEIN TRANSMEMBRANE TRANSPORTER ACTIVITY	30	-0,525	-1,632	0,021	0,037	0,922	3205
GO0016866 INTRAMOLECULAR TRANSFERASE ACTIVITY	15	-0,608	-1,617	0,021	0,041	0,934	2329
GO0004536 DEOXYRIBONUCLEASE ACTIVITY	21	-0,567	-1,603	0,024	0,046	0,958	3375
GO0016776 PHOSPHOTRANSFERASE ACTIVITY, PHOSPHATE GROUP AS ACCEPTOR	21	-0,552	-1,602	0,014	0,046	0,959	1278
GO0004812 AMINOACYL-TRNA LIGASE ACTIVITY	30	-0,503	-1,600	0,023	0,046	0,961	3786
GO0008134 TRANSCRIPTION FACTOR BINDING	119	-0,391	-1,599	0,001	0,045	0,962	1599

GO MOLECULAR FUNCTION Tr6	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0044769 ATPASE ACTIVITY, COUPLED TO TRANSMEMBRANE MOVEMENT OF IONS, ROTATIONAL MECHANISM	27	0,775	2,575	0,000	0,000	0,000	466
GO0046961 PROTON-TRANSPORTING ATPASE ACTIVITY, ROTATIONAL MECHANISM	26	0,776	2,537	0,000	0,000	0,000	466
GO0042625 ATPASE ACTIVITY, COUPLED TO TRANSMEMBRANE MOVEMENT OF IONS	48	0,613	2,320	0,000	0,000	0,000	466
GO0019829 CATION-TRANSPORTING ATPASE ACTIVITY	48	0,613	2,314	0,000	0,000	0,000	466
GO0015078 HYDROGEN ION TRANSMEMBRANE TRANSPORTER ACTIVITY	53	0,594	2,254	0,000	0,000	0,000	466
GO0016820 HYDROLASE ACTIVITY, ACTING ON ACID ANHYDRIDES, CATALYZING TRANSMEMBRANE MOVEMENT OF SUBSTANCES	98	0,479	2,113	0,000	0,004	0,017	1013
GO0043492 ATPASE ACTIVITY, COUPLED TO MOVEMENT OF SUBSTANCES	98	0,479	2,093	0,000	0,004	0,024	1013
GO0042626 ATPASE ACTIVITY, COUPLED TO TRANSMEMBRANE MOVEMENT OF SUBSTANCES	98	0,479	2,081	0,000	0,004	0,028	1013
GO0072509 DIVALENT INORGANIC CATION TRANSMEMBRANE TRANSPORTER ACTIVITY	39	0,539	1,917	0,000	0,021	0,150	1913
GO0022890 INORGANIC CATION TRANSMEMBRANE TRANSPORTER ACTIVITY	212	0,391	1,895	0,000	0,024	0,184	2165
GO0008376 ACETYLGALACTOSAMINYLTRANSFERASE ACTIVITY	18	0,622	1,885	0,002	0,024	0,200	1281
GO0015399 PRIMARY ACTIVE TRANSMEMBRANE TRANSPORTER ACTIVITY	117	0,409	1,849	0,000	0,031	0,269	1013
GO0015405 P-P-BOND-HYDROLYSIS-DRIVEN TRANSMEMBRANE TRANSPORTER ACTIVITY	117	0,409	1,808	0,000	0,042	0,366	1013
GO0015297 ANTIporter ACTIVITY	24	0,553	1,799	0,005	0,043	0,395	1539

GO SLIM Tr2	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0005730 NUCLEOLUS	78	-0,729	-2,783	0,000	0,000	0,000	1736
GO0051276 CHROMOSOME ORGANIZATION	286	-0,605	-2,723	0,000	0,000	0,000	3069
GO0007067 MITOSIS	173	-0,636	-2,715	0,000	0,000	0,000	2255
GO0006259 DNA METABOLIC PROCESS	245	-0,599	-2,660	0,000	0,000	0,000	2724
GO0042254 RIBOSOME BIOGENESIS	60	-0,733	-2,659	0,000	0,000	0,000	1593
GO0007059 CHROMOSOME SEGREGATION	122	-0,637	-2,614	0,000	0,000	0,000	1638
GO0005654 NUCLEOPLASM	279	-0,569	-2,578	0,000	0,000	0,000	2506
GO0005694 CHROMOSOME	326	-0,566	-2,570	0,000	0,000	0,000	3045
GO0005635 NUCLEAR ENVELOPE	76	-0,672	-2,549	0,000	0,000	0,000	1489
GO0004386 HELICASE ACTIVITY	99	-0,642	-2,521	0,000	0,000	0,000	1717
GO0003735 STRUCTURAL CONSTITUENT OF RIBOSOME	156	-0,588	-2,485	0,000	0,000	0,000	2583
GO0005840 RIBOSOME	159	-0,584	-2,453	0,000	0,000	0,000	2583
GO0000228 NUCLEAR CHROMOSOME	109	-0,611	-2,448	0,000	0,000	0,000	3306
GO0006397 MRNA PROCESSING	246	-0,541	-2,412	0,000	0,000	0,000	2801
GO0006412 TRANSLATION	306	-0,521	-2,374	0,000	0,000	0,000	3283
GO0016779 NUCLEOTIDYLTRANSFERASE ACTIVITY	68	-0,621	-2,275	0,000	0,000	0,000	1357
GO0004518 NUCLEASE ACTIVITY	73	-0,591	-2,226	0,000	0,000	0,000	2946
GO0005815 MICROTUBULE ORGANIZING CENTER	84	-0,590	-2,216	0,000	0,000	0,000	2251
GO0008168 METHYLTRANSFERASE ACTIVITY	81	-0,575	-2,195	0,000	0,000	0,000	2235
GO0051301 CELL DIVISION	190	-0,507	-2,193	0,000	0,000	0,000	1477
GO0000988 PROTEIN BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY	113	-0,521	-2,113	0,000	0,000	0,002	3000
GO0003723 RNA BINDING	356	-0,457	-2,092	0,000	0,000	0,002	3025
GO0006913 NUCLEOCYTOPLASMIC TRANSPORT	97	-0,533	-2,088	0,000	0,000	0,002	1607

GO SLIM Tr2 (cont.)	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0008135 TRANSLATION FACTOR ACTIVITY, NUCLEIC ACID BINDING	65	-0,553	-2,056	0,000	0,000	0,002	2932
GO0065003 MACROMOLECULAR COMPLEX ASSEMBLY	220	-0,471	-2,046	0,000	0,000	0,002	1819
GO0005739 MITOCHONDRION	398	-0,439	-2,027	0,000	0,000	0,003	2781
GO0006399 TRNA METABOLIC PROCESS	61	-0,557	-2,006	0,000	0,000	0,003	3404
GO0007005 MITOCHONDRION ORGANIZATION	93	-0,507	-1,984	0,000	0,000	0,003	3137
GO0022618 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX ASSEMBLY	36	-0,584	-1,924	0,002	0,000	0,005	3553
GO0006461 PROTEIN COMPLEX ASSEMBLY	157	-0,423	-1,782	0,000	0,001	0,027	1819
GO0003729 MRNA BINDING	165	-0,391	-1,652	0,000	0,005	0,169	2445
GO0006457 PROTEIN FOLDING	89	-0,412	-1,607	0,003	0,009	0,276	2835
GO0042393 HISTONE BINDING	15	-0,594	-1,576	0,051	0,012	0,351	1618
GO0008134 TRANSCRIPTION FACTOR BINDING	119	-0,391	-1,565	0,004	0,013	0,384	1599
GO0008283 CELL PROLIFERATION	253	-0,346	-1,560	0,001	0,013	0,399	1607
GO0006605 PROTEIN TARGETING	135	-0,367	-1,521	0,004	0,018	0,531	2781
GO0016853 ISOMERASE ACTIVITY	100	-0,366	-1,467	0,013	0,029	0,697	2531
GO0009790 EMBRYO DEVELOPMENT	500	-0,303	-1,429	0,001	0,040	0,826	3167
GO0016887 ATPASE ACTIVITY	281	-0,312	-1,420	0,005	0,042	0,850	2326

GO SLIM Tr6	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
GO0005773 VACUOLE	62	0,671	2,681	0	0	0	2046
GO0005764 LYSOSOME	26	0,541	1,769	0,005	0,028	0,047	1612
GO0055085 TRANSMEMBRANE TRANSPORT	355	0,3	1,564	0	0,041	0,23	2539
GO0051604 PROTEIN MATURATION	43	0,416	1,543	0,028	0,044	0,273	1303
GO0003013 CIRCULATORY SYSTEM PROCESS	23	0,519	1,649	0,031	0,045	0,116	3091
GO0005578 PROTEINACEOUS EXTRACELLULAR MATRIX	55	0,406	1,565	0,014	0,048	0,229	2899

KEGG Tr2	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
03013 RNA TRANSPORT	96	-0,638	-2,502	0,000	0,000	0,000	2960
03030 DNA REPLICATION	28	-0,803	-2,491	0,000	0,000	0,000	1357
03008 RIBOSOME BIOGENESIS IN EUKARYOTES	50	-0,723	-2,473	0,000	0,000	0,000	1737
03020 RNA POLYMERASE	23	-0,812	-2,367	0,000	0,000	0,000	1142
03018 RNA DEGRADATION	43	-0,681	-2,333	0,000	0,000	0,000	2058
03040 SPLICEOSOME	85	-0,594	-2,312	0,000	0,000	0,000	2763
03430 MISMATCH REPAIR	15	-0,866	-2,306	0,000	0,000	0,000	941
00240 PYRIMIDINE METABOLISM	69	-0,619	-2,281	0,000	0,000	0,000	2816
03420 NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR	26	-0,714	-2,153	0,000	0,000	0,000	1979
03022 BASAL TRANSCRIPTION FACTORS	28	-0,663	-2,033	0,000	0,000	0,004	2834
03015 MRNA SURVEILLANCE PATHWAY	50	-0,557	-1,957	0,000	0,001	0,011	2938
03010 RIBOSOME	72	-0,462	-1,740	0,000	0,015	0,179	5451
04914 PROGESTERONE-MEDIATED OOCYTE MATURATION	30	-0,544	-1,731	0,009	0,016	0,196	182
04120 UBIQUITIN MEDIATED PROTEOLYSIS	64	-0,460	-1,684	0,003	0,025	0,318	2564
00230 PURINE METABOLISM	104	-0,409	-1,641	0,001	0,036	0,447	2816

KEGG Tr6	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX
04145 PHAGOSOME	55	0,620	2,443	0,000	0,000	0,000	2046
04142 LYSOSOME	61	0,466	1,902	0,000	0,014	0,038	2505
00562 INOSITOL PHOSPHATE METABOLISM	26	0,597	1,924	0,003	0,015	0,028	1581
04070 PHOSPHATIDYLINOSITOL SIGNALING SYSTEM	33	0,524	1,862	0,003	0,017	0,057	2465
00190 OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	39	0,491	1,774	0,005	0,030	0,129	963