



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



PEDECIBA
MEC-UDELAR

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CLEMENTE ESTABLE

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (PEDECIBA-Biología)

Rol de la guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) en la
percepción del oxígeno durante el desarrollo del cerebro
larvario de *Drosophila melanogaster*.
Caracterización de un biosensor de GMPc.

Lic. Ana Clara Gonzalez

Orientador:

Dr. Daniel Prieto

Co-orientador:

Dr. Rafael Cantera

Tribunal:

Presidente: Dra. Soledad Astrada

Vocales: Dra. Lucía Canclini

Dra. Romina Pagotto

Montevideo, Uruguay

2022

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
1.1 Importancia del oxígeno como regulador metabólico	7
1.2 Rol de la hipoxia en el desarrollo y diferenciación neural ...	9
1.3 Respuesta a hipoxia en el lóbulo óptico	12
1.4 Sistema traqueolar	13
1.5 La guanilato ciclasa soluble atípica como sensor molecular de O ₂	15
1.6 Biosensor de GMPC	16
2. Hipótesis y objetivos	20
2.1 Hipótesis	20
2.2 Objetivos	20
3. Materiales y métodos	21
3.1 Clonado sin restricción (<i>Restriction-free cloning</i>)	21
3.1.1 Generación de cebadores para generar la línea de células S2 CUTie2	23
3.1.2 Generación de cebadores para generar la mosca transgénica	23
3.1.3 PCR para el clonado sin restricción	23
3.1.4 Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i>	

quimiocompetentes	25
3.1.5 Controles	25
3.1.6 PCR de colonias	25
3.2 Línea celular S2 CUTie2	27
3.2.1 Medio de cultivo	27
3.2.2 Transfección transitoria de células S2	27
3.2.3 Generación de línea estable S2 CUTie2	28
3.2.4 Inducción de expresión del biosensor	28
3.2.5 Clasificación celular activada por fluorescencia	28
3.3 Generación de cepas transgénicas de <i>Drosophila</i>	
<i>melanogaster</i>	29
3.3.1 Obtención de las cepas UAS-CUTie2	29
3.3.2 Mantenimiento de cepas de <i>Drosophila</i>	
<i>melanogaster</i>	30
3.3.3 Uso del sistema UAS-GAL4	30
3.4 Citometría de flujo	32
3.4.1 Selección de filtros y láseres	32
3.4.2 Preparación de células S2	32
3.4.3 Preparación de cerebros de larvas de estadio 3	33
3.4.4 Estrategia de <i>gating</i> en R	33
3.5 Fluorimetría	39
3.5.1 Preparación de células S2	39
3.5.2 Preparación de cerebros larvarios para fluorimetría	39

3.5.3 Establecimiento de parámetros en el fluorímetro	40
3.5.4 Análisis en R	40
3.6 Microscopía confocal	42
3.6.1 Anticuerpos y marcaciones	42
3.6.2 Disección, fijación e inmunohistoquímica	42
3.6.3 Procesamiento de imágenes	43
3.6.4 Análisis de intensidad de fluorescencia en R	44
4. Resultados	47
4.1 Expresión de CUTie2 en células S2	47
4.1.1 Secuenciación de las construcciones realizadas	47
4.1.2 Enriquecimiento por clasificación celular	50
4.1.3 Análisis por citometría de flujo	54
4.1.4 Análisis por fluorimetría	66
4.1.5 Análisis por microscopía confocal	69
4.2 Expresión de CUTie2 en <i>Drosophila melanogaster</i>	71
4.2.1 Caracterización fenotípica de CUTie2	71
4.2.2 Cruce para dirigir el biosensor a neuroblastos	76
4.2.3 Análisis del efecto de la expresión del sensor CUTie2 en homocigosis y heterocigosis	77
4.2.4 Análisis del efecto de la temperatura en la expresión del transgén	79
4.2.5 Cruce de moscas UAS-CUTie2 con diferentes <i>drivers</i>	85

4.2.6 Citometría de flujo a partir de cerebros disgregados	87
5. Discusión	91
5.1 Estabilidad y expresión del biosensor CUTie2 en células S2	91
5.2 Expresión y estabilidad del biosensor CUTie2 en la mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	95
5.3 Análisis de FRET <i>in vitro</i>	99
5.4 Conclusión y perspectiva a futuro	102
5.5 Agradecimientos	104
ANEXO	105
Anexo I. Cebadores utilizados para el clonado sin restricción	105
Anexo II. Secuencias y mapas de vectores utilizados	106
Anexo III. Alineamientos	113
Bibliografía	115

Resumen

El control de la proliferación y la diferenciación celular es de gran interés no sólo para comprender los procesos del desarrollo, sino también para dilucidar mecanismos involucrados en patologías como el cáncer. En los insectos el oxígeno llega a los diversos tejidos a través de las traqueolas del sistema respiratorio. Durante el desarrollo, el cerebro larval de *Drosophila melanogaster* se encuentra altamente traqueolado en las zonas donde residen las neuronas diferenciadas. Sin embargo, lo opuesto ocurre en los lóbulos ópticos que son zonas con alta tasa proliferativa. Dado que éstos no presentan características de activación de la vía canónica de respuesta a la hipoxia HIF/Sima, planteamos la hipótesis de que la guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) actúa como un sensor de oxígeno molecular en la zona de proliferación del cerebro, elevando los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en condiciones de hipoxia. Con el fin de investigar esa posibilidad, decidimos generar una cepa transgénica de *Drosophila melanogaster* y células Schneider-2 que expresaran un biosensor de GMPc. Logramos generar cepas estables tanto de células como de moscas transgénicas que expresan el biosensor de GMPc CUTie2, basado en el sistema de Transferencia de Energía por Resonancia de Förster (FRET) para realizar ensayos *ex vivo* e *in vitro*. Los ensayos mostraron la presencia y localización subcelular de los fluoróforos que componen el biosensor por microscopía confocal, fluorimetría y citometría de flujo. También analizamos el funcionamiento *in vitro* del mismo luego del agregado de GMPc, pudiendo observar un aumento de la fluorescencia del aceptor. También demostramos que es posible dirigir la expresión del biosensor a tipos específicos de células o tejidos, por medio del sistema UAS-GAL4. En conclusión, generamos el primer organismo multicelular transgénico con la construcción del biosensor CUTie2, y logramos demostrar su funcionamiento *in vitro* y *ex vivo* tanto en células disgregadas como en cerebros larvales de *Drosophila melanogaster*. Ésta mosca permitirá a futuro hacer estudios sobre los niveles de GMPc, en cualquier tipo celular al que sea dirigido, y realizar ensayos *in vivo* en larvas o moscas.

Abstract

The control of cell proliferation and differentiation is of great interest not only to understand developmental processes, but also to elucidate mechanisms involved in pathologies such as cancer. In insects, oxygen reaches the various tissues through the tracheoles of the respiratory system. During development the larval brain of *Drosophila melanogaster* is highly tracheolated in the areas where differentiated neurons reside. However, the opposite occurs in the optic lobes where there is a high rate of proliferation. Given that the optic lobes do not present the activation landmarks of the canonical HIF/Sima pathway in response to hypoxia, we hypothesize that an alternative oxygen sensor is active in the brain. Our hypothesis is that atypical soluble guanylate cyclase (asGC) acts as a molecular oxygen sensor in the proliferative zone of the brain, raising the levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) under hypoxic conditions. Therefore, we decided to generate a transgenic strains of Schneider cells and *Drosophila melanogaster* flies that expresses a cGMP biosensor CUTie2, based on Förster Resonance Energy Transfer (FRET) and carried out tests *ex vivo* and *in vitro*. We demonstrated the presence and subcellular localization of the fluorophores that make up the biosensor by confocal microscopy, fluorometry and flow cytometry. We also analyzed its performance *in vitro* after the addition of cGMP, observing an increase in the fluorescence of the acceptor. We carried out several crosses to direct the expression of the biosensor to different cell types through the UAS-GAL4 system, demonstrating the functioning of this system in the constructed strain. In conclusion, we generated the first transgenic organism with the construction of the CUTie2 biosensor, which was non-lethal for the fly and were able to demonstrate its operation *in vitro* and *ex vivo* both in disaggregated brain cells and in larval brains of *Drosophila melanogaster*. This fly stock will allow in the future to carry out studies on the levels of cGMP, in any cell type to which it is directed, and to carry out tests *in vivo* in larvae or flies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del oxígeno como regulador metabólico

El oxígeno es un metabolito esencial para la mayoría de los seres vivos. Es un agente altamente oxidante y tiende a producir la oxidación de otras moléculas, generando especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Se trata de iones de O_2 y moléculas, que poseen un electrón libre que los vuelve muy reactivos (Catling et al., 2005, Koch and Britton, 2007, 2008). Estas moléculas juegan papeles importantes tanto en la fisiología como en la fisiopatología de la vida aeróbica (Li and Trush, 2016).

Las ROS y los agentes antioxidantes también funcionan como moléculas de señalización cruciales en la respuesta al estrés oxidativo. Bajo algunas condiciones patológicas tales como lesión cerebral traumática, daño por isquemia y reperfusión, e hipoxia en el tumor, la acumulación relativa de ROS, podría romper la homeostasis celular, dando como resultado estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. El estrés oxidativo también puede promover la autofagia, que a su vez puede contribuir a reducir los daños oxidativos al fagocitar y degradar la sustancia oxidada (Li et al., 2015).

La concentración del oxígeno en la atmósfera resulta tóxica para las células. En 1952, Shooter y Gey, analizando cultivos celulares, observaron que el nivel de oxígeno ambiental era tóxico para las células (Shooter and Gey, 1952). Posteriormente, otro grupo realizó ensayos en cultivos de embriones y observó que los tejidos mostraban una tensión de oxígeno mucho menor (Mitchell and Yochim, 1968). Los organismos debieron evolucionar sistemas que permitieran la regulación de la concentración interna del transporte, dosificación y concentración del oxígeno (Zinchuk and Borisiuk, 1999).

Diversos estudios han demostrado que el cerebro es de los órganos con mayor actividad metabólica de todo el organismo, lo que lleva a un mayor consumo de O_2 por parte de éste y por ende un mayor metabolismo del adenosín trifosfato (ATP; Hoge and Pike, 2001). Se

observó que el flujo sanguíneo cerebral aumentaba localmente más de un 50% durante una estimulación intensa (Fox y Raichle, 1984, 1986; Fox et al., 1986, Posner et al.,1988) y que esto podría ser el resultado de cambios en el consumo metabólico cerebral de oxígeno (Hoge and Pike, 2001).

1.2 Rol de la hipoxia en el desarrollo y diferenciación neural

Durante el desarrollo se producen en el organismo nichos hipóxicos donde residen las células madre, se regula la diferenciación celular y se produce la estimulación de varios factores inducibles por hipoxia (Simon and Keith, 2008). Estos nichos son compartimientos anatómicos que contienen componentes celulares y acelulares que integran señales sistémicas y locales que regulan la biología de las células madre (Jones and Wagers, 2008; Li and Xie, 2005; Scadden, 2006; Yin and Li, 2006). Este microambiente está compuesto por células, vasos sanguíneos, glicoproteínas de matriz y el espacio tridimensional que se forma a partir de ellas (Scadden, 2006). Por medio de la manipulación experimental de los niveles de O_2 se demostró que las tensiones más bajas influyen positivamente en la biología de las células madre (Eliasson y Jonsson, 2010; Panchision, 2009; Silvan et al., 2009).

Las células madre neurales (NSC) forman parte de la cascada de eventos de la neurogénesis tanto embrionaria como adulta, su actividad y destino están estrictamente regulados por su entorno o nicho local (Engler et al., 2018). Varios estudios han demostrado que los niveles de O_2 pueden influir en estos nichos, promoviendo el desarrollo y diferenciación a determinados tipos celulares o inhibiendo otros (Simon and Keith, 2008).

En tejidos adultos existen diferentes niveles en la tensión de oxígeno que difieren en gran medida de la tensión de oxígeno ambiental inhalado, que ronda el 21% (160mm Hg) (Figura 1) (Mohyeldin et al., 2010). Hay diversos procesos que regulan la homeostasis del O_2 en el organismo, ya que las condiciones fisiológicas de normoxia para las células es de 2 a 9% de O_2 (14,4 a 64,8mm Hg) mientras que en los nichos hipóxicos ronda el 1% de O_2 (7,2mm Hg) (Simon and Keith, 2008).

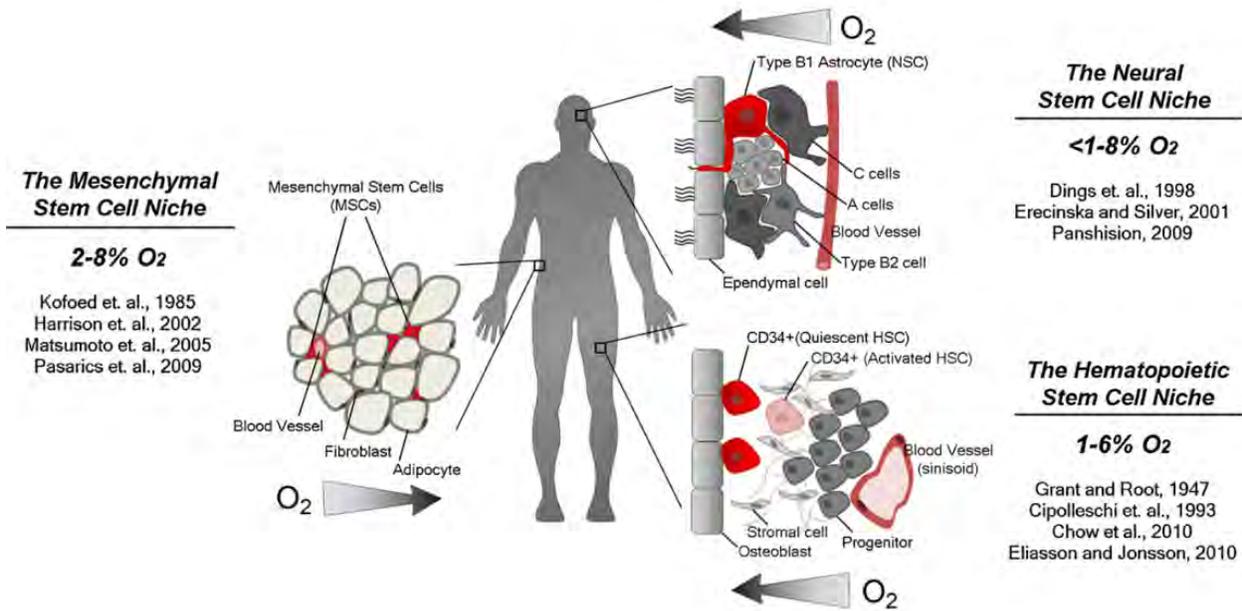


Figura 1: Concentración de oxígeno en diversos nichos de células madre: Modelo esquemático que muestra la tensión de oxígeno para las células madre hematopoyéticas, mesenquimales y neurales en sus respectivos nichos: la médula ósea, el tejido adiposo y la zona subventricular del cerebro, respectivamente (Extraído de Mohyeldin et al., 2010).

Existen varios mecanismos que regulan los niveles de oxígeno en el organismo. Sin embargo, el mecanismo molecular para la percepción de oxígeno más estudiado es el que se basa en el factor inducible por hipoxia (HIF) (Semenza, 2012), un heterodímero formado por las proteínas HIF1- α y HIF1- β . Se ha demostrado que la sobreexpresión de HIF1- α en embriones transgénicos resulta en letalidad embrionaria, mientras que la sobreexpresión de HIF1- β prolonga significativamente el tiempo de recuperación de la mosca tras ser sometida a un estupor anóxico de 5 minutos (Ma and Haddad, 1999) provocando un aumento de su actividad transcripcional a medida que disminuye la concentración celular de O₂ (Semenza, 2012).

En los mamíferos, la embriogénesis está altamente influenciada por el gradiente de oxígeno. Esto se evidenció al medir las tensiones de oxígeno en los tejidos endometriales y trofoblásticos durante el embarazo temprano (Mitchell y Yochim, 1968; Rodesch et al., 1992).

In vitro, la hipoxia puede promover un estado indiferenciado en las células madre de la cresta neural y las células madre neurales (Morrison et al., 2000). También se han realizado observaciones sobre una mejora en la supervivencia y proliferación de NSC en condiciones de hipoxia leve (Chen et al., 2007; Morrison et al., 2000; Pistollato et al., 2007; Studer et al., 2000).

En otros ensayos sobre neurogénesis se determinó la importancia de *Notch* como factor de diferenciación celular, siendo éste quien produce la inhibición de la diferenciación de células precursoras neuronales, hematopoyéticas y miogénicas (de la Pompa et al., 1997), influyendo sobre células adyacentes que expresan su receptor *Delta*. A su vez, también se demostró una correlación entre los niveles de O₂ y la expresión de *Notch*, activando la expresión río abajo y bloqueando la diferenciación neuronal y miogénica, debido a la interacción de HIF1- α con *Notch* (Gustafsson et al., 2005).

Los niveles de hipoxia también controlan los niveles del regulador *Wnt* tanto en *Drosophila melanogaster* como en mamíferos. La unión de HIF- α con la β -catenina provoca la detención del ciclo celular, lo que inhibe la actividad transcripcional (Kaidi et al., 2007).

1.3 Respuesta a hipoxia en el lóbulo óptico

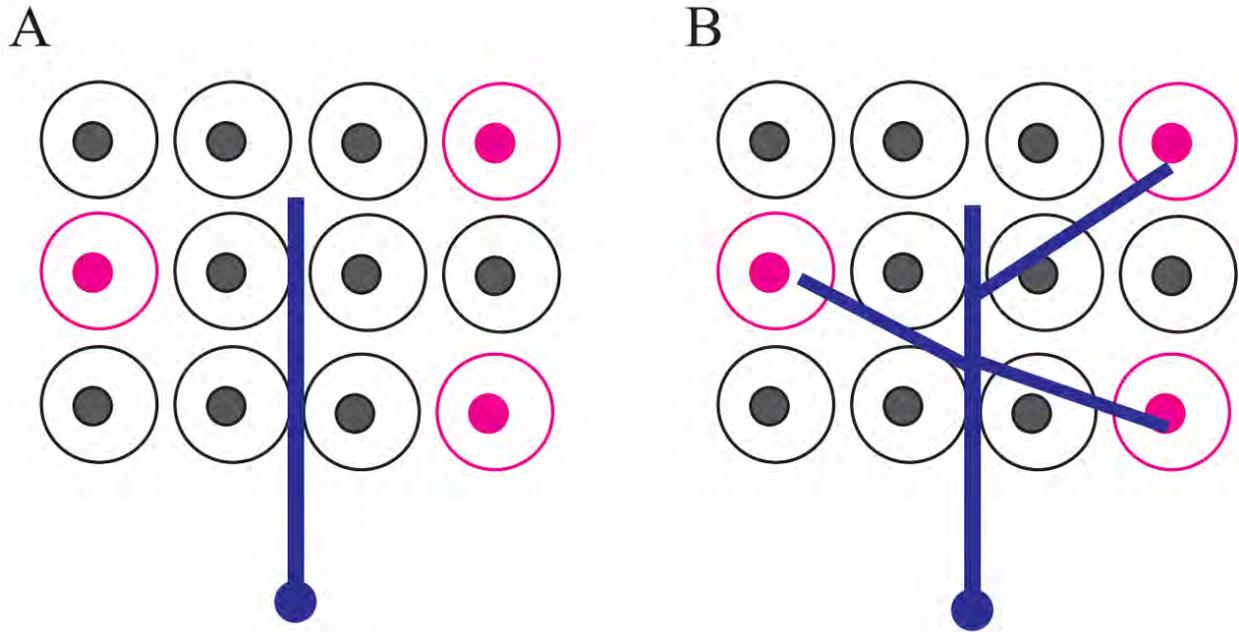
Durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* el cerebro se forma en pocas horas, permitiendo que la larva eclosiona con un cerebro funcional. Sin embargo, en los siguientes días de desarrollo larval, éste sigue teniendo grandes poblaciones de células proliferantes. La parte del cerebro larvario donde residen las neuronas diferenciadas se denomina cerebro central. A cada lado del mismo existe una gran región proliferativa llamada lóbulo óptico (OL, *optic lobe*). El OL se origina a partir de un neuroepitelio (NE), cuya gran actividad mitótica explica el rápido crecimiento del cerebro larvario (Hofbauer y Campos-Ortega, 1990). El NE prolifera por divisiones simétricas de las células neuroepiteliales hasta que se diferencian en neuroblastos (NB). Estos se dividen de manera asimétrica produciendo cada vez un NB y una célula madre ganglionar que se divide una sola vez simétricamente (Hofbauer y Campos-Ortega, 1990; Egger et al., 2007, 2008). Posteriormente, durante la metamorfosis, estas células comenzarán su diferenciación terminal (glial o neuronal) simultáneamente (Melnattur and Lee, 2011; Ngo et al., 2017).

Nuestro equipo de investigación observó que en la larva, a diferencia del cerebro central que recibe una gran cantidad de traqueolas tal como es de esperarse en un tejido con alto metabolismo, el OL recibe muy pocas traqueolas (Misra et al., 2017). Esta relativa escasez de tubos respiratorios sugería que el OL podría ser hipóxico en relación al cerebro central. Sin embargo, se observó que el OL no exhibe ninguno de los tres síntomas clave de activación de la vía tradicional de HIF/Sima: acumulación nuclear de HIF/Sima, expresión de lactato deshidrogenasa y crecimiento traqueolar (Misra et al., 2017; Baccino-Calace et al., 2020).

1.4 Sistema traqueolar

Como en todos los insectos, el sistema respiratorio de *Drosophila melanogaster* es una red tubular que se encarga de suministrar oxígeno a tejidos internos por difusión a lo largo de grandes tubos (traqueas) que se subdividen hasta formar capilares (traqueolas) donde ocurre el intercambio de gases (Uv et al., 2003). Jarecki y sus colegas han demostrado que en la larva de *Drosophila* el crecimiento de las traqueolas está guiado por una señal local (secreción de la proteína *Branchless*) emitida desde células que se encuentran privadas de O₂ y que atrae traqueolas, que por su parte expresan *Breathless*, que funciona como receptor de *Branchless* (Sutherland et al., 1996; Jarecki et al., 1999).

Estudios realizados sobre Bnl, que es un homólogo del factor de crecimiento de fibroblastos, y sobre su receptor Btl, demostraron que la expresión errónea de Bnl da como resultado un defecto traqueolar que provoca la muerte de las larvas (Stahl et al., 2007).



*Figura 2: La traqueogénesis durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* es regulada por niveles locales de O_2 y la interacción entre el receptor *Breathless*, expresado en las traqueolas y su ligando *Branchless*, secretado por células con falta de oxígeno.*

*A) Las células en magenta son células donde bajos niveles de O_2 inducen la expresión de *Branchless*; B) Respuesta del sistema traqueal ante la detección de señal celular por falta de O_2 , produciendo la extensión de ramas traqueolares. (Adaptado de (Jarecki et al., 1999))*

1.5 La guanilato ciclasa soluble atípica como sensor molecular de O₂

La respuesta tradicional a la hipoxia incluye acumulación nuclear de HIF/Sima, sobreexpresión de lactato deshidrogenasa y crecimiento de traqueolas. (Lavista-Llanos et al., 2002; Centanin et al., 2008).

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que durante el desarrollo larval en el lóbulo óptico no están presentes estas características típicas de la respuesta tradicional a la hipoxia asociadas a la vía asociadas a la vía HIF/Sima. Solo unas pocas células acumulan Sima en su núcleo, no existe expresión preponderante de lactato deshidrogenasa ni se detecta aumento de la traqueolación (Baccino-Calace et al., 2020). Esto sugiere la existencia de una vía alternativa en el cerebro en desarrollo.

Se ha demostrado tanto para *Drosophila melanogaster* como para otros invertebrados como *Anopheles gambiae*, *Manduca sexta* y *Caenorhabditis elegans*, que mediante la unión a un grupo hemo, las subunidades de guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) funcionan como un sensor molecular de oxígeno por eso su denominación de atípica, ya que las guanilato ciclasas sensan comunes NO (Morton, 2004). La activación de la asGC produce un aumento de GMPc de hasta 50 veces más que en células incubadas en ausencia de oxígeno frente a concentraciones atmosféricas normales (Morton & Vermehren, 2007).

Un primer estudio del patrón de expresión espacial de las asGC basado en hibridación *in situ*, indicó su expresión en el cerebro larvario (Langlais et al., 2004). Cuando se usó densitometría para reanalizar esos resultados, se reveló un patrón de enriquecimiento de mRNA en el lóbulo óptico con respecto al cerebro central (Prieto, datos no publicados). Este hallazgo sugirió que las asGC podrían actuar en la percepción del oxígeno dentro de las zonas proliferativas del cerebro de *D. melanogaster*.

1.6 Biosensor de GMPc

Dados estos antecedentes y la importancia de estudiar la vía de respuesta a la hipoxia en el OL, es que encontramos importante la utilización de un biosensor de GMPc.

El biosensor de GMPc utilizado en la presente tesis fue desarrollado por el grupo del Dr. Sergio Pantano en el Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares del Institut Pasteur de Montevideo. Este sensor, denominado CUTie2, se basa en el sistema de Transferencia de Energía por Resonancia de Förster (FRET). FRET es un fenómeno basado en la transferencia de energía entre dos fluoróforos, en este caso el fluoróforo aceptor es la YFP y el fluoróforo dador es la CFP. Una vez excitado el fluoróforo donante, le transfiere energía a un fluoróforo aceptor a través del acoplamiento por resonancia. La eficiencia de esta transferencia de energía depende en gran medida de la distancia entre los fluoróforos, así como de la superposición de los espectros de emisión y excitación de los fluoróforos donantes y aceptores (Deal et al., 2020). El biosensor CUTie2 contiene un sitio de unión de la proteína quinasa GI (PKGI) en una región desplegada que funciona como *linker* y mantiene apartados los dos fluoróforos a una distancia que no permite el efecto FRET. Al unirse al ligando (GMPc) el *linker* experimenta un cambio alostérico que permite el acercamiento de los módulos fluorescentes permitiendo la transferencia de energía por resonancia. Así, el sensor CUTie2 es altamente específico y sensible al GMPc en ensayos *in vitro* (Klein et al., 2021).

La caracterización bioquímica del biosensor CUTie2 mostró que el módulo de unión a GMPc mantiene prácticamente la misma afinidad y selectividad por su ligando que la proteína de longitud completa. La arquitectura del biosensor está integrada por un par de fluoróforos adecuados para FRET y su vinculación a dominios convenientes del módulo detector (Figura 3) La secuencia y mapa de biosensor se encuentran en el ANEXO II.

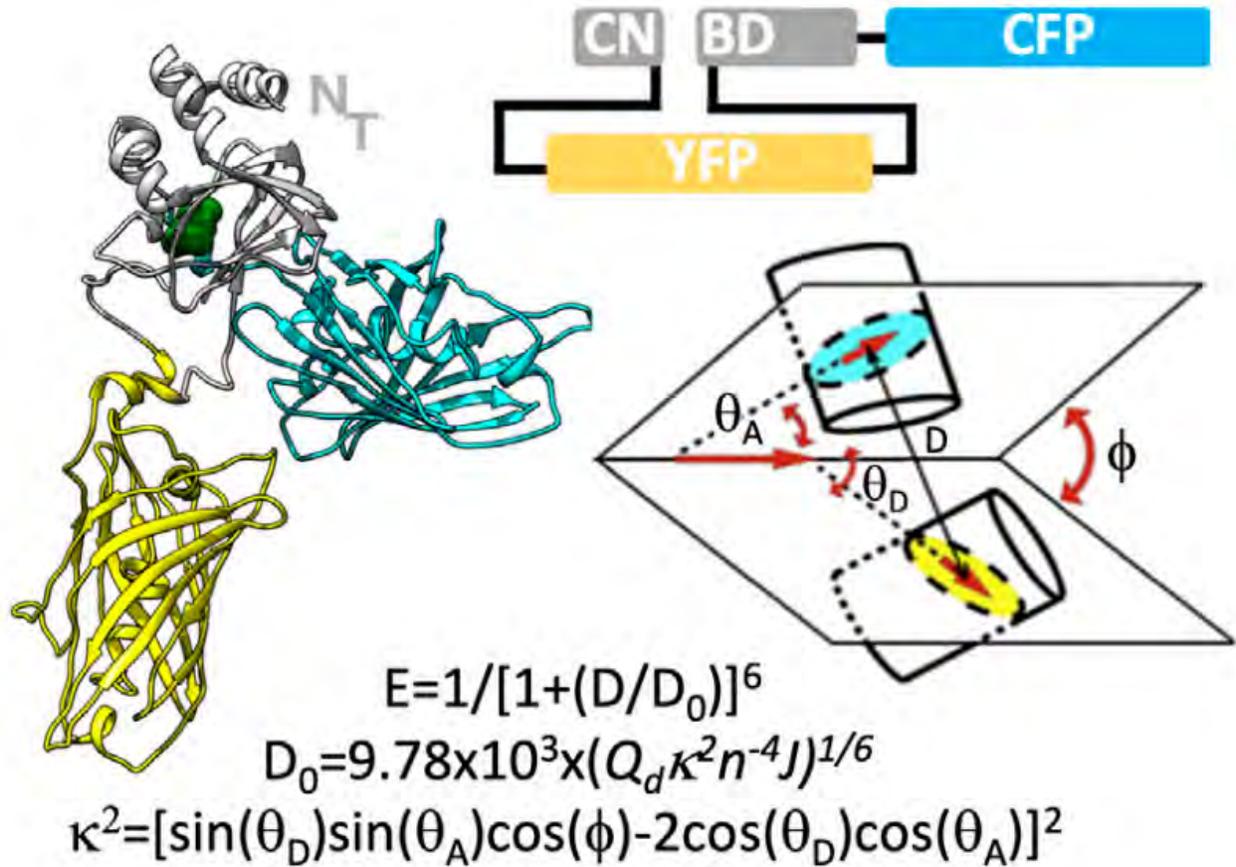


Figura 3: Representación esquemática del biosensor CUTie2.

El extremo N-terminal permanece libre para poder realizar construcciones de fusión con dominios de direccionamiento. En la parte inferior se muestran las ecuaciones y factores geométricos utilizados para calcular la señal de FRET (Extraído de Klein et al., 2021).

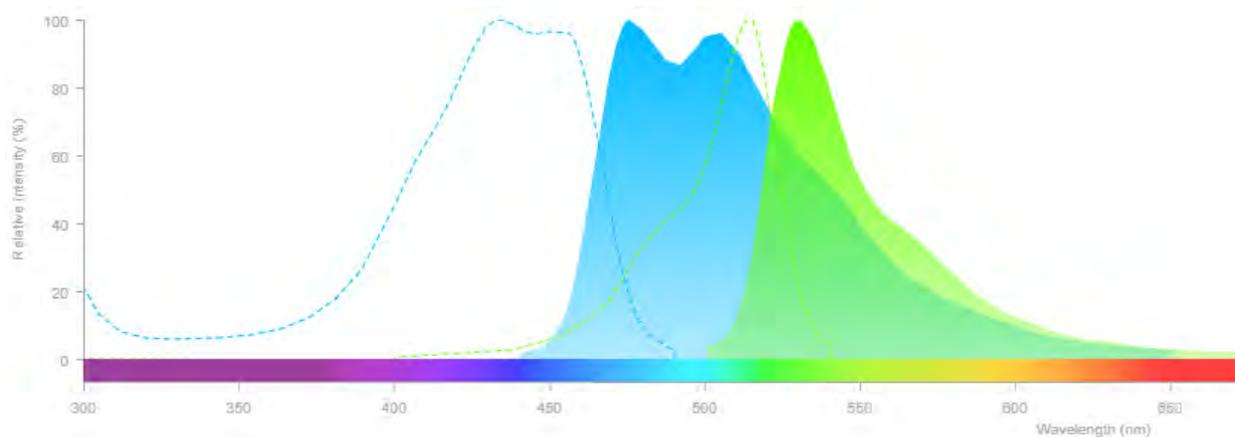


Figura 4: Espectro de absorción y emisión de CFP e YFP.

Se observa en celeste punteado el espectro de absorción de CFP y en pintado celeste el espectro de emisión de CFP. En verde punteado el espectro de absorción de YFP y en pintado verde el espectro de emisión de YFP.

Estudios previos demostraron que en células de mamíferos la producción de GMPc es regulada por la unión del óxido nítrico (NO) a las guanilato ciclasas solubles (típicas), mientras que su degradación está estrictamente controlada por ocho de las once isoformas de fosfodiesterasas presentes (Friebe et al., 2020).

Ensayos *in vitro* mostraron que el sensor CUTie2 desarrollado *in silico* mantiene una afinidad casi nativa ($EC_{50} = 27nM$) y una selectividad de más de dos órdenes de magnitud para GMPc frente a AMPc, alcanzando un cambio máximo de FRET del 26% (Klein et al., 2021).

Dados los resultados prometedores de los ensayos *in vitro* realizados sobre este biosensor (Klein et al., 2021), y nuestro interés en determinar si la asGC tiene un rol en la respuesta a hipoxia en el lóbulo óptico durante el desarrollo del cerebro larvario de *Drosophila melanogaster*, vía que tiene como segundo mensajero el GMPc, decidimos generar moscas transgénicas que expresen este biosensor. Esto se convirtió en el objetivo principal de esta tesis de maestría.

La emergencia sanitaria provocada por la pandemia de COVID-19, que coincidió con el inicio de esta tesis y la consecuente demora en la instalación del microscopio de dos

fotones, nos obligó a cancelar el objetivo del proyecto original que proponía ensayos de medición de GMPc *in vivo* en larvas transgénicas frente a distintas concentraciones de O₂. Complementariamente, introdujimos un nuevo objetivo, menos ambicioso, consistente en la generación de una línea estable de células Schneider-2 (S2) de *D. melanogaster* que contuviera y expresara el biosensor de GMPc CUTie2 para la realización de ensayos *in vitro*.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) actúa como un sensor de oxígeno molecular en la zona proliferativa del cerebro, elevando los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en condiciones de hipoxia.

2.2 OBJETIVOS

En el presente trabajo nos propusimos como objetivo principal, generar una cepa transgénica de moscas *Drosophila melanogaster* que expresen el biosensor de GMPc y realizar una caracterización preliminar de su funcionamiento *in vitro* y *ex vivo*.

Específicamente nos propusimos llevar a cabo los siguientes objetivos:

1. Realización de las construcciones moleculares necesarias para la generación de la cepa transgénica de *Drosophila melanogaster*.
2. Generación de una línea estable de células S2 de *Drosophila melanogaster* que contenga y exprese el biosensor de GMPc, permitiendo el análisis *in vitro* del funcionamiento del biosensor.
3. Generación de una cepa transgénica de *Drosophila melanogaster* conteniendo y expresando la construcción del biosensor de GMPc CUTie2.
4. Caracterización *in vitro* y *ex vivo* del biosensor de GMPc.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El inicio de esta tesis, que conlleva los ensayos referidos a las construcciones génicas tanto para generar las moscas transgénicas UAS-CUTie2 y la línea celular S2 CUTie2, y todos los ensayos relacionados con dicha línea celular, los llevé a cabo durante mi pasantía en el Institut Pasteur de Montevideo bajo la tutoría de la Dra. Cecilia Abreu, quién me enseñó y capacitó para culminar esta primera parte de mi tesis.

3.1 Clonado sin restricción (*Restriction-free cloning*)

Para cumplir el primer objetivo específico, elegimos el método de clonado sin restricción (*RF-cloning*), que permite la inserción de la secuencia de interés en el plásmido necesario de manera simple, sin necesidad de usar enzimas de restricción (van den Ent and Löwe, 2006) (Figura 5).

La técnica consta de la amplificación del fragmento de interés durante una primer ronda de PCR lineal generando el mega-cebador necesario para la segunda ronda de PCR sobre el plásmido de destino. Se diseñan los cebadores para que una parte hibride con el fragmento de interés y otra parte lo haga con el vector de destino. Las ventajas de esta técnica son: insertar genes completos sin la introducción de residuos no deseados, ausencia de alteraciones en la proteína final y sencillo diseño de los cebadores (van den Ent and Löwe, 2006).

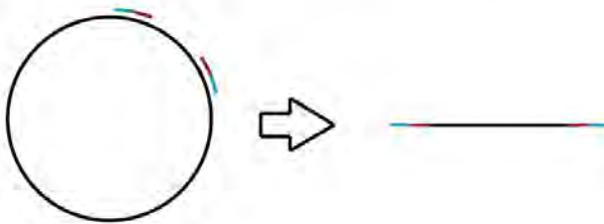
Con este método realicé dos construcciones, una para generar la línea estable de células S2 conteniendo el biosensor y otra para la generación de la mosca transgénica conteniendo el biosensor bajo el control de un elemento UAS. Las secuencias de los cebadores y mega-cebadores se encuentran disponibles en mi repositorio de GitHub (<https://github.com/AnaClGonzalez>).

1. Generación de primers forward (Fw) y reverse (Rv)

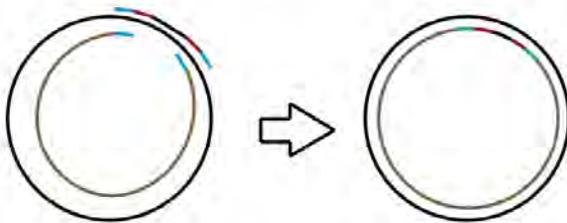


- Zona que hibrida en el fragmento de interés
- Zona que hibrida en el vector

2. 1er PCR - Generación de *megaprimer*



3. 2da PCR - Clonado en vector de interés



4. 3ra PCR - Eliminación de vector parental

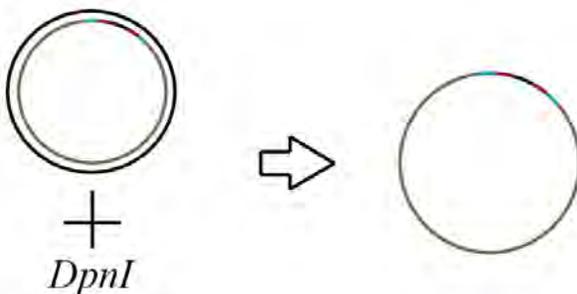


Figura 5: Diagrama de flujo de trabajo de la técnica de clonado sin restricción.

Se detallan los pasos que componen el sistema de clonado sin restricción utilizado. 1) Diseño de cebadores necesarios para amplificar el fragmento de interés y generar el mega-cebador;

2) Primer ronda de PCR con amplificación lineal para generar el mega-cebador; 3) Segunda ronda de PCR para amplificar el fragmento de interés en el plásmido de destino; 4) Incubación con *DpnI* para eliminar el vector parental metilado.

3.1.1 Generación de cebadores para generar la línea de células S2 CUTie2

Para la primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR) generé los cebadores “pMT_GMPc_*Fw*” y “pMT_GMPc_*Rv*” cuya secuencia se encuentra en el anexo (ANEXO I). En el caso del cebador *Reverse* añadí un codón *stop* al final de la secuencia del biosensor y un sitio de corte con la enzima *XhoI*. En el caso del *Forward* añadí un sitio de corte para la enzima *EcoRI* como precaución, porque en caso de que la técnica no funcionara, esto me permitiría hacer un clonado por corte y ligación. Una característica particular de estos cebadores es que tienen en su secuencia un sitio que hibrida en el biosensor, y otro que es capaz de aparearse con el vector en el cual se va a insertar luego la secuencia para generar el mega-cebador necesario para la segunda PCR.

3.1.2 Generación de cebadores para generar la mosca transgénica

En este caso generé los cebadores “pUASTattB_GMPc_*Fw*” y “pUASTattB_GMPc_*Rv*”, cuyas secuencias se encuentran en Anexo (ANEXO I). El elemento UAS es una secuencia de ADN de levadura que permite activar la expresión del transgén en presencia del factor de transcripción GAL4 (ver sección 3.3.3). Aquí no añadí secuencias de corte con enzimas de restricción, pero si agregué el codón *stop* al final de la secuencia del biosensor en el cebador reverso.

3.1.3 PCR para el clonado sin restricción

En la primera etapa de PCR utilicé el vector pcDNA 3.1 GMPc YC (Klein et al., 2021) para la construcción de la línea S2 y el vector pUAST para la construcción de la mosca transgénica. En ambos casos utilicé los vectores en una concentración final de 50mg/ml.

El vector pUAST contiene la secuencia de levadura *Upstream Activating Sequence* (UAS), que permite activar la transcripción del transgén selectivamente por interacción con la proteína GAL4 (Ver Sección 3.3.3). El vector contiene el gen miniWhite (mW) para la selección positiva de las moscas transgénicas, la secuencia correspondiente a la cola de poli-A para la proteína de interés y también la secuencia loxP, para su recombinación en la mosca. A su vez, contiene resistencia a ampicilina, los orígenes de replicación necesarios para su expresión y selección negativa en bacterias.

Para la reacción de PCR utilicé la enzima Phusion DNA Pol que tiene actividad exonucleasa y su correspondiente búfer (TermoFisher™), los cebadores citados en el apartado anterior y el vector conteniendo el fragmento de interés. Esta PCR contó con un ciclo inicial de 1 minuto a 98°C, seguido por 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 58°C y 2 minutos a 72°C, para finalizar añadí 5 minutos de elongación adicional.

Corrí el producto de la PCR en un gel de agarosa 1% con el agregado de bromuro de etidio y luego purifiqué la banda correspondiente al producto de interés (2000 pares de bases en ambos casos) con PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™), obteniendo una concentración de 15,5ng/ μ l en el caso del mega-cebador para el vector pMT y de 15ng/ μ l en el caso del vector pUASTattB. Ambas concentraciones fueron evaluadas por espectrofotometría en gota (nanodrop).

En una segunda PCR utilicé el mega-cebador generado, y como molde utilicé el plásmido pMT a una concentración final de 60ng/ μ l; para el caso del vector pUASTattB utilicé una concentración final de 53,3ng/ μ l, y el mega-cebador generado para este vector. En esta PCR utilicé un ciclo inicial de 3 minutos a 98°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 98°C, 30 segundos a 61°C y 6 minutos a 72°C, para finalizar añadí 10 minutos de elongación adicional.

En una siguiente etapa generé un nuevo preparado con 10 μ l del producto de esta segunda PCR, búfer DpnI y la enzima *DpnI*. Realicé un ciclo de 90 minutos a 37°C y 20 minutos a 80°C para inactivar la enzima. Este paso es necesario para digerir el plásmido parental metilado.

3.1.4 Transformación de bacterias *Escherichia coli* quimiocompetentes

Con el producto de la digestión con *DpnI* transformé una cepa de *E. coli* quimiocompetentes preparadas con protocolo TSS (Chung et al., 1989). Utilicé 50 μ l de la cepa y añadí 5 μ l del producto de la etapa anterior para cada vector.

Para la transformación utilicé un protocolo tradicional, incubando en hielo 20 min luego del agregado de la mezcla de digestión, seguido de un choque térmico de 90 segundos a 42°C seguido inmediatamente por incubación en hielo por 2 minutos, posteriormente agregué 700 μ l de medio LB y dejé en estufa con agitación por una hora, luego plaqué las bacterias en medio LB con ampicilina a una concentración de 0,1mg/ml. Utilicé dos placas, sembrando 200 μ l en una y el resto de la transformación en otra, para evitar que se desarrollaran demasiadas colonias en caso de que la transformación tuviera alta eficiencia.

3.1.5 Controles

Como control del paso de digestión con *DpnI* añadí al ciclo un tubo con el mismo preparado, pero en vez del producto de la segunda PCR agregué como molde 10 μ l del vector pMT sin el biosensor. Posteriormente también transformé *E. coli* quimiocompetentes con este preparado control, con el cual no debía obtener colonias (control de digestión del plásmido utilizado como molde).

3.1.6 PCR de colonias

Para seleccionar las colonias positivas realicé una PCR de colonias utilizando 10 de cada transformación. En el preparado agregué búfer de Taq Polimerasa, MgCl₂, dNTPs, Taq Polimerasa y como cebadores utilicé los de la primer PCR del clonado libre de restricción correspondientes a cada construcción.

El ciclo de PCR utilizado fue de 10 minutos iniciales a 94°C, seguido por 33 ciclos de 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 2 minutos a 72°C, seguido por una extensión adicional de 15 minutos a 72°C. Dejé crecer una colonia positiva de cada construcción en 10ml de medio LB líquido con ampicilina 0,1mg/ml a 37°C en agitación *overnight*. Una parte se guardó a

-80°C y con el resto realicé una midiprep con el kit PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen™). Luego cuantifiqué midiendo la absorbancia 260nm en nanodrop (DeNovix DS-11), obteniendo una concentración de 871,5ng/μl para la construcción pMT_GMPc_YC y 412ng/μl para la construcción pUASTattB_GMPc_YC.

3.2 Línea celular S2 CUTie2

Para la transfección de las células S2 utilicé el vector pCoPURO, que contiene el gen que confiere resistencia al antibiótico puromicina (Iwaki et al., 2003) y permite la selección de células positivas. Co-transfecté con el vector pMT conteniendo la secuencia del biosensor de GMPc. Los detalles de ambos vectores están en el anexo II.

El vector pMT utilizado contiene la señal BiP de translocación al retículo endoplásmico, un promotor de metalotioneína (MT) inducible por metales, la señal de poli-A para la proteína de interés además de los tags V5 y 6xHis. También contiene resistencia a ampicilina para su clonado en bacterias, el origen de replicación y un sitio de múltiple clonado (SMC).

3.2.1 Medio de cultivo

Las células S2 son usadas para la expresión de proteínas y provienen de células aisladas de embriones de *Drosophila* (Schneider, 1972). Para su mantenimiento utilicé el medio *Schneider* (Echalier, 1997) de ThermoFisher™ suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Como estas células provienen de un insecto, se incuban a 28°C, para lo que utilicé una estufa de Thermo Scientific™.

3.2.2 Transfección transitoria de células S2

Una vez descongeladas las mantuve en estufa a 25°C hasta que llegaran a una concentración de 5×10^6 células/ml para poder transfectarlas con el sistema de lipofección Effectene (Qia-gen), que utiliza lípidos no liposomales para la transfección de ADN.

Para la co-transfección utilicé el vector pCo-PURO a una concentración final de $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y el vector pMT_GMPc_YC a $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. A la mezcla le agregué *Effectene* búfer e incubé 5 minutos a temperatura ambiente, luego agregué $20 \mu\text{l}$ de *Effectene Transfer Reagent* y volví a incubar 15 minutos a temperatura ambiente. En cuanto a las células, retiré el medio condicionado y lo guardé para utilizarlo después. Las resuspendí en 4ml de medio *Schneider* y agregué 1ml de la mezcla de transfección, gota a gota sobre las células. Las incubé 1 día a 28°C en el medio con la mezcla. Al día siguiente removí el medio de transfección, agregué

4ml de medio nuevo más 1ml del medio guardado previo a la transfección y las volví a colocar en el mismo frasco.

3.2.3 Generación de línea estable S2 CUTie2

Realicé una segunda co-transfección con el vector pCo-PURO con las mismas concentraciones que usé para la expresión transitoria, utilizando el medio *Schneider* (Echalier, 1997) suplementado con 10% de SFB y antibiótico puromicina (Invitrogen) a una concentración final de 10ug/ml para selección de células transfectadas positivas.

3.2.4 Inducción de expresión del biosensor

Tanto para inducir la expresión transitoria del biosensor en las células S2 como en la línea estable de S2 CUTie2 probé la inducción con dos metales, cadmio o cobre, a unas concentraciones finales de 10mM y 0,5mM de sus respectivas sales, para ver con cuál respondía mejor.

3.2.5 Clasificación celular activada por fluorescencia

Debido a que la eficiencia en la transformación fue baja tuvimos pocas células positivas, por lo que decidimos realizar la clasificación celular activada por fluorescencia (*cell sorting*) de la línea estable de S2 CUTie2 con la asistencia de una técnica especializada, utilizando el citómetro de flujo BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences) del Institut Pasteur de Montevideo. Para ello induje las células con CdCl₂, que fue la sal de metal que mostró mejores resultados, y a las 48hs se sometieron a la clasificación celular para enriquecer la población en células positivas.

3.3 Generación de cepas transgénicas de *Drosophila melanogaster*

3.3.1 Obtención de las cepas UAS-CUTie2

Para el objetivo principal del presente proyecto generé dos cepas transgénicas de *D. melanogaster*. Ambas expresan la misma construcción genética que permite expresar el biosensor de GMPc (Klein et al., 2021) de modo tejido específico por medio del sistema UAS-GAL4, pero en distintos cromosomas: en el cromosoma II en una cepa y en el III en la otra, con el fin de aumentar las posibilidades de uso en futuros experimentos.

Para conseguir esas cepas realicé las construcciones génicas en el vector pUAST (Bischof et al., 2007) (ANEXO II) que contiene la secuencia UAS para el sistema UAS-GAL4, como se detalla en el apartado 3.1.3, y también contiene el sitio loxP para utilizar el sistema de integrasa Phi para su recombinación específica mediante sitios de reconocimiento attB y attP. Esta construcción la enviamos a la empresa estadounidense BestGene Inc. En esa empresa, usando técnicas estándar, nuestro plásmido fue inyectado en embriones de moscas con mutación en el gen *white* que provoca la característica fenotípica de ojos blancos y es revertida parcialmente por el gen miniWhite (mW) contenido en el vector construido durante esta tesis (ver sección 3.1.3).

Una vez obtenidas las cepas transgénicas una con el sensor en el cromosoma II y otra con el sensor en el cromosoma III, con nuestra construcción en heterocigosis y balanceada por si el biosensor resultaba letal en homocigosis, proseguí a generar una cepa que contuviese exclusivamente moscas homocigotas. Una ventaja que tiene la cepa heterocigota, es que permite generar una construcción por cruzamiento, pudiendo ser seleccionada por ausencia del cromosoma balanceador de los parentales. A partir de cruzamientos de los heterocigotas generé las cepas de homocigotas para el biosensor en el cromosoma II ($UAS-CUTie2/UAS-CUTie2$) y para el cromosoma III ($UAS-CUTie2/UAS-CUTie2$), lo que no resultó letal para las moscas.

3.3.2 Mantenimiento de cepas de *Drosophila melanogaster*

Mantuve las cepas de moscas en condiciones estándar: en estufa húmeda con ciclo luz/oscuridad controlado 12h/12h a 25°C durante el tiempo que llevaron los experimentos, cambiando las botellas o tubos cuando fue requerido y manteniendo las poblaciones a una densidad baja para evitar que la sobrepoblación causara falta de alimento en el recipiente.

Las cepas generadas en esta tesis se encuentran en el stock del Departamento de Biología del Neurodesarrollo, en estufa húmeda con ciclo luz/oscuridad controlado 12h/12h a 19°C.

Para realizar cruzamientos elegí sexar las pupas bajo un microscopio estereoscópico (“lupa”) WESO SM-300 SERIES con un aumento de 6,4x, humedeciendo las pupas con PBS para mejorar la visibilidad de los rasgos fenotípicos buscados. Utilicé la misma lupa para caracterizar y separar los heterocigotas de los homocigotas.

3.3.3 Uso del sistema UAS-GAL4

Para poder dirigir la expresión del sensor a un tejido o tipo celular específico utilicé el sistema bipartito de expresión UAS-GAL4 de *D. melanogaster* (Brand y Perrimon, 1993; Caygill and Brand, 2016). Con este sistema se puede obtener, por medio del cruce de moscas de dos cepas transgénicas, la expresión de la proteína deseada (que en nuestro caso es el biosensor) en un tejido específico. Una de las dos cepas del cruce expresa la proteína de levadura GAL4 bajo el control otorgado por el promotor de mosca usado para construir la cepa GAL4. Esta cepa actúa como *driver*. Por ejemplo, en una cepa GAL4 que use el promotor de un gen que codifica tubulina, todas las células que normalmente expresan tubulina también expresarán GAL4 mientras que en una cepa donde el GAL4 esté asociado a un promotor del gen *elav* expresará la proteína GAL4 solamente en las neuronas. La proteína GAL4 funciona como activador de la expresión de secuencias codificantes asociadas al elemento UAS (Upstream Activating Sequence). En nuestro caso, aquellas células que normalmente expresen el “*driver*” (el GAL4), en la progenie del cruce expresarán también el biosensor, porque en ellas el GAL4 activará la expresión del transgén que lo codifica.

Para hacer los cruzamientos para dirigir la expresión del biosensor a diferentes tejidos, utilicé

las siguientes cepas disponibles en el laboratorio:

- Cepa tubulina-GAL4: Dirige la expresión a todas las células (*;ficP{w[+mC]=matalpha-GAL-VP16}V37*).
- Cepa *insc*-GAL4: Dirige la expresión a neuroblastos (Betschinger et al., 2006).
- Cepa *elav* -GAL4: Dirige la expresión a neuronas (*;elav-GAL4/CyO;TM2/TM6B*).

3.4 Citometría de flujo

Los experimentos de citometría de flujo los hice en el Institut Pasteur de Montevideo, donde recibí entrenamiento hasta ser usuaria independiente del equipo. Utilicé el citómetro *Attunex* (Thermo Fisher Scientific) que tiene una configuración de láseres y filtros adecuada para los fluoróforos usados en este proyecto de posgrado.

3.4.1 Selección de filtros y láseres

Tanto para los ensayos con las células S2 como con los cerebros de *D. melanogaster* utilicé los filtros BL1 para YFP (emisión: 530/30nm; excitación: 488nm), VL1 para la CFP (emisión: 440/50nm; excitación: 405nm) y en el caso del FRET utilicé el VL2 (emisión: 512/25nm; excitación: 405nm) ya que necesitaba excitar con el láser para CFP y recolectar los datos de la emisión de YFP. Por último, para medir la viabilidad mediante la tinción nuclear con verde de metilo utilicé el filtro RL1 (emisión: 670/14nm; excitación: 637nm).

3.4.2 Preparación de células S2

Para analizar las células transfectadas por citometría de flujo, induje la expresión del sensor con CdCl₂ 10mM a una concentración celular de $4,75 \times 10^6$ /ml y las dejé en estufa a 28°C.

Para este experimento tomé una muestra de las células inducidas durante 48hs, a una concentración de $4,2 \times 10^6$ /ml y una muestra a las 72hs con una concentración de $4,6 \times 10^6$ /ml, para comparar los tiempos de inducción y ver cuál daba mejor resultado.

Las muestras fueron colocadas en tubos de 1,5ml y llevadas al citómetro de flujo. Cinco minutos antes del pasaje de cada muestra les añadí verde de metilo a una concentración final de 40μM (Prieto et al., 2014) como marcador de viabilidad.

Coseché las células en el momento previo al pasaje por el citómetro para evitar aumentar la muerte celular por el tiempo fuera de sus condiciones ideales de crecimiento.

3.4.3 Preparación de cerebros de larvas de estadio 3

Para los ensayos de citometría de flujo de células individuales a partir de disecciones de cerebros de *D. melanogaster* utilicé el cruce con el *driver insc-GAL4* (*insc-GAL4* x *UAS-CUTie2*) que dirige la expresión del biosensor a neuroblastos.

Por medio de microdisección, extraje cerebros de larvas estadio 3 de la progenie del cruce, y de la cepa parental, como control negativo. Diseccioné 25 cerebros de cada genotipo, para tener un número celular considerable, ya que los neuroblastos son células poco abundantes.

Para obtener las células individuales primero diseccioné los cerebros y luego hice 3 lavados con PBS. A continuación, incubé con colagenasa en búfer Rinaldini a una concentración final de 0,5mg/ml. Incubé 1 hora a temperatura ambiente, luego centrifugué 5 minutos a 300g, retiré el sobrenadante, volví a lavar con PBS para sacar restos de colagenasa y resuspendí en PBS. Finalmente filtré las muestras (40 μ m) para descartar cúmulos celulares que no se separaron (para evitar taponamiento de la aguja del citómetro).

3.4.4 Estrategia de *gating* en R

Para los análisis de citometría de flujo, defino *gate* como la zona de interés determinada por los parámetros a analizar, por lo que cuando me refiera a porcentaje de células haré referencia a aquellos eventos que se encuentren dentro de estas zonas definidas previamente.

Para analizar los datos obtenidos opté por realizar un análisis de *gates* en R, que describiré a continuación (Figura 6). Este *script* fue modificado a partir del original del Dr. Daniel Prieto.

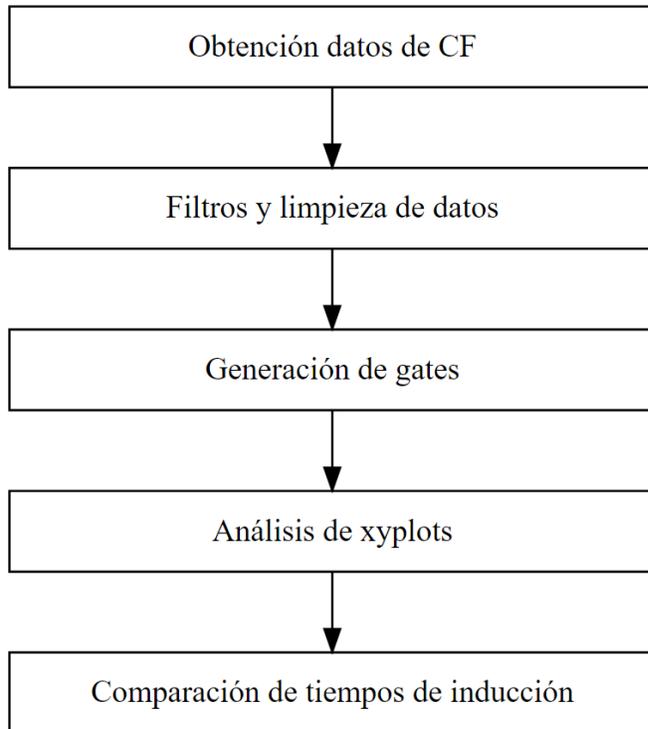


Figura 6: Diagrama de flujo de trabajo para la estrategia de gates en R.

Se detallan los pasos a seguir para el análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo a través de la estrategia de gating en R, iniciando por la obtención de datos en archivos .fcs a partir del citómetro de flujo, luego filtrado y limpieza los datos, generación de los gates necesarios para el análisis, generación de los xy plots a utilizar y comparación de las condiciones experimentales.

Para hacer este tipo de análisis en lote dirigido por datos utilicé las siguientes librerías de R: “flowCore”, “flowDensity”, “flowStats”, “flowViz”, “ggcyto” y “ggpubr”.

A continuación, mostraré la estructura del análisis para un solo conjunto de datos, ya que se repitió lo mismo para los otros. Para comenzar se deben llamar los archivos *fcs* que nos entrega el citómetro, organizarlos y realizar una transformación a los datos del tipo seno hiperbólico (*logicle*) para poder utilizarlos. En nuestro caso, el canal BL1 corresponde a la YFP, el canal VL1 corresponde a la CFP, el canal VL2 corresponde al FRET y el RL1 al verde de metilo.

```

bx <- logicleTransform()
bxlist <- transformList(c("FSC.A", "SSC.A", "FSC.H", "BL1.A",
                          "VL2.A", "VL1.A", "RL1.A"), bx)
datostrans <- transform(fs, bxlist)

```

Luego realicé una limpieza a los datos para quitar detritos celulares y posibles contaminantes en base al tamaño y granularidad de las células (canales FSC.A y SSC.A), obteniendo como resultado un subgrupo de datos limpios denominado *clean.dt*.

```

clean.dt <- datostrans
for (i in 1:8) { # Aquí se debe setear la cantidad de archivos que tengamos
  f <- datostrans[[i]]
  fsc.indices <- intersect (which (exprs (f)[, "FSC.A"] < 5.5) ,
                            which (exprs (f) [, "FSC.A"] > 3.5))
  ssc.indices <- intersect (which ( exprs ( f)[, "SSC.A"] > 3) ,
                            which ( exprs (f)[, "SSC.A"] < 5.5) )
  non.debris.indices <- intersect ( fsc.indices , ssc.indices )
  f.clean <- f[non.debris.indices]
  clean.dt [[i]] <- f.clean
}

```

Posteriormente apliqué los filtros necesarios para quedarnos únicamente con los singuletes. Generamos un *gate* elipsoide (*lymphGate*) dirigido por los datos de tamaño y granularidad cuyo centroide coincide con la zona de mayor densidad de eventos, como los utilizados para seleccionar linfocitos en una muestra de sangre, obteniendo una nueva muestra denominada *linf*. A esta nueva muestra la filtramos con otro *gate* elipsoidal de densidad dirigido por los datos de altura y área del canal de tamaño (FSC.H y FSC.A), obteniendo una nueva muestra denominada *linfossing* que contiene los singuletes libres de detritos.

```

linfos <- lymphGate(clean.dt, channels=c("FSC.A", "SSC.A"),
                    preselection=NULL, scale=3, plot = T)
linf <- Subset(clean.dt, linfos)
singfilt1 <- lymphGate(linf, channels = c("FSC.H", "FSC.A"),
                       preselection = NULL, scale=3, bwFac = 2,
                       filterId = "singGate", evaluate = T, plot =T)
linfossing <- Subset(linf, singfilt1)

```

En nuestro caso, para las células S2, aplicamos verde de metilo como marcador de viabilidad, lo que en estos datos corresponde al canal **RL1**. A continuación se filtraron en el canal **RL1** las células negativas a verde de metilo por medio de un *gate*, ya que su incorporación indica una pérdida de la integridad de membrana.

```

viablesfilt <- rectangleGate("RL1.A" = c(0, 2), "SSC.A" = c(4, 5))
cellviables <- Subset(linfossing, viablesfilt)

```

Luego separo en dos grupos los datos, las inducidas y las no inducidas.

```

test1 <- (cellviables[1:4])
test2 <- (cellviables[1:8])

```

Para poder extraer información de los gráficos de Trellis debemos generar los *gates* que corresponden a los canales de interés: CFP, YFP y FRET. Para no generar *gates* de forma subjetiva e irreproducible decidimos hacer un análisis estadístico para determinar los puntos de corte de las poblaciones, ya que las poblaciones no se separan completamente.

```

marcadorFRET <- rangeGate(test1, "VL2.A", plot = T, alpha = "min",
                           filterId = "FRETfilt1")
marcadorCFP <- rangeGate(test1, "VL1.A", plot = T, alpha = "min",
                           filterId = "CFPfilt1", sd=0.5)
marcadorYFP <- rangeGate(test2, "BL1.A", plot = T, alpha= "min",

```

```

        filterId = "YFPfilt1")
#Aplico esos gates
YFPposfilt <- rectangleGate("BL1.A" = c(2.2, 5), "SSC.A" = c(4, 5))
CFPposfilt <- rectangleGate("VL1.A" = c(marcadorCFP@min, 5),
        "SSC.A" = c(4, 5))
FRETfilt <- rectangleGate("VL2.A" = c(marcadorFRET@min, 4),
        "SSC.A" = c(4, 5))

```

Generamos un *xyplot* para cada archivo separando los canales y obtuvimos uno para CFP, otro para YFP y otro para FRET. *xyplot* hace referencia a los graficos de citometría de flujo de los eventos registrados contrastando dos canales.

```

xy1YFP<-xyplot('SSC.A' ~ 'BL1.A', data = cellviables[1],
        filter=YFPposfilt, smooth=F, xlim=c(0,4.5),
        ylim=c(4,5), stats = T, xlab="YFP", ylab="SSC-A")
#Repetimos para cada archivo 1 al 8 de cellviables

```

En el caso de comparar datos de diferente tiempo de inducción, en nuestro caso 48 y 72hs, repetí los pasos pero con los archivos correspondientes a 72hs, para después llamarlos y poder combinarlos en un gráfico de violín con un indicador de significancia estadística. Para esta última parte, utilicé las librerías “ggsignif” y “tidyverse”.

Primero combiné los datos de manera de tener por separado los grupos de cada tiempo de inducción.

```

fs48ind1 <- rbind2(cellviables[1],cellviables[2])
fs48ind2 <- rbind2(cellviables[3],cellviables[4])
fs48indfinal <- rbind2(fs48ind1,fs48ind2)
fs72ind1 <- rbind2(cellviables2[1],cellviables2[2])
fs72ind2 <- rbind2(cellviables2[3],cellviables2[4])
fs72indfinal <- rbind2(fs72ind1,fs72ind2)

```

Luego generé un gráfico de violín con una capa de significancia estadística para cada canal.

```
comparados1 <- rbind2(fs48indfinal, fs72indfinal)
p1 <- ggcyto(comparados1, aes(y = 'BL1.A'))
p1 + geom_violin(aes(x=factor(name), fill=name)) +
  scale_fill_manual(values = c("#FADEE1", "#D9F1F1"), name= "Tiempo")+
  coord_cartesian(ylim =c(0, 4))+
  facet_null()+
  stat_signif(aes(x=factor(name)), comparisons = list(c("48 hs", "72 hs")),
             test = "wilcox.test", map_signif_level=TRUE, color="black",
             size = 0.5, textsize = 5, y_position = c(3.6, 3.8))+
  xlab("Tiempo de inducción") + ylab("YFP") +
  theme_classic(base_size = 14) +
  labs(title="Comparación de tiempos de inducción", size = 14) +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  scale_x_discrete(labels = NULL, breaks = NULL) + labs(x = "")
```

3.5 Fluorimetría

Los ensayos de fluorimetría los realicé con los siguientes tres tipos de muestras: células S2 CUTie2, extracto celular a partir de las células S2 CUTie2 y cerebros disgregados y lisados de larvas de estadio 3 del cruce *insc-GAL4 x UAS-CUTie2*.

3.5.1 Preparación de células S2

Para estos ensayos, induje la expresión del sensor en células S2 CUTie2 con CdCl_2 10mM durante las 48hs previas y como control utilicé células S2 CUTie2 sin inducir. Primero coseché las células, las centrifugué a 4°C a 200g durante 5 minutos y descarté el sobrenadante. Luego de hacer un lavado con PBS, volví a centrifugar y, en el caso del análisis de extractos celulares, las resuspendí en búfer 50mM Tris pH=8, EDTA 2mM, NaCl_2 50mM e inhibidor de proteasas 1x (Thermo Scientific™). Para poder lisar las células las pasé por jeringa (21Gx32mm) con 15 incursiones del émbolo.

En el caso de las células S2 CUTie2 enteras, luego del lavado con PBS, las resuspendí en el mismo búfer pero sin inhibidor de proteasas.

Las células inducidas al momento del experimento se encontraban a una concentración de $7,6 \times 10^6$ /ml y las no inducidas a una concentración de 8×10^6 /ml.

3.5.2 Preparación de cerebros larvarios para fluorimetría

Para el estudio del cerebro larvario elegimos seleccionar larvas del último estadio. Diseccioné 150 cerebros de la progenie F1 del cruce *insc-GAL4 x UAS-CUTie2* y 150 cerebros de la cepa parental UAS-CUTie2.

Los lavé 3 veces con PBS y luego los incubé una hora con colagenasa en búfer Rinaldini a una concentración final de 0,5mg/ml. Por último, centrifugué el tejido, lo lavé con PBS y lo pasé 15 veces por jeringa (21Gx32mm) para lisar las células.

3.5.3 Establecimiento de parámetros en el fluorímetro

Estos ensayos los realicé en el fluorímetro VARIAN CARY Eclipse del Institut Pasteur de Montevideo. Para el establecimiento de los parámetros, utilicé una longitud de onda de excitación de 435nm y la emisión la establecí entre 450nm y 600nm para poder ver los picos de CFP e YFP. La ventana de emisión la establecí en 5 y el fotomultiplicador a 780 en modo manual. En el ensayo dónde adicione GMPC, lo hice a una concentración de 1mM.

3.5.4 Análisis en R

Todos los *scripts* utilizados en esta tesis se encuentran disponibles en mi repositorio de GitHub (<https://github.com/AnaClGonzalez>). Para el análisis de los datos de fluorimetría partí de los archivos “.csv” que nos entrega el fluorímetro.

Primero llamé a los archivos que usé como por ej: Inducidas y no inducidas, y renombré las columnas para una mejor organización de los datos.

```
colnames(datos)<- c("Longitud de onda (nm)", "Int. Fluo (AU)", "status")
```

Luego de organizar los archivos generé un *data frame* con los datos de las muestras inducidas y no inducidas.

```
dF <- rbind(datos,datos2)
```

Para hacer los gráficos utilicé la librería “ggplot2”. El siguiente paso fue hacer los gráficos de no inducidas y combinar los resultados de ambas muestras.

```
line <- ggplot(dF)+  
  geom_line(aes( x='Longitud de onda (nm)', y='Int. Fluo (AU)',  
                color=status), size = 2.5)+  
  theme_light()+  
  scale_color_brewer(palette = "Pastel2")+  
  theme(axis.title.x=element_text(size=14),
```

```
axis.title.y=element_text(size=18),  
axis.text.x = element_text(size=14),  
axis.text.y = element_text(size=14),  
legend.title = element_text(size=14),  
legend.text = element_text(size=14))
```

3.6 Microscopía confocal

3.6.1 Anticuerpos y marcaciones

Para ensayos de microscopía confocal de cerebros larvarios utilicé los siguientes anticuerpos: anti-Dpn de cobayo (los anticuerpos específicos para Deadpan son usados como marcador de neuroblastos; Jürgen Knoblich, IMBA, Institute of Molecular Biotechnology, Viena, Austria; dilución 1/2500); anti-Pros de ratón (los anticuerpos específicos para Prospero son usados como marcador de células madre ganglionares; MR1A - The Developmental Studies Hybridoma Bank (DHSB) ; Dilución 1/100); anti-elav de rata (Los anticuerpos específicos para Elav se usan como marcador de neuronas; 7E8A10 - The Developmental Studies Hybridoma Bank (DHSB) ; Dilución 1/50); anticuerpos secundarios anti-cobayo-AlexaFluor™568 (Molecular Probes; Dilución 1/1000); anticuerpos secundarios anti-ratón-Cy5 (Molecular Probes; Dilución 1/1000); anticuerpos secundarios anti-rata-Cy3 (Molecular Probes; Dilución 1/1000); Faloidina conjugada a AlexaFluor™633 (A22284; ThermoFisher™; Dilución 1/500).

Para células S2 también utilicé como marcador de viabilidad verde de metilo a una concentración final de $40\mu\text{M}$ (Prieto et al., 2014). También realicé la marcación de ADN con Hoechst 33342 (62249; ThermoFisher™ (20mM); Dilución 1/2000, concentración final $10\mu\text{M}$) como alternativa.

Para todas las imágenes de microscopía confocal utilicé el microscopio ZEISS LSM 800, los objetivos 20X (AN=0,8), 40X (AN=1,3) y 63X (AN=1,4; inmersión en aceite), y para el procesamiento de imágenes en *ImageJ* usé el filtro de la mediana con un radio de 1,2 píxeles.

3.6.2 Disección, fijación e inmunohistoquímica

Para los ensayos de microscopía confocal diseccioné los cerebros con pinzas de precisión DUMONT 5 bajo una lupa WESO SM-300 SERIES (microscopio estereoscópico) a un aumento final de 160x utilizando búfer Rinaldini. Fijé en formaldehído al 4% en PBS preparado a partir de paraformaldehído (PFA 4%) durante 10 minutos. Lavé 3 veces los cerebros con PBS-Triton X-100 0,5% (PBS-T) y lo incubé con la solución correspondiente del anticuerpo

primario, disuelto en PBS-T y lo dejé *overnight* a 4°C. Al día siguiente retiré los anticuerpos primarios, lavé 3 veces con PBS-T e incubé con anticuerpos secundarios, también preparado en PBS-T e incubé *overnight* a 4°C. Al otro día retiré los anticuerpos secundarios, hice dos lavados con PBS-T y un último lavado con PBS. Por último, monté los cerebros en glicerol 80% en Tris pH=8,8, trabajando bajo lupa estereoscópica para obtener una buena orientación antes de colocar el cubreobjetos.

En el caso de los preparados realizados para ver la CFP y la YFP, evité la fijación y monté los cerebros en PBS luego de su disección, ya que habíamos observado que la fijación reduce mucho la fluorescencia de la CFP.

Para los preparados de células S2, traté previamente los cubreobjetos con *concanavalinaA*, esto es necesario ya que son células que crecen en semi-adherencia y para evitar que se muevan durante la toma de imágenes. Hice una dilución a partir de la solución stock para evitar la formación de cristales, colocando 30 μ l de la solución stock (5mg/ml en PBS) en 10 ml de agua bidestilada. Coloqué una gota y dejé secar, luego los dejé bajo luz UV durante 15 minutos para esterilizar. A la hora de montar, coloqué una gota de la suspensión celular sobre el cubreobjetos ya tratado y dejé reposar hasta que las células decantaron por completo, luego fijé con PFA 4% en PBS 5 minutos. Lavé 3 veces con PBS y teñí con faloidina conjugada AlexaFluor™633 y Hoechst 33342. Luego retiré el exceso de líquido y lavé 3 veces con PBS. Finalmente coloqué una gota de glicerol 70% búfer Tris pH=8 en el portaobjetos y sellé.

Para los ensayos de microscopía confocal utilicé el microscopio ZEISS 800, utilizando el filtro 405 para visualizar la CFP y para la YFP el filtro 488.

3.6.3 Procesamiento de imágenes

Para el análisis de imágenes en FIJI/ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos) opté por aplicar un filtro de mediana con un radio de 1,2 píxeles para limpiar las imágenes de ruido. En las imágenes donde la intensidad de fluorescencia era muy baja debí aumentar el brillo con las opciones de “brillo y contraste” para lograr visualizar la CFP, manteniendo los mismos valores en casos de comparación de condiciones.

Para el análisis de intensidad de fluorescencia por pixel elegí 5 cerebros de cada condición y seleccioné los 8 planos contiguos de mayor intensidad de cada uno generando un sub-stack para obtener datos representativos. Luego definí regiones de interés (ROI) de igual dimensión xy para todos los planos confocales, para determinar el área de la imagen donde se tomarían los datos y utilicé la mediana de fluorescencia por *Z-stack*.

3.6.4 Análisis de intensidad de fluorescencia en R

Una vez obtenidos los datos de Intensidad de fluorescencia por píxel, procedí a realizar un *script* para analizarlos. Primero llamé los archivos, tanto para 25°C como para 29°C.

```
datos25_1 <- read.csv(archivos25[1])
```

Luego hice para cada archivo un test de Shapiro-Wilk para determinar la eventual normalidad de los datos.

```
shapiro.test(datos25_1[,3])
```

Como el resultado del test me hizo rechazar la hipótesis de normalidad, el resto de los análisis los hice utilizando la mediana y el test de *Mann-Whitney-Wilcoxon*.

Agrupé los datos por temperatura y los renombré para un manejo más sencillo.

```
datos25CFP <- cbind.data.frame(datos25_1[1:10,3], datos25_3[1:10,3],
                              datos25_5[1:10,3], datos25_7[1:10,3],
                              datos25_9[1:10,3] )
datos25YFP <- cbind.data.frame(datos25_2[1:10,3], datos25_4[1:10,3],
                              datos25_6[1:10,3], datos25_8[1:10,3],
                              datos25_10[1:10,3] )
colnames(datos25CFP) <- c("cerebro 1", "cerebro 2", "cerebro 3",
                          "cerebro 4", "cerebro 5")
colnames(datos25YFP) <- c("cerebro 1", "cerebro 2", "cerebro 3",
```

```

                                "cerebro 4", "cerebro 5")
datos25group <- cbind.data.frame(datos25CFP, datos25YFP)
colnames(datos25group) <- c("CFP", "YFP")

```

Repetí todo lo anterior pero para los datos de 29°C y agrupé todos los datos crudos para poder graficarlos.

```

CFP25 <- c(datos25_1[,3], datos25_3[,3], datos25_5[,3], datos25_7[,3],
           datos25_9[,3])
YFP25 <- c(datos25_2[,3], datos25_4[,3], datos25_6[,3], datos25_8[,3],
           datos25_10[,3])
CFP29 <- c(datos29_1[,3], datos29_3[,3], datos29_5[,3], datos29_7[,3],
           datos29_9[,3])
YFP29 <- c(datos29_2[,3], datos29_4[,3], datos29_6[,3], datos29_8[,3],
           datos29_10[,3])

```

Para poder hacer el análisis estadístico en función de la temperatura agregué una columna que indicase 25°C o 29°C según correspondiese.

```

d25 <- cbind(CFP25, YFP25, 25)
colnames(d25) <- c("CFP", "YFP", "temp")
d29 <- cbind(CFP29, YFP29, 29)
colnames(d29) <- c("CFP", "YFP", "temp")
dFgraph <- rbind.data.frame(d25, d29)

```

Para graficar utilicé las librerías “reshape2”, “ggplot2” y “ggpubr”.

Luego realicé un *box-plot* para cada fluoróforo de 25°C vs 29°C con su correspondiente significancia estadística.

Primero grafiqué los datos para CFP utilizando *box-plots* y realicé la comparación de medianas con el test de *Mann-Whitney-Wilcoxon*.

```
p1 <- ggplot(dFgraph, aes(y=CFP, factor(temp)))+
  geom_boxplot(size=1.6)+
  geom_jitter(width = 0.1, alpha=0.5)+
  theme(axis.title.x=element_text(size=14), axis.title.y=element_text(size=18),
        axis.text.x = element_text(size=14))+
  xlab("Temperatura (°C)")+
  ylim(c(3000,18000))+
  geom_signif(comparisons = comp, test = "t.test", map_signif_level=TRUE,
             color="black", size = 0.2, textsize = 5)
```

Luego hice lo mismo para la CFP.

```
p2 <- ggplot(dFgraph, aes(y=YFP, factor(temp)))+
  geom_boxplot(size=1.6)+
  xlab("Temperatura (°C)")+
  geom_jitter(width = 0.1, alpha=0.5)+
  theme(axis.title.x=element_text(size=14),
        axis.title.y=element_text(size=18),
        axis.text.x = element_text(size=14))+
  xlab("Temperatura (°C)")+
  ylim(c(3000,18000))+
  geom_signif(comparisons = comp, test = "t.test", map_signif_level=TRUE,
             color="black", size = 0.2, textsize = 5)
```

Finalmente uní los gráficos de ambos fluoróforos.

```
plot <- ggarrange(p1, p2)
```

4. RESULTADOS

4.1 Expresión de CUTie2 en células S2

Con el fin de cumplir con el objetivo de expresar el biosensor de GMPc CUTie2 en células S2 de *Drosophila*, realicé las construcciones correspondientes utilizando la técnica de clonado sin restricción, con la cuál transfecté las células S2. Con la línea celular S2 CUTie2 establecida, medí tanto la fluorescencia de la CFP como la de la YFP mediante técnicas de citometría de flujo, fluorimetría y microscopía confocal.

4.1.1 Secuenciación de las construcciones realizadas

Parar verificar que las colonias contuvieran las construcciones de los vectores correspondientes, realicé una PCR de colonias tanto para la construcción en el vector pMT (Figura 7) como también para la del vector pUAST (Figura 8). En el caso del vector pMT utilicé la colonia correspondiente a la calle C del gel y en el caso del vector pUAST utilicé la colonia correspondiente a la calle B. Cualquier colonia positiva analizada en el gel podría haber servido para continuar con el siguiente paso, pero por una cuestión de costos en el secuenciado, preferí enviar a secuenciar una única colonia de cada caso. De todas formas, guardé en stock las primeras 4 colonias positivas, por si la secuenciación de la colonia elegida no fuera buena. En estos casos, las colonias positivas son aquellas con 2 bandas y las negativas de una única banda. Esto se debe a que los primers utilizados para la PCR de colonias levantan parte de la secuencia donde se inserta el biosensor, siendo la positiva la que tiene una banda de mayor tamaño. En el caso del control negativo, es el control de PCR sin molde.

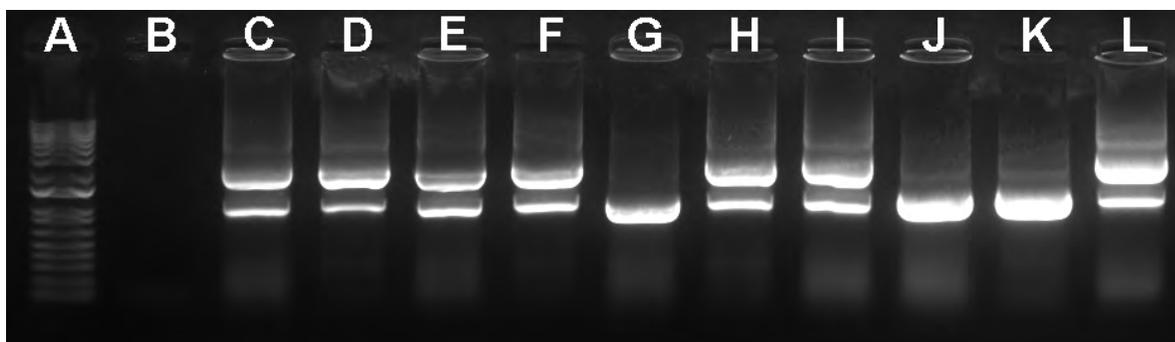


Figura 7: PCR de colonias vector pMT + CUTie2.

Se muestra la PCR de colonias realizada. A) Marcador 1Kb; B) control negativo sin molde; C,D,E, F, H, I y L) Colonias positivas; G, J y K) Colonias negativas.

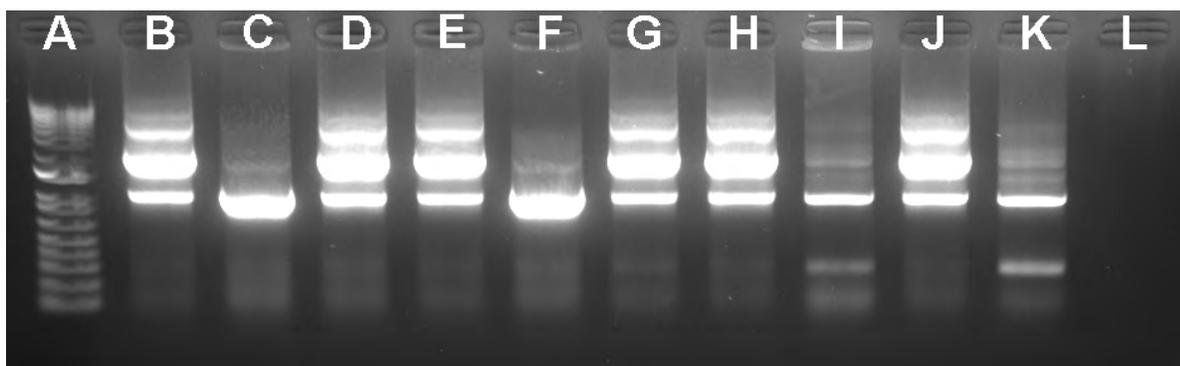


Figura 8: PCR de colonias vector pUAST + CUTie2.

Se muestra la PCR de colonias realizada. A) Marcador 1Kb; B,D,E,G, H y J) Colonias positivas; C, F, I y K) Colonias negativas; L) control negativo sin molde.

Enviamos las construcciones realizadas a Macrogen (Corea del Sur) para su secuenciación con la intención de verificar que se hubiesen amplificado correctamente y no presentaran mutaciones que pudieran producir un mal funcionamiento del biosensor.

Para ello envié los cebadores utilizados en la técnica de clonado sin restricción junto con el producto de la purificación por midiprep de una colonia positiva de cada construcción, obteniendo un alineamiento con un 98% de identidad con el cebador Fw, que es la parte de la secuencia que más nos importaba, por ser la zona del biosensor, demostrando que no se habían generado mutaciones en la secuencia (ANEXO III), lo que permitió continuar con los

experimentos.

4.1.2 Enriquecimiento por clasificación celular

Mediante microscopía confocal observé una baja eficiencia en la transfección, teniendo muy pocas células positivas como se puede ver en la figura 9.

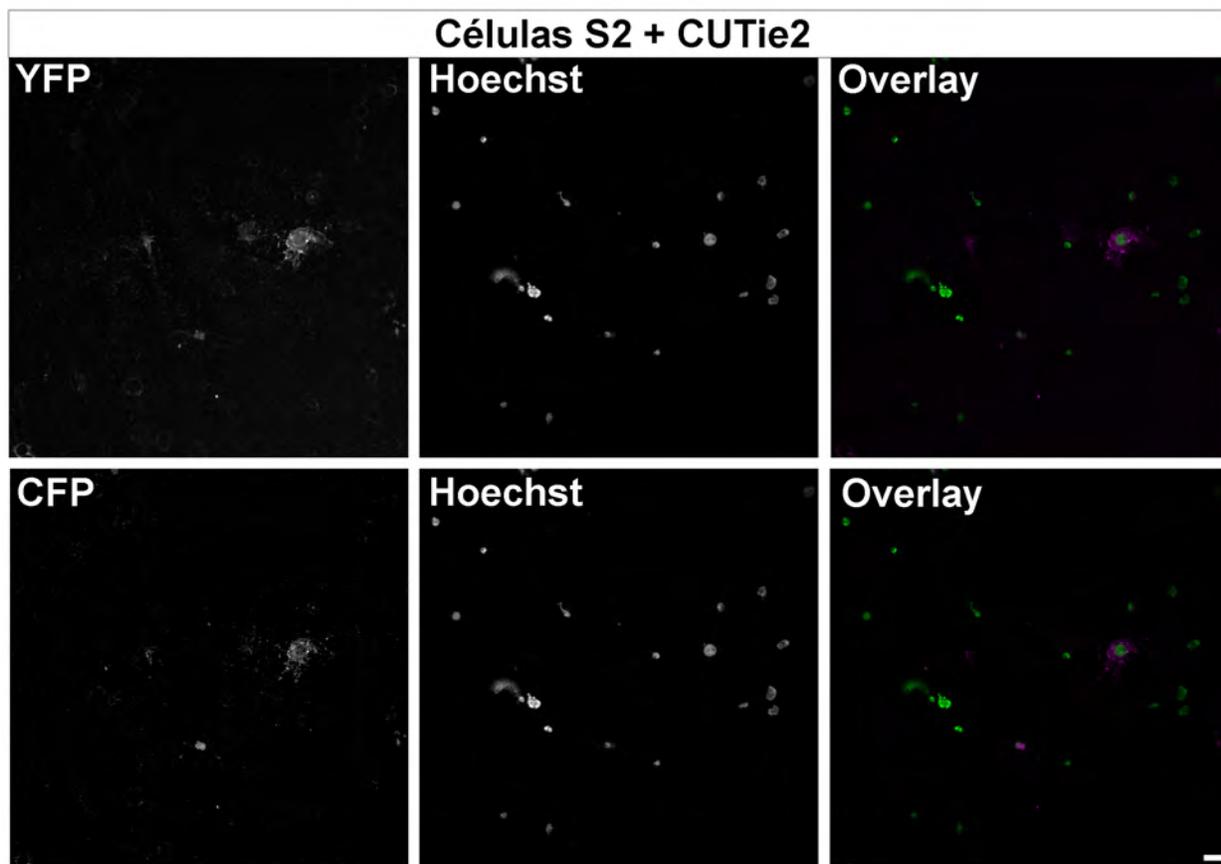


Figura 9: Observación de baja población de células S2 CUTie2 inducidas.

Microscopía confocal de células S2 CUTie2 con 48 hs de inducción con CdCl₂; ADN en verde; CFP e YFP en magenta; plano focal único; Barra de escala: 20μm.

Debido a que la eficiencia de la transfección de las células S2 fue baja, optamos por utilizar la técnica de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para enriquecer la población en células positivas (Figura 10). Los *gates* se realizaron según la clasificación de la tabla de la figura 11.

Se realizó el *gate* **P1** para marcar la población de células vivas dejando por fuera detritos celulares utilizando los parámetros de tamaño y granularidad celulares (FSC y SSC), luego

el *gate* **P2** para seleccionar los singuletes utilizando los parámetros de tamaño comparando área (A) y altura (H) del canal de tamaño (FSC). A partir de aquí sólo se tomaron los eventos que estuvieran dentro de **P1** y **P2** para los siguientes gráficos.

En el *gate* **P8** se seleccionaron las células positivas para CFP y en el *gate* **P7** las YFP positivas utilizando los parámetros de granularidad en función de cada fluoróforo. Por otro lado, se realizaron tres *gates* más dónde se utilizaron los parámetros de CFP e YFP; el **P6** seleccionando células negativas a YFP, el **YFP+/CFP high** que representa las células YFP positivas y que a la vez tienen una alta fluorescencia de CFP y por último el *gate* **YFP+/CFP low** que son células YFP positivas pero con baja fluorescencia de CFP.

Como resultado de esta clasificación celular recuperamos las últimas dos poblaciones y formamos nuevas líneas celulares enriquecidas un 88,7% en células positivas a ambos fluoróforos, ambas están criopreservadas. Todos los ensayos a partir de esta etapa los hice con la línea celular recuperada a partir del *gate* **YFP+/CFP high**.

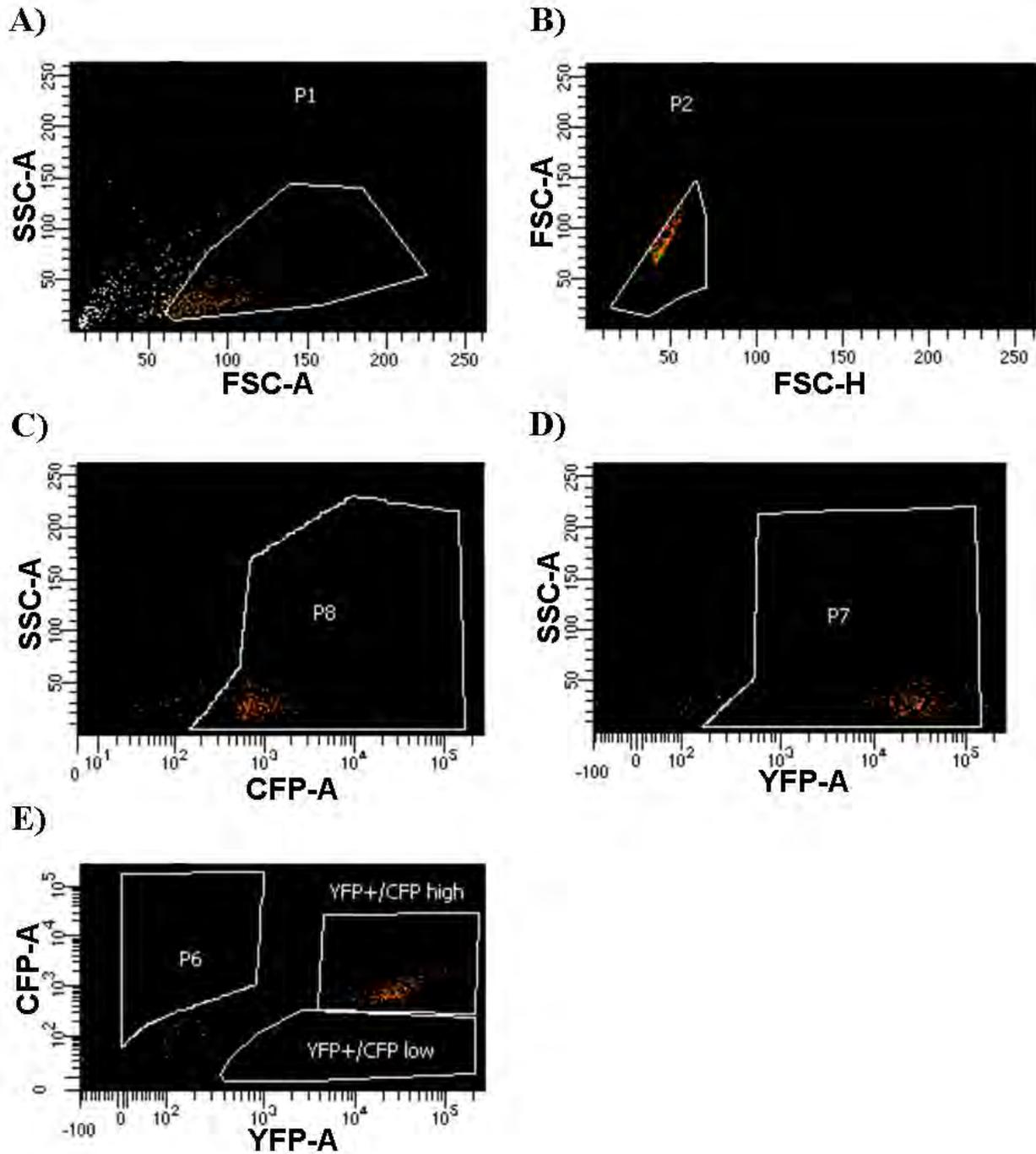


Figura 10: Enriquecimiento de las poblaciones transfectadas en células CFP e YFP positivas mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

A) Representa los eventos en función de los parámetros de tamaño (FSC-A) y granularidad celular (SSC-A), dónde el gate P1 representa la población de células vivas dejando por fuera

detritos celulares; B) Muestra dentro del parámetro de tamaño celular el área (FSC-A) y la altura (FSC-H), donde el gate P2 engloba los singuletes. C) Representa el canal de CFP y granularidad celular (SSC) dónde el gate P8 corresponde a las células positivas para CFP; D) Canal de YFP en función de la granularidad celular (SSC), siendo P7 las YFP positivas; E) Compara los parámetros de CFP e YFP, donde el gate P6 son células negativas a YFP, el YFP+/CFP high representa las células YFP positivas y que a la vez tienen una alta fluorescencia de CFP y por último el gate YFP+/CFP low son células YFP positivas pero con baja fluorescencia de CFP.

	CFP	YFP		CFP	YFP
P6	+	-	YFP+/CFP high	++	+
P7		+	YFP+/CFP low	+	+
P8	+				

Figura 11: Cuadro de significado de gates resumido. El presente cuadro resume la positividad o negatividad a CFP e YFP de los gates utilizados para el cell sorting.

4.1.3 Análisis por citometría de flujo

Con el fin de analizar cuál era el mejor tiempo de inducción para la línea S2 CUTie2, hice un análisis por citometría de flujo de muestras tratadas con dos tiempos diferentes de inducción para visualizar las poblaciones enriquecidas de CFP, YFP y FRET a 48hs y a 72hs. Como control negativo usé células S2 CUTie2 sin inducir (presentan fluorescencia debido a la expresión basal del biosensor).

A partir de los datos obtenidos realicé un análisis que me permitió obtener el punto de corte ideal entre las poblaciones de células positivas y negativas para cada canal (Figura 12). Esta determinación es necesaria para poder diferenciar ambas poblaciones, ya que no estaban lo suficientemente alejadas entre sí como para delimitarlas visualmente. Cada experimento tuvo 3 réplicas técnicas.

El objetivo de obtener los puntos de corte con este análisis estadístico es mejorar la exactitud y reproducibilidad a la hora de generar los *gates* sobre las poblaciones celulares de interés y eliminar el error que se puede cometer al definir sus límites de forma subjetiva.

Este ensayo nos brindó un panorama sobre la muerte celular producto de la inducción con Cd, siendo de 4% a 48hs de inducción y 15% a 74hs de inducción.

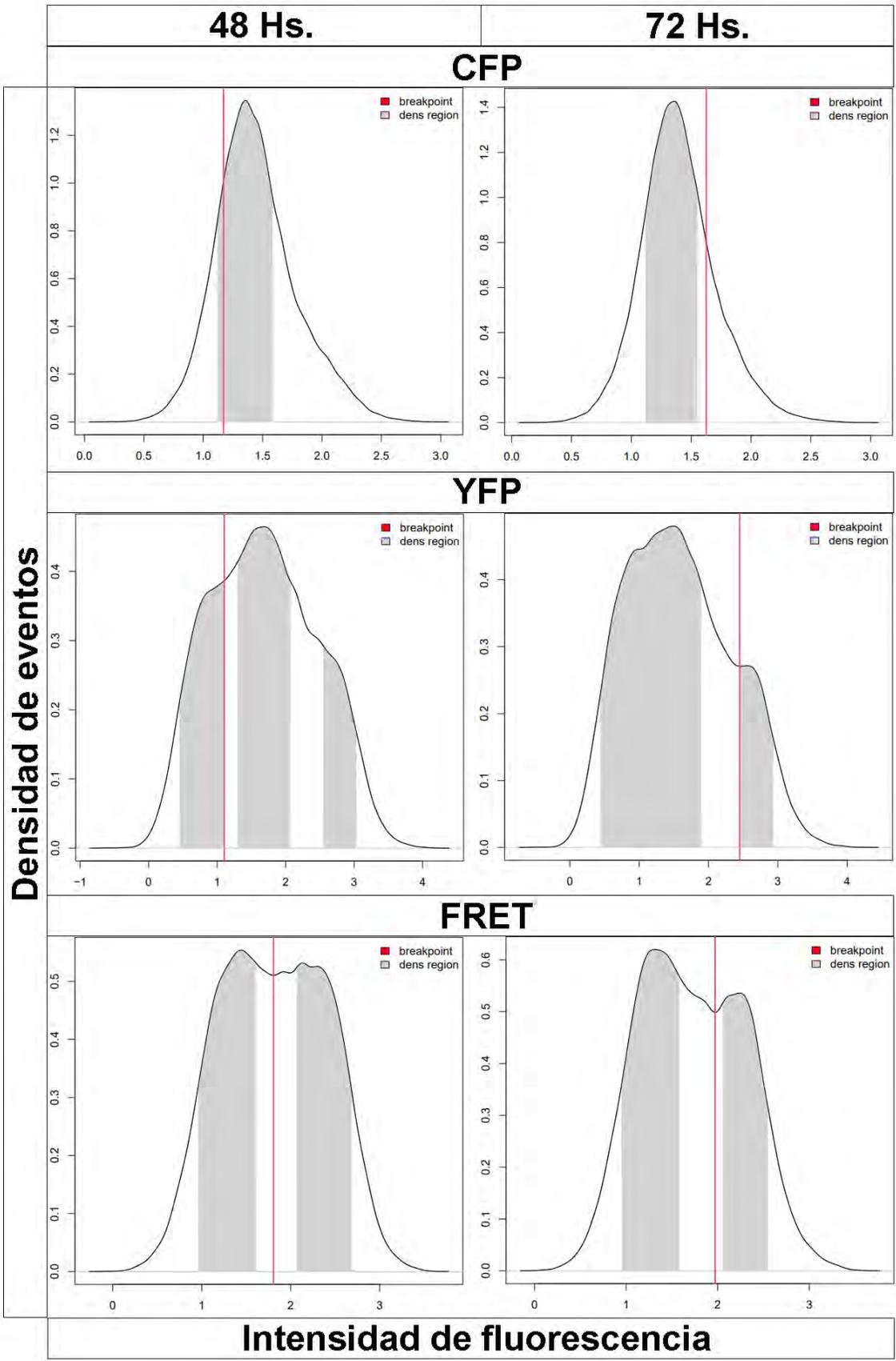


Figura 12: Puntos de corte determinados por análisis estadístico para separar poblaciones.

Se obtuvieron los puntos de corte estadísticos que permiten dividir de manera correcta la población positiva de la negativa para cada conjunto de datos. En todos los casos se graficó en el eje y la densidad de eventos, en el eje x la intensidad de fluorescencia de cada canal y en rojo se marca el punto de corte entre ambas poblaciones.

Con el propósito de determinar el tiempo de inducción óptimo y definir la población positiva para CFP, YFP y FRET, utilicé estos puntos de corte para los tres canales a 48 y a 72hs de inducción para obtener el porcentaje de población positiva correspondiente a cada uno.

En la figura 13-A se muestra el control de muerte celular en células S2, necesario para corroborar la eliminación de detritos celulares y en la figura 13-B se corrobora dicha muerte celular por el canal de verde de metilo.

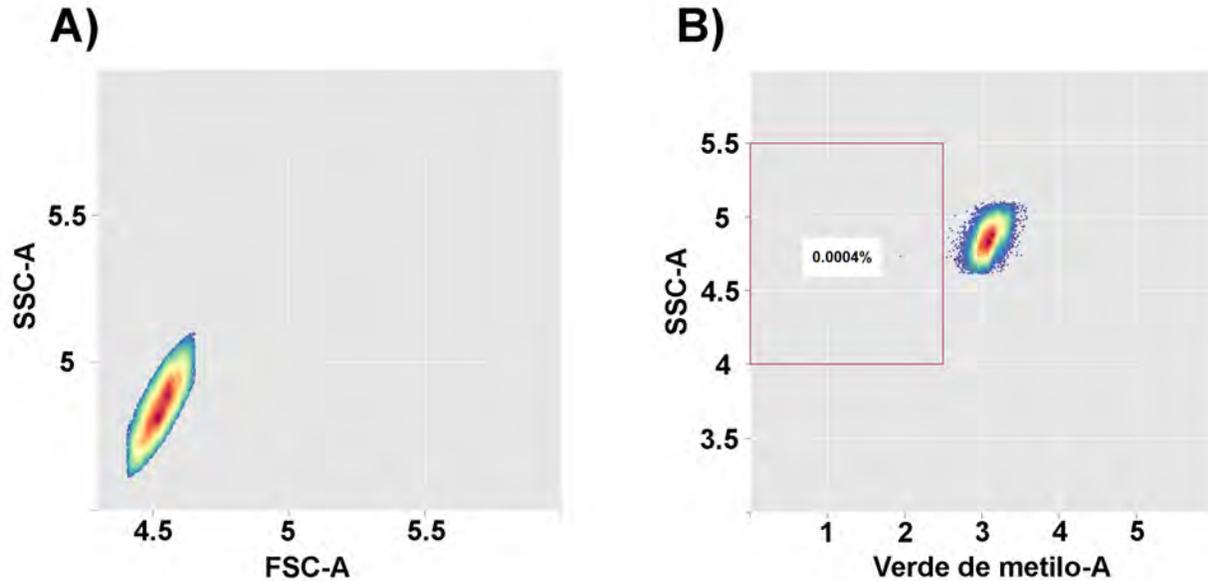


Figura 13: Control de muerte celular.

A) En el eje x se representa el tamaño celular (FSC-A) y en el eje y la granularidad celular (SSC-A). Células S2 CUTie2 inducidas y sometidas a un baño térmico a 95°C durante 15 minutos para provocar la muerte celular. B) Se muestra el control de muerte celular por el canal de verde de metilo en el eje x y en el eje y la granularidad celular (SSC-A), donde se muestra el gate de células viables.

El número de eventos positivos a CFP de las células inducidas aumentó en promedio 6x con respecto a la fluorescencia de las células no inducidas (36% vs. 5,65%; Figura 14) al cabo de 48hs de inducción y 23x al cabo de 72hs de inducción (31% vs. 1,35%; Figura 17). Se debe resaltar que la fluorescencia promedio registrada para CFP al cabo de 72hs fue relativamente menor que la emitida a las 48hs (31% vs. 36%).

El número de eventos positivos a YFP observé un aumento en promedio de 10x con respecto de las células no inducidas (48,5% vs. 4,78%; Figura 15) luego de 48hs de inducción y 72x cuándo las células fueron inducidas durante 72hs (32% vs. 0,44%; Figura 18). Debe destacarse que la fluorescencia promedio registrada en este canal a las 72hs también fue menor que la emitida a las 48hs (32% vs. 48,5%).

Por último, el número de eventos positivos a FRET aumentó en promedio 9x con respecto a

la fluorescencia de las no inducidas (50% vs. 5,6%; Figura 16) al cabo de 48hs de inducción y 32x cuando las células fueron inducidas durante 72hs (36% vs. 1,1%; Figura 19). Cabe destacar que también en este canal la fluorescencia promedio registrada para FRET al cabo de 72hs fue relativamente menos que la emitida a 48hs (36% vs. 50 %).

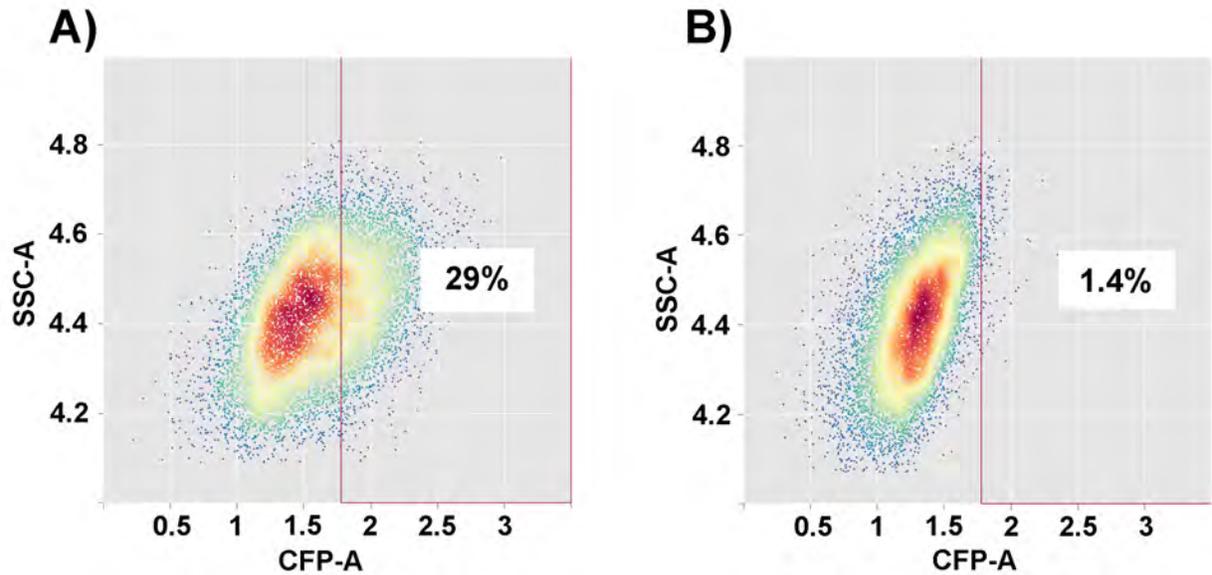


Figura 14: Porcentaje de células CFP positivas a 48hs de inducción.

En el eje x se representa la intensidad de fluorescencia de CFP y en el eje y la granularidad celular (SSC-A). A) células S2 transfectadas con pMT-CUTie2 e inducidas con CdCl₂ (10mM) por 48hs a 25°C. B) Células S2 transfectadas incubadas por 48hs a 25°C sin inductor.

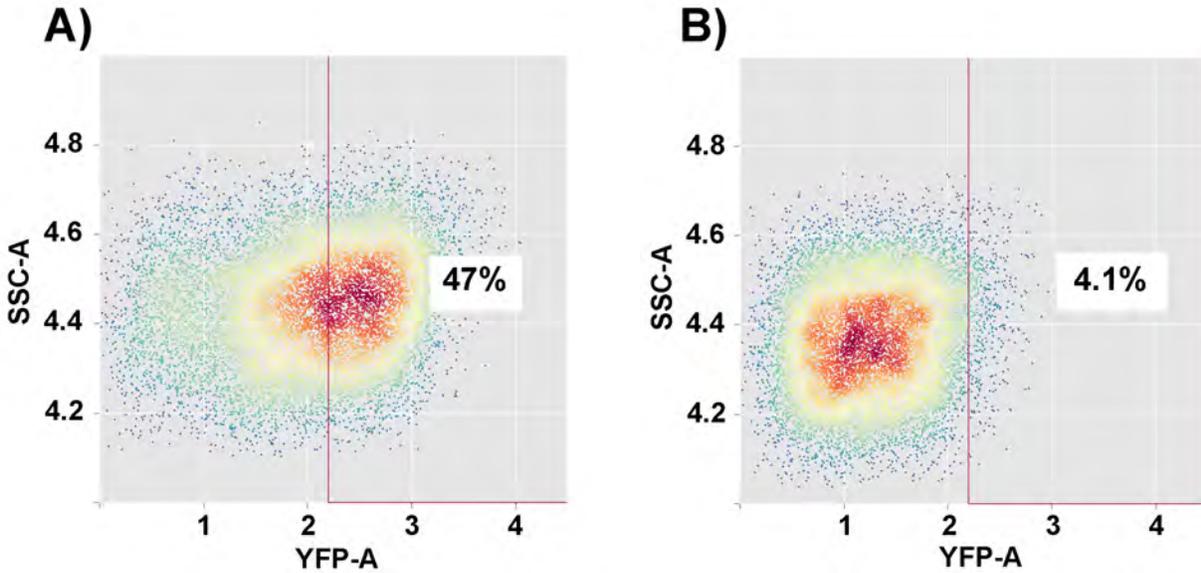


Figura 15: Porcentaje de células YFP positivas a 48hs de inducción.

En el eje x se representa la intensidad de fluorescencia de YFP y en el eje y la granularidad celular (SSC-A). A) células S2 transfectadas con pMT-CUTie2 e inducidas con CdCl₂ (10mM) por 48hs a 25°C. B) Células S2 transfectadas incubadas por 48hs a 25°C sin inductor.

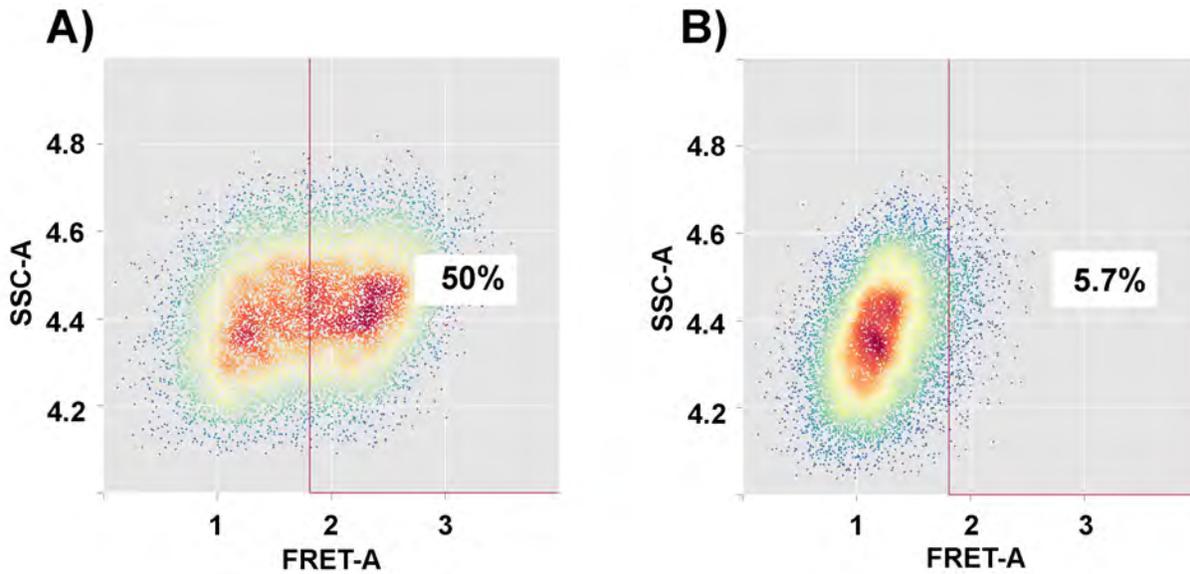


Figura 16: Porcentaje de células FRET positivas a 48hs de inducción.

En el eje x se representa la intensidad de fluorescencia de FRET y en el eje y la granularidad celular (SSC-A).

idad celular (SSC-A). A) células S2 transfectadas con pMT-CUTie2 e inducidas con CdCl₂ (10mM) por 48hs a 25°C. B) Células S2 transfectadas incubadas por 48hs a 25°C sin inductor.

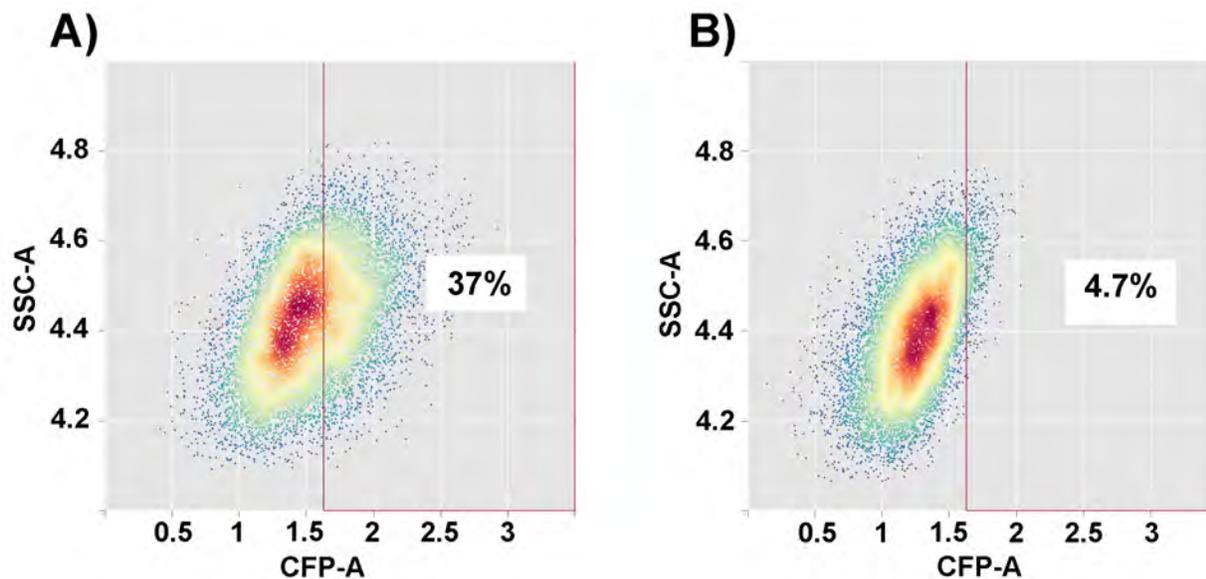


Figura 17: Porcentaje de células CFP positivas a 72hs de inducción.

En el eje x se representa la intensidad de fluorescencia de CFP y en el eje y la granularidad celular (SSC-A). A) células S2 transfectadas con pMT-CUTie2 e inducidas con CdCl₂ (10mM) por 48hs a 25°C. B) Células S2 transfectadas incubadas por 48hs a 25°C sin inductor.

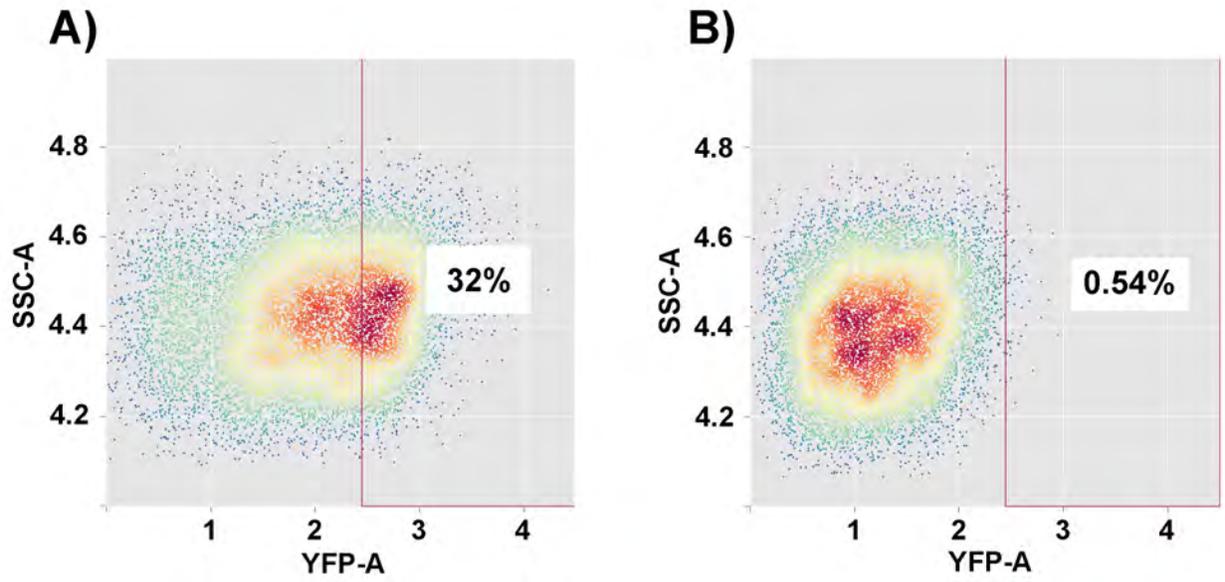


Figura 18: Porcentaje de células YFP positivas a 72hs de inducción.

En el eje x se representa la intensidad de fluorescencia de YFP y en el eje y la granularidad celular (SSC-A). A) células S2 transfectadas con pMT-CUTie2 e inducidas con CdCl_2 (10mM) por 48hs a 25°C . B) Células S2 transfectadas incubadas por 48hs a 25°C sin inductor.

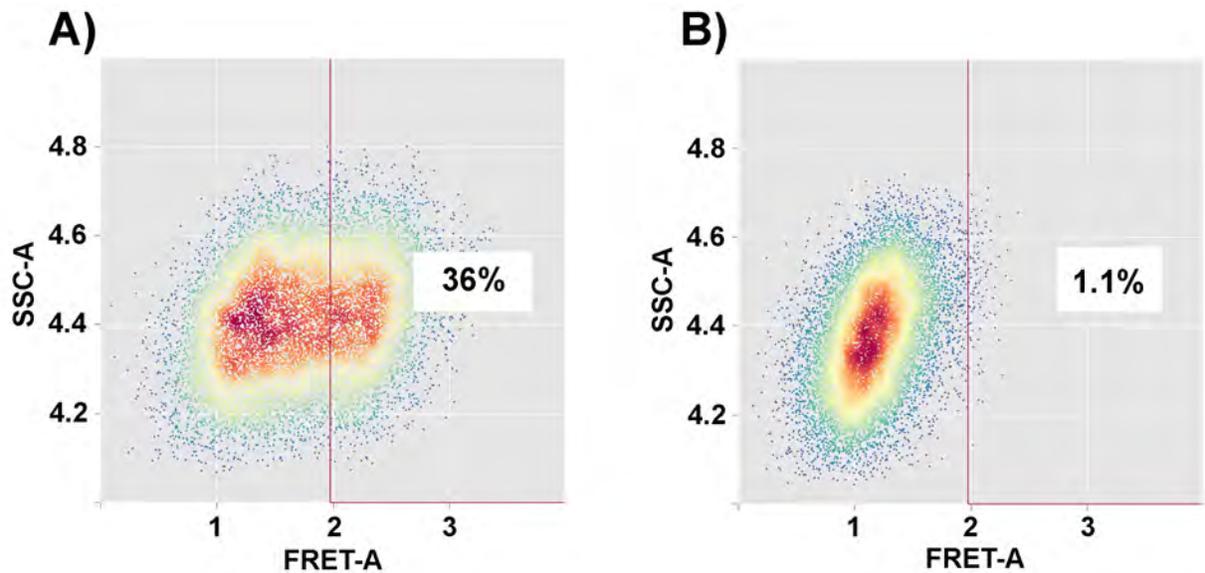


Figura 19: Porcentaje de células FRET positivas a 72hs de inducción.

En el eje x se representa la intensidad de fluorescencia de FRET y en el eje y la granular-

idad celular (SSC-A). A) células S2 transfectadas con pMT-CUTie2 e inducidas con CdCl₂ (10mM) por 48hs a 25°C. B) Células S2 transfectadas incubadas por 48hs a 25°C sin inductor.

En la tabla de la figura 20 se muestra un resumen de las medianas de intensidad de fluorescencia de todos los eventos analizados por cada canal y la mediana del porcentaje de población positiva a cada canal, con sus desvíos estándar correspondientes.

		Mediana de intensidad de fluorescencia	D.E.	% de población promedio	D.E.
48hs	CFP	1,7575	± 0,036	36	± 2,217
	YFP	2,365	± 0,044	48,5	± 2,646
	FRET	2,0175	± 0,017	50	± 0,817
72hs	CFP	1,7575	± 0,036	31	± 1,893
	YFP	2,365	± 0,044	32	± 1,633
	FRET	2,02	± 0,014	36	± 0,5

Figura 20: Resumen intensidad de fluorescencia por canal y porcentajes de población positiva. En la tabla se muestra la comparación de 48 y 72hs de inducción. Se detallan las medianas de intensidad de fluorescencia de todos los eventos medidos en cada canal y su correspondiente desvío estándar. Se muestra el promedio del porcentaje de células positivas a cada canal y en cada condición, con su respectivo desvío estándar. D.E. = desvío estándar.

Con el objetivo de seleccionar el método estadístico más adecuado para comparar intensidad de fluorescencia con estos datos, proseguí a analizar su normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk y obtuve que los datos no poseían una distribución normal.

Para determinar el tiempo óptimo de inducción en función de la fluorescencia realicé entonces

la comparación usando el test no paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney obteniendo como óptimo las 48hs. Con este análisis obtuve un p-valor tanto para CFP, como YFP y FRET fue de $2,22 \times 10^{-16}$ (Figura 21).

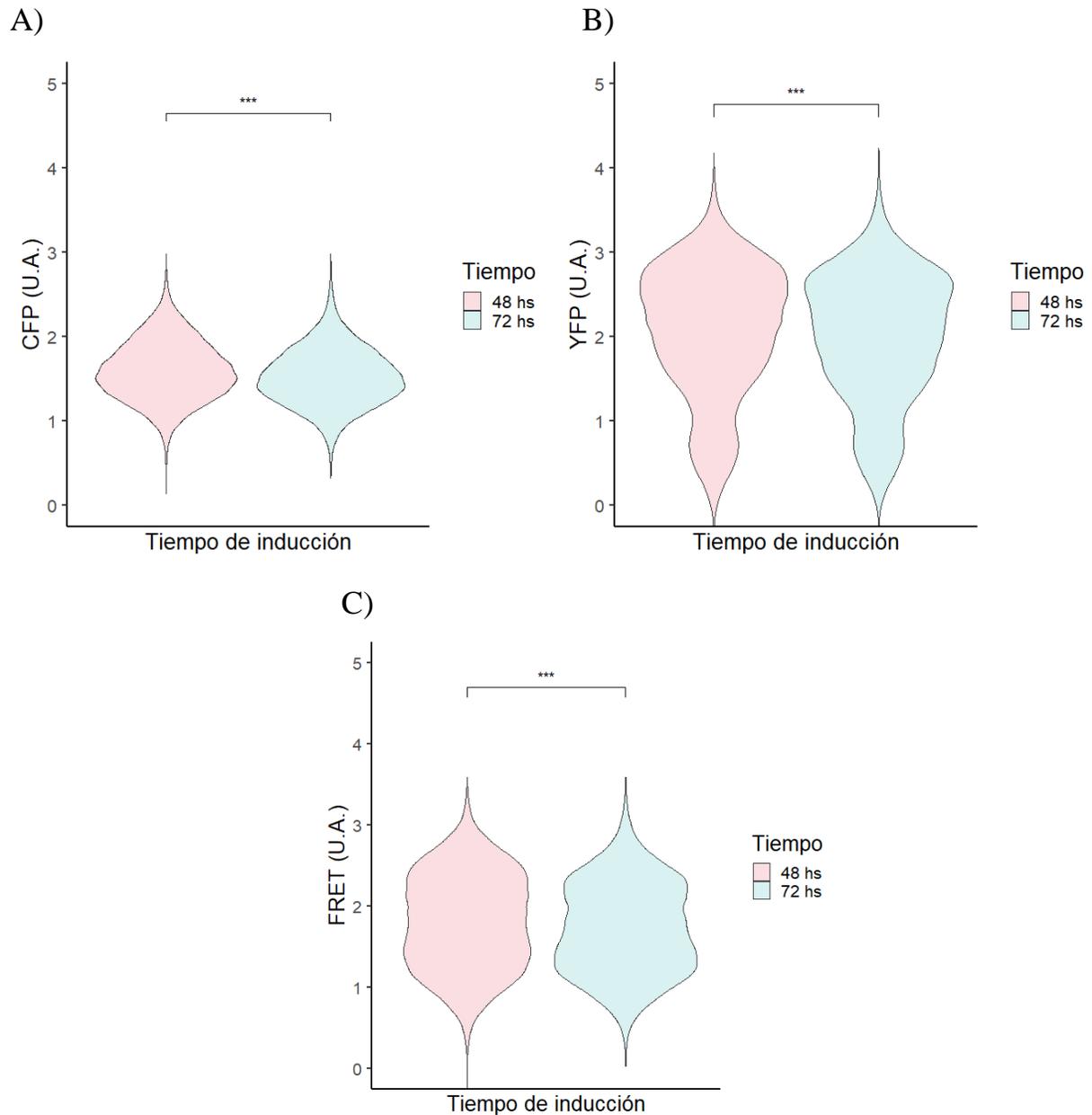


Figura 21: Influencia del tiempo de inducción en la intensidad de fluorescencia de CFP. 1) Se muestra la comparación de intensidades de fluorescencia de CFP

de células S2 CUTie2 y su análisis estadístico mediante gráficos de violín (48 vs 72hs) de células S2 CUTie2 individuales (p -valor= $2,2 \times 10^{-16}$); 2) Mismo análisis, pero comparando la fluorescencia a distinto tiempo en el canal de YFP (p -valor= $2,2 \times 10^{-16}$); 3) Análisis estadístico sobre el canal de FRET. Utilicé el test Mann-Whitney-Wilcoxon en los tres casos (p -valor= $2,2 \times 10^{-16}$). U.A.: unidades arbitrarias.

Con el fin de analizar la intensidad de fluorescencia del FRET al mejor tiempo de inducción, decidí realizar un gráfico de densidad de eventos de las células S2 CUTie2 para comparar las células inducidas y las no inducidas (Figura 22).

Observamos un único pico en las muestras no inducidas correspondiente a la densidad de células negativas, mientras que en la muestra de inducidas se observa que los dos picos se solapan, lo que se corresponde con las poblaciones marcadas en los *gates* anteriores, donde se ve que se proyecta una población positiva, pero que no llega a separarse completamente de la negativa.

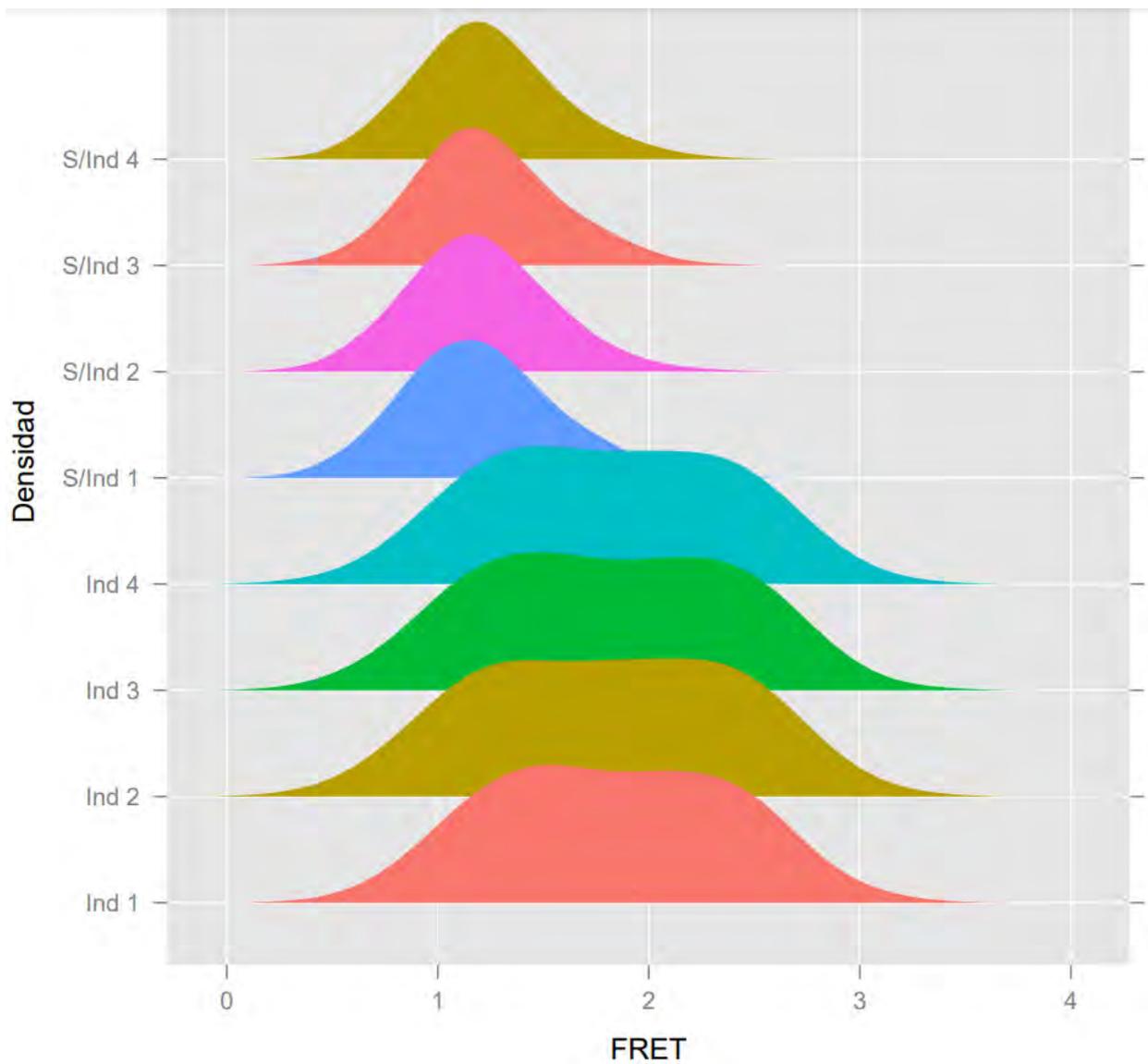


Figura 22: *Comparación de densidad de FRET con 48 hs de inducción y sin inducción.* Se muestran las curvas de densidad de FRET comparando células inducidas y no inducidas en función de la distribución de los datos obtenidos para dicho canal. Se puede visualizar un único pico en las no inducidas y dos picos que no se separan completamente, formando una meseta, en las inducidas (48hs).

4.1.4 Análisis por fluorimetría

Con el objetivo de visualizar los espectros de emisión correspondientes a YFP y CFP, y analizar si se producen cambios en ellos al agregar GMPc, proseguí a hacer un análisis por fluorimetría de células S2 CUTie2.

En todos los casos, para estandarizar un control negativo y que los picos correspondientes a cada fluoróforo fuesen representativos, utilicé células S2 CUTie2 sin inducir como control.

Analicé ambos espectros tanto en células S2 CUTie2 sin lisar (Figura 23A) como en células S2 CUTie2 lisadas (Figura 23B), donde busqué visualizar los picos correspondientes a CFP e YFP. Es necesario aclarar que con las condiciones de seteo, el pico de intensidad de fluorescencia a 530nm que se va a observar no corresponde a la YFP pura sino a la YFP que florece por FRET, ya que en la longitud de onda de excitación que se seteo, florece la CFP pero no la YFP.

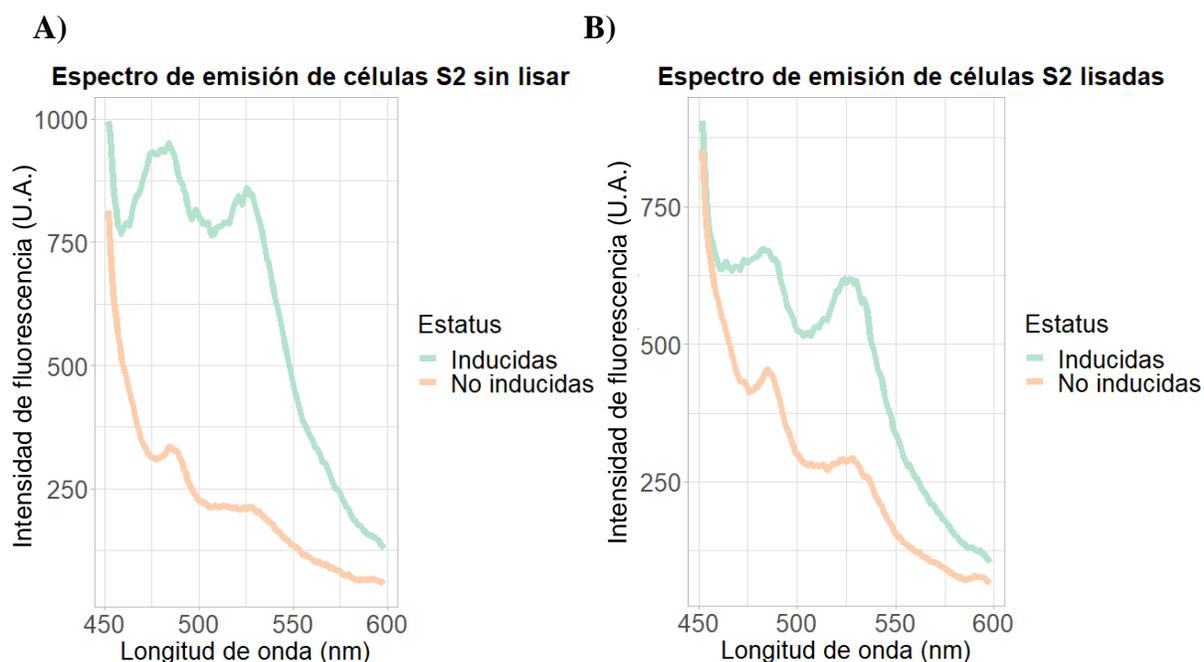


Figura 23: Presencia de fluorescencia de CFP e YFP en células S2 CUTie2.

A) Intensidad de fluorescencia de células S2 CUTie2 sin lisar inducidas 48hs; B) Mismo ensayo, pero con células S2 CUTie2 lisadas. En ambos casos se usó de control células no inducidas. Excitación en 435nm y emisión entre 450 y 600nm.

Para probar la funcionalidad del biosensor en las células S2, quise determinar si se presentaban cambios en los picos de emisión de CFP e YFP luego del agregado *in vitro* de GMPc. Cinco minutos antes de agregar el GMPc, añadí un inhibidor de fosfodiesterasas (IBMX) para evitar la degradación celular del GMPc, luego tomé los datos a tiempo cero y cada 1 minuto luego del agregado de GMPc. En este ensayo observé un leve aumento de la fluorescencia en el pico de emisión correspondiente a la YFP a 530nm, pero casi no hubo cambios en el pico de CFP, a los 480nm (Figura 24).

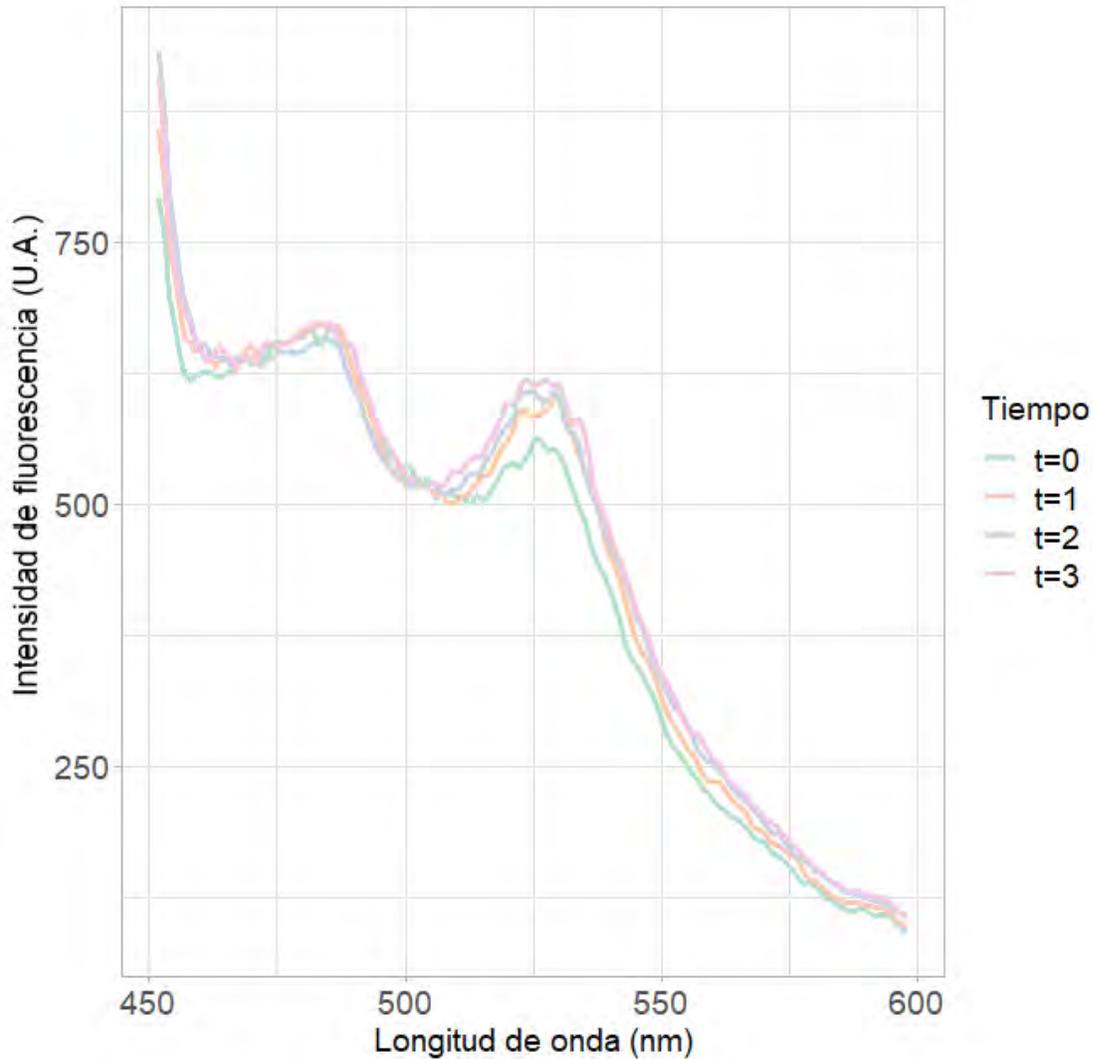


Figura 24: Efecto del tratamiento con IBMX y GMPc sobre la fluorescencia emitida por el sensor. Dependencia del tiempo.

La fluorescencia emitida por el sensor CUTie2 a distintas longitudes de onda, luego de distintos intervalos del tratamiento fue medida con fluorimetría de lisados de células Schneider-2 transfectadas. Excitación: 435nm, emisión: entre 450 y 600nm. Cada una de las curvas de distinto color corresponde a la fluorescencia emitida luego de un tiempo de tratamiento (de $t=0$ a $T=3$). La fluorescencia aumenta a medida que se incrementa el tiempo de tratamiento con el estímulo. UA.: Unidades arbitrarias.

4.1.5 Análisis por microscopía confocal

Con el fin de visualizar el biosensor por una tercer técnica y determinar su localización subcelular, procedí a tomar imágenes por microscopía confocal de un preparado de células S2 CUTie2 fijadas con PFA 4% y adheridas a un cubreobjetos tratado con concanavalina A. Utilicé *Hoechst 33342* como marcador nuclear.

La figura 25, donde se pueden observar varios núcleos marcados, es representativa de los resultados obtenidos. Algunas células no exhiben fluorescencia CFP o YFP y en aquellas que sí lo hacen, la fluorescencia es citoplásmica y tiene aspecto granular.

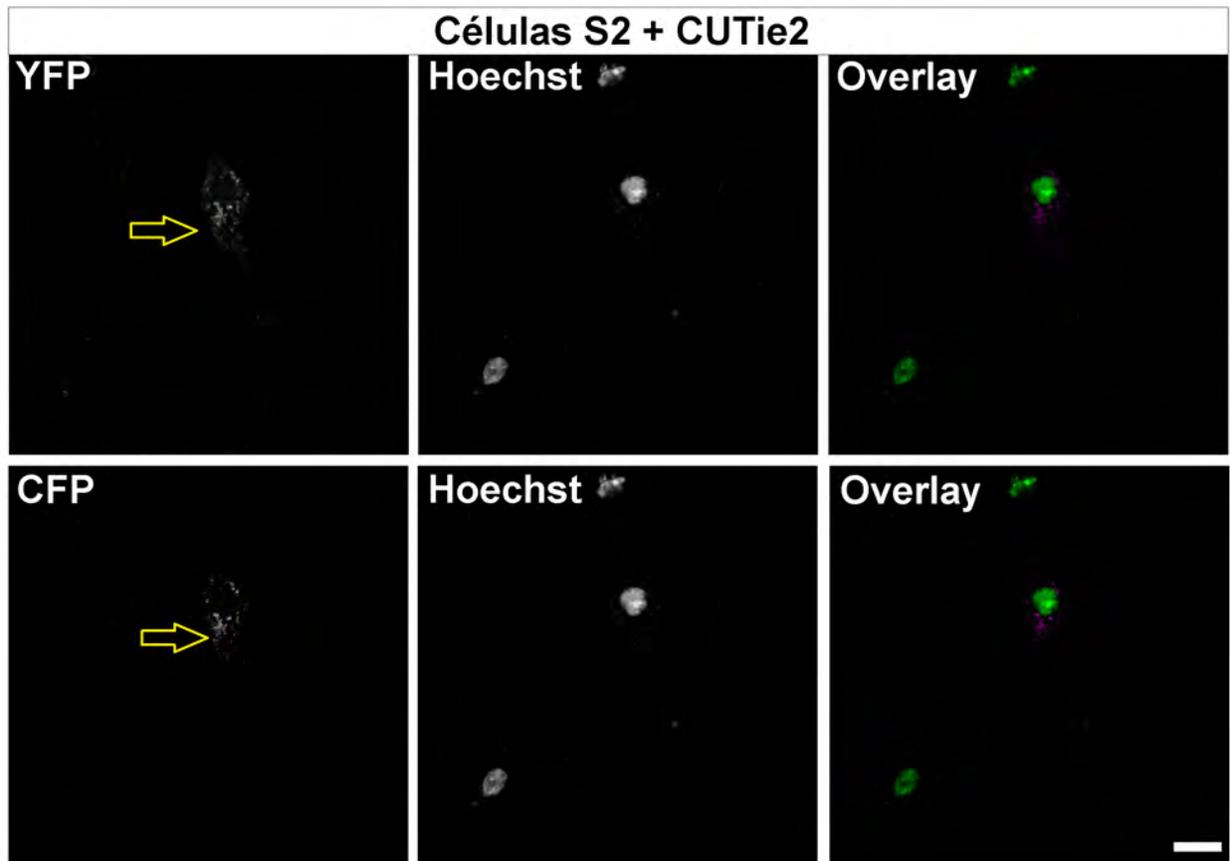


Figura 25: Distribución subcelular del biosensor CUTie2 observada mediante microscopía confocal en células S2 inducidas. Microscopía confocal de células S2 CUTie2 inducidas por 48hs; ADN en verde; CFP e YFP en magenta; Barra de escala:

20μm. plano focal único.

4.2 Expresión de CUTie2 en *Drosophila melanogaster*

4.2.1 Caracterización fenotípica de CUTie2

Mediante las construcciones realizadas inicialmente clonando el biosensor de GMPc CUTie2 en el vector pUAST, logré cumplir con el objetivo principal de esta tesis de maestría y generar el primer organismo multicelular transgénico viable que expresara constitutivamente este biosensor. Por tratarse del primero, procedí a caracterizar fenotípicamente a la cepa transgénica de *D. melanogaster* UAS-CUTie2 analizando los rasgos característicos de cada uno de los marcadores presentes en los cromosomas balanceadores dependiendo del cromosoma en el que se encuentra la construcción.

Por un lado, la cepa que tiene el biosensor en el cromosoma II contiene el balanceador *CyO* (Figura 26), que se caracteriza por tener alas curvas. Por otro lado, la cepa que lo tiene en el cromosoma III tiene el balanceador *TM3* que, a diferencia de los pelos finos y terminados en punta característicos de la mosca silvestre, tiene los pelos más cortos y gruesos, terminando de forma recta y no en punta (Figura 28). Estos resultados coinciden con lo esperado.

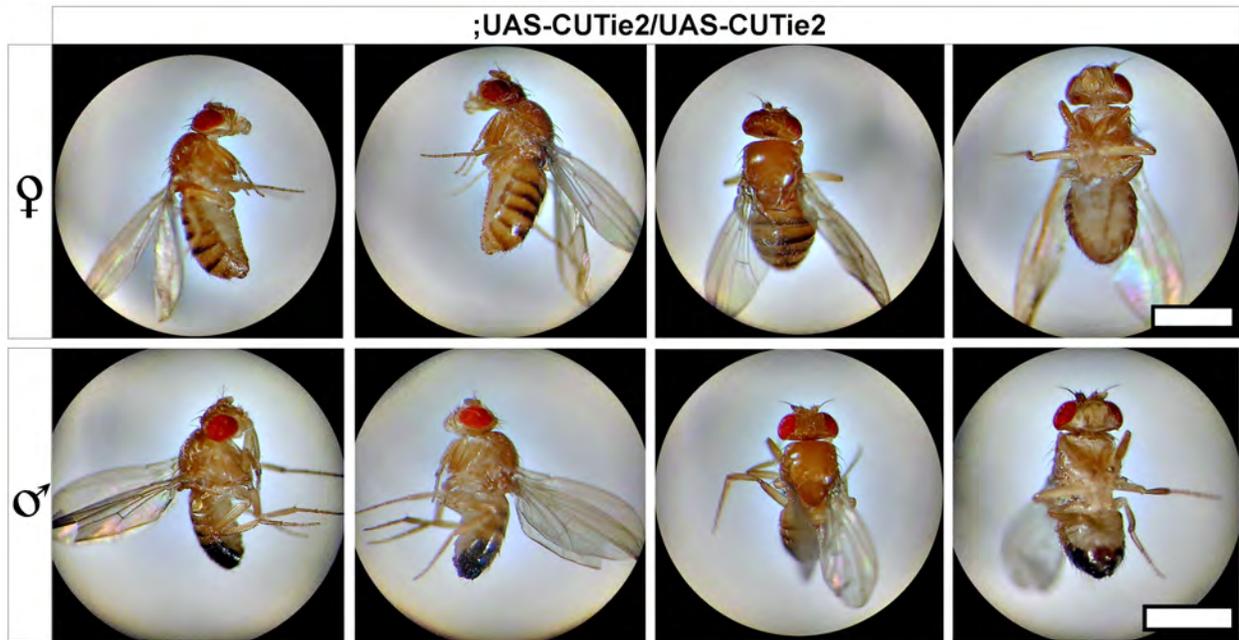
Además, se muestran las fotos tomadas de la cepa homocigota en el cromosoma II (Figura 27) y la cepa homocigota para el cromosoma III (Figura 29), confirmando que en homocigosis se pierden los rasgos fenotípicos del balanceador, tal como era previsible.

Otra característica fenotípica de estas moscas que permite su clasificación es que en heterocigosis tienen los ojos anaranjados, producto de que los huevos inyectados con el transgén provenían de moscas con la mutación *white* y en la construcción que tiene el biosensor se encuentra la secuencia codificante para el producto del gen *miniwhite* (que codifica una proteína necesaria para la pigmentación del ojo), que produce un efecto de compensación del fenotipo. Es por ello que, cuando el biosensor está en homocigosis, se revierte en mayor medida el fenotipo de la mutación *white* y las moscas vuelven a tener los ojos rojos de un color similar al de la cepa silvestre.

Estas moscas se encuentran disponibles en el *fly stock* del Departamento de Biología del Neurodesarrollo (IIBCE).



Figura 26: Caracterización fenotípica de la cepa de D. melanogaster conteniendo el biosensor. Heterocigosis en cromosoma II. Imágenes de hembras en la primer fila y machos en la segunda fila de la cepa ;UAS-CUTie2/CyO. De izquierda a derecha se muestran los lados: lateral derecho, lateral izquierdo, dorsal y ventral; Se observa la característica fenotípica del balanceador CyO que son las alas curvas; Barra de escala: 1mm.



*Figura 27: Caracterización fenotípica de la cepa de *D. melanogaster* conteniendo el biosensor. *Heomocigosis* en cromosoma II. Imágenes de hembras en la primer fila y machos en la segunda fila de la cepa ;UAS-CUTie2/UAS-CUTie2. De izquierda a derecha se muestran los lados: lateral derecho, lateral izquierdo, dorsal y ventral; Se observa la ausencia de alas curvas, debida a la ausencia del cromosoma balanceador; Barra de escala: 1mm.*

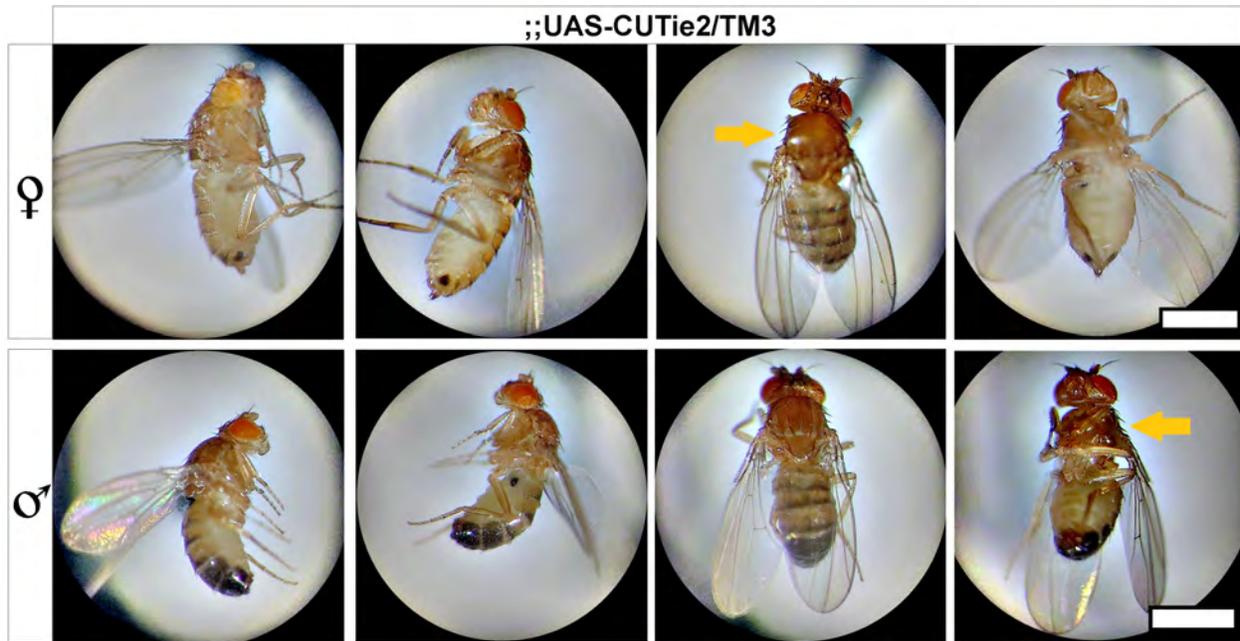


Figura 28: Caracterización fenotípica de la cepa de *D. melanogaster* conteniendo el biosensor. **Heterocigosis en cromosoma III.** Imágenes de hembras en la primer fila y machos en la segunda fila de la cepa **::UAS-CUTie2/TM3**. De izquierda a derecha se muestran los lados: lateral derecho, lateral izquierdo, dorsal y ventral; Se observan los pelos característicos del balanceador *TM3*, que son gruesos y sin punta fina; Barra de escala: 1mm.



Figura 29: *Caracterización fenotípica de la cepa de D. melanogaster conteniendo el biosensor. Homocigosis en cromosoma III. Imágenes de hembras en la primer fila y machos en la segunda fila de la cepa ;;UAS-CUTie2/UAS-CUTie2. De izquierda a derecha se muestran los lados: lateral derecho, lateral izquierdo, dorsal y ventral; Se muestra como en homocigosis se pierde la característica de los pelos gruesos del balanceador TM3 y las moscas presentan pelos afinados y en punta, debida a la ausencia del cromosoma balanceador; Barra de escala: 1mm.*

4.2.2 Cruce para dirigir el biosensor a neuroblastos

Para demostrar la posibilidad de dirigir la expresión del biosensor a diferentes tipos celulares utilizando el sistema UAS-GAL4, decidimos realizar cruzamientos usando *drivers* ya caracterizados por conferir expresión específica en neuroblastos (*insc-GAL4*), en neuronas (*elav-GAL4*) o en todas las células (*tubulina-GAL4*).

Primero examiné si podía conseguir la expresión del sensor en neuroblastos del cerebro larval utilizando el *driver* *insc-GAL4* y realicé el cruce seleccionando pupas hembras de la cepa $UAS-CUTie2/CyO$, con el fin de tener hembras vírgenes para cruzar con machos de la cepa *insc-GAL4*.

En este experimento observé que la intensidad de ambas fluorescencias (CFP e YFP) era muy baja, siendo la CFP casi imperceptible (Figura 30).

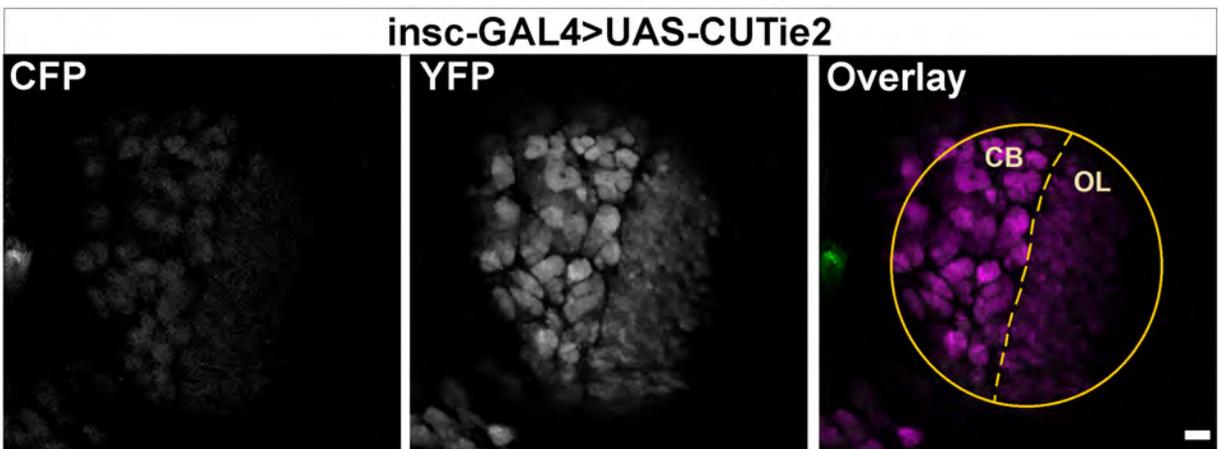


Figura 30: *Presencia de fluoróforos del biosensor demostrada por microscopía confocal en cerebros larvales.* Vista dorsal del hemisferio izquierdo del cerebro de una larva resultante del cruce *insc-GAL4* x *UAS-CUTie2* en heterocigosis. Imágenes tomadas por microscopía confocal; En verde se muestra la CFP y en magenta la YFP. plano focal único. Barra de escala: 20 μ m.

4.2.3 Análisis del efecto de la expresión del sensor CUTie2 en homocigosis y heterocigosis

La dosis genética del GAL4 o del elemento UAS afecta el nivel de expresión (Rezával et al., 2007) de modo que una doble copia (homocigosis del GAL4, el UAS, o ambos) generalmente resulta en una expresión mayor del transgén que a partir de una copia única (heterocigosis).

Dada la baja intensidad de fluorescencia CFP obtenida en individuos heterocigotos como se ha referido en el apartado 4.2.2, buscamos la forma de aumentar su intensidad intentando obtener larvas con mayor expresión del sensor duplicando el transgén por medio de homocigosis.

Para ello seleccioné pupas de ambos sexos en diferentes tubos y, una vez eclosionadas seleccioné las moscas que no tuvieran alas curvas (es decir, individuos que tienen el sensor en homocigosis). Como las hembras eran vírgenes se garantizó que toda la descendencia sería homocigota. Con este procedimiento generé la cepa homocigota ;UAS-CUTie2/UAS-CUTie2.

Por microscopía confocal comparé la fluorescencia de CFP e YFP en cerebros de larvas de tercer estadio de homocigotas y heterocigotas, producto del cruce con *insc-GAL4* y aparentemente se observa un aumento de intensidad en ambos fluoróforos (Figura 31), por lo que en los demás experimentos continué utilizando la cepa en homocigosis.

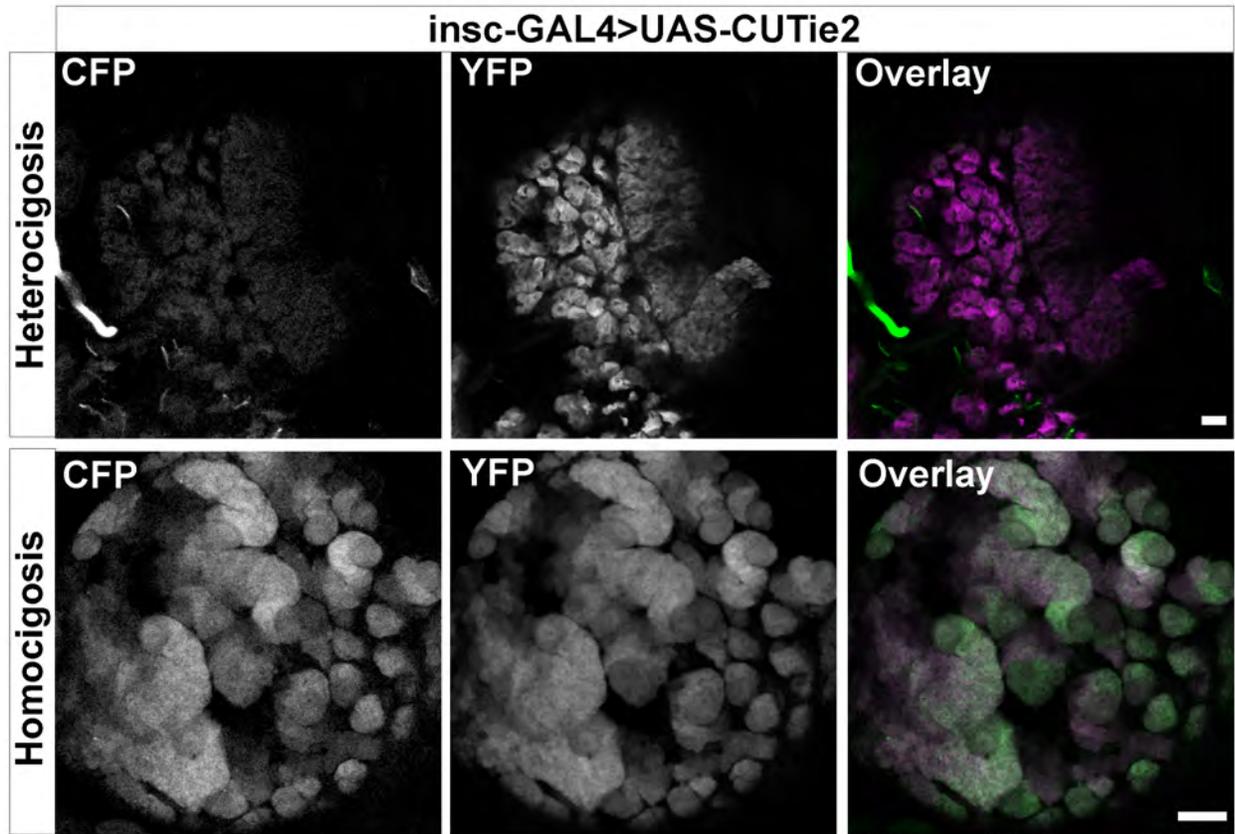


Figura 31: Efecto positivo de la homocigosis sobre la fluorescencia de CFP e YFP. Imagen del hemisferio izquierdo (vista dorsal de un plano focal) de larvas del cruce insc-GAL4 x UAS-CUTie2 en homocigosis y heterocigosis; Imágenes tomadas por microscopía confocal. En verde se muestra la CFP y en magenta la YFP. plano focal único. Barra de escala: 20 μ m.

4.2.4 Análisis del efecto de la temperatura en la expresión del transgén

El sistema UAS-GAL4 es sensible a la temperatura (Odenthal and Brinkkoetter, 2019) y se sabe que, si las moscas son cultivadas a temperaturas dentro del rango de 18 a 29°C, a mayor temperatura se obtiene mayor expresión de la proteína GAL4, lo cual aumenta la expresión del transgén acoplado a la secuencia UAS (que en nuestro caso codifica el sensor CUTie2).

Como la emisión de ambos fluoróforos en larvas cultivadas a 25°C, seguía siendo más baja de lo esperado decidimos analizar si incubando las larvas a 29°C se producía un aumento en la intensidad de fluorescencia. Para esto subdividí las larvas provenientes del cruce *insc-GAL4* x UAS-CUTie2 en dos grupos y mantuve uno de ellos a 25°C y el otro a 29°C (durante las 24hs previas a la disección).

En las imágenes tomadas por microscopía confocal en las mismas condiciones, se observa que el aumento de la temperatura provoca un aumento en la intensidad de fluorescencia de ambos fluoróforos (Figura 32).

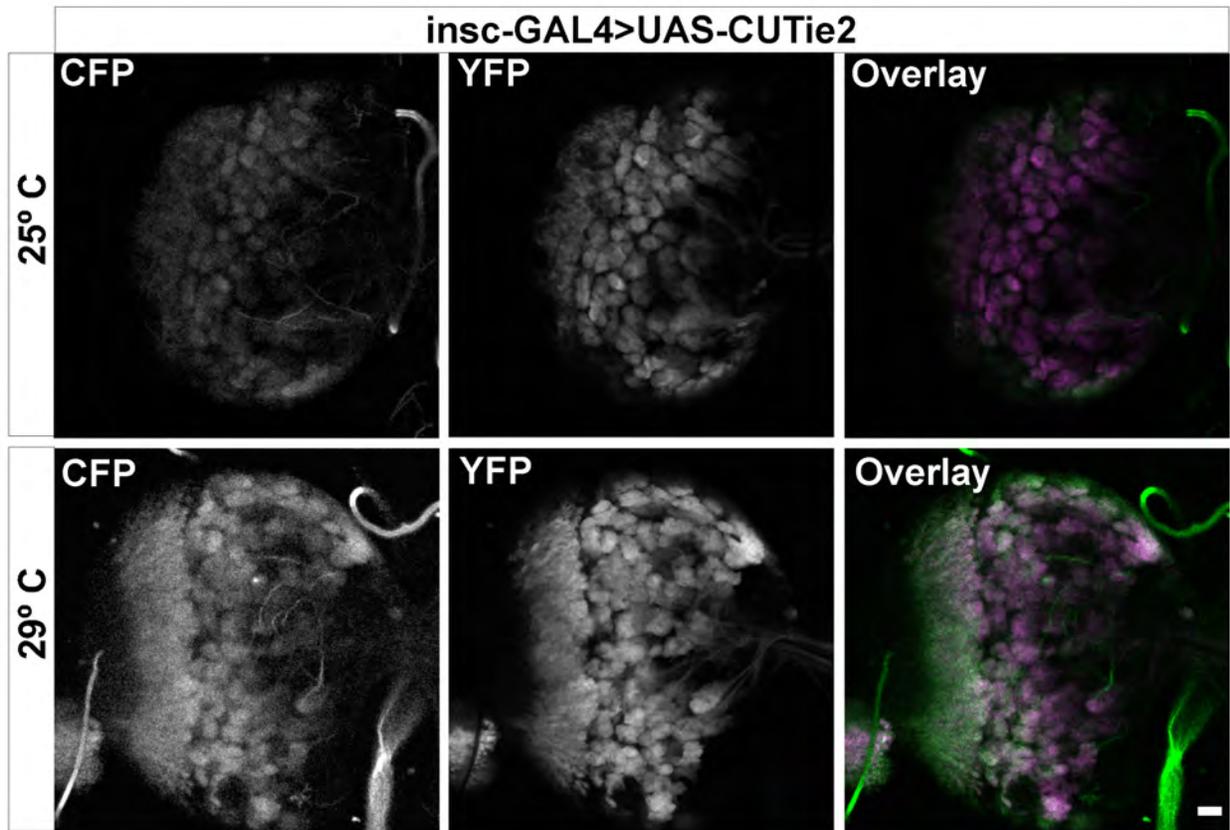


Figura 32: Efecto positivo de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia de ambos fluoróforos. Imagen del hemisferio derecho de cerebros de larvas del cruce *insc-GAL4 x UAS-CUTie2* mantenidas a temperaturas de 25°C vs 29°C (24hs previas a la disección). Imágenes tomadas por microscopía confocal. En verde se muestra la CFP y en magenta la YFP. También se observan en verde las estructuras tubulares que son tráqueas y traqueolas que autofluorescen cuando son iluminadas con luz de longitudes de onda del rango violeta-azul. plano focal único. Barra de escala: 20µm.

Para verificar que la temperatura más alta causaba un aumento de la intensidad de fluorescencia, tanto de la CFP como de la YFP, hice un análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia por píxel, en base a datos obtenidos de los 8 planos contiguos de mayor intensidad de 5 cerebros a 25°C y de 5 cerebros a 29°C.

Mediante este análisis confirmé que la temperatura causa un aumento significativo en la

intensidad de fluorescencia con un p-valor de 0,027 para la CFP (Figura 33A) y de $1,2 \times 10^{-5}$ en el caso de la YFP (Figura 33B), por lo que para los demás ensayos opté por colocar las larvas a 29°C durante las 24hs previas a la disección.

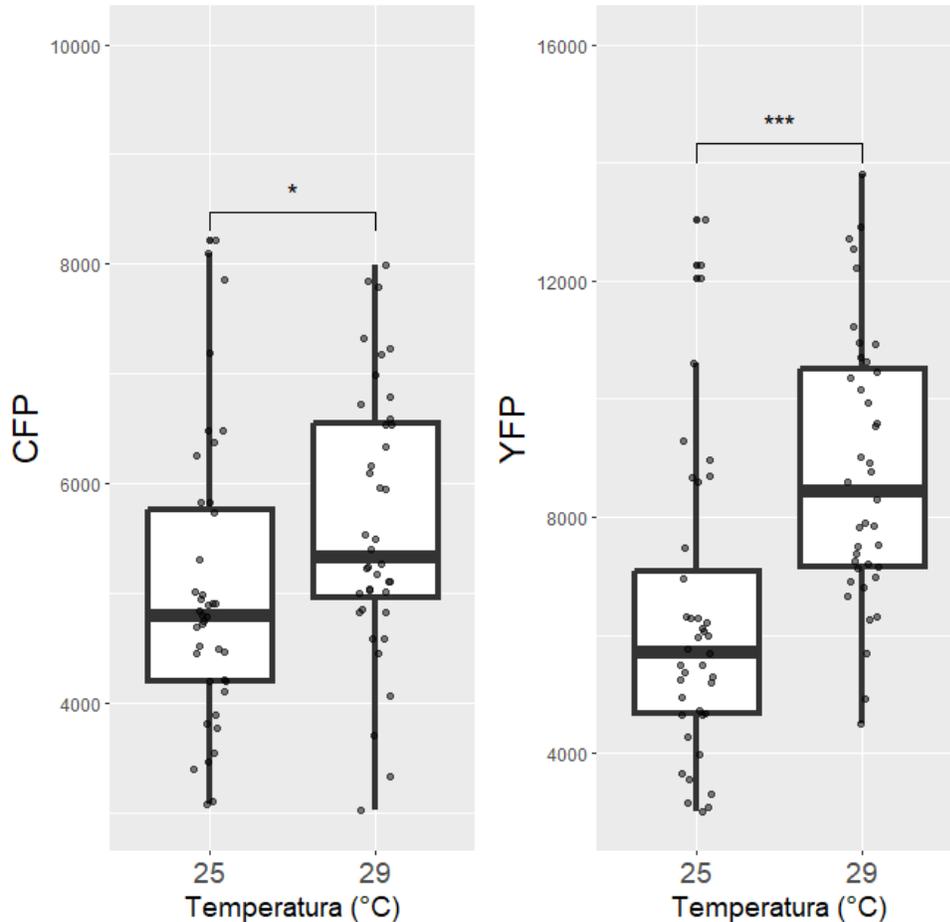


Figura 33: Análisis estadístico del efecto positivo de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia. Intensidad de fluorescencia por pixel de CFP (A) e YFP (B) de larvas del cruce *insc-GAL4 x UAS-CUTie2* (homocigotas) incubadas a 25°C y 29°C. Test de Mann-Whitney-Wilcoxon (CFP $p=0,027$, YFP $p=1,2 \times 10^{-5}$).

Utilizando la cepa homocigota para CUTie2 y dejando las larvas *insc-GAL4 > UAS-CUTie2* a 29°C las 24hs previas a la disección, hice una doble inmunotinción con anticuerpos anti-Dpn y anti-Pros, para identificar neuroblastos y células madre ganglionares respectivamente, ya que en los ensayos previos se veía que el *driver* *insc-GAL4* dirigía la expresión del sensor no

sólo a neuroblastos.

El resultado de ambos cruces confirmó que se puede dirigir la expresión del sensor de modo específico a distintos tipos celulares (Figura 34). Una característica que observé en estas imágenes del biosensor dirigido a neuroblastos es que se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma.

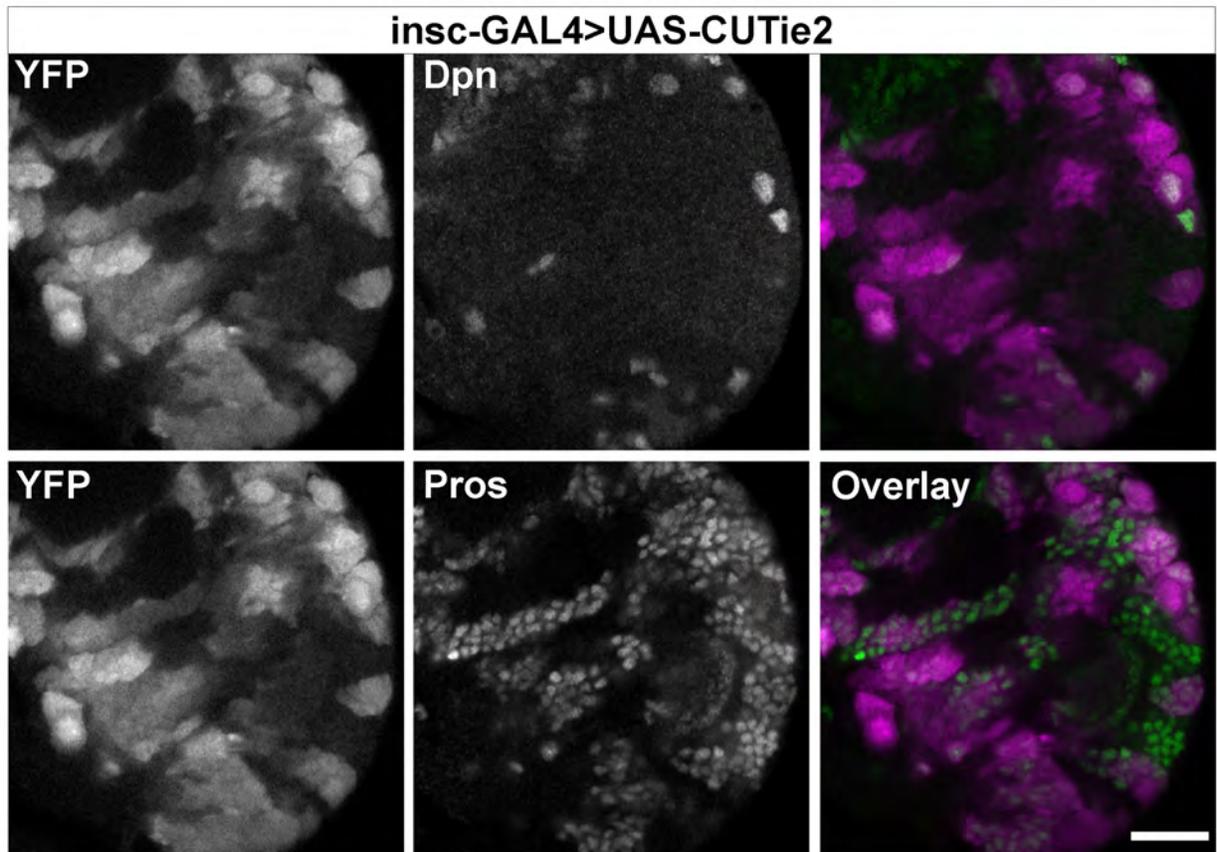


Figura 34: Presencia de la expresión del biosensor en neuroblastos y CMG. Imagen del hemisferio izquierdo de un cerebro de larva del cruce *insc-GAL4 x UAS-CUTie2* marcado con anti-Dpn y anti-Pros mediante microscopía confocal; En verde marcación con anti-Dpn o anti-Pros, según corresponda y en magenta la YFP. plano focal único. Barra de escala: 20 μ m.

Debido a que se observa la colocación de YFP con los respectivos anticuerpos para la marcación de neuroblastos y CMG, nos planteamos dos posibilidades. Por un lado que el

driver sea poco específico y dirija la expresión del biosensor también a otras células o, por otro lado, que el biosensor tenga un tiempo largo de vida media, lo que podría explicar que se transmita a la descendencia celular de los neuroblastos.

Decidimos hacer un cruce adicional utilizando el *driver* *insc-GAL4*, pero con una cepa de mosca que expresa **GFP** bajo control de un elemento UAS, para ver si observábamos lo mismo que con el cruce de CUTie2.

Realicé una doble inmunomarcación con los mismos anticuerpos y observé que la **GFP** se expresa en neuroblastos y en CMG, lo que podría deberse a una inespecificidad del *driver* o a que las CMG donde se ve señal, aún presenten expresión de *Dpn* (Figura 35).

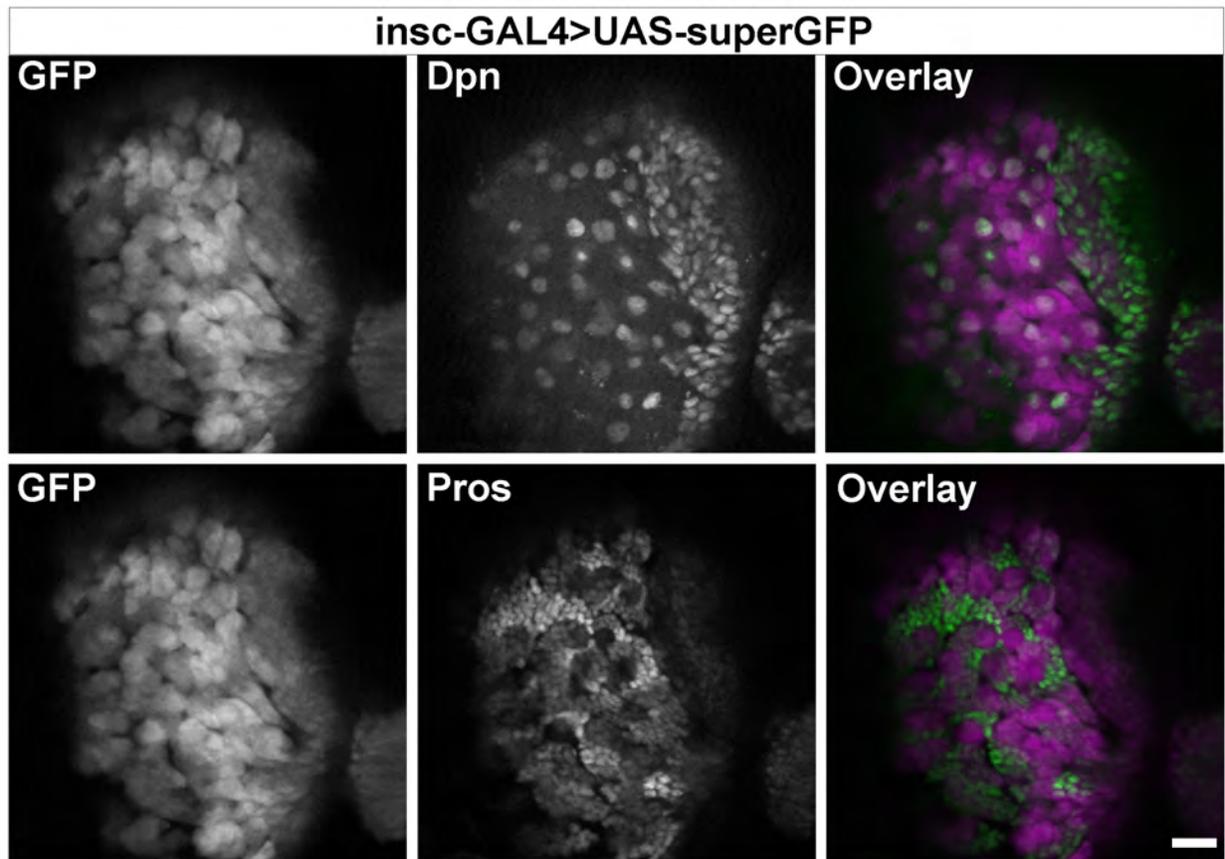


Figura 35: Análisis de expresión de GFP en neuroblastos y CMG. Imagen del hemisferio derecho de un cerebro de larva 3 del cruce insc-GAL4 x UAS-superGFP marcado con anti-Dpn y anti-Pros mediante microscopía confocal. En verde inmunomarcación con anti-Dpn o anti-Pros, según corresponda y en magenta la GFP. plano focal único. Barra de escala: 20µm.

4.2.5 Cruce de moscas UAS-CUTie2 con diferentes *drivers*

Para demostrar que el sistema UAS-GAL4 se puede utilizar en la cepa transgénica UAS-CUTie2 generada en este trabajo de tesis y que la misma es capaz de responder adecuadamente a la transactivación por GAL4, busqué dirigir la expresión del biosensor a otros tipos celulares además de neuroblastos como se mostró en los apartados anteriores.

Primero dirigí la expresión del sensor a neuronas mediante el cruce con el *driver* neuronal *elav-GAL4* (*elav-GAL4* x UAS-CUTie2). Para corroborar la expresión neuronal hice una inmunotinción con anticuerpos específicos para la proteína Elav en cerebros de larvas de la progenie F1 del cruce *elav-GAL4* x UAS-CUTie2 y tal como muestra la figura 36, observé colocalización entre el marcador neuronal y la fluorescencia emitida por el sensor.

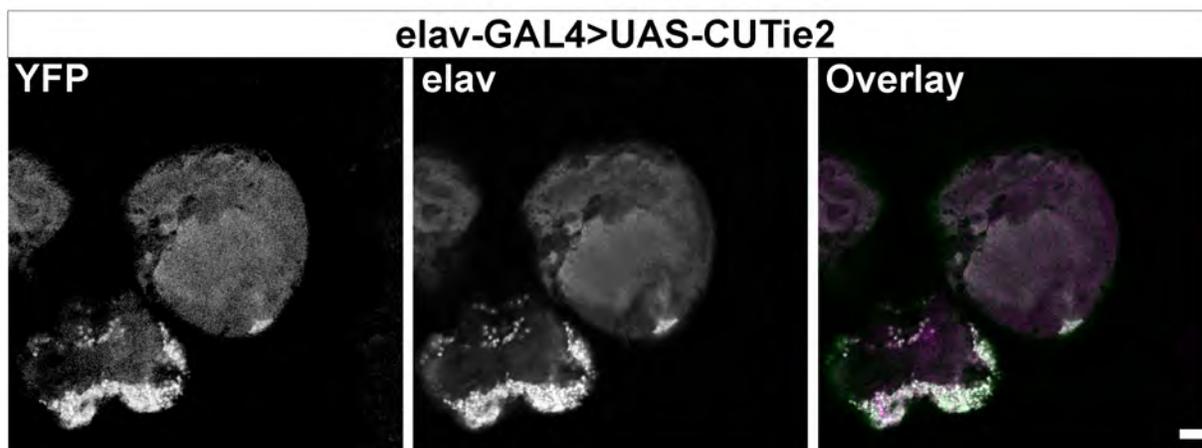


Figura 36: Presencia de fluorescencia del biosensor en neuronas. Imagen del cerebro y parte del cordón nervioso ventral de una larva *elav-GAL* x UAS-CUTie2 mediante microscopía confocal. En magenta la YFP y en verde anti-*elav*. Se confirmó la colocalización de ambas fluorescencias. plano focal único. Barra de escala: 20 μ m.

También hice un cruce utilizando el *driver* *tub-GAL4*, que dirige la expresión a todas las células, en mayor o menor medida, dependiendo del nivel de expresión de tubulina de cada tipo celular. En este caso, usé como contraste una marcación de la actina filamentosa con faloidina conjugada a AlexaFluor™633.

En la figura 37 se puede observar la presencia del biosensor en todas las células del cerebro

larval y la localización de la marcación característica de la faloidina. Esta fluorescencia es particularmente intensa en la zona central (neuropilo), ocupada por axones y fibras neuronales, muy enriquecidas tanto en tubulina como en actina.

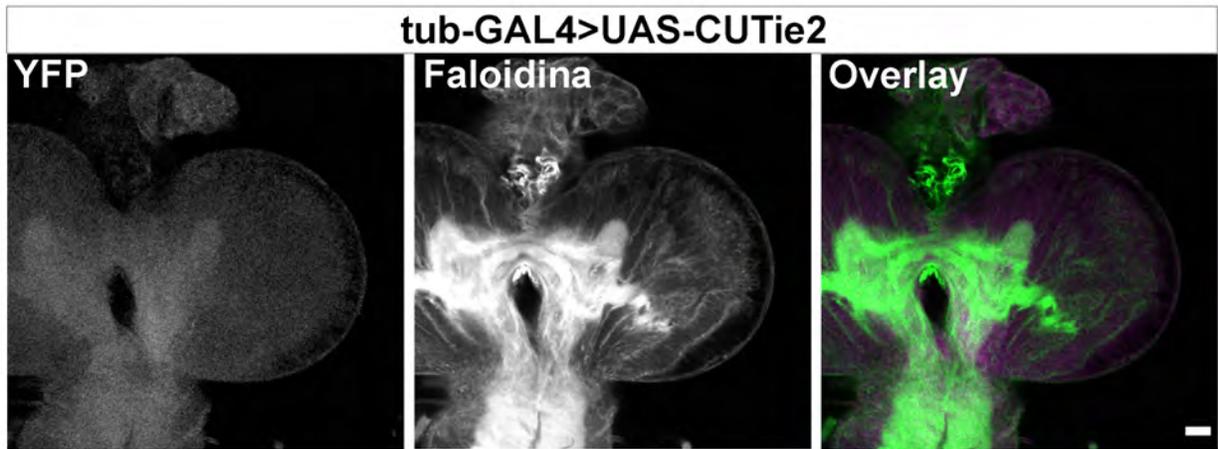


Figura 37: Análisis de la expresión del biosensor dirigida con un driver pancelular (tubulina). Imagen del cerebro de una larva estadio 3 cruce tub-GAL4 x UAS-CUTie2 (24hs previas a 29°C) mediante microscopía confocal. En verde actina F marcada con faloidina y en magenta la YFP. plano focal único. Barra de escala: 20µm.

4.2.6 Citometría de flujo a partir de cerebros disgregados

Con el objetivo de analizar si aumentaba la población de células CFP, YFP y FRET positivas tras el agregado de GMPc en la muestra de cerebros disgregados de nuestra cepa transgénica de *Drosophila*, decidí hacer un análisis por citometría de flujo, a partir de cerebros larvales resultantes del cruce *insc-GAL4* x *UAS-CUTie2*.

Dado que la muestra biológica es un disgregado de cerebro, hay gran diversidad de tipos celulares y no se pueden identificar poblaciones específicas. Sin embargo, se pueden identificar células positivas para CFP e YFP que asumimos que son neuroblastos por el *driver* utilizado.

Para estos ensayos tomé datos 1 y 5 minutos luego de agregar GMPc y como controles negativos usé cerebros de la cepa parental sin biosensor y cerebros del cruce *insc-GAL4* x *UAS-CUTie2* sin el agregado de GMPc (expresión basal). Los eventos se registraron para los tres canales individuales: CFP, YFP y FRET.

En la figura 38 se observa un aumento en el porcentaje de población positiva para el canal de CFP al minuto de agregar GMPc en comparación con la muestra sin agregado de un derivado de GMPc capaz de permear la membrana celular (8Br-GMPc). Este porcentaje disminuye rápidamente luego de 5 minutos. Esta dinámica también se vió en los canales de YFP (Figura 39) y en el canal de FRET (figura 40).

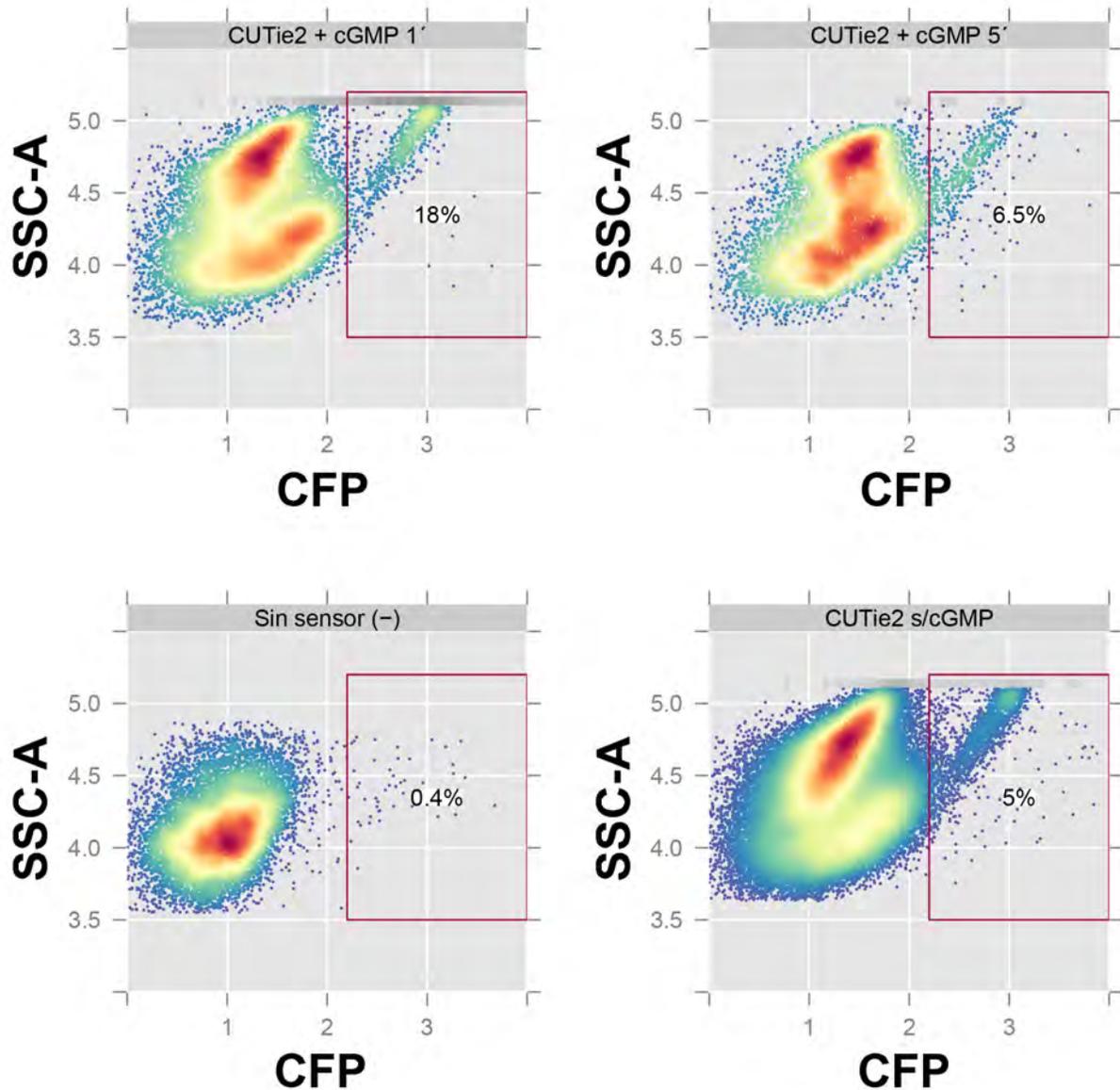


Figura 38: Respuesta del sensor CUTie2 al agregado de 8-Br-GMPc. Dependencia del tiempo. Canal de CFP

Plots de eventos de células individuales provenientes de cerebros de larvas de estadio 3 *insc-GAL4>UAS-CUTie2*. Intensidad de fluorescencia de CFP en función de la granularidad celular (SSC-A). En los gates se marca la población positiva para dicho fluoróforo. Comparación a 1 y 5 minutos luego del agregado de 8-Br-GMPc. Controles negativos sin sensor y sin GMPc. Datos obtenidos por citometría de flujo y analizados con R.

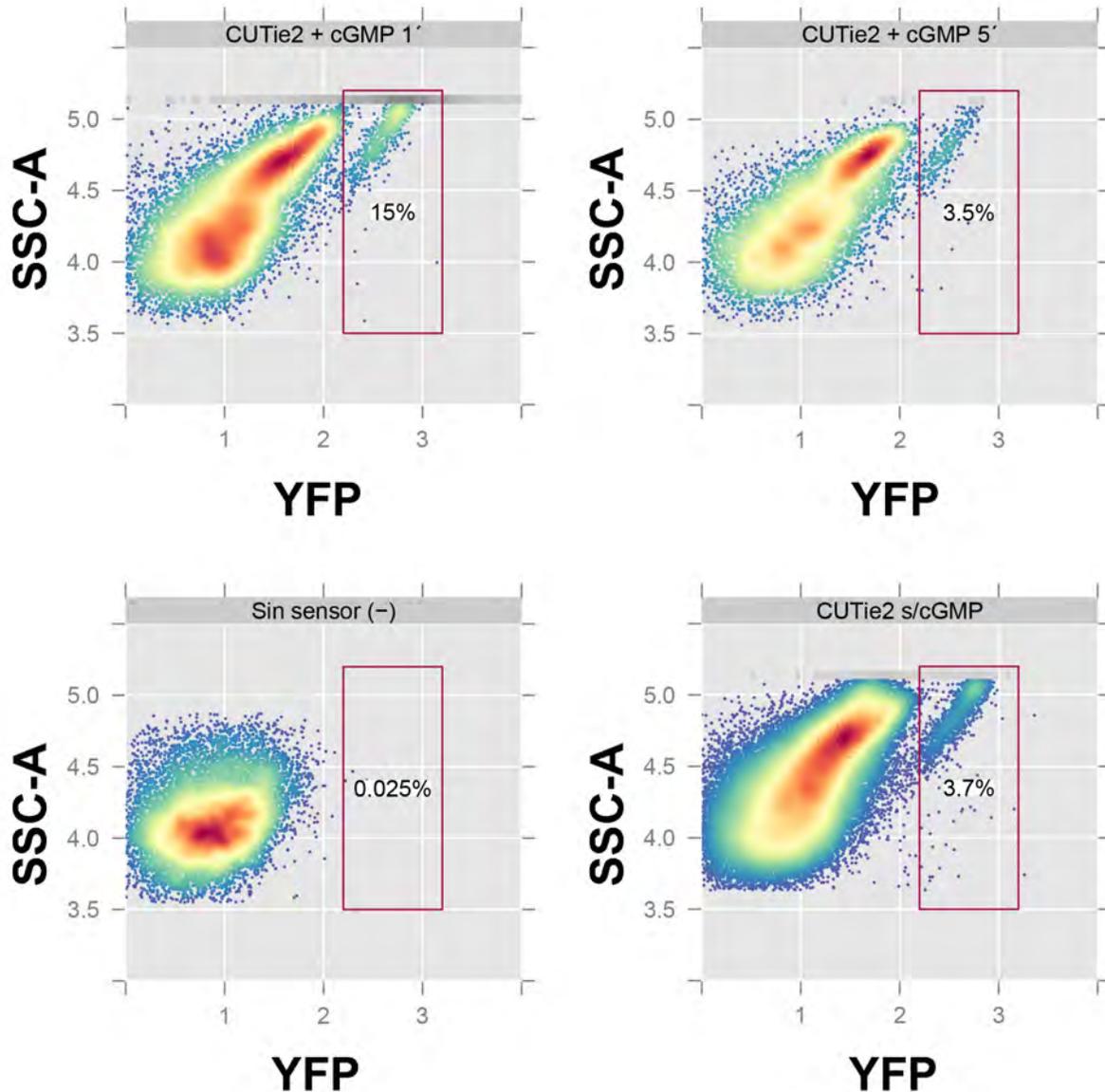


Figura 39: Respuesta del sensor CUTie2 al agregado de 8-Br-GMPc. Dependencia del tiempo. Canal de YFP

Plots de eventos de células individuales provenientes de cerebros de larvas de estadio 3 *insc-GAL4>UAS-CUTie2*. Intensidad de fluorescencia de YFP en función de la granularidad celular (SSC-A). En los gates se marca la población positiva para dicho fluoróforo. Comparación a 1 y 5 minutos luego del agregado de 8-Br-GMPc. Controles negativos sin sensor y sin GMPc. Datos obtenidos por citometría de flujo y analizados con R.

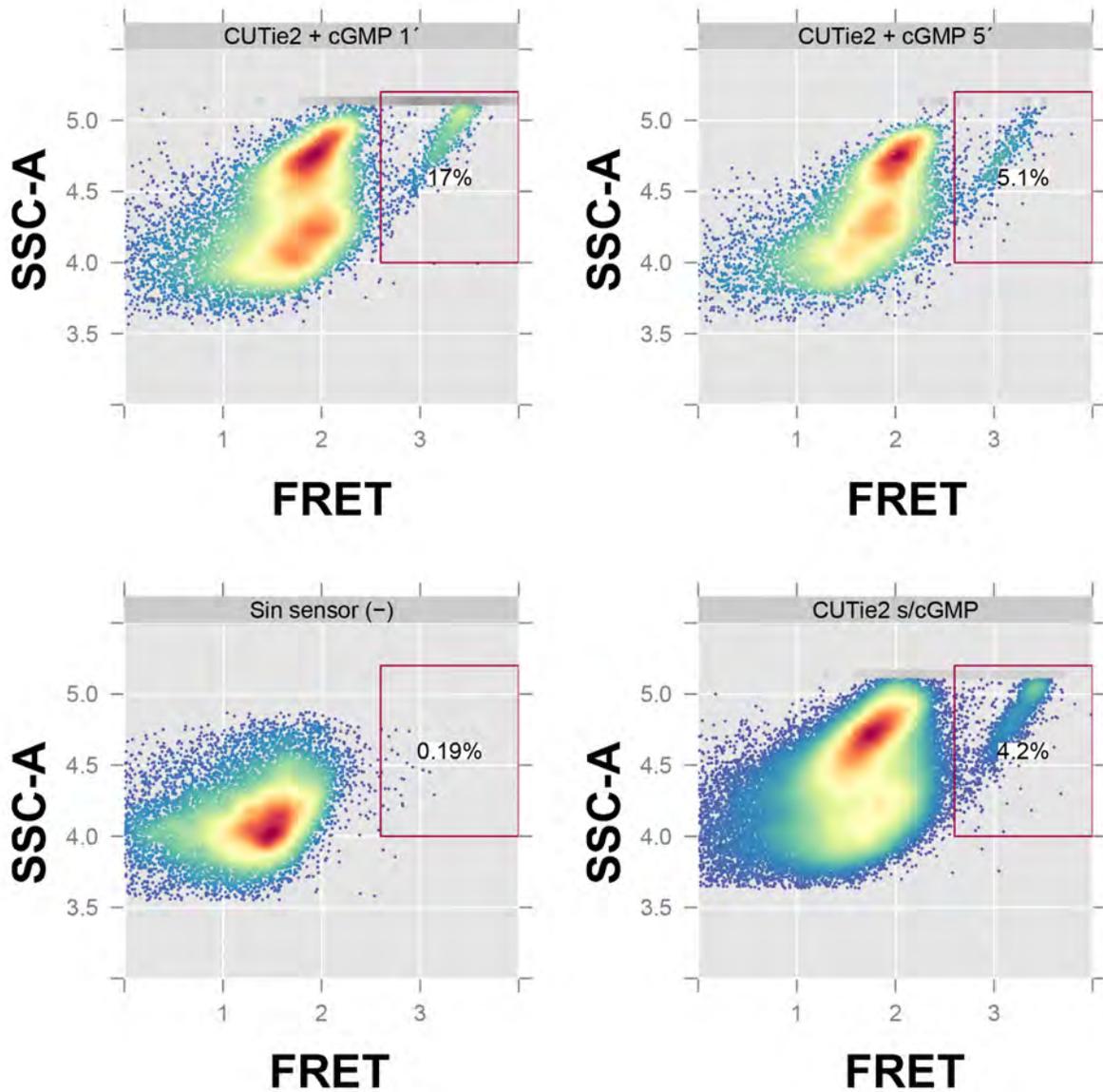


Figura 40: Respuesta del sensor CUTie2 al agregado de 8-Br-GMPc. Dependencia del tiempo. Canal de FRET

Plots de eventos de células individuales provenientes de cerebros de larvas de estadio 3 *insc-GAL4>UAS-CUTie2*. Intensidad de fluorescencia de FRET en función de la granularidad celular (SSC-A). En los gates se marca la población positiva para dicho fluoróforo. Comparación a 1 y 5 minutos luego del agregado de 8-Br-GMPc. Controles negativos sin sensor y sin GMPc. Datos obtenidos por citometría de flujo y analizados con R.

5. DISCUSIÓN

Esta tesis es parte de un proyecto de investigación cuya hipótesis principal es que la guanilato ciclasa soluble atípica actúa como sensor de oxígeno, que eleva los niveles de GMPc en condiciones de hipoxia en el cerebro en desarrollo.

Como objetivo principal planteamos generar cepas transgénicas de moscas *Drosophila melanogaster* que expresaran un biosensor de GMPc y realizar una caracterización preliminar de su funcionamiento *in vitro* y *ex vivo*. Realicé los ensayos *in vivo* e *in vitro* mediante tres técnicas: microscopía confocal, citometría de flujo y fluorimetría.

La emergencia sanitaria provocada por la pandemia de COVID-19 coincidió con el inicio de esta tesis y demoró la instalación del microscopio de dos fotones. Esto nos llevó a abandonar el objetivo específico que proponía usar ese instrumento para analizar *in vivo* el sensor en la cepa de moscas generada. Decidimos entonces adecuarnos a la situación y reemplazar ese objetivo por otro realizable: generar una línea estable de células Schneider 2 (S2) de *D. melanogaster* que contuviera y expresara un biosensor de GMPc.

5.1 Estabilidad y expresión del biosensor CUTie2 en células S2

El grupo de trabajo del Dr. Pantano del Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares del Institut Pasteur de Montevideo recientemente desarrolló un biosensor FRET capaz de detectar GMPc llamado CUTie2 y lo caracterizó *in silico* (Klein et al., 2021). FRET se ha convertido en un pilar para el estudio de la localización de proteínas en células y tejidos vivos, y se ha vuelto ampliamente utilizado para comprender la señalización celular (Deal et al., 2020). Para generar sensores de GMPc basados en FRET, se puede partir de dos tipos de dominios de unión a GMPc. Por un lado, el que se encuentra en la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), y por otro lado el que se encuentra en la fosfodiesterasa 5, cNMP-BD. Al analizar la cinética de unión en ensayos *in vivo* en células HEK-293 (línea derivada de riñón embrionario humano), resultó ser más rápida la de la construcción con el dominio de unión a

GMPc de PKG (Russwurm et al., 2007). Otro grupo de investigadores generó otro biosensor de GMPc con alta afinidad por GMPc, también basado en FRET, utilizando el dominio de unión a nucleótidos cíclicos carboxilo-terminal de la proteína quinasa (PKG) dependiente de cGMP (Calamera et al., 2019).

Utilizando CdCl₂ para inducir la fluorescencia del sensor, encontramos que tiempos de inducción más cortos daban mejores resultados que aquellos más largos, siendo mejor la inducción a 48hs que a 72hs. A su vez, vimos que la inducción con esta sal de metal era más efectiva que la inducción con CuSO₄. Esto coincide con lo descrito previamente sobre la inducción de la expresión de proteínas en células de *D. melanogaster*, donde los investigadores compararon la inducción con CdCl₂ y con CuSO₄ y concluyeron, al igual que nosotros, que la mejor la inducción es con CdCl₂ (Uribe et al., 2013). Por otro lado, el tiempo de inducción afectó negativamente la viabilidad de las células. Esto probablemente se debe a que la exposición a Cd y otros metales es tóxica para las células en general (Cherian, 1985, Gaetke, 2003). Recientemente se ha demostrado que en larvas de *Drosophila* la exposición al Cd incrementa la muerte celular por apoptosis, produciendo daño en el ADN. El mismo grupo también observó daño celular intestinal y un aumento de las ROS, indicando que este metal provoca estrés oxidativo (Yang et al., 2022). La toxicidad que producen las sales de metales en las células coincide con lo que observé en mis cultivos, sobre todo con la aparición más temprana de deformación celular y apoptosis en la inducción con Cu. Elegimos un promotor que permite inducir la expresión de la proteína con metales, sin embargo, son tóxicos para las células. Esto me lleva a suponer que, si utilizamos otro tipo de promotor que no requiera la adición de un componente tan tóxico, podría aumentar la viabilidad celular en los ensayos. Debe haber una relación costo/beneficio entre aumentar la viabilidad y no perder productividad de la proteína de interés. A su vez, también está descrito que se pueden utilizar cócteles de metales, como por ejemplo una mezcla de CdCl₂ y ZnCl₂, con los metales en menor concentración, en estos ensayos se produjo un aumento en la viabilidad celular sin perder productividad, comprobado por ensayos de purificación de proteína y ensayos enzimáticos (Prosise et al., 2004).

Por microscopía confocal observé que la distribución subcelular del biosensor es citoplásmica

y de aspecto puntiforme. Nuestra construcción tiene la señal de secreción de *Drosophila* BiP río arriba del sitio de múltiple clonado (Invitrogen, n.d.). Esta señal codifica para la chaperona de unión a inmunoglobulina y se utiliza para obtener altos niveles de BiP en el retículo endoplasmático en líneas celulares de S2 (Kirkpatrick et al., 1995). Esta chaperona se une a la proteína (en nuestro caso, el biosensor) aun no plegada en el interior del retículo para guiar su correcto plegamiento (Sano and Reed, 2013). El aspecto puntiforme que se observa, me lleva a pensar que podría deberse al agrupamiento dentro de la célula de copias del biosensor producido, ya sea en el retículo endoplasmático, aparato de Golgi o en vesículas, para confirmarlo se podría realizar una inmunomarcación a proteínas de cada compartimiento. En la producción de proteínas recombinantes se suelen dar problemas de solubilidad, ocasionando cuerpos de inclusión (Moraes et al., 2012). Estos problemas pueden superarse con la utilización de otros vectores disponibles para mejorar el rendimiento de la proteína de interés (Ortega et al., 2018).

Por fluorimetría observé una mejor resolución de las diferencias en intensidad de fluorescencia de ambos fluoróforos al lisar las células. Esto podría deberse a que en estas condiciones el biosensor se encuentra libre en solución y no está presente la interferencia generada por la membrana celular (J. A. Kiernan, 2015). También observé expresión basal del biosensor en las células no inducidas, lo que se ajusta con lo descrito sobre otros sistemas de expresión, donde se ha reportado que ya antes de la inducción existe una expresión mínima de la proteína de interés (Dubendorf and Studier, 1991).

Un experimento de particular interés en esta tesis tenía como objetivo confirmar que el biosensor respondía al GMPc aumentando su fluorescencia. Efectivamente, el agregado de GMPc provocó un aumento en la intensidad de fluorescencia de YFP. Esto coincide con lo descrito en bibliografía, que un aumento en la intensidad de fluorescencia del fluoróforo aceptor está relacionado al efecto del FRET producido (Karpova and McNally, 2006) además de que al excitar a 435nm, estoy excitando la CFP y no la YFP, por lo cual, el pico de YFP que observo es del FRET producido. El hecho de que la YFP aumentara su intensidad y luego se mantuviera constante podría deberse a la cinética de saturación del biosensor, ya que el GMPc no sería degradado debido a la adición del inhibidor de fosfodiesterasas.

También esperaba ver una disminución en la intensidad de fluorescencia de la CFP debido a que parte de su energía es transferida por resonancia a la YFP, a consecuencia del cambio conformacional que sufre el biosensor al acoplar GMPc y el acercamiento de ambos fluoróforos (Klein et al., 2021). Sin embargo, no ocurrió. Esto me lleva a pensar que podría deberse a que la energía emitida por la CFP y absorbida por la YFP no cambió lo suficiente como para ser detectada por el aparato de medición. Dado que no logré observar una disminución en la intensidad de la fluorescencia de la CFP, se podría realizar el mismo ensayo pero comparando entre con y sin adición de IBMX, donde debería haber un aumento y una disminución posterior de la intensidad de fluorescencia de YFP, y observar si produce algún cambio en la CFP. Incluso podría probar otra condición, añadiendo ODQ que es un inhibidor de asGC sin el agregado de IBMX, para eliminar todo el GMPc del medio y que no se vuelva a producir más, limpiando así el sistema y viendo la fluorescencia basal propia del biosensor.

5.2 Expresión y estabilidad del biosensor CUTie2 en la mosca *Drosophila melanogaster*

Existen en la literatura ejemplos de organismos multicelulares que expresan un biosensor de GMPc. Sin embargo, ninguno de ellos tiene la capacidad de ser dirigido a tejidos o a células como las moscas CUTie2 generadas en esta tesis. Recientemente se han utilizado ratones transgénicos que expresan un biosensor de GMPc para estudiar diferentes temas. Estudios realizados en cortes de cerebros de esos ratones mostraron que la aplicación de NO causa un aumento del GMPc en varias regiones del cerebro. Estudios previos muestran la presencia de la vía de señalización de NO-GMPc en esas regiones del cerebro (Peters et al., 2018). Otros estudios realizados en ratones transgénicos que expresan un biosensor de GMPc basado en FRET investigaron las señales vasculares de GMPc asociadas con la vasodilatación *in vivo* (Thunemann et al., 2013) y la producción de GMPc en cardiomiocitos de rata (Schobesberger et al., 2020). Estos biosensores tienen la desventaja de que se necesita generar un nuevo ratón transgénico cada vez que se necesite estudiar un nuevo tejido o tipo celular. Esto conlleva el tiempo de generación de las construcciones sumado al tiempo de desarrollo del modelo experimental.

Nuestras cepas de moscas transgénicas que expresan CUTie2 presentan ventajas frente a los sistemas existentes en ratón relacionadas con el modelo experimental: bajo costo de mantenimiento, instalaciones sencillas, desarrollo desde embrión hasta adulto muy rápido comparado con mamíferos y existencia de numerosas herramientas genéticas, como por ejemplo los cromosomas balanceadores y el sistema UAS-GAL4, que permite dirigir la expresión del biosensor a un tipo celular de interés. Estas características nos permitieron mantener el biosensor tanto en heterocigosis como homocigosis y expresarlo en distintos tipos celulares. Según la literatura disponible a la fecha, esta es la primera vez que se obtiene la expresión de un sensor de GMPc dirigible a tejidos específicos en un organismo multicelular, lo que presenta una ventaja frente a los biosensores mencionados anteriormente.

Las cuatro cepas generadas durante el transcurso de esta tesis se encuentran disponibles para la comunidad científica. Son mantenidas en el stock del Departamento de Biología del Neurodesarrollo en el IIBCE, donde realicé mi maestría y en el Departamento de Biología

de la Universidad de Friburgo donde trabaja el Dr. Boris Egger en Suiza, integrante del proyecto Fondo Clemente Estable en el cual se inscribe el presente postgrado.

Las cepas heterocigotas corresponden fenotípicamente a lo esperado para los cromosomas balanceadores utilizados en cada caso. Estos cromosomas sirven para estabilizar la mutación insertada y son utilizados en aquellos casos que se precise el gen de interés en heterocigosis, ya sea porque se lo necesita así para futuros cruzamientos o porque puede ser letal en homocigosis (Greenspan, 2004). En ambos casos, solicitamos a la empresa que realizó las microinyecciones que la construcción estuviera en heterocigosis para evitar la muerte de la mosca en caso de que el biosensor provocara letalidad en homocigosis. Esta última hipótesis la descarté al generar la cepa homocigota a partir de la heterocigota.

Durante los cruzamientos y experimentos realizados, tanto al crecer estas cepas como larvas progenie de un cruzamiento de estas cepas con otras, observé un enlentecimiento en su desarrollo. Comparando los tiempos entre la aparición de larvas de estadio 1 y la subida por las paredes del frasco de larvas de estadio 3, descubrí que las cepas transgénicas demoraban 2 días más que otras cepas utilizadas en esta tesis, como por ejemplo UAS-GFP, tub-GAL4, elav-GAL4 e insc-GAL4. Este dato lo obtuve de la experiencia de trabajar con estas moscas y tomando anotaciones durante cada experimento. Sin embargo no realicé experimentos particulares ni una cuantificación de esta observación. Se ha demostrado que infecciones por *Pseudomonas fluorescens* provocan fenotipos letales y no letales en *D. melanogaster*, incluido el retraso en el inicio de la metamorfosis y defectos morfológicos en las moscas adultas supervivientes (Olcott et al., 2010). Sin embargo, dado que no encontré bibliografía sobre demora en el crecimiento en cepas transgénicas de *D. melanogaster*, esta particular demora en el crecimiento me lleva a pensar que se podría deber al tamaño de la construcción insertada y que podría ocasionar un enlentecimiento en la replicación del ADN.

Según la literatura existente, tanto en mamíferos como en insectos, se sabe que algunos tipos celulares se vuelven poliploides, aumentando su contenido de ADN para alcanzar un tamaño celular mayor (Sher et al., 2013, Edgar et al., 2014). En estudios realizados sobre larvas de mosca y otros insectos, se analizó su adaptación para crecer más rápido mediante la endoreplicación del ADN, replicándolo en ausencia de mitosis (Reed and Orr-Weaver,

1997, Edgar and Orr-Weaver, 2001). Este endociclo consta únicamente de fases alternas S y G produciendo tejidos poliploides, siendo durante la fase S donde la heterocromatina y las regiones eucromáticas específicas se replican insuficientemente y se reduce el número de copias (Sher et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que el bloqueo de determinados endociclos durante el desarrollo larvario de *D. melanogaster* pueden provocar la muerte del organismo (Schoenfelder et al., 2014). Existe literatura sobre cómo se pueden ver alterados estos endociclos por cambios en la dieta, que afectan tanto el crecimiento de las larvas como su desarrollo (Britton and Edgar, 1998, Contreras et al., 2021). Tal vez la inserción de la construcción conteniendo el biosensor en el genoma de las cepas generadas, podría estar provocando una demora en el crecimiento de las larvas relacionada al aumento del material genético a replicar, sobre todo en aquellas células que se caracterizan por contar con ciclos de endoreplicación y al ser alterado influye en el crecimiento de la mosca.

En los ensayos *ex vivo* por citometría de flujo de células de cerebros larvarios disgregadas demostramos un aumento en el porcentaje de células positivas luego del agregado de GMPc y su consecuente vuelta a la situación basal. Esto se corresponde con datos encontrados en la bibliografía sobre el tiempo de vida medio del GMPc debido a su rápida degradación por parte de las fosfodiesterasas (Morton & Vermehren, 2007). Se demostró previamente que este nucleótido cíclico puede aumentar hasta 50 veces su concentración intracelular al activarse la vía correspondiente y que su tiempo de vida es efímero (Friebe et al., 2020). La rápida degradación del GMPc, que al actuar como segundo mensajero no debería estar presente por un largo tiempo, me lleva a pensar en la posibilidad de medir esta variación con mediciones entre períodos más cortos, con el fin de realizar una curva de porcentaje de células positivas a lo largo del tiempo. Como yo observé un aumento al minuto de adicional GMPc, y luego a los 5 minutos ya se había revertido, quizás tomando una medición cada 30 segundos sea suficiente para observar el aumento y el decrecimiento del porcentaje de células positivas.

Por fluorimetría, no logré observar emisión de ninguno de los fluoróforos utilizando células de cerebros disgregados. Se ha detallado que en cada hemisferio cerebral del cerebro larval se pueden encontrar aproximadamente 98 neuroblastos (Homem and Knoblich, 2012). La poca

cantidad de neuroblastos presentes en cada hemisferio, me hizo suponer en un inicio que la falta de fluorescencia podría deberse a una baja cantidad celular y provocando una baja cantidad del biosensor. Aumenté 10 veces la cantidad de cerebros con el fin de incrementar la cantidad de biosensor, sin embargo, tampoco observé fluorescencia. Esto podría deberse a que la estructura proteica del biosensor haya sido afectada durante la disgregación o que la turbidez del tubo post disgregación bloqueara la emisión de luz del fluorímetro y esta no llegara al biosensor, pese a que la muestra fue filtrada.

5.3 Análisis de FRET *in vitro*

Existen diversos tipos de biosensores para GMPc. Para la presente tesis optamos por un biosensor FRET, debido a que permite realizar mediciones en tiempo real, lo que era fundamental ya que el tiempo de vida del GMPc es muy corto (Friebe et al., 2020). Previamente el grupo del Dr. Sergio Pantano ya había caracterizado *in silico* la funcionalidad del biosensor CUTie2, indicando que mantenía una afinidad casi nativa (Klein et al., 2021).

Una de las principales características que tiene que tener un buen par de fluoróforos para FRET es que se superponga el espectro de emisión del dador con el de absorción del aceptor. Otro factor que influye es el Radio de Förster (R_0 , distancia donde ocurre el 50% de FRET), ya que la eficiencia de FRET depende en gran medida de la distancia que separa el par de fluoróforos y su orientación relativa (Piston and Kremers, 2007).

Es necesario mencionar dos términos importantes a la hora de medir el rendimiento de FRET y del par de fluoróforos utilizados, por un lado, el rendimiento cuántico que hace referencia a la probabilidad de emitir un fotón por cada fotón absorbido, y por otro lado el coeficiente de extinción que es la absorbancia de un fluoróforo en su pico de excitación (Lam et al., 2012).

Existen diversos pares de fluoróforos aptos para FRET. El primer par estable utilizado fue el CFP-YFP, el mismo que utiliza el biosensor CUTie2. Sin embargo, hay algunos donantes derivados de CFP como el mTurquoise2 que tiene el rendimiento cuántico más alto dentro de este tipo de donantes. Hay algunos YFP aptos para utilizar como par aceptor como por ejemplo mVenus, que tienen mayor resistencia al pH y son más fotoestables que el EYFP (Bajar et al., 2016). Los biosensores FRET basados en el par CFP-YFP presentan un rango dinámico FRET relativamente bajo cuando se utilizan en biosensores de quinasas. Esta eficiencia podría aumentar cambiando el par de fluoróforos por LUMP-Venus, que tienen un mejor rendimiento cuántico, mejor rango dinámico y aumenta su eficiencia de FRET (Bajar et al., 2016) o al par Clover-mRuby2, que son de los pares de fluoróforos rojo y verde más brillantes (Lam et al., 2012).

La baja fluorescencia de CFP observada en nuestros ensayos podría deberse al par de fluoróforos, que si bien sigue siendo un buen par FRET, tanto YFP como CFP presentan bajo

rango dinámico. También sufren de fototoxicidad de la luz de excitación CFP y diafonía espectral, ya que la luz de excitación violeta del CFP puede ser fototóxica (Piston and Kremers, 2007; Lam et al., 2012). Particularmente, la CFP tiene una baja fotoestabilidad y su eficiencia es baja al producirse variaciones en el pH (Bajar et al., 2016), lo que podría haber causado el apagado de la fluorescencia al fijar o montar en glicerol 80%. Si se tratase de una pérdida en la intensidad de fluorescencia producto de la disección y la manipulación posterior de los cerebros, esta señal podría mejorar en ensayos *in vivo* al no tener que extraer el cerebro de la mosca, incluso provocando un aumento en la eficiencia del biosensor, ya que no sería expuesto al aire ni a la luz. Esto concuerda con ensayos realizados por otros investigadores, donde demostraron que los coeficientes de extinción de los fluoróforos varían incluso entre diferentes líneas celulares (Li et al., 1999). Por otro lado, en todos los ensayos observé una menor fluorescencia de la CFP con respecto a la YFP, y esto podría deberse a que la YFP posee un rendimiento cuántico mayor que la CFP (Bajar et al., 2016). Una posibilidad para observar mejor la fluorescencia de la CFP es realizar la toma de imágenes en un microscopio confocal directo con inversión en agua.

Nuestros ensayos mostraron que luego del tratamiento con GMPc, aumentó el porcentaje de células positivas a FRET volviendo al estado basal a los 5 minutos, lo que coincidiría con la observación de que en la mosca el aumento fisiológico de GMPc es efímero y se degrada rápidamente (Friebe et al., 2020). Teniendo en cuenta lo poco que se sabe sobre la dinámica temporal de la señalización por GMPc, nuestros resultados permiten pronosticar que las herramientas construidas durante este proyecto podrían permitir realizar experimentos que aumenten el conocimiento científico sobre este tema.

En esta tesis demostramos un aumento en la intensidad de fluorescencia de YFP en células transfectadas con el biosensor CUTie2, lo que podría indicar la activación del FRET. Por lo tanto, el aumento de intensidad de fluorescencia podría deberse a esta activación. En todos los casos observamos una señal basal previa al agregado de GMPc. Esto se debe a que existe una señal basal de FRET en este tipo de biosensores, pero se busca en su diseño minimizarlo. Este FRET basal puede estar causado porque la distancia entre ambos donantes no es la suficiente para impedir que se produzca FRET aún sin ligando (Komatsu et al., 2011).

En los ensayos de microscopía confocal observamos una pérdida de fluorescencia de CFP, al cabo de un tiempo de diseccionar el cerebro y tras la fijación. Esto coincide con bibliografía que indica que el apagado de la fluorescencia puede deberse a la interacción con moléculas que funcionan de “apagadores” disminuyendo su vida útil o rendimiento cuántico (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012). Estos apagadores, al entrar en contacto con el fluoróforo provocan que éste regrese a su estado fundamental sin la emisión de un fotón (Lakowicz, 2006). Debido a esto, para contrarrestar este “apagado” tuve que optar por montar los cerebros inmediatamente en PBS y rápidamente analizarlos por la técnica utilizada.

5.4 Conclusión y perspectiva a futuro

El principal hito en esta tesis de maestría fue la generación del primer organismo transgénico multicelular viable y funcional conteniendo un biosensor de GMPc capaz de ser dirigido a distintos tejidos con un simple cruce, demostrando su correcta expresión y funcionalidad.

Durante este proyecto logré aprender una nueva técnica de clonado (clonado sin restricción) e implementarla exitosamente. También aprendí sobre mantenimiento de *D. melanogaster*, a utilizar el sistema UAS-GAL4, a sexar pupas, a seleccionar tanto pupas como moscas adultas según rasgos fenotípicos característicos, a diseccionar cerebros de larvas, a realizar inmunomarcación de tejidos y montar cerebros para microscopía. También aprendí a transfectar células de insectos, a generar líneas celulares estables, a realizar marcaciones en células y su correcto montaje, a contar células en cámara de Neubauer y a hacer estudios de viabilidad.

A su vez, di mis primeros pasos en el uso de R, pudiendo generar *scripts* para el análisis de datos por fluorimetría, análisis de intensidad de fluorescencia por píxel y mejora del *script* disponible en el laboratorio para el análisis de datos de citometría de flujo mediante *gates* en R para comparar distintos tiempos de inducción y distintas condiciones. Mejoré mis habilidades en el manejo de la plataforma **ImageJ** para el análisis de imágenes de microscopía confocal.

También obtuve la categoría de usuaria independiente del microscopio confocal ZEISS LSM 800 del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), culminé con un puntaje de 100/100 el entrenamiento en citometría de flujo del Institut Pasteur de Montevideo, especializándome en el citómetro de flujo *Attune Nxt*, y aprendí a utilizar el fluorímetro, ya sea para muestras únicas o en secuencia temporal.

Logré expresar satisfactoriamente el biosensor CUTie2 en dos modelos experimentales distintos, en células S2 y en la mosca *D. melanogaster*, pudiendo analizar la fluorescencia de los fluoróforos que lo componen y haciendo un análisis *in vitro* del FRET frente al tratamiento con GMPc.

Este trabajo de tesis de posgrado puede ser visto como el puntapié inicial que permitirá la realización de ensayos *in vivo* sobre la variación de los niveles de GMPc y permitirá

hacer diversos ensayos *ex vivo* e *in vitro*, con la versatilidad de poder dirigir su expresión a diversos tipos celulares, gracias al sistema GAL4-UAS. Este sistema permite solventar la desventaja de otros biosensores en mamíferos mencionados anteriormente, que carecen de esta posibilidad de ser dirigidos a diferentes tejidos.

Como perspectiva a futuro, creo que este biosensor tiene mucho para dar. Con las cepas transgénicas (células y moscas) se pueden hacer estudios como análisis de fasores mediante microscopía confocal multiespectral. Estos experimentos se están llevando a cabo por el Dr. Prieto y colegas de la Unidad de Imagenología avanzada del Institut Pasteur de Montevideo, en los que se puede visualizar de forma cuantitativa la señal de FRET. Sin embargo, esta técnica presenta como limitante que sólo se puede analizar un único plano xy y esto se debe a que se produce un barrido espectral completo del plano xy, por lo que los espectros de emisión suelen ser amplios y se extienden a múltiples canales espectrales y requiere algoritmos de análisis complejos (Fereidouni et al., 2012).

Las moscas transgénicas, ya sea en homocigosis como en heterocigosis se encuentran disponibles para la comunidad científica en el stock del Departamento de Biología del Neurodesarrollo dirigido por el Dr. Rafael Cantera en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y serán enviadas a cualquier colega que las solicite.

Cuando esté disponible la microscopía de dos fotones en nuestro país, se podrán hacer análisis *in vivo* utilizando estas moscas transgénicas y sometiénolas a hipoxia controlada comparando estos resultados con normoxia, para ver el efecto de distintas concentraciones de O₂ utilizando el FRET del biosensor *in vivo*.

Las cepas de moscas y la línea celular S2 CUTie2 generadas en esta tesis se pueden utilizar también para realizar ensayos de medición y curvas de tiempo medio de vida de GMPc, para aumentar los conocimientos sobre su cinética como segundo mensajero. En el caso de las moscas, la utilización del sistema UAS-GAL4 permitirá medir la actividad y cinética del GMPc en diferentes tipos celulares.

5.5 Agradecimientos

Estoy profundamente agradecida con el Dr. Daniel Prieto y el Dr. Rafael Cantera por su supervisión y constante incentivo en aprender nuevas técnicas y a utilizar nuevos instrumentos. Sobre todo, un especial agradecimiento por guiarme para poder culminar satisfactoriamente mi tesis de maestría en tiempo y forma pese a la pandemia por la que todavía continúa atravesando el mundo y por las etapas de teletrabajo por las que pasamos. También por guiarme para culminar los experimentos a tiempo pese a las demoras provocadas por el cese de entrenamientos y demora en los servicios necesarios para obtener la mosca transgénica.

A mis compañeros y compañeras del grupo de trabajo, por brindarme ayuda siempre que la necesité y por brindarme un ambiente de trabajo agradable.

A ANII por la financiación al presente proyecto, a PEDECIBA y al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Al Dr. Pantano y su equipo por diseñar el biosensor utilizado para esta tesis.

A la Dra. Cecilia Abreu por su guía y capacitación en el manejo de cultivos celulares y sus técnicas asociadas durante mi pasantía en su laboratorio.

Y un especial agradecimiento a mi familia y mi pareja por ser un constante pilar durante este proceso y apoyarme en todo.

ANEXO

I. Cebadores utilizados para el clonado sin restricción

A) pMT_GMPc_Fw

5'-GTGCAACTAAAGGGGGGATCCGATCATGCGGACCGGACTGATCAAACATA-3'

B) pMT_GMPc_Rv

5'-TCGATCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAAAAAATACAGTTCATCCATCCCCAGG-
3'

C) pUASTattB_GMPc_Fw

5'-TCTGAATAGGGAATTGGGAATTCGTGAATTCATGCGGACCGGACTGATCAAACATA-
3'

D) pUASTattB_GMPc_Rv

5'-ATACAGTTCATCCATCCCCAGGTA ACTCGAGAAAATACAGTTCATCCATCCCCAGG-
3'

II. Secuencias y mapas de vectores utilizados

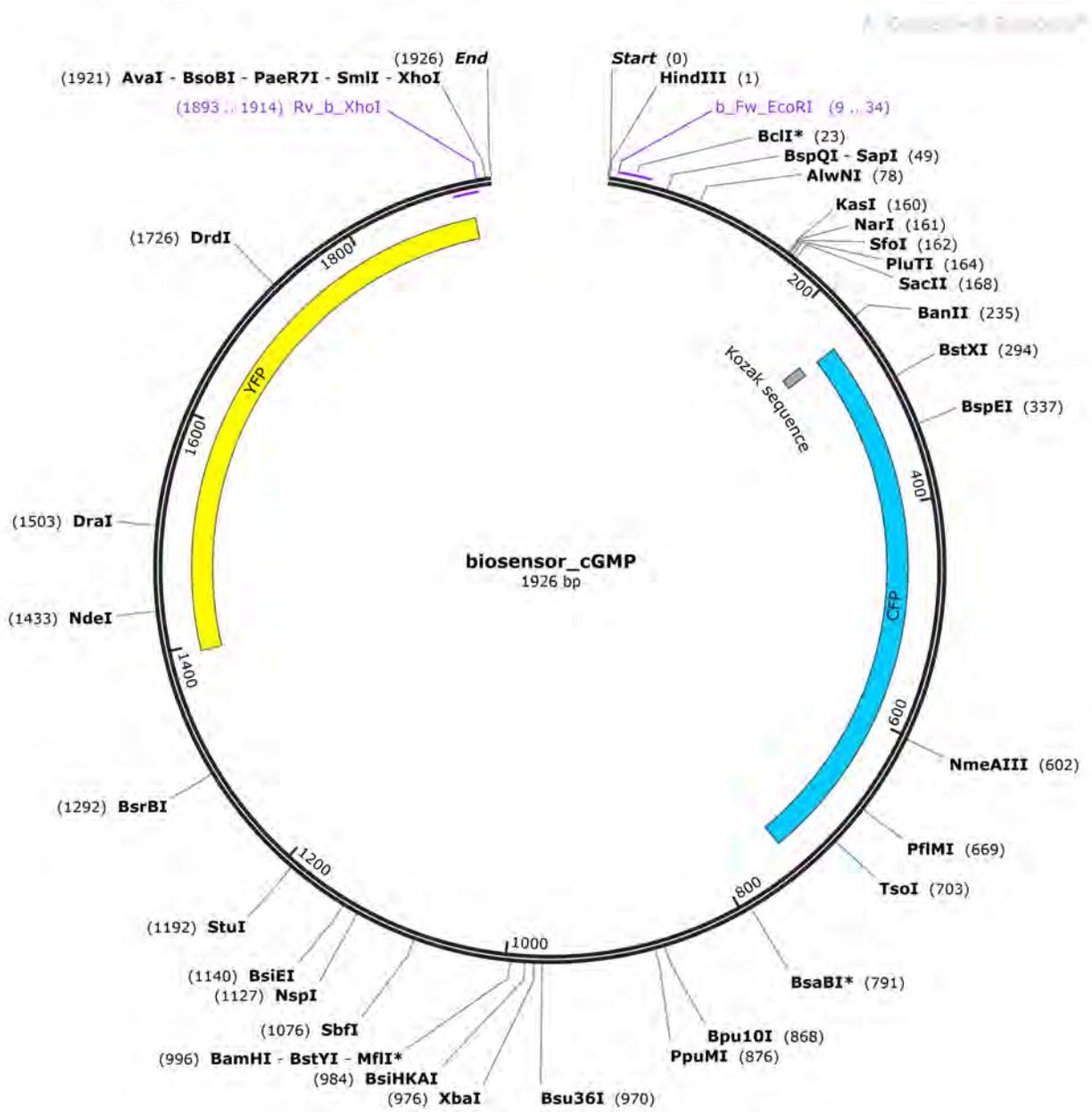
A) Secuencia biosensor de GMPc CUTie2.

5'-AAGCTTGCCATGCGGACCGGACTGATCAAACATACTGAATACATGGAGTTC
CTGAAGAGCGTGCCCTACTTTCCAGAGCCTGCCTGAAGAAATCCTGTCCAAGC
TGGCCGACGTGCTGGAGGAGACACACTACGAGAATGGCGAGTATATCATCCG
GCAGGGCGCCCGCGGCGATACATTCTTTATCATCTCTAAGGGCACCGTGAAC
GTGACAATGAAGCGCAAGGGCAAGAGCCCAGTGGCCACCATGGTGTCCAAGG
GCGAGGAGCTGTTACAGGCGTGGTGCCCATCCTGGTGGAGCTGGACGGCGA
TGTGAATGGCCACAAGTTTAGCGTGTCCGGAGAGGGAGAGGGCGACGCAACC
TACGGCAAGCTGACACTGAAGTTCATCTGCACCACAGGCAAGCTGCCCCTGC
CTTGGCCAACCCTGGTGACCACATTCGGCTACGGCCTGCAGTGTTTTGCCCG
GTATCCTGACCACATGAAGCAGCACGATTTCTTTAAGAGCGCCATGCCAGAG
AGGGCTACGTGCAGGAGAGGACAATCTTCTTTAAGGACGATGGCAACTATAA
GACCAGAGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACACTGGTGAACCGGATCGAG
CTGAAGGGCATCGACTTTAAGGAGGATGGCAATATCCTGGGCCACAAGCTGG
AGTACA ACTATAATAGCCACAACGTGTACATCATGGCCGATAAGCAGAAGAAC
GGCATCAAGGTCAATTTCAAGATCAGGCACAATATCGAGGACGGCTCCGTGC
AGCTGGCCGATCACTATCAGCAGAACACCCCTATCGGCGACGGACCCGTGCT
GCTGCCTGATAATCACTACCTGTCCTATCAGTCTGCCCTGAGCAAGGACCCA
AACGAGAAGAGAGATCACATGGTGCTGCTGGAGTTTGTGACCGCAGCAGGAA
TCACACTGGGAATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGCCTGAGGTCTAGAGCACA
GGCCAGCGAGGATCCAGTGGAGGAGAATGGAGCAGTGGAGTTCCTGCGGACC
CTGGGCAAGGGCGACTGGTTTGGCGAGAAGGCCCTGCAGGGAGAGGATGTGC
GGACCGCAAACGTGATCGCAGCAGAGGCCGTGACATGCCTGGTCATCGACCG
CGATTCCTTCAAGCACCTGATCGGCGGCCTGGACGACGTGAGCAATAAGGCC
TATGAGGACGCCAGTAAAGGCGAGGAGCTGTTTACCGGCGTGGTGCCTATCC
TGGTCGAACTGGACGGCGATGTGAACGGACACCGCTTCTCTGTGAGCGGCGA
AGGAGAGGGCGATGCCACTTATGGCAAGCTGACACTGAAGTTTATCTGTACT
ACCGGCAAGCTGCCTGTCCCATGGCCAACCCTGGTCACCACACTGACATGGG

GCGTGCAGTGTTTCTCCAGGTATCCCGATCATATGAAACAGCATGATTTCTTT
AAGTCTGCCATGCCTGAAGGATACGTGCAGGAGCGCACCATCTTCTTTAAAGA
TGACGGAAACTATAAGACCAGGGCTGAAGTCAAATTTGAAGGCGACACACTGG
TGAATAGAATTGAGCTGAAGGGAATTGACTTTAAGGAAGATGGCAACATCCTG
GGACATAAGCTGGAATATAACTATATCTCTCACAAACGTGTACATCACAGCCGA
CAAACAGAAGAACGGCATCAAGGCGCACTTCAAGATCAGACATAACATCGAGG
ACGGCAGTGTCCAGCTGGCCGATCACTACCAGCAGAACACCCCAATCGGCGAC
GGACCAGTGCTGCTGCCCCGATAATCACTATCTGTCCACACAGTCTGCCCTGTC
CAAAGACCCTAACGAGAAGCGGGATCACATGGTGCTGCTGGAATTTGTGACCG
CCGCTGGCATTACCCTGGGGATGGATGAACTGTATAAATAACTCGAG-3'

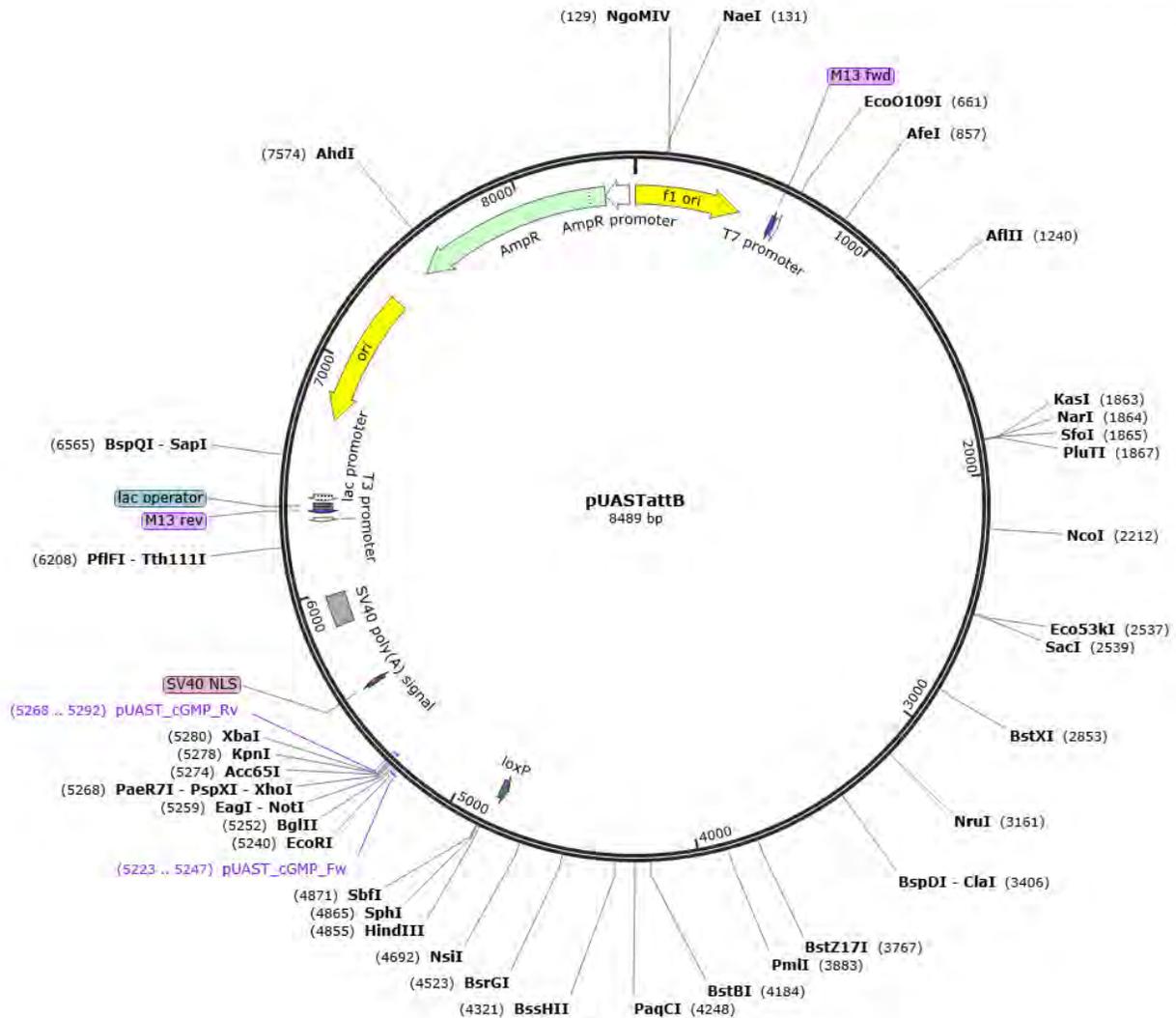
Secuencia del biosensor CUTie2

B) Mapa del biosensor GMPC



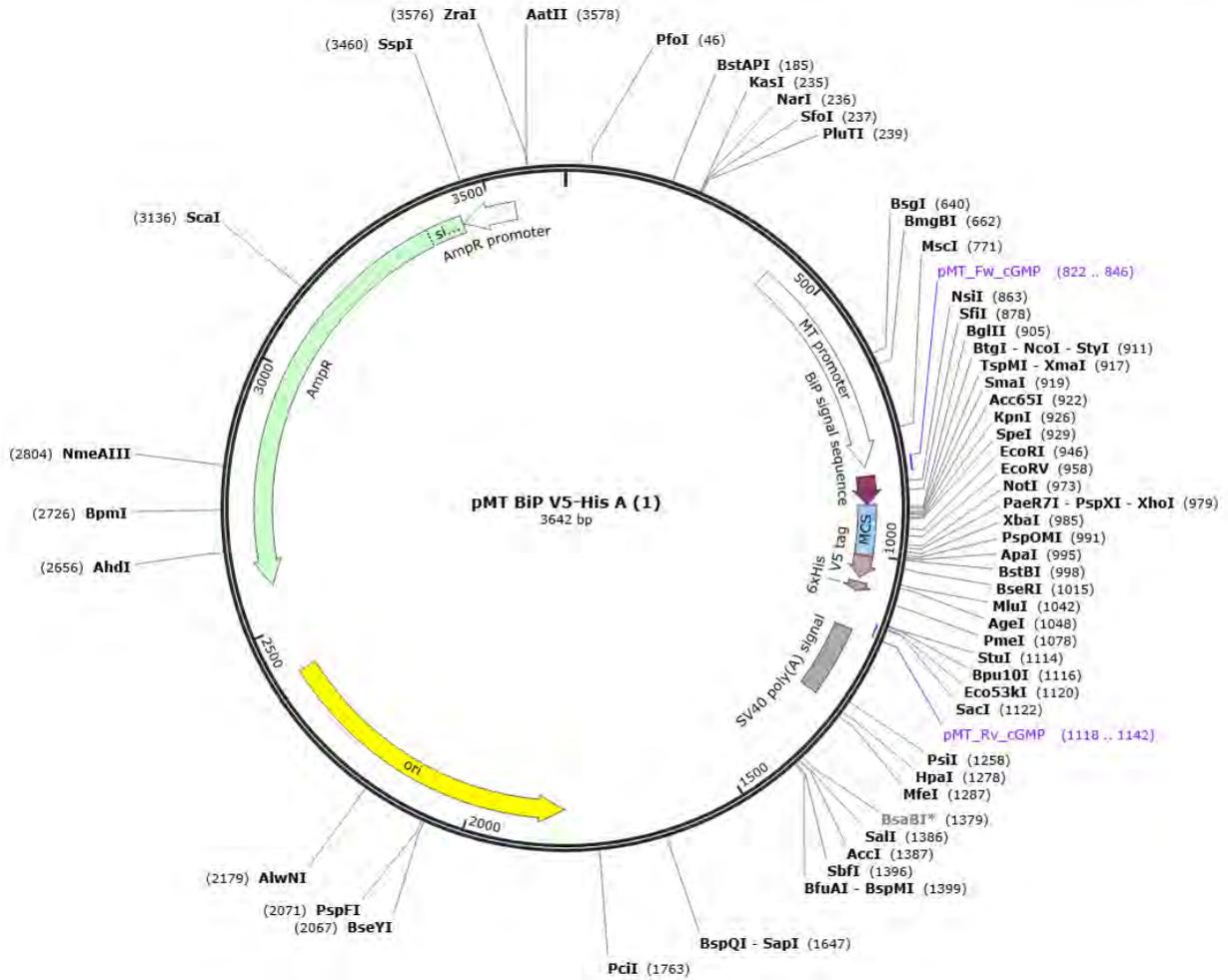
Mapa del biosensor mostrado de forma circular, con los puntos de corte de enzimas de restricción que posee.

C) Mapa del vector pUAST usado como molde.



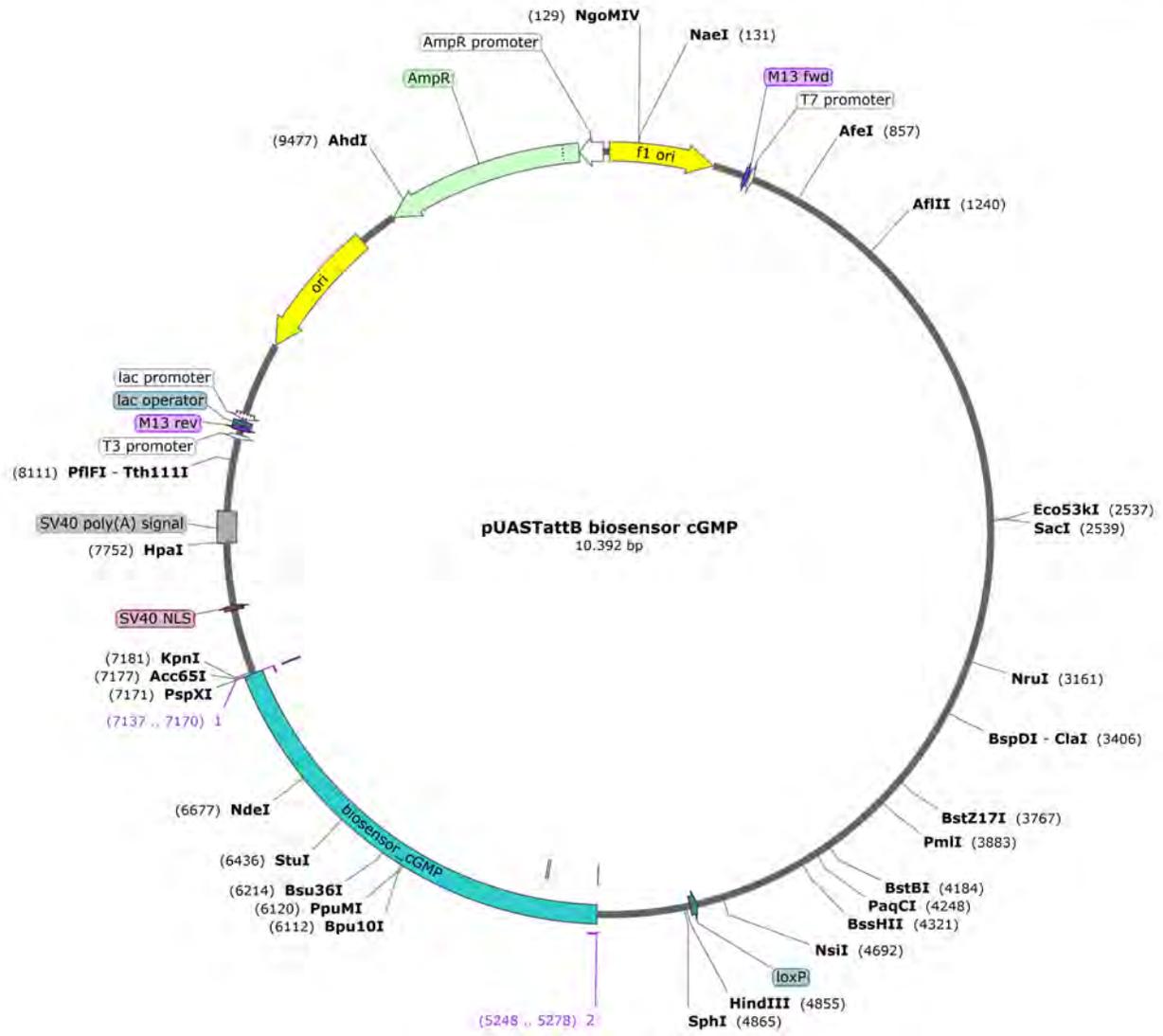
Se visualizan los sitios de corte que posee el vector y la secuencia donde pegan los cebadores generados para el clonado sin restricción, así como también los orígenes de replicación, sitios de corte y secuencias características de este vector detalladas en materiales y métodos.

D) Mapa del vector pMT usado como molde.



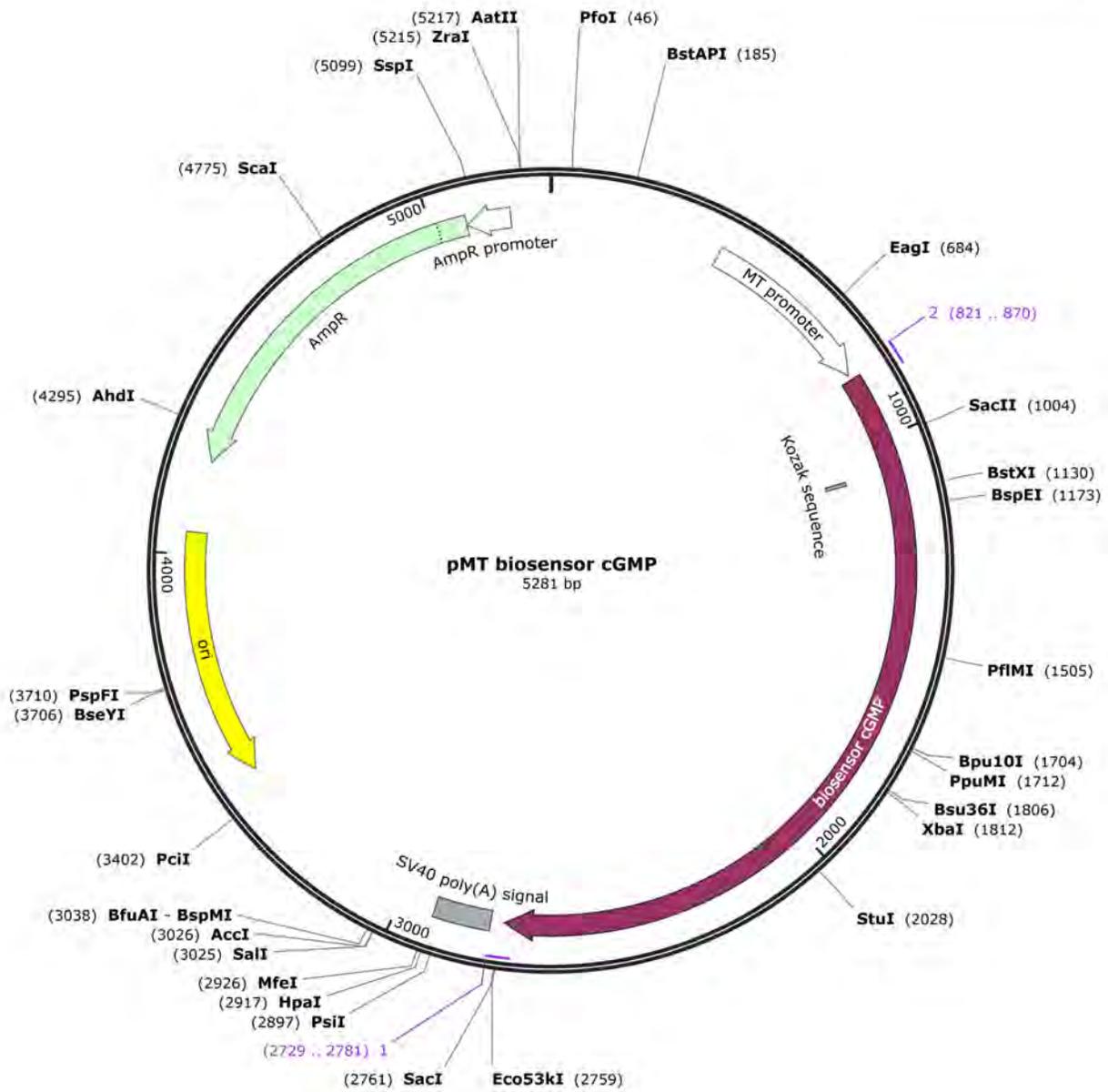
Se observan los puntos de corte de diferentes enzimas de restricción que posee el vector y se marca el sitio de pegado de los cebadores generados para el clonado. También se visualizan las secuencias características de este vector ya detalladas en materiales y métodos.

E) Mapa del vector pUAST + CUTie2.



Se muestra la zona del vector pUAST dónde se clonó el biosensor. El número 1 representa el inicio y el 2 el final del mega-cebador generados en la primer ronda de PCR del clonado libre de restricción.

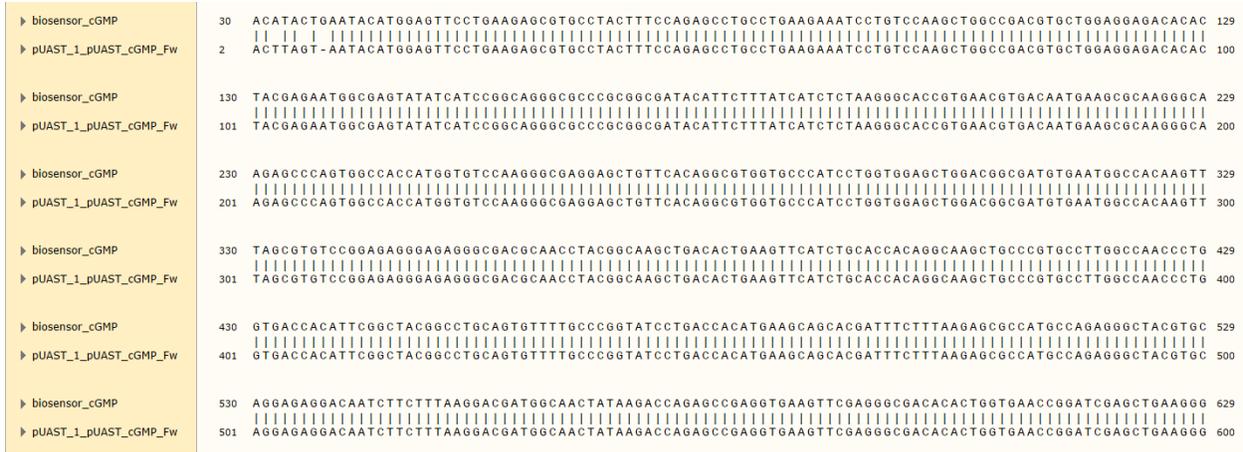
F) Mapa del vector pMT + CUTie2.



Se muestra la zona del vector pMT dónde se clonó el biosensor. El número 1 representa el inicio y el 2 el final del mega-cebador generados en la primer ronda de PCR del clonado libre de restricción.

III. Alineamientos

A)



B)



Figura : Resultado de la secuenciación de la construcción pMT_CUTie2

En la figura se muestra el alineamiento de los primeros 600pb de la construcción enviada a secuenciar a Macrogen (Corea del Sur) con la secuencia original de la construcción, alineados con la secuencia del biosensor. A) Secuencia correspondiente a la secuenciación realizada con el cebador Fw; B) Secuencia correspondiente a la secuenciación realizada con el cebador Rv.

A)

▶ biosensor_cGMP	10	ATGCGGACCGGACTGATCAAACATACTGAATACATGGAGTTCTCTGAAGAGCGTGCCTACTTTCCAGAGCCTGCCTGAAGAAATCCTGTCCAAGCTGGCCGACGTGCTGGA	119
▶ 10-1pMT_M13F_CA	433	ATGCGGACCGGACTGATCAAACATACTGAATACATGGAGTTCTCTGAAGAGCGTGCCTACTTTCCAGAGCCTGCCTGAAGAAATCCTGTCCAAGCTGGCCGACGTGCTGGA	542
▶ biosensor_cGMP	120	GGAGACACACTACGAGAATGGCGAGTATATCATCCGGCAGGGCCCGCGCGGATACATTCTTTATCATCTCTAAGGGCACCGTGAAACGTGACAATGAAGCGCAAGGGCA	229
▶ 10-1pMT_M13F_CA	543	GGAGACACACTACGAGAATGGCGAGTATATCATCCGGCAGGGCCCGCGCGGATACATTCTTTATCATCTCTAAGGGCACCGTGAAACGTGACAATGAAGCGCAAGGGCA	652
▶ biosensor_cGMP	230	AGAGCCCACTGGCCACCATTGGTGTCCAAGGGCAGGAGGCTGTTACAGGCGTGGTGCCCATCTGGTGGAGCTGGACGGCGATGGAATGGCCACAAGTTTATGCGTGTC	339
▶ 10-1pMT_M13F_CA	653	AGAGCCCACTGGCCACCATTGGTGTCCAAGGGCAGGAGGCTGTTACAGGCGTGGTGCCCATCTGGTGGAGCTGGACGGCGATGGAATGGCCACAAGTTTATGCGTGTC	762
▶ biosensor_cGMP	340	GGAGAGGGAGAGGGCGACGCAACCTACGGCAAGCTGACACTGAAGTTTATCTGCACCACAGGCAAGCTGCCCCGTGCCTTGGCCAAACCTGGTACCACATTCGGCTACGG	449
▶ 10-1pMT_M13F_CA	763	GGAGAGGGAGAGGGCGACGCAACCTACGGCAAGCTGACACTGAAGTTTATCTGCACCACAGGCAAGCTGCCCCGTGCCTTGGCCAAACCTGGTACCACATTCGGCTACGG	872
▶ biosensor_cGMP	450	CCTGCAGTGTGTTTCCCGGTATCTGACCACATGAAGCAGCAGC-ATTTCTTT-AAGAGC-GCCATGCCAGAGGGCTACGTGCAGGAGGACAATCTTC--TTTAAGGA	554
▶ 10-1pMT_M13F_CA	873	NNTGCANNGTTTTGCGCGNATCTGACCACHTGNAGCAGCAGNNTTCTTTNNANANNNNNNATNNNNNANGNTACNNGCNANANANNCNTNTNTTANGNA	982
▶ biosensor_cGMP	555	CGATGGCAACTATAAGACC	573
▶ 10-1pMT_M13F_CA	983	CGATGG-NNNATAANANC	1000

B)

▶ biosensor_cGMP	277	GGC-GTGGTGCCCA---TCCTGGTGGAGCTGGACGGCGATGTGAAT--GGCCACAAGTTTATGCGTGTCCGAGAGGG-AGA--GGGCGACGCAACCTACGGCAAGCTGAC	377
▶ 67-1_pMTRev_CA	6	GGGGCGGT-CACAAATTC-----AGCAGCA---CCATGTG-ATCCCGCTTCTCG-TTAGGGTCTTTGGACAGGGCAGACTGTGTG-----GACA----GAT	88
▶ biosensor_cGMP	378	ACTGAAGTTCAT-TGCACCACAGGCAAGCT-GCCCGT-GCC--TTGGCCAACCTGGTACCACATTCCGGCTACGGCTGCAGTGTGTTTGGCCGGTATCTGACCACAT	482
▶ 67-1_pMTRev_CA	89	AGTGA---TTATCGGGCAGCA--GCA-CTGGTCCGTCGCCGATTGG-----GGTG-----TTCTGCT-----GGTAGTGATCGGCCAG-----CTGGACAC--	163
▶ biosensor_cGMP	483	GAAGCAG--CACGAT-----TTCTTTAAGAGCGCC--ATGCCAGAGGGCTACGTGCAGGAGAGGACAATCTTC--TTTAAGGAC--GATGGCAAC--TATAAG	570
▶ 67-1_pMTRev_CA	163	--TGCCGTCTCGATGTTATGTCTGATCTTGAAGTGGCGCTTGATGC-----CGT-----TCTTCTGTTTGTGCGCTGTGATGTACACGTTGTGAG	247
▶ biosensor_cGMP	571	ACCAGAGCCGA---GGTGAAGTTCGAGGGCGACACACTGGTGAACC-GGATCGAGCTGAAGGGCATGACTTTAAGGAGGATGGCAATATCCTGGCCACAAGCTGGAGT	676
▶ 67-1_pMTRev_CA	248	A-----GATATAGTTATATTCCAG-----CTTATGTCCAGGAT--GTT---GCCATCTTCCTTA-----AAGTCAAT-TCC-----CTTCAGC	315
▶ biosensor_cGMP	677	ACAACATAATAGCCA-CAACGTGTACATCATGCCGATAAGCAGAGAAGAACGGCATCAAGGTCAATTTCAAGA--TCAGGCACAATATCGAGGACGGCTCCGTGCAGCTG	783
▶ 67-1_pMTRev_CA	316	TCAATTCTATT--CACCAAGTGTG-----CGCCTTCA-----AATTT--GACTTCAGCC-----CTGGT-CTTATAG-TT	374
▶ biosensor_cGMP	784	GCCGATCA-CTATCAGCAGAACACCCCTATCGGCGACGGACCCGCTGCTGCTGCCTGATAATCAC-TACCTGTCTATCAGTC-TGCCCTGAGCAAGGACCCAAACGAGAA	890
▶ 67-1_pMTRev_CA	375	TCCG-TCATCTTAA--AGAA-----GATG-----GTGC-GCT-CCTG-----CACGTA---TCCT-TCAGGCATG-----GCA-GACTTAA-----	436
▶ biosensor_cGMP	891	GAGAGATCACATGGTGTGCTGCTGGAGTTTGTGACCGCAGCAGGAATCACACTGG-GAATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGCTGAGGCTAGAGCACAGGCCAGCGAGGAT	999
▶ 67-1_pMTRev_CA	436	-AGAAATCA---TGCTGTTTCA---TATGATCG-----GGATAC---CTGGAGAA-----ACA-----CTG-----CAGGCC-----	488

Figura : Resultado de la secuenciación de la construcción pUAST_CUTie2

En la figura se muestra el alineamiento de los primeros 600pb de la construcción enviada a secuenciar a *Macrogen* (Corea del Sur) con la secuencia original de la construcción, alineados con la secuencia del biosensor. A) Secuencia correspondiente a la secuenciación realizada con el cebador *Fw*; B) Secuencia correspondiente a la secuenciación realizada con el cebador *Rv*.

BIBLIOGRAFIA

- Baccino-Calace, M., Prieto, D., Cantera, R., Egger, B., 2020. Compartment and cell-type specific hypoxia responses in the developing *Drosophila* brain. *Biol. Open* 9, bio053629. <https://doi.org/10.1242/bio.053629>
- Bajar, B., Wang, E., Zhang, S., Lin, M., Chu, J., 2016. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors* 16, 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>
- Betschinger, J., Mechtler, K., Knoblich, J.A., 2006. Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Cell* 124, 1241–1253. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.038>
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., Basler, K., 2007. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3312–3317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Dev. Camb. Engl.* 118, 401–415.
- Britton, J.S., Edgar, B.A., 1998. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* 125, 2149–2158. <https://doi.org/10.1242/dev.125.11.2149>
- Calamera, G., Li, D., Ulsund, A.H., Kim, J.J., Neely, O.C., Moltzau, L.R., Bjornerem, M., Paterson, D., Kim, C., Levy, F.O., Andressen, K.W., 2019. FRET-based cyclic GMP biosensors measure low cGMP concentrations in cardiomyocytes and neurons. *Commun. Biol.* 2, 394. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0641-x>
- Catling, D.C., Glein, C.R., Zahnle, K.J., McKay, C.P., 2005. Why O₂ Is Required by Complex Life on Habitable Planets and the Concept of Planetary “Oxygenation Time.” *Astrobiology* 5, 415–438. <https://doi.org/10.1089/ast.2005.5.415>
- Caygill, E.E., Brand, A.H., 2016. The GAL4 System: A Versatile System for the Manipulation and Analysis of Gene Expression, in: Dahmann, C. (Ed.), *Drosophila, Methods in Molec-*

ular Biology. Springer New York, New York, NY, pp. 33–52. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6371-3_2

Centanin, L., Dekanty, A., Romero, N., Irisarri, M., Gorr, T.A., Wappner, P., 2008. Cell Autonomy of HIF Effects in *Drosophila*: Tracheal Cells Sense Hypoxia and Induce Terminal Branch Sprouting. *Dev. Cell* 14, 547–558. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.020>

Chen, H.-L., Pistollato, F., Hoepfner, D.J., Ni, H.-T., McKay, R.D.G., Panchision, D.M., 2007. Oxygen Tension Regulates Survival and Fate of Mouse Central Nervous System Precursors at Multiple Levels. *Stem Cells* 25, 2291–2301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0609>

Cherian, M.G., 1985. Rat kidney epithelial cell culture for metal toxicity studies. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 21, 505–508. <https://doi.org/10.1007/BF02620842>

Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H., 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2172–2175. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172>

Contreras, E.G., Glavic, Á., Brand, A.H., Sierralta, J.A., 2021. The Serine Protease Homolog, Scarface, Is Sensitive to Nutrient Availability and Modulates the Development of the *Drosophila* Blood–Brain Barrier. *J. Neurosci.* 41, 6430–6448. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0452-20.2021>

de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., Conlon, R.A., 1997. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 124, 1139–1148.

Deal, J., Pleshinger, D.J., Johnson, S.C., Leavesley, S.J., Rich, T.C., 2020. Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: A biological perspective of the history of FRET. *Cell. Signal.* 75, 109769. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109769>

Dubendorf, J.W., Studier, F.W., 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219, 45–59. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90856-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90856-2)

- Echalier, G., 1997. *Drosophila* cells in culture. Academic Press.
- Edgar, B.A., Orr-Weaver, T.L., 2001. Endoreplication Cell Cycles. *Cell* 105, 297–306. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00334-8)
- Edgar, B.A., Zielke, N., Gutierrez, C., 2014. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 197–210. <https://doi.org/10.1038/nrm3756>
- Egger, B., Boone, J.Q., Stevens, N.R., Brand, A.H., Doe, C.Q., 2007. Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the *Drosophila* optic lobe. *Neural Develop.* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-2-1>
- Egger, B., Chell, J.M., Brand, A.H., 2008. Insights into neural stem cell biology from flies. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 39–56. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2011>
- Eliasson, P., Jönsson, J.-I., 2010. The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be. *J. Cell. Physiol.* 222, 17–22. <https://doi.org/10.1002/jcp.21908>
- Engler, A., Zhang, R., Taylor, V., 2018. Notch and Neurogenesis, in: Borggreffe, T., Giaimo, B.D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Notch Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 223–234. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3_11
- Fereidouni, F., Bader, A.N., Gerritsen, H.C., 2012. Spectral phasor analysis allows rapid and reliable unmixing of fluorescence microscopy spectral images. *Opt. Express* 20, 12729. <https://doi.org/10.1364/OE.20.012729>
- Fox, P.T., Mintun, M.A., Raichle, M.E., Miezin, F.M., Allman, J.M., Van Essen, D.C., 1986. Mapping human visual cortex with positron emission tomography. *Nature* 323, 806–809. <https://doi.org/10.1038/323806a0>
- Fox, P.T., Raichle, M.E., 1986. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1140–1144. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.4.1140>
- Fox, P.T., Raichle, M.E., 1984. Stimulus rate dependence of regional cerebral blood flow in

human striate cortex, demonstrated by positron emission tomography. *J. Neurophysiol.* 51, 1109–1120. <https://doi.org/10.1152/jn.1984.51.5.1109>

Friebe, A., Sandner, P., Schmidtko, A., 2020. GMPc: a unique 2nd messenger molecule – recent developments in GMPc research and development.

Gaetke, L., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)

Greenspan, R.J., 2004. Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics, 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., Bondesson, M., 2005. Hypoxia Requires Notch Signaling to Maintain the Undifferentiated Cell State. *Dev. Cell* 9, 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.010>

Hofbauer, A., Campos-Ortega, J.A., 1990. Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* 198, 264–274. <https://doi.org/10.1007/BF00377393>

Hoge, R.D., Pike, G.B., 2001. Oxidative metabolism and the detection of neuronal activation via imaging. *J. Chem. Neuroanat.* 22, 43–52. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(01\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(01)00114-4)

Homem, C.C.F., Knoblich, J.A., 2012. *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development* 139, 4297–4310. <https://doi.org/10.1242/dev.080515>

Invitrogen, n.d. pMT/BiP/V5-His A, B, and C USER GUIDE.

Ishikawa-Ankerhold, H.C., Ankerhold, R., Drummen, G.P.C., 2012. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 17, 4047–4132. <https://doi.org/10.3390/molecules17044047>

Iwaki, T., Figuera, M., Ploplis, V.A., Castellino, F.J., 2003. Rapid selection of *Drosophila* S2 cells with the puromycin resistance gene. *BioTechniques* 35, 482–486. <https://doi.org/10.2144/03353bm08>

- Jarecki, J., Johnson, E., Krasnow, M.A., 1999. Oxygen Regulation of Airway Branching in *Drosophila* Is Mediated by Branchless FGF. *Cell* 99, 211–220. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81652-9)
- Jones, D.L., Wagers, A.J., 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 11–21. <https://doi.org/10.1038/nrm2319>
- Kaidi, A., Williams, A.C., Paraskeva, C., 2007. Interaction between betha-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat. Cell Biol.* 9, 210–217. <https://doi.org/10.1038/ncb1534>
- Karpova, T., McNally, J.G., 2006. Detecting Protein–Protein Interactions with CFP-YFP FRET by Acceptor Photobleaching. *Curr. Protoc. Cytom.* 35. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1207s35>
- Kiernan, J.A., 2015. Histological and histochemical methods.
- Kirkpatrick, J.J.R., Enion, D.S., Burd, D.A.R., 1995. Hydrofluoric acid burns: a review. *Burns* 21, 483–493. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(95\)93254-H](https://doi.org/10.1016/0305-4179(95)93254-H)
- Klein, F., Sardi, F., Machado, M.R., Ortega, C., Comini, M.A., Pantano, S., 2021. CUTie2: The Attack of the Cyclic Nucleotide Sensor Clones. *Front. Mol. Biosci.* 8, 629773. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.629773>
- Koch, L.G., Britton, S.L., 2008. Aerobic metabolism underlies complexity and capacity: Oxygen metabolism, complexity and disease. *J. Physiol.* 586, 83–95. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.144709>
- Koch, L.G., Britton, S.L., 2007. Evolution, atmospheric oxygen, and complex disease. *Physiol. Genomics* 30, 205–208. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00043.2007>
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., Matsuda, M., 2011. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* 22, 4647–4656. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-01-0072>
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.
- Lam, A.J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J.D., Cranfill, P.J., Baird, M.A., McKeown,

- M.R., Wiedenmann, J., Davidson, M.W., Schnitzer, M.J., Tsien, R.Y., Lin, M.Z., 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 9, 1005–1012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>
- Langlais, K.K., Stewart, J.A., Morton, D.B., 2004. Preliminary characterization of two atypical soluble guanylyl cyclases in the central and peripheral nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 207, 2323–2338. <https://doi.org/10.1242/jeb.01025>
- Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D.M., Gleadle, J.M., Bocca, S.N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P.J., Wappner, P., 2002. Control of the Hypoxic Response in *Drosophila melanogaster* by the Basic Helix-Loop-Helix PAS Protein Similar. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6842–6853. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.19.6842-6853.2002>
- Li, L., Gryczynski, I., Lakowicz, J.R., 1999. Resonance energy transfer study using a rhenium metal–ligand lipid conjugate as the donor in a model membrane. *Chem. Phys. Lipids* 101, 243–253. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(99\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(99)00066-3)
- Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., Zhang, Q., 2015. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 615–621. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0166-x>
- Li, L., Xie, T., 2005. STEM CELL NICHE: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 605–631. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525>
- Li, Y.R., Trush, M., 2016. Defining ROS in Biology and Medicine. *React. Oxyg. Species* 1. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- Ma, E., Haddad, G.G., 1999. Isolation and characterization of the hypoxia-inducible factor 1beta in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Brain Res.* 73, 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00224-7)
- Magdalena Romero, N., Dekanty, A., Wappner, P., 2007. Cellular and Developmental Adaptations to Hypoxia: A *Drosophila* Perspective, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 123–144. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)35007-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)35007-6)
- Melnattur, K.V., Lee, C.-H., 2011. Visual circuit assembly in *Drosophila*. *Dev. Neurobiol.* 71, 1286–1296. <https://doi.org/10.1002/dneu.20894>
- Misra, T., Baccino-Calace, M., Meyenhofer, F., Rodriguez-Crespo, D., Akarsu, H., Armenta-

- Calderón, R., Gorr, T.A., Frei, C., Cantera, R., Egger, B., Luschnig, S., 2017. A genetically encoded biosensor for visualizing hypoxia responses in vivo. *Biol. Open* bio.018226. <https://doi.org/10.1242/bio.018226>
- Mitchell, J.A., Yochim, J.M., 1968. Intrauterine Oxygen Tension During the Estrous Cycle in the Rat: Its Relation to Uterine Respiration and Vascular Activity. *Endocrinology* 83, 701–705. <https://doi.org/10.1210/endo-83-4-701>
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., Quiñones-Hinojosa, A., 2010. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>
- Moraes, Â.M., Jorge, S.A.C., Astray, R.M., Suazo, C.A.T., Calderón Riquelme, C.E., Augusto, E.F.P., Tonso, A., Pamboukian, M.M., Piccoli, R.A.M., Barral, M.F., Pereira, C.A., 2012. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. *Biotechnol. Adv.* 30, 613–628. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.009>
- Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., Anderson, D.J., 2000. Culture in Reduced Levels of Oxygen Promotes Clonogenic Sympathoadrenal Differentiation by Isolated Neural Crest Stem Cells. *J. Neurosci.* 20, 7370–7376. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-19-07370.2000>
- Morton, D.B., 2004. Invertebrates Yield a Plethora of Atypical Guanylyl Cyclases. *Mol. Neurobiol.* 29, 097–116. <https://doi.org/10.1385/MN:29:2:097>
- Morton, D.B., Vermehren, A., 2007. Soluble guanylyl cyclases in invertebrates: Targets for NO and O₂, in: *Advances in Experimental Biology*. Elsevier, pp. 65–82. [https://doi.org/10.1016/S1872-2423\(07\)01003-4](https://doi.org/10.1016/S1872-2423(07)01003-4)
- Ngo, K.T., Andrade, I., Hartenstein, V., 2017. Spatio-temporal pattern of neuronal differentiation in the *Drosophila* visual system: A user’s guide to the dynamic morphology of the developing optic lobe. *Dev. Biol.* 428, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.008>
- Odenthal, J., Brinkkoetter, P.T., 2019. *Drosophila melanogaster* and its nephrocytes: A versatile model for glomerular research, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 217–240.

<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.03.011>

Olcott, M.H., Henkels, M.D., Rosen, K.L., L.Walker, F., Sneh, B., Loper, J.E., Taylor, B.J., 2010. Lethality and Developmental Delay in *Drosophila melanogaster* Larvae after Ingestion of Selected *Pseudomonas fluorescens* Strains. *PLoS ONE* 5, e12504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012504>

Ortega, C., Prieto, D., Abreu, C., Oppezzo, P., Correa, A., 2018. Multi-Compartment and Multi-Host Vector Suite for Recombinant Protein Expression and Purification. *Front. Microbiol.* 9, 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01384>

Panchision, D.M., 2009. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J. Cell. Physiol.* 220, 562–568. <https://doi.org/10.1002/jcp.21812>

Peters, S., Paolillo, M., Mergia, E., Koesling, D., Kennel, L., Schmidtko, A., Russwurm, M., Feil, R., 2018. cGMP Imaging in Brain Slices Reveals Brain Region-Specific Activity of NO-Sensitive Guanylyl Cyclases (NO-GCs) and NO-GC Stimulators. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2313. <https://doi.org/10.3390/ijms19082313>

Pistollato, F., Chen, H.-L., Schwartz, P.H., Basso, G., Panchision, D.M., 2007. Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.04.003>

Piston, D.W., Kremers, G.-J., 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* 32, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>

Posner, M.I., Petersen, S.E., Fox, P.T., Raichle, M.E., 1988. Localization of Cognitive Operations in the Human Brain. *Science* 240, 1627–1631. <https://doi.org/10.1126/science.3289116>

Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P.E., Zolessi, F.R., 2014. A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochem. Cell Biol.* 142, 335–345. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1215-0>

Prosise, W.W., Yarosh-Tomaine, T., Lozewski, Z., Ingram, R.N., Zou, J., Liu, J.-J., Zhu, F., Taremi, S.S., Le, H.V., Wang, W., 2004. Protease domain of human ADAM33 produced by

Drosophila S2 cells. *Protein Expr. Purif.* 38, 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.09.004>

Reed, B.H., Orr-Weaver, T.L., 1997. The Drosophila gene *morula* inhibits mitotic functions in the endo cell cycle and the mitotic cell cycle. *Development* 124, 3543–3553. <https://doi.org/10.1242/dev.124.18.3543>

Rezával, C., Werbach, S., Ceriani, M.F., 2007. Neuronal death in Drosophila triggered by GAL4 accumulation: Neuronal death by protein overload. *Eur. J. Neurosci.* 25, 683–694. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05317.x>

Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., Jauniaux, E., 1992. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 80, 283–285.

Russwurm, M., Mullershausen, F., Friebe, A., Jäger, R., Russwurm, C., Koesling, D., 2007. Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem. J.* 407, 69–77. <https://doi.org/10.1042/BJ20070348>

Scadden, D.T., 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075–1079.

Sano, R., Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>

Scadden, D.T., 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075–1079. <https://doi.org/10.1038/nature04957>

Schneider, I., 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27, 353–365.

Schobesberger, S., Wright, P.T., Poulet, C., Sanchez Alonso Mardones, J.L., Mansfield, C., Friebe, A., Harding, S.E., Balligand, J.-L., Nikolaev, V.O., Gorelik, J., 2020. β 3-Adrenoceptor redistribution impairs NO/cGMP/PDE2 signalling in failing cardiomyocytes. *eLife* 9, e52221. <https://doi.org/10.7554/eLife.52221>

Schoenfelder, K.P., Montague, R.A., Paramore, S.V., Lennox, A.L., Mahowald, A.P., Fox, D.T., 2014. Indispensable pre-mitotic endocycles promote aneuploidy in the *Drosophila* rectum. *Development* 141, 3551–3560. <https://doi.org/10.1242/dev.109850>

Semenza, G.L., 2012. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>

Sher, N., Von Stetina, J.R., Bell, G.W., Matsuura, S., Ravid, K., Orr-Weaver, T.L., 2013. Fundamental differences in endoreplication in mammals and *Drosophila* revealed by analysis of endocycling and endomitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9368–9373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304889110>

Shooter, R.A., Gey, G.O., 1952. Studies of the mineral requirements of mammalian cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 33, 98–103.

Silván, U., Díez-Torre, A., Arluzea, J., Andrade, R., Silió, M., Aréchaga, J., 2009. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation* 78, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.06.002>

Simon, M.C., Keith, B., 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrm2354>

Slack, J.M.W., 2008. Origin of Stem Cells in Organogenesis. *Science* 322, 1498–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1162782>

Stahl, M., Schuh, R., Adryan, B., 2007. Identification of FGF-dependent genes in the *Drosophila* tracheal system. *Gene Expr. Patterns* 7, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.07.005>

Studer, L., Csete, M., Lee, S.-H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B., McKay, R., 2000. Enhanced Proliferation, Survival, and Dopaminergic Differentiation of CNS Precursors in Lowered Oxygen. *J. Neurosci.* 20, 7377–7383. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-19-07377.2000>

Surdo, N.C., Berrera, M., Koschinski, A., Brescia, M., Machado, M.R., Carr, C., Wright, P., Gorelik, J., Morotti, S., Grandi, E., Bers, D.M., Pantano, S., Zaccolo, M., 2017. FRET biosensor uncovers AMPc nano-domains at β -adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. *Nat. Commun.* 8, 15031. <https://doi.org/10.1038/ncomms15031>

TermoFisher, n.d. *Drosophila* Schneider 2 (S2) Cells USER GUIDE.

Thunemann, M., Wen, L., Hillenbrand, M., Vachaviolos, A., Feil, S., Ott, T., Han, X., Fukumura, D., Jain, R.K., Russwurm, M., de Wit, C., Feil, R., 2013. Transgenic Mice for GMPc Imaging. *Circ. Res.* 113, 365–371. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301063>

Uribe, E., Venkatesan, M., Rose, D.R., Ewart, K.V., 2013. Expression of recombinant Atlantic salmon serum C-type lectin in *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells. *Cytotechnology* 65, 513–521. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9505-7>

Uv, A., 2003. *Drosophila* tracheal morphogenesis: intricate cellular solutions to basic plumbing problems. *Trends Cell Biol.* 13, 301–309. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00083-7)

van den Ent, F., Löwe, J., 2006. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* 67, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.12.008>

Yang, P., Yang, X., Sun, L., Han, X., Xu, L., Gu, W., Zhang, M., 2022. Effects of cadmium on oxidative stress and cell apoptosis in *Drosophila melanogaster* larvae. *Sci. Rep.* 12, 4762. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08758-0>

Yin, T., 2006. The stem cell niches in bone. *J. Clin. Invest.* 116, 1195–1201. <https://doi.org/10.1172/JCI28568>

Zinchuk, V.V., Borisiuk, M.V., 1999. [The role of the oxygen-binding properties of the blood in maintaining pro-oxidant-antioxidant equilibrium in the body]. *Usp. Fiziol. Nauk* 30, 38–48.