

UCH - FC  
MAG - B  
6643  
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO

## **Expresión y función de *lin28* durante la metamorfosis de *Drosophila melanogaster***

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias**

**Por Sergio Andrés González Itier.**

**Noviembre, 2017**

**Director de Tesis Dr. Álvaro Glavic Maurer.  
Co-director de Tesis Dr. Juan Larraín Correa.  
Co-director de Tesis Dr. Fernando Faunes Quinteros.**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el Candidato:

**Sergio Andrés González Itier**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 15 de Septiembre de 2017.

Director de Tesis:  
Dr. Álvaro Glavic Maurer

:  \_\_\_\_\_.

Co-Director de Tesis:  
Dr. Juan Larraín Correa

:  \_\_\_\_\_.

Co-Director de Tesis:  
Dr. Fernando Faunes Quinteros

:  \_\_\_\_\_.

Comisión de Evaluación de la Tesis:  
Dr. Miguel Allende

:  \_\_\_\_\_.

Dr. John Ewer

:  \_\_\_\_\_.

*A mi familia, a mis amigos, a mis tutores y todos los que se cruzaron en mi camino durante esta tesis.*

## BIOGRAFÍA



Nací un 27 de Octubre de 1989 y soy el menor de 4 hermanos (1 hermana y 3 hermanos). Toda mi enseñanza escolar, desde Pre-Kinder a Cuarto Medio la realicé en el Colegio Santa Gema Galgani. Desde siempre me gustó investigar y saber el porqué de las cosas, fue así que apenas salí del colegio realicé un curso de verano de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, donde supe que mi camino era la Biotecnología. En el año 2008 ingresé al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, con el fin de prepararme y llenar vacíos en mi conocimiento. En el año 2010 me transferí a Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias, carrera que me presentó muchos caminos y posibilidades de investigación que yo no conocía, ahí conocí compañeros y amigos que hasta el día de hoy tengo la dicha de compartir con ellos. En el año 2015 ingresé al programa de Magíster en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, continuando con mi formación como científico y que me abrió puertas para seguir ligado a la investigación.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis tutores, Álvaro, Juan y Fernando por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su alero, por enseñarme y guiarme durante esta tesis, crecí como investigador y como persona. A mis compañeros del Laboratorio de Biología del Desarrollo y Regeneración de la P. Universidad Católica, por el apoyo, las enseñanzas y los buenos momentos durante mi estancia allá. A mis compañeros del Laboratorio de Biología del Desarrollo, Universidad de Chile, por el apoyo, las enseñanzas, las conversaciones y todos los momentos compartidos, gracias. A los "Patanes de los Peluches" porque gracias a ellos se pudo sobrellevar los momentos difíciles de la tesis. A los miembros VP-LAB y MA-LAB que fueron un desahogo y compañía durante la tesis.

También, quisiera agradecer a mis amigos que me apoyaron, escucharon, aconsejaron, alegraron, motivaron durante esta tesis, gracias por aguantarme, por soportarme en los momentos más oscuros de la tesis.

Finalmente, quisiera agradecer a mi familia por todo el apoyo durante mi carrera y magíster, gracias por aguantarme en mis momentos de mayor estrés. Nuevamente, gracias por su apoyo incondicional.

Muchas gracias a todos.

## INDICE

INDICE .....	iv
INDICE DE FIGURAS .....	vii
INDICE DE TABLAS .....	viii
ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Desarrollo Post-embionario: Metamorfosis.....	1
1.2. Ciclo de Vida y metamorfosis de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	2
1.3. La Metamorfosis en anfibios e insectos es regulada hormonalmente. ....	3
1.4. Regulación Génica de Transiciones en Desarrollo Post-embionario. ....	5
1.5. Características y función de Lin28.....	6
1.6. Lin28 regula la metamorfosis en <i>X. laevis</i> . ....	8
1.7. Función de Lin28 durante el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
1.8. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio del gen <i>lin28</i> . ....	10
HIPÓTESIS .....	12
2.1. Hipótesis .....	12
OBJETIVOS .....	12
3.1. Objetivo General .....	12
3.2. Objetivos Específicos .....	12
MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
4.1. Cultivo de modelo de estudio <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	13
4.2. Cultivos Bacterianos.....	13
4.3. Transformación Bacteriana. ....	13
4.4. Reacción de Transcriptasa Reversa con ARN de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	14
4.5. Clonamiento del Marco de Lectura Abierto del gen <i>lin28</i> .....	14
4.6. Obtención de muestras para perfiles de expresión génica mediante RT-qPCR. ....	16
4.7. Purificación de ARN desde larvas y pupas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	17
4.8. Reacción de la polimerasa en tiempo real (qPCR). ....	17

4.9. Inmuno-fluorescencia.....	19
4.10. Curvas de Formación de Pupario y eclosión.....	20
4.11. Análisis de Tamaño y Masa de pupas.....	20
4.12. Extracción de proteínas y Western Blot.....	21
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
5.1. Caracterización del patrón de expresión de Lin28 en el cuerpo graso y cerebro de larvas Instar 3 y larvas instar 3 <i>wandering</i> .....	23
5.2. Generación de herramientas para estudiar la ganancia de función de Lin28 durante la metamorfosis de <i>D. melanogaster</i> .....	28
5.2.1. Sobre-expresión de Lin28 y su efecto en el tiempo de desarrollo de <i>D. melanogaster</i> y eclosión del adulto.....	29
5.2.2. Efecto de la sobre-expresión de Lin28 en el tamaño de las pupas.....	30
5.2.3. Efecto de Lin28 en la expresión de genes de respuesta a Ecdisona.....	31
5.2.4. Efecto de la sobre-expresión de Lin28B humano en la formación de pupario y eclosión en <i>D. melanogaster</i> .....	35
5.3. Pérdida de Función de Lin28 y su efecto en la metamorfosis de <i>D. melanogaster</i> .....	37
5.3.1. Generación de herramientas para evaluar el efecto de la Pérdida de función de <i>lin28</i> sobre la degradación de la Glándula Salival.....	40
5.3.2. Efecto de la pérdida de función de <i>lin28</i> en el tamaño y peso de las pupas... ..	41
5.3.3. Efecto de la deficiencia de Lin28 en la expresión de genes de respuesta a Ecdisona.....	44
<b>DISCUSION .....</b>	<b>47</b>
6.1. Patrón de expresión espacial de <i>lin28</i> en Sistema Nervioso Central (SNC). .....	47
6.2. Efecto de <i>lin28</i> en el tiempo de desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .....	50
6.3. Efecto de <i>lin28</i> en la eclosión de adultos.....	51
6.4. Efecto de <i>lin28</i> en el tamaño de los animales. ....	52
6.5. Efecto de <i>lin28</i> en la degradación de la glándula salival.....	54
6.6. Efecto de <i>lin28</i> en la expresión de genes de respuesta a ecdisona.....	55
6.7. Efecto de la sobreexpresión de <i>Hslin28B</i> .....	56
6.8. Perspectivas. ....	57
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	3
Figura 2. Desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> y pulsos de la hormona ecdisona. ....	4
Figura 3. Genes heterocrónicos en desarrollo de <i>C. elegans</i> .....	5
Figura 4. Lin28 y la metamorfosis de <i>X. laevis</i> .....	8
Figura 5. Lin28 no se expresa en cuerpo graso de Larvas Instar 3 y Larvas Instar 3 <i>Wandering</i> .....	23
Figura 6. Lin28 se expresa en sistema nervioso central de Larva Instar 3.....	24
Figura 7. Lin28 no se expresa en neuroblastos en cerebro de Larvas Instar 3 <i>Wandering</i> .....	25
Figura 8. Lin28 no se detecta en células gliales en cerebro de Larvas Instar 3 <i>wandering</i> .....	26
Figura 9. Lin28 no se detecta en neuronas en cerebro de Larvas Instar 3 <i>Wandering</i> .....	27
Figura 10. Vector <i>pUAS-dmlin28</i> .....	28
Figura 11. Curva de formación de pupario con la Ganancia de Lin28.....	29
Figura 12. Sobre-expresión de Lin28 genera un aumento en el tamaño de las pupas.....	31
Figura 13. Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona L3W, 0-1 h, 6-7 h y 12-13 h después de la formación de pupario.....	32
Figura 14. Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona a 6-7 h, 16-17 h, 24-25 h y 32-33 h después de la formación del pupario.....	34
Figura 15. Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona a 6-7 h, 16-17 h, 24-25 h y 32-33 h después de la formación del pupario.....	35
Figura 16. Curva de formación de pupario y eclosión con la Ganancia de <i>hsLin28B</i> .....	36
Figura 17. Curva de formación de pupario con la pérdida de función de <i>lin28</i> .....	37
Figura 18. Porcentajes de Eclosión con la pérdida de función de <i>lin28</i> .....	38
Figura 19. Degradación de la Glándula salival en animales <i>lin28<sup>Δ1</sup></i> .....	41
Figura 20. Pérdida de función de <i>lin28</i> genera una disminución en el tamaño de las pupas.....	42
Figura 21. Pérdida de función de <i>lin28</i> genera una disminución en el peso de las pupas.....	44
Figura 22. Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona a L3W, 0-1 h, 6-7 h y 12-13 h después de la formación del pupario.....	45



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores Clonamiento <i>lin28</i> . .....	16
Tabla 2. Partidores utilizados en RT-qPCR. ....	18

## ABREVIATURAS

°C	: Grado Celsius
µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
µm	: Micrometro
ACT	: Actina Beta
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNi	: Ácido ribonucleico de interferencia
CSD	: <i>Del inglés:</i> Cold Shock Domain
Dpn	: <i>Del inglés:</i> Deadpan
EcR	: Receptor de la Hormona Ecdisona
ElaV	: <i>Del inglés:</i> Embryonic Lethal, Abnormal Vision
Fbp1	: <i>Del inglés:</i> Fat body protein 1
H	: Horas
InR	: Receptor de la Insulina
L1	: Larva Instar 1
L2	: Larva Instar 2
L3	: Larva Instar 3
L3W	: Larva Instar 3 <i>wandering</i>
LB	: Medio de cultivo Luria Bertani
mA	: miliAmperes
PBS	: Tampón Fosfato Salino
PBT	: 1xPBS con Tritón X-100 al 0,3%
PFA	: Para-formaldehído
RDD	: RDD, Tampón de Digestión de ADN
REPO	: <i>Del inglés:</i> Reversed-Polarity
RLT	: RLT, Tampón de Lisis
RPE	: RPE, Tampón de Lavado (75% Etanol).
RW1	: RW1, Tampón de Lavado.
UAS	: <i>Del inglés:</i> Upstream Activating Sequence

## RESUMEN

La metamorfosis es un proceso de cambios post-embrionarios que ocurren durante el desarrollo de algunos animales como anfibios e insectos. Ambas clases presentan cambios morfológicos drásticos en su desarrollo y han sido modelos experimentales clásicos para entender el efecto de hormonas en la metamorfosis. En insectos, la hormona ecdisona es el principal regulador del proceso de metamorfosis.

Por otro lado, los genes heterocrónicos regulan el orden de los eventos durante el desarrollo del organismo. Éstos se describieron primero en *C. elegans*, pero se han encontrado en diferentes especies, siendo el gen *lin28* uno de los más conservados. *Lin28* se expresa en Larva 1 y regula la transición a Larva 2, durante el desarrollo de *C. elegans*. La sobreexpresión de *Lin28* retrasa la entrada en metamorfosis de *X. laevis* y la pubertad en mamíferos. Sin embargo, no se ha analizado si *lin28* participa en el proceso de metamorfosis en *Drosophila melanogaster*.

En esta tesis, se estudió el patrón de expresión espacial y temporal de *lin28* y su rol durante el período larval (y metamorfosis). *lin28* se expresa en el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, no se identificó el tipo celular que expresa *lin28* durante el estadio de Larva Instar 3 *wandering*, previo a la metamorfosis. El análisis funcional, mediante pérdida de función con alelos de *lin28*, evidenció un adelanto en la formación de pupario, un menor tamaño de las pupas y un aumento en los niveles de expresión del Receptor de Ecdisona y del Broad-Complex. Sumado a esto, se observó un retraso en la temporalidad de la degradación de la glándula salival. Por el contrario, la ganancia de función de *lin28* induce un aumento en el tamaño larvario, sin generar cambios en el perfil de expresión de genes de respuesta a ecdisona con excepción de *let7-Complex*. La sobreexpresión de *lin28* induce la muerte de los animales durante la

metamorfosis por lo que no se pudo realizar otros análisis. Estos resultados sugieren que *lin28* participa en la metamorfosis en *D. melanogaster*.

## ABSTRACT

Metamorphosis is defined as a process of post-embryonic changes during the development of some animals such as amphibians and insects. Both classes present drastic morphological changes in their development and have been traditional experimental models to understand the effect of hormones on metamorphosis. In insects, the ecdysone hormone is the main regulator of the metamorphosis process.

Heterochronic genes regulate the order of events during the development of the organism. These genes were first described in *C. elegans*, but have been found in different species. *Lin28* is one of the most conserved heterochronic genes. During the development of *C. elegans*, *Lin28* is expressed in Larva 1 and regulates the transition to Larva 2. Over expression of *Lin28* delays the onset of metamorphosis in *X. laevis* and puberty in mammals. However, it has not been analyzed if *lin28* participates in the process of metamorphosis in *D. melanogaster*.

In this thesis, we studied the spatial and temporal expression pattern of *lin28* and its role during the larval period (and metamorphosis). We found that *lin28* is expressed in the central nervous system (CNS). However, the cell type expressing *lin28* was not identified during the stage of Larva Instar 3 wandering, prior to the metamorphosis. Functional analysis, by the loss of function with *lin28* alleles, showed an accelerated puparium formation, a lower size of the pupae and increased expression levels of the Ecdysone and Broad-Complex Receptor compared to wild-type animals. In addition, a delay in the temporality of salivary gland degradation was observed. *Lin28* gain of function induces an increase in larval size, without generating changes in the expression profile of ecdysone response genes except for *let7-Complex*. *Lin28* overexpression induces the death of animals during metamorphosis. Altogether, these

results suggest that *lin28* participates in the metamorphosis of *D. melanogaster*.

## INTRODUCCIÓN

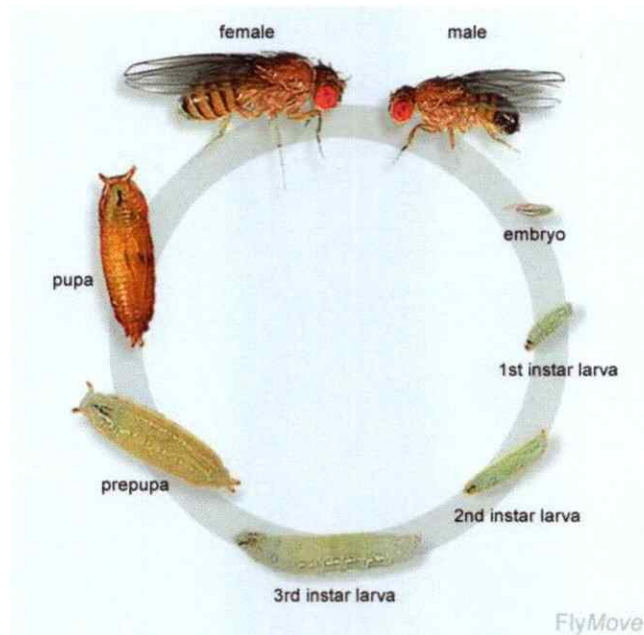
### 1.1. Desarrollo Post-embrionario: Metamorfosis.

La metamorfosis, proveniente del griego “meta” (cambios) y “morfos” (forma). Se define como el proceso de cambios post-embrionarios que ocurren durante el desarrollo de un animal a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico, conductual y ecológico. Este fenómeno comprende la transición entre un estado larval a uno juvenil que poseen una morfología diferente (Laudet., 2011). La metamorfosis está presente durante el desarrollo de diversos animales, siendo los anfibios y los insectos las clases más estudiadas. En algunos anfibios, como *Xenopus laevis*, la metamorfosis ocurre mientras estos siguen activos en su hábitat, a diferencia de algunos insectos como *Drosophila melanogaster*, que sufren una metamorfosis completa, donde hay una transición de un estadio larval a pupa estacionaria y luego a un adulto sexualmente apto para reproducirse (Tyler., 2000; Paris & Laudet., 2008). La metamorfosis y las transiciones durante el desarrollo post-embrionario, involucran la coordinación estricta de patrones espaciales y temporales de proliferación, diferenciación, muerte celular, entre otros, donde programas genéticos y hormonales responden a señales ambientales para un correcto desarrollo (Faunes & Larraín., 2016). Estos mismos programas han sido reportados en el desarrollo de células troncales embrionarias y cancerígenas, y en procesos como pubertad y crecimiento, sugiriendo que entender el proceso de transiciones en el desarrollo (metamorfosis), permitiría entender la biología de células troncales y los cambios en el destino celular (Faunes & Larraín., 2016).

## **1.2. Ciclo de Vida y metamorfosis de *Drosophila melanogaster*.**

El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Mosca del vinagre) dura 10 días en condiciones estándar de laboratorio (25°C) (Figura 1). Durante este periodo de tiempo, este modelo pasa por un estadio embrionario, 3 estadios larvales, un estadio de pupa y luego eclosiona como adulto (Imago). Los estadios larvales, denominados Larva Instar 1 (L1), Larva Instar 2 (L2) y Larva Instar 3 (L3) se separan por la muda de la cutícula. Luego del periodo de crecimiento de la larva, al final del estadio L3, la larva se aleja de la comida (*wandering*) y se dispone a entrar en metamorfosis. Este proceso se inicia con la formación del pupario, donde ocurre un cese de sus movimientos y un endurecimiento de la cutícula. En el pupario, se da inicio a una lisis celular y a la elongación celular de tejidos especializados (Discos Imaginales) que darán origen a las estructuras identificables en el animal adulto. Una vez que el proceso de metamorfosis culmina y se desarrolla el adulto, éste es capaz de romper y emerger de la cutícula, donde la hembra es sexualmente receptiva antes de 12 horas luego de eclosionar, comenzando con el ciclo nuevamente (Tyler., 2000; Thummel., 2001; Stocker & Gallant., 2008).





**Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Esquema del Ciclo de Vida y metamorfosis de *D. melanogaster*. El ciclo de vida se divide en embrión, tres estadios larvales, pupa y adulto. Imagen tomada desde FlyMove.

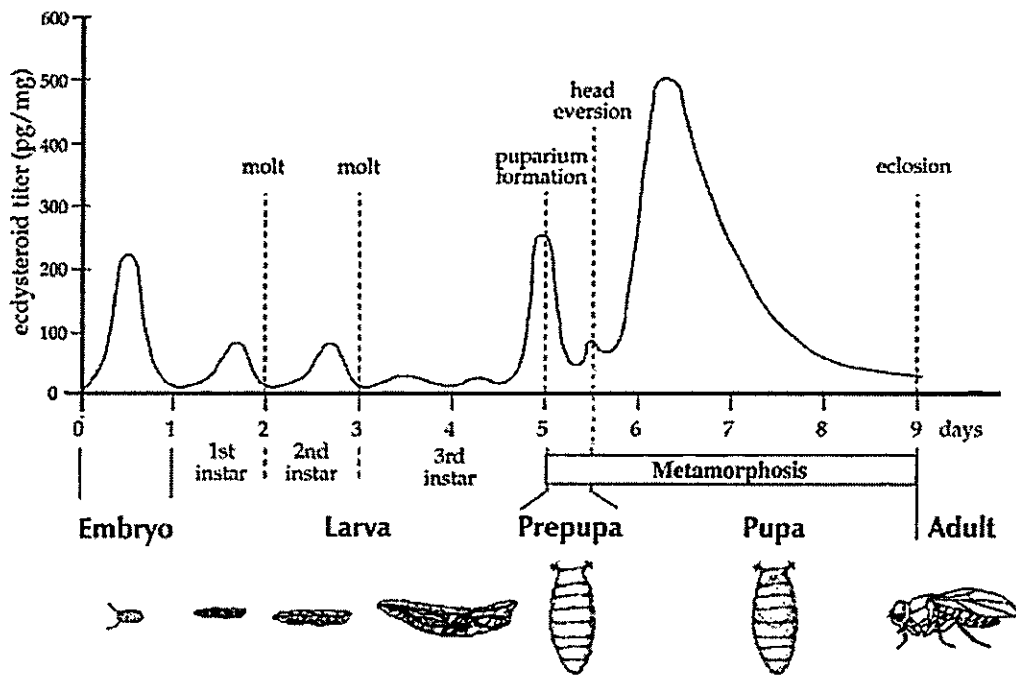
([http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life\\_cycle.jpg](http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life_cycle.jpg))

### 1.3. La Metamorfosis en anfibios e insectos es regulada hormonalmente.

El control hormonal de la metamorfosis es crucial, este es un proceso altamente complejo, donde ocurre el remodelamiento y la formación de nuevos órganos que serán utilizados durante la etapa adulta. En los anfibios, la hormona tiroidea es uno de los principales reguladores de este proceso (Brown & Cai., 2007).

Por otra parte, en *D. melanogaster*, son las hormonas Ecdisona y juvenil las que regulan las transiciones larvales (mudas, la entrada a pupa y la posterior metamorfosis a una mosca adulta), induciendo cambios fisiológicos, morfológicos y conductuales asociados a estas etapas del desarrollo (Yamanaka y cols., 2013). La Ecdisona es secretada principalmente por la Glándula protorácica, tejido que expresa las enzimas que participan en la biosíntesis de esta hormona. Una vez que se forma, la ecdisona es liberada a la hemolinfa y es transformada a su forma activa (20-hidroxiecdisona) en

diversos tejidos del animal, siendo el cuerpo grasso uno de los más importantes para su oxidación (Yamanaka y cols., 2013). La regulación hormonal por la 20-hidroxiecdisona ejerce su efecto directamente modulando la expresión génica y sus pulsos sincronizan los diferentes eventos durante la metamorfosis (Figura 2) (Yamanaka y cols., 2013).



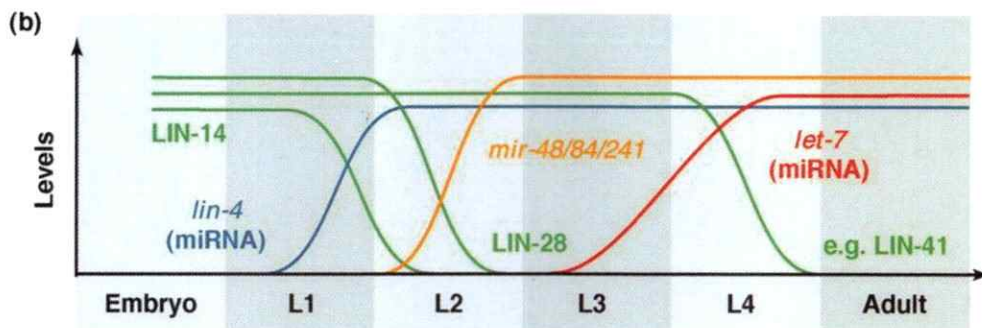
**Figura 2. Desarrollo de *Drosophila melanogaster* y pulsos de la hormona ecdisona.** Pulsos de la hormona ecdisona comandan los diferentes estadios durante el desarrollo de *D. melanogaster*. (Esquema tomado de Thummel C., 2001).

Durante el desarrollo de *D. melanogaster*, posterior a la eclosión del embrión, la ecdisona comanda las mudas entre los estadios larvales (L1 a L2 y L2 a L3) y el inicio de la metamorfosis, donde un pulso de hormona induce la formación de pupario. En este estadio, se inicia la degradación de tejidos larvares como el intestino medio, mientras que los discos de ala y pata (precursores de las estructuras adultas) evierten y detienen su proliferación. Aproximadamente 12 horas luego de la formación del pupario, otro pulso de ecdisona regula el paso de pupario a pupa, donde la cabeza toma su posición correcta y se evierte desde la parte anterior del pupario (Thummel.,

2001). Asimismo, comanda el inicio de la degradación de las glándulas salivales (Jiang y cols., 1997; Martin & Baehrecke., 2004). Estos diferentes eventos determinan el plan básico del cuerpo del animal adulto, cuyo desarrollo finaliza luego de 4 días de desarrollo pupal (Thummel., 2001; Stocker & Gallant., 2008).

#### 1.4. Regulación Génica de Transiciones en Desarrollo Post-embriionario.

Además de la regulación hormonal, existen otros elementos importantes que controlan las transiciones del desarrollo y la metamorfosis, estos son los genes heterocrónicos. Estos genes regulan la sincronización de eventos durante el desarrollo animal (Moss., 2007).



**Figura 3. Genes heterocrónicos en desarrollo de *C. elegans*.** Durante el desarrollo de *C. elegans* los niveles de Lin28 disminuyen en Larva 2. (Esquema tomado de Büssing y cols., 2008).

Los genes heterocrónicos se describieron inicialmente en el nemátodo *Ceanorhabditis elegans* (Figura 3). Este modelo, posee dos tipos de transiciones durante su desarrollo. Un tipo corresponde al paso por 4 estadios larvales separados por mudas, que finalizan con el adulto sexualmente maduro. Por otra parte, en el estadio larvario 1 puede entrar en un estado de diapausa en respuesta a condiciones ambientales adversas (Moss & Rougvie., 2013). Mutantes para estos genes en este modelo generan fenotipos de alteración del patrón estereotipado de eventos durante el

desarrollo larval, similares a los observados con las mutaciones “lin” o linaje celular anormal (del inglés: *Cell lineage abnormal*), donde los animales mutantes son incapaces de depositar huevos y/o carecen de un sistema para realizar dicha función (Ambros & Horvitz., 1984). Estos mutantes pueden generar un fenotipo precoz o retrasado, donde en el primer caso, estadios son omitidos y el estadio adulto se alcanza antes, mientras que en el segundo, estadios son repetidos y la llegada del estadio adulto se retrasa (Moss., 2007). Inicialmente se definieron 4 genes heterocrónicos: *lin-4*, *lin-14*, *lin-28* y *lin.29*. Mutaciones en *lin4* generan la iteración de patrones de desarrollo de Larva 1. Por el contrario, mutaciones en *lin14* hace que los patrones de desarrollo de Larva 1 sean saltados. Los mutantes de *lin19* están retrasados en su desarrollo, al igual que *lin4*. Sin embargo, esto no se observa hasta Larva 4. Finalmente, cuando *lin28* se encuentra mutado los patrones característicos de división celular que dan origen al estadio Larval 2 son saltados (Moss & Rougvie., 2013). Algunos de estos genes se pueden encontrar en diferentes especies, siendo uno de los más conservados *lin28*, que está presente en *X. laevis*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* y *D. melanogaster* entre otros (Moss & Tang., 2003; Moss., 2007). En *C. elegans*, *lin28* se expresa desde el estadio Larval 1 y en Larva 2 sus niveles disminuyen, mientras aumentan los niveles de otro gen heterocrónico, el micro-ARN *let-7* (Büssing y cols., 2008).

### 1.5. Características y función de Lin28.

Lin28 es una proteína de unión a RNA que actúa como regulador temprano de la sincronización del desarrollo en *C. elegans*, es abundante en la embriogénesis temprana y en el primer estadio larval, y luego es regulada negativamente post-transcripcionalmente (Moss & Rougvie., 2013). Esta proteína posee dos motivos de

unión a ARN, uno corresponde a CSD (del inglés: *Cold Shock Domain*) y un par de dedos de zinc CCHC del tipo retro-viral, siendo la única proteína conocida en animales con este par de motivos (Mayr & Heinemann., 2013). Lin28 ejerce su función por 3 vías diferentes, regula la biogénesis del micro ARN *let-7*, modula la traducción de ARN mensajeros y también actúa como regulador transcripcional (Mayr & Heinemann., 2013; Zeng y cols., 2016).

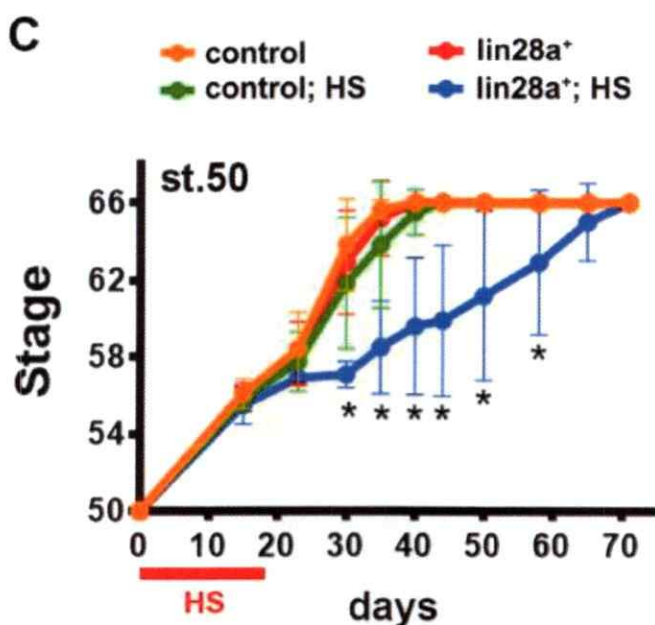
Se ha reportado que Lin28 participa en diferenciación, desarrollo y metabolismo de glucosa (Zhu y cols., 2010). Además, se ha descrito que Lin28 se expresa en células troncales embrionarias humanas, de ratón y en líneas de carcinomas (Yang & Moss., 2003). En *C. elegans* se encuentra expresada en tejidos en desarrollo (proliferación), pero sus niveles disminuyen a medida que las células se van diferenciando (Moss & Tang., 2003; Yang & Moss., 2003). Lin28 modula muchas estas funciones mediante la inhibición de la biogénesis del micro-ARN *let-7*. Esta proteína se une al *bucle* terminal tanto, del pri- como, del pre-*let7*, reprimiendo el procesamiento mediado por las ARNasas III Drosha y Dicer. Este proceso está mediado por las dos isoformas presentes en humanos, Lin28a y Lin28b, que pueden localizarse en el citoplasma y en el núcleo celular, respectivamente (Mayr & Heinemann., 2013).

Además de esta función regulatoria, se ha reportado que Lin28 regula la proliferación y mantención de la auto-renovación de células troncales, estabilizando y promoviendo la traducción de ARN mensajeros involucrados en el control del ciclo celular (Viswanathan & Daley., 2010), mediante el reclutamiento de una ARN Helicasa a los polisomas (Mayr & Heinemann., 2013). Finalmente, Lin28 también ejerce una función de regulador transcripcional. Se ha reportado en células troncales embrionarias de ratón, que el 56% de las secuencias a las que se une Lin28a también se encuentra la Polimerasa II y son regiones ricas en modificaciones epigenéticas de transcripción

activa. Asimismo, Lin28 recluta a Tet1, una proteína capaz de generar modificaciones epigenéticas, demetilando el ADN y regulando la expresión génica, sugiriendo un modelo jerárquico (Zeng y cols., 2016).

### 1.6. Lin28 regula la metamorfosis en *X. laevis*.

Recientemente, se ha reportado el efecto de Lin28 en el modelo clásico de metamorfosis *X. laevis* (Faunes y cols., 2017). Como se mencionó previamente, la metamorfosis de este modelo es regulada por la hormona tiroidea (Brown & Cai., 2007).



**Figura 4. Lin28 y la metamorfosis de *X. laevis*.** La sobre-expresión de Lin28 retrasa la metamorfosis de *X. laevis*. Los animales demoran 30 días más que el control para completar la metamorfosis. (Gráfica tomada de Faunes y cols., 2017).

La sobre-expresión de Lin28, previo a la activación de la señalización de la hormona tiroidea, retrasa la metamorfosis (Figura 4) e inhibe la expresión de genes de respuesta

a esta hormona. Asimismo, el retraso producido es revertido por la adición exógena de hormona tiroidea, indicando que Lin28 funciona río arriba o de manera paralela a esa vía hormonal (Faunes y cols., 2017).

Análisis del transcriptoma muestran que la sobre-expresión de Lin28, previo a cualquier retraso en la metamorfosis (Estadio 50 a 56), reduce los niveles de mensajeros de hormonas peptídicas secretadas por la pituitaria y regula la expresión de genes partícipes en el transporte, metabolismo y señalización de la hormona tiroidea en *X. laevis* (Faunes y cols., 2017).

#### **1.7. Función de Lin28 durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.**

En *D. melanogaster*, la expresión de *lin28* se observa en la embriogénesis hasta el primer estadio larval y luego en la etapa pupal (Moss & Tang., 2003). Se ha visto que Lin28 tiene un rol esencial para la ovogénesis y la formación de músculos durante su desarrollo (Stratoulías y cols., 2014). Además, la pérdida de función de este gen genera defectos en la musculatura abdominal especializada para la eclosión y genera una letalidad cercana al 50% de los animales antes de eclosionar a adulto (Stratoulías y cols., 2014).

Sumado a esto, se ha reportado que Lin28 comanda las divisiones simétricas de células troncales del intestino adulto. La pérdida de función de este gen disminuye la población de células troncales y aumentan tipos celulares más diferenciados como Enteroblastos y Enterocitos; distribución que se observa de manera similar en condiciones de inanición. Este fenotipo fue revertido mediante la expresión del receptor de insulina (*InR*) en células troncales intestinales, mediante el uso de clones, en condiciones nutricionales normales, siendo estos efectos independientes de *let-7* (Chen y cols., 2015).

En el Sistema Nervioso Central, la expresión de *lin28* se ha reportado específicamente en la población de neuroblastos, *Lin28* se expresa en estadio larvales temprano hasta 48 horas posterior a la eclosión del huevo (Larva Instar 1 y 2) y deja de expresarse en estadios larvales tardíos a las 72 horas (Larva Instar 3) (Syed y cols., 2017).

### **1.8. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio del gen *lin28*.**

*D. melanogaster* corresponde a un modelo clásico de estudio debido a las numerosas herramientas genéticas y moleculares que se han desarrollado. Asimismo, este modelo posee una metamorfosis holometábola, o completa, que comprende 3 estadios larvales, un estadio de pupa y luego la eclosión del adulto, lo que permite el estudio de este proceso evaluando diferentes hitos durante su desarrollo.

Dentro de las herramientas genéticas presentes en este modelo, probablemente la más usada y sencilla es el sistema GAL4/UAS, sistema binario adaptado de levaduras (Brand & Perrimon., 1993). Por lo tanto, al cruzar un animal transgénico que posee la secuencia codificante de Gal4 controlada por elementos reguladores de la transcripción específicos con otro animal transgénico, esta vez que posee una secuencia particular río abajo de las secuencias regulatoria UAS, la descendencia expresará esa secuencia según las características de los elementos reguladores de la transcripción específicos que controlan la expresión del Gal4.

Otra herramienta ampliamente utilizada es el uso de transposones (*Elemento P*). Estos elementos móviles permiten realizar deleciones en genes donde fueron insertados previamente, permitiendo escindir secuencias aledañas y generar pérdidas de función de genes de manera específica (Majumdar & Rio., 2015).



Con estos antecedentes, donde se ha descrito el efecto de Lin28 en transiciones larvales en *C. elegans* y su efecto en la metamorfosis de *X. laevis*. Además, de saber que se expresa en *D. melanogaster* en neuroblastos en estadios larvales tempranos, pero se desconoce su distribución y participación en etapas tardías como la metamorfosis, es que se propuso estudiar en detalle el patrón espacial de expresión de *lin28* y su posible participación en el proceso de metamorfosis utilizando herramientas como el sistema GAL4/UAS y mutantes que permiten manipular sus niveles de expresión.

## HIPÓTESIS

### 2.1. Hipótesis

*lin28* se expresa durante la metamorfosis y participa en este proceso en *Drosophila melanogaster*.

## OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

Evaluar la expresión y función de Lin28 durante la metamorfosis de *Drosophila melanogaster*

### 3.2. Objetivos Específicos

1.- Caracterizar la expresión de *lin28* durante la metamorfosis de *Drosophila melanogaster*.

2.- Evaluar el efecto de la ganancia de función de *lin28* en la progresión de la metamorfosis de *Drosophila melanogaster*.

3.- Evaluar el efecto de la pérdida de función de *lin28* en la progresión de la metamorfosis de *Drosophila melanogaster*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cultivo de modelo de estudio *Drosophila melanogaster*.

Los animales fueron almacenados y mantenidos en viales plásticos con medio de cultivo estándar sólido a 18°C. Los cruces experimentales fueron realizados y mantenidos a 25°C.

Se utilizaron líneas de animales transgénicos que se detallan a continuación: Tub-Gal4/TM6B (Bloomington; Bellen H. 2012),  $y^1w^{1118}$  (Blomington),  $w^{1118}$ ; ; Lin28<sup>Δ1</sup> (Chen, 2015),  $w^{1118}$ ; ; Lin28<sup>Δ1</sup>, Lin28::mCherry (Chen, 2015),  $w^{1118}$ ; ; Lin28<sup>ΔF30</sup> (Stratoulas, 2014), Cg-Gal4 (Bloomington BL-7011), Lin28<sup>ARNi1</sup> (Bloomington BL-29564), Lin28<sup>ARNi2</sup> (Bloomington BL-50679).

### 4.2. Cultivos Bacterianos.

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli DH5α*. Los cultivos se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) de forma aeróbica a 37°C y a 200 Revoluciones por Minuto (rpm) de agitación por 16 h.

### 4.3. Transformación Bacteriana.

Bacterias quimio-competentes fueron incubadas con el plásmido a utilizar durante 30 minutos en hielo, luego se les dio un golpe térmico a 42°C por 45 seg y se las dejó en hielo durante 2 min. Posteriormente las bacterias fueron crecidas en 1 mL de medio LB durante 1 h, se las centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. El *pellet* generado se re-suspendió en 100 μL de medio LB y se plaquearon en una placa LB + Ampicilina (50 μg/mL). Fueron incubadas a 37°C toda una noche.

#### **4.4. Reacción de Transcriptasa Reversa con ARN de *Drosophila melanogaster*.**

Se extrajo ARN total de *Drosophila melanogaster*, se diluyó en agua destilada (dH<sub>2</sub>O) ARNasa free en la razón 1:4 (2 µL de ARN diluido y 6 µL de dH<sub>2</sub>O ARNasa free).

Se preparó un mix para una reacción de Transcriptasa Reversa en un volumen final de 20 µL (4µL de Buffer [5x], 1 µL Random Primers [hexámeros con secuencias al azar (50 µg/mL)], 1µL dNTPs (500 µM cada uno), 2 µL BSA (100 µg/mL), 2 µL DTT (10 mM), 7 µL dH<sub>2</sub>O ARNasa free, 1µL MMLV [Moloney murine leukemia virus]). Para el clonamiento del marco de lectura abierto del gen *lin28*, se agregaron 2 µL ARN diluido 1:4 (200 ng de ARN aproximadamente). Para las reacciones de qPCR se usaron 200 ng de ARN aproximadamente, completando los 20 µL totales de reacción con dH<sub>2</sub>O ARNasa free. Finalmente, la reacción de Transcriptasa Reversa se dejó 90 min a 42°C en baño termo-regulado y se detuvo en hielo.

#### **4.5. Clonamiento del Marco de Lectura Abierto del gen *lin28*.**

Se preparó un mix para una reacción de Transcriptasa Reversa según Ítem 4.4. Luego, mediante PCR se amplificó *lin28* desde el ADN complementario (ADNc) de *D. melanogaster* obtenido previamente (Programa de PCR: 5 min 95°C para denaturación del ADN, luego 30 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C. Finalizados los 30 ciclos se dejaron 10 min a 72°C y se guardaron a 4°C, para esto se preparó un mix para 10 reacciones de PCR en un volumen final de 10 µL cada una (Mix 100 µL; 10 µL Buffer 10X, 3 µL dNTPs 10 mM, 2 µL MgSO<sub>4</sub> 50 mM, 3 µL Partidores DmLin28 Fw/Rv, 0,8 µL Pfx, 74,5 µL H<sub>2</sub>O, 6,7 µL ADNc). Este producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% (30 minutos a 120 V en tampón TAE (4,8 g/L TRIS, 1,1 mL/L ácido acético, EDTA 0,1M). El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador UV. El producto de PCR obtenido se purificó mediante el Kit Qiaquick

Gel Extracción (Qiagen). Para el clonamiento del producto de PCR en el vector pGEMT-Easy (Promega), se realizó una reacción de A-tailing en un volumen final de 40  $\mu$ L al producto purificado (A-tailing; 4  $\mu$ L Buffer, 0,8  $\mu$ L ATP 10mM, 0,3  $\mu$ L GoTaq, 2,4  $\mu$ L  $MgCl_2$  [25 mM], 25  $\mu$ L ADN purificado y 3,5  $\mu$ L de  $H_2O$ ). La reacción se incubó por 30 min a 70°C.

Posteriormente, se tomó este ADN para una reacción de ligación con el vector pGEM-T Easy en un volumen final de 10  $\mu$ L que se dejó toda la noche a 15°C (Mix: 1  $\mu$ L Buffer 10X, 1  $\mu$ L pGEM-T Easy, 1  $\mu$ L Ligasa, 7  $\mu$ L DNA).

Luego, se tomaron 4,5  $\mu$ g del vector pUAS-attb (Bischof y cols., 2007), 10  $\mu$ g pGEMT-*dmlin28* y cada uno se digirió con la enzima NotI durante toda la noche a 37°C. Se purificó tanto el vector digerido como el fragmento correspondiente a *lin28* y se realizó una reacción de ligación como se describió previamente. Posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* y se chequeó la orientación de la ligación en las colonias obtenidas mediante PCR utilizando los partidores UAS-Fw y Lin28-Rv. El vector obtenido (pUAS-attb-*dmlin28*) se mandó a secuenciar en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología, P. Universidad Católica de Chile, para corroborar el fragmento clonado. Se utilizaron los partidores Heat-shock-pUAS-Fw y Rv. Finalmente, luego de chequear el vector pUAS-attb-*dmlin28*, éste se envió a Best Gene Inc. para generar una mosca transgénica que permita la sobre-expresión de *lin28* de *D. melanogaster* mediante el sistema Gal4-UAS. La mosca generada fue:  $w^{1118}$ ; UAS-*dmlin28*, con la construcción presente en el cromosoma II.

**Tabla 1. Partidores Clonamiento *lin28*.**

<b>Partidores</b>	<b>Secuencia 5' – 3'</b>
DmLin28-Fw	ATGGAGAACGTACAGCTGGA
DmLin28-Rv	CTAGGTGGCCTCCTCGCTCTTCTC
UAS-Fw	GCAACTACTGAAATCTGCC
Heat-shock-pUAS-Fw	TAAACAAGCGCAGCTGAACA
Heat-shock-pUAS-Rv	TGCTCCCATTTCATCAGTTCC

#### **4.6. Obtención de muestras para perfiles de expresión génica mediante RT-qPCR.**

Se obtuvieron muestras para la extracción de ARN y posterior evaluación de perfiles de expresión génica mediante qPCR para evaluar la ganancia de función y la pérdida de función de Lin28.

Para la ganancia de función, se realizaron 4 cruces independientes con hembras vírgenes Tub-Gal4/TM6B y con machos UAS-dmlin28. De estos cruces se obtuvieron al azar 5 animales por réplica biológica, completando un total de 3 réplicas biológicas, generando una mezcla desde los 4 cruces. Los animales se obtuvieron en Larva Instar 3 *wandering*, 0-1 h, 6-7 h y 12-13 h luego de la formación del pupario.

Posteriormente, se obtuvieron muestras a las 6-7 horas, 16-17 horas, 24-25 horas y 32-33 horas luego de la formación de pupario.

Para la pérdida de función, se realizaron 4 grupos de entre 40 a 50 animales (machos y hembras) del genotipo  $w^{1118}; ; Lin28^{\Delta 1}/TM6b$ . De estos 4 grupos se obtuvieron al azar 5 animales (homocigotos para la mutación) por réplica biológica, completando un total de 3 réplicas biológicas generando una mezcla desde los 4 cruces. Los animales se obtuvieron en Larva Instar 3 *wandering*, 0-1 h, 6-7 h y 12-13 h luego de la formación del pupario. Los animales recolectados fueron preservados en ARN-Later (Qiagen) a -20°C hasta su uso.

#### **4.7. Purificación de ARN desde larvas y pupas de *Drosophila melanogaster*.**

La purificación de ARN se realizó siguiendo las especificaciones del Kit RNeasy Mini (Qiagen). Brevemente, las muestras se sacan de ARN-Later y se pasan a tubos con DTT 2M y Buffer RLT, se homogenizan con un homogenizador y taladro (Karson). Se centrifuga el lisado a velocidad máxima durante 1 min, se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio y se le agrega un volumen de etanol 70%, se homogeniza por inversión y se transfiere a una columna perteneciente al kit. Se centrifuga durante 15 segundos a 8000 rpm, se le agregan 350  $\mu$ L de buffer RW1 y se vuelven a centrifugar otros 15 segundos. Se agrega ADNasa I mezclada con buffer RDD (80  $\mu$ L), se incuba durante 15 min a temperatura ambiente, se le agregan 350  $\mu$ L de buffer RW1 y se centrifuga durante 15 segundos a 8000 rpm. Se agregan 350  $\mu$ L de buffer RPE, se centrifuga por 15 segundos a 8000 rpm y luego se agregan 500  $\mu$ L de buffer RPE y se centrifuga por 2 min a 8000 rpm. Se vuelve a centrifugar para eliminar trazas del buffer. Se agregan 30  $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O libre de ARNasa, se dejan incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 1 minuto a 8000 rpm. Este ARN se cuantificó en un Espectrofotómetro (Epoch, Biotek) y se guardó a -20 °C para su posterior uso.

#### **4.8. Reacción de la polimerasa en tiempo real (qPCR).**

Luego de la extracción de ARN de las muestras previamente mencionadas, se realizó una transcripción reversa seguida de una Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR, *del inglés, Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*). La reacción de transcriptasa reversa se realizó como se describió en el Ítem 4.4.

Para llevar a cabo la reacción de qPCR se prepararon tubos de reacción según las instrucciones del fabricante (Power SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems) en

un volumen final de 15 µL. Se realizaron 3 reacciones (réplicas técnicas) por cada muestra analizada. El programa utilizado fue el siguiente: Se activó la polimerasa durante 10 minutos a 95°C, posteriormente se realizaron 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Finalmente, se realizó una curva de denaturación para cada uno de los partidos usando las condiciones predeterminadas del equipo, estableciendo la producción de un producto específico. Esto se realizó evaluando la presencia de un solo pico en las curvas obtenidas.

De esta forma, se determinó el ciclo umbral necesario para determinar el nivel de expresión del transcrito blanco. Para este fin se utilizó el método de Pfaffl y cols., 2001, utilizando el gen *RPI32* como control de carga (Ponton y cols., 2011; Francis y cols., 2010).

Los partidores utilizados, con sus respectivas secuencias se muestran a continuación:

**Tabla 2. Partidores utilizados en RT-qPCR.**

Partidor	5' – 3'	Referencia
EcR-Fw	GCGGCCAAGACTTTGTGAAGA	Varghese Cohen, 2007
EcR-Rv	TAACGGCCAAGCTGATTGTACG	
Let7C-Fw	AGGTGCGATCTAGTGTGCCGTCTC	Chawla, 2012
Let7C-Rv	TTAGGGCAAGCTCTGTTGTCCGAA	
E74-Fw	GAATCCGTAGCCTCCGACTGT	Varghese Cohen, 2007
E74-Rv	AGGAGGGAGAGTGG TGGTGTT	
Fbp1-Fw	AACGGTGGGCAGGTTATGAG	Varghese Cohen, 2007
Fbp1-Rv	TATTCGCATGGGTCGTGTCC	
BR-C-Fw	AGGAGATCGGCGACGGAC	Francis, 2010
BR-C-Rv	TTGAGACCTAGCAACGCTGAG	
Eip75B-Fw	CACCCAGGACGATAAGTTCAC	DRSC
Eip75B-Rv	ACGAGTCAAACATGCAGATCAG	
Lin28-Fw	AGGACCACCAGCCAGAGTT	Chen, 2015
Lin28-Rv	GCACACAACCGCATTCTC	
InR-Fw	GAAGTGGAGACGACGGGTAAG	Chen, 2015
InR-Rv	TCGCGCTGTTGTGCGATTGTT	
Dm_Rpl32-Fw	ATGCTAAGCTGTGCGACAAATG	Ponton, 2011
Dm_Rpl32-Rv	GTTTCGATCCGTAACCGATGT	



#### 4.9. Inmuno-fluorescencia.

Se seleccionaron larvas en estadio 3 y larvas en estadio 3 "wandering" con una diferencia de 24 horas de edad del genotipo  $w^{1118}$ ; ;  $Lin28^{\Delta 1}$ ,  $Lin28::mCherry$ . Estas larvas fueron disectadas en PBS 1x y fijadas en PFA 4% en PBS 1x durante 20 min. Posteriormente, se lavaron con PBT 0,3% (PBS 1x con Tritón X-100 al 0,3%) 3 veces durante 5 min cada lavado. Se bloqueó con BSA 1% en PBT 0,3%. Los anticuerpos primarios fueron incubados en solución de bloqueo a 4°C durante la noche. Posteriormente fueron lavados 3 veces con PBT 0,3% por 15 min cada lavado. Seguido a esto se agregaron los anticuerpos secundarios pertinentes y se incubaron durante toda la noche a 4°C. A continuación, se incubó con TO-PRO-3 (Invitrogen) durante 20 min y se lavó 3 veces con PBT por 15 minutos cada lavado. Finalmente, las muestras fueron montadas en medio para fluorescencia VectaShield (Vector Labs).

Las muestras se observaron en un microscopio Confocal Zeiss LSM 510 meta. Para el análisis de las imágenes se utilizaron los programas ImageJ y Photoshop CS6.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anti-Deadpan 1:5000 (Dpn) (Guinea Pig) Generado en el Laboratorio de la Dra. Andrea Brand. No publicado.
- Anti-Dsred (Rabbit) 1:500 (Clontech).
- Anti-ElaV (Mouse) 1:20 (Developmental Studies Hybridoma Bank).
- Anti-Repo (Mouse) 1:30 (Developmental Studies Hybridoma Bank).
- Alexa Fluor 546 Anti-Guinea Pig; Alexa Fluor 488 Anti-Mouse y Alexa Fluor 568 Anti-Rabbit (ThermoFischer Scientific), 1:200.
- TO-PRO-3 (Invitrogen) 1  $\mu$ M.

#### 4.10. Curvas de Formación de Pupario y eclosión.

Para evaluar la ganancia de función de *lin28* se utilizaron 300 hembras vírgenes de los *drivers* utilizados (Tub-Gal4 y Cg-Gal4) por cada cruce realizado. Se utilizaron para el control 40 machos  $y^1w^{1118}$  y para el sujeto experimental 40 machos (UAS-dmlin28, UAS-*lin28*<sup>RNAi1</sup> o UAS-*lin28*<sup>RNAi2</sup>).

Para evaluar la pérdida de función de *lin28* se utilizaron entre 400 a 500 moscas (machos y hembras) por condición. Como control se utilizó la cepa  $y^1w^{1118}$  y como sujeto experimental el mutante de *lin28*, *Lin28*<sup>Δ1</sup>.

Se colectaron huevos de cada cruce durante 3 a 4 horas en placas Petri con medio de colecta (Agar 2,25% [p/v], jugo de fruta 28% [p/v], Metilparabeno 0,15% [p/v], Glucosa 2,5% [p/v], en agua) y se dejaron por 22 horas a 25 °C. Posteriormente, se colectaron Larvas Instar 1 recién eclosionadas durante 2 horas y se depositaron en placas Petri con medio de cultivo estándar para *D. melanogaster* espolvoreado con levadura seca. Luego de dos días, se seleccionaron Larvas Instar 3 y se pasaron a viales plásticos (40 larvas máximo por cada vial) con medio de cultivo estándar. En estos viales se realizó el análisis de formación de pupario y posteriormente el análisis de eclosión de moscas adultas.

#### 4.11. Análisis de Tamaño y Masa de pupas.

Para evaluar la ganancia de función de *lin28* se utilizaron 20 hembras vírgenes de los *drivers* utilizados (Tub-Gal4 y Cg-Gal4) por cada cruce realizado. Se utilizaron para el control 5 machos  $y^1w^{1118}$  y para el sujeto experimental 5 machos (UAS-dmlin28, UAS-*lin28*<sup>RNAi1</sup> o UAS-*lin28*<sup>RNAi2</sup>).

Para evaluar la pérdida de función de *lin28* se utilizaron entre 30 a 50 moscas (machos y hembras) por condición. Como control se utilizó la cepa  $y^1w^{1118}$  y como sujeto experimental el mutante de *lin28*,  $Lin28^{\Delta 1}$  y  $Lin28^{dF30}$ .

En cada condición, se seleccionaron pupas (entre 20 a 30 por condición) y se les fotografió utilizando una lupa Nikon SMZ800 acoplada a una cámara y el programa Micrometrics SE Premium 4. También se seleccionaron larvas machos y hembras (20-30 por cada sexo) por cada condición y se les fotografió como se describió previamente. Para fotografiar las pupas, éstas se adhirieron a un portaobjetos utilizando cinta adhesiva doble faz. En cada pupa se midió el largo y el ancho utilizando el programa Imaris x64 6.3.1 y para obtener su volumen se utilizó la fórmula de un elipsoide regular [ $Volumen = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{L}{2}\right) \left(\frac{l}{2}\right)^2$ ] (L, Largo; l, Ancho) según (Delanoue y cols., 2010). Posteriormente, estas pupas fueron masadas en una balanza analítica (Sartorius, BP121S).

#### **4.12. Extracción de proteínas y Western Blot.**

Por cada cruce se colectaron 20 larvas de estadio 3 en PBS frío y se homogenizaron mecánicamente en 200  $\mu$ L de tampón HEPES 40 mM, pH 7,5; NaCl 120 mM; Pirofosfato 10 mM; Glicerofosfato 10 mM; NaF 50 mM;  $Na_3VO_4$  1,5 mM; EDTA 1 mM; CHAPS al 0,3% y un cocktail de inhibidores de proteasas según Kim y cols., 2002. Se incubó a 4°C durante media hora, se centrifugó a 15000 x g durante 30 minutos a 4°C, se obtuvo la fase acuosa y se volvió a centrifugar a 15000 x g durante 30 minutos a 4°C, se guardó la fase acuosa a -20°C.

Se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante por el método colorimétrico de Bradford, utilizando BSA como estándar para la curva de calibración.

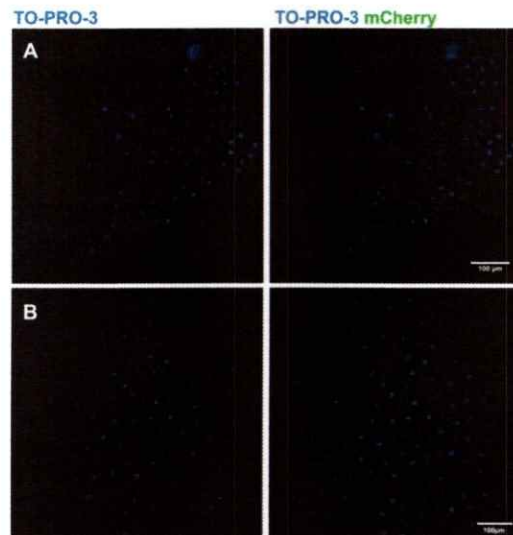
Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. El gel concentrador se preparó al 5% y el gel separador al 12% de acrilamida: bis-acrilamida. Se cargaron 100 µg de proteína en cada carril. El gel se sometió a electroforesis en tampón de corrida (30,3 g/L Tris Base, 144,2 g/L Glicina, 0,1% SDS) a 75V por 15 minutos, y luego a 120V hasta antes de que el frente de corrida alcanzara el término del gel. La transferencia se realizó a 300 mA durante 2 horas en tampón de transferencia (30,3 g/L Tris Base, 144,2 g/L Glicina, 20% v/v metanol) a 4°C utilizando membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm. La membrana se bloqueó con Leche al 5% en TBS (80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 30 g/L Tris Base, pH = 8) con Tween 20 al 0,1% (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Las membranas se incubaron durante toda la noche con anticuerpo primario disuelto en leche al 1% en TBS-T a 4°C con agitación constante. Se lavó tres veces durante 15 min con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario disuelto en leche 5% en TBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante, luego se lavó tres veces durante 15 minutos con TBS-T. El revelado de las membranas se realizó con quimioluminiscencia utilizando el reactivo Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) y el Fotodocumentador (UVITEC, Cambridge). Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anti-Flag (Rabbit) 1:1000 (Sigma Aldrich).
- Anti-βActina (Mouse) 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-Mouse HRP 1:2500 (Calbiochem).
- Anti-Rabbit HRP 1:2500 (Calbiochem).

## RESULTADOS

### 5.1. Caracterización del patrón de expresión de Lin28 en el cuerpo graso y cerebro de larvas Instar 3 y larvas instar 3 *wandering*.

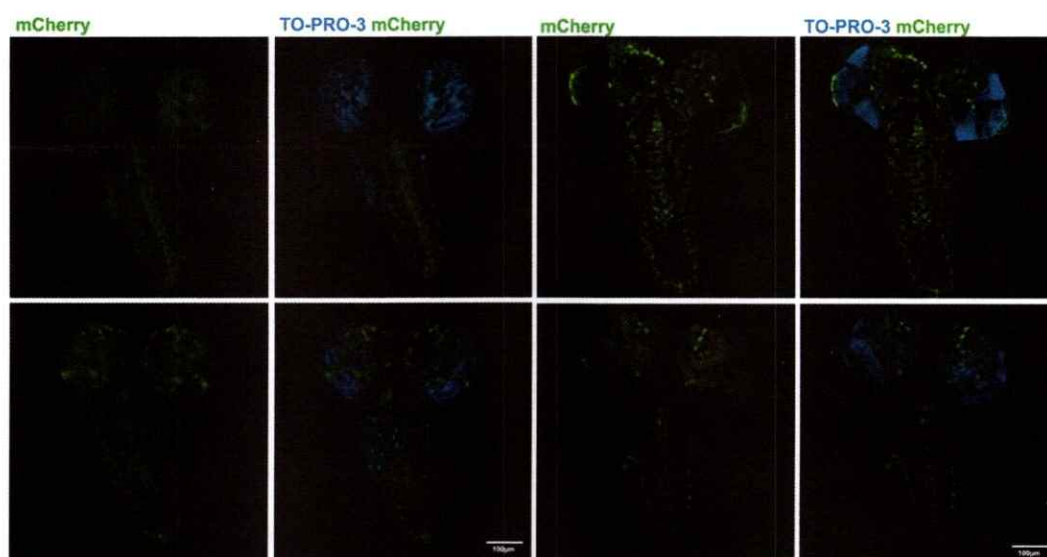
En la literatura se ha reportado la expresión de *lin28* en estadios embrionarios y en algunos tejidos en el adulto (Moss & Tang., 2003; Stratoulis y cols., 2014; Chen y cols., 2015). Sin embargo, no se ha reportado su expresión durante el desarrollo post-embriionario (desarrollo larval y metamorfosis). Un tejido importante durante el desarrollo post-embriionario de *D. melanogaster* es el cuerpo graso. Este tejido realiza la conversión de la hormona Ecdisona a su forma activa 20-Hidroxiecdisona. Es debido a esto se decidió analizar la presencia de Lin28 en este tejido en los estadios larvales instar 3 (L3) e instar 3 *wandering* (L3W), utilizando un animal reportero de la expresión endógena de *lin28*. Este animal es un rescate genómico *lin28::mCherry* en un *background* mutante de *lin28* ( $Lin28^{\Delta 1}$ ) (Chen y cols., 2015).



**Figura 5. Lin28 no se expresa en cuerpo graso de Larvas Instar 3 y Larvas Instar 3 *Wandering*.** (A) Cuerpo Graso de Larvas Instar 3 y (B) Cuerpo Graso de Larvas Instar 3 *Wandering* sin marca para *Lin28::mCherry*. mCherry (Verde), marca nuclear TO-PRO3 (Azul), faloidina (Rojo). Barra = 100  $\mu$ m.

Como se muestra en la Figura 5, no se detectó expresión de Lin28 en cuerpo graso durante los estadios Larvales Instar 3 e Instar 3 *wandering*.

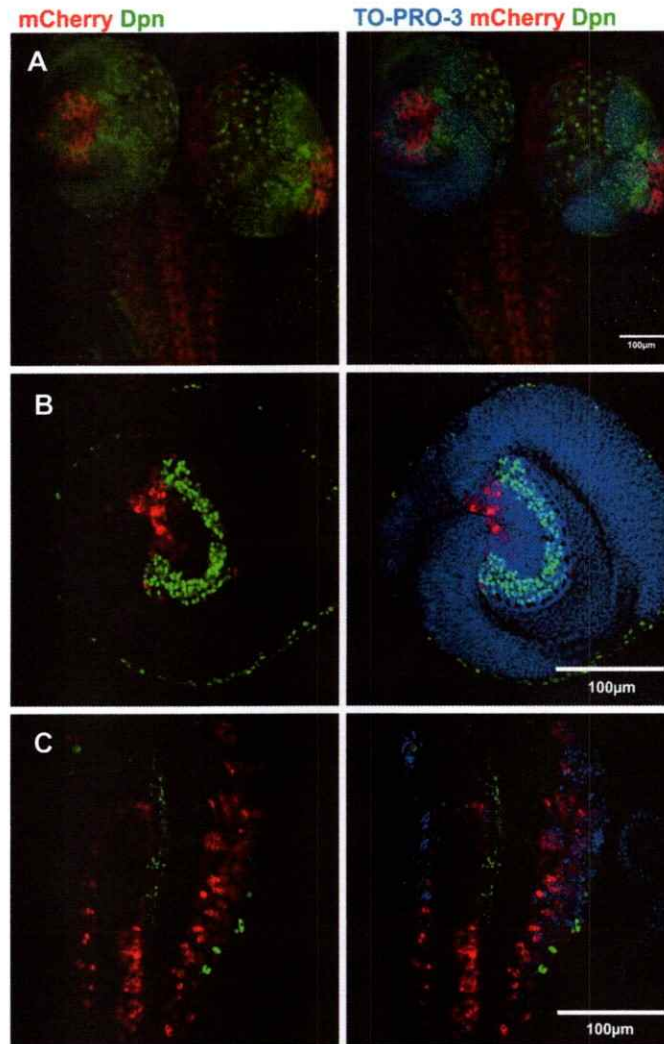
Dado que se ha reportado en otros modelos que Lin28 participa en neurogénesis (Yang y cols., 2015), además de la participación del SNC en la señalización para liberar ecdisona al sistema (Yamanaka y cols., 2013; Faunes & Larraín., 2016), es que se estudió su expresión en cerebro de larvas instar 3 e instar 3 *wandering*. Como se muestra en la Figura 6, Lin28 se encontró presente en los Lóbulos ópticos del cerebro y en el Cordón Nervioso Ventral de Larvas Instar 3 (Figura 6A) y Larvas Instar 3 *wandering* (Figura 6B).



**Figura 6. Lin28 se expresa en sistema nervioso central de Larva Instar 3. (A)** Cerebro de L3 con marcas positivas para Lin28::mCherry en los lóbulos ópticos y el cordón central ventral. mCherry (Verde), TO-PRO3 (Azul) en dos planos diferentes. **(B)** Cerebro de L3W con marcas positivas para Lin28::mCherry en los lóbulos ópticos y el cordón central ventral. mCherry (Verde), marca nuclear TO-PRO3 (Azul) en dos planos diferentes. Barra = 100µm.

Para determinar la población celular que expresa la proteína de fusión Lin28::mCherry en estos estadios se realizó una doble inmunofluorescencia contra mCherry y el marcador de neuroblastos Deadpan (Dpn). Esto debido a los reportes en la literatura

de la participación de Lin28 en la proliferación de células troncales (Chen y cols., 2015; Yang y cols., 2015).

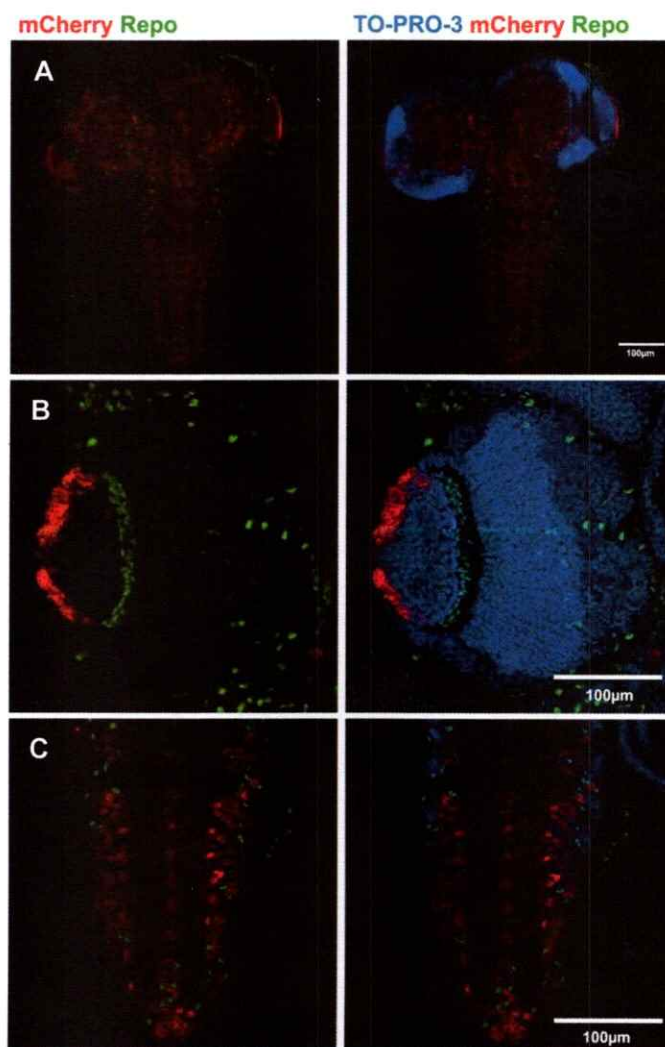


**Figura 7. Lin28 no se expresa en neuroblastos en cerebro de Larvas Instar 3 *Wandering*.** (A) Células con marcas positivas para Lin28::mCherry (Rojo) y células con marcas para neuroblasto Dpn (Verde) en los lóbulos ópticos y el cordón Nervioso ventral. TO-PRO3 (Azul). Células positivas para Lin28::mCherry (Rojo) no son positivas para el marcador Dpn de Neuroblasto (Verde) en el Lóbulo Óptico (B) ni en el Cordón Nervioso Ventral (C) de L3W. Marca nuclear; TO-PRO-3 (Azul). Barra = 100 $\mu$ m.

Al realizar esta doble inmunofluorescencia (Figura 7A) no se observaron células doble positivas para Lin28 y Dpn en los lóbulos ópticos (Figura 7B) ni en el Cordón Nervioso



Ventral (Figura 7C), indicando que los neuroblastos no expresan Lin28 en el estadio Larva Instar 3 *Wandering*.

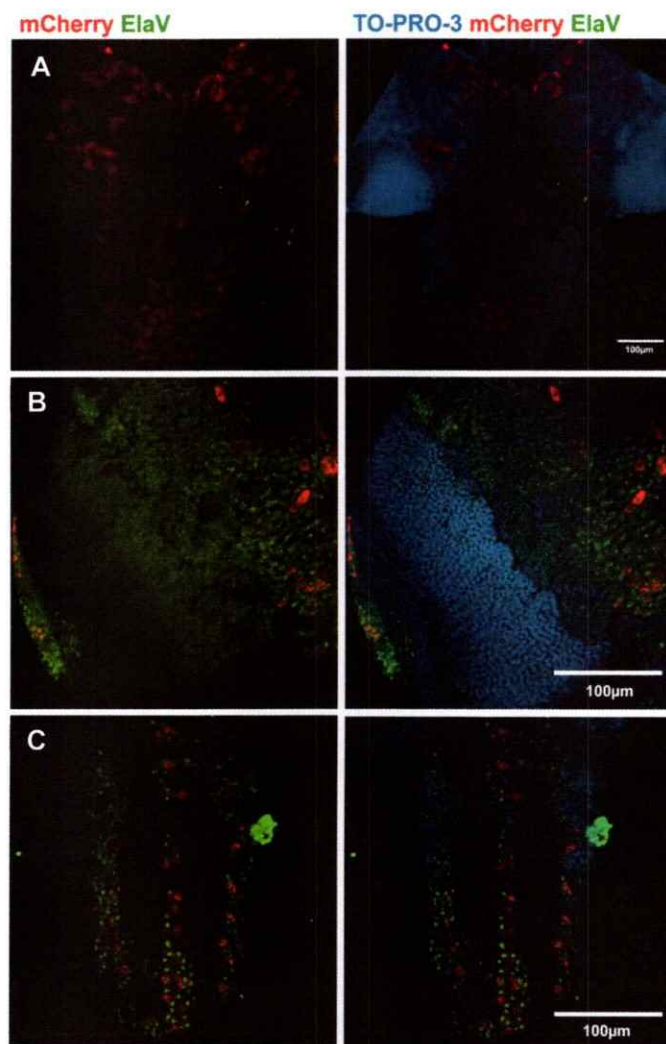


**Figura 8. Lin28 no se detecta en células gliales en cerebro de Larvas Instar 3 *wandering*.** (A) Células con marcas positivas para Lin28::mCherry (Rojo) y células con marcas para glía Repo (Verde) en el SNC. Células con marcas positivas para Lin28::mCherry (Rojo) y células con marcas para glía Repo (Verde) en los (B) lóbulos ópticos y en el (C) cordón nervioso ventral. Marca nuclear; TO-PRO3 (Azul). Barra = 100µm.

Se analizó la expresión de Lin28 en Glía, utilizando el marcador Reversed-polarity (Repo) (Berger y cols., 2007). Al analizar este marcador no se observaron células dobles positivas para la marca de Lin28 y el marcador de Glía (Repo). Esta



observación se realizó tanto en los Lóbulos Ópticos (Figura 8B) como en el Cordón Nervioso Ventral (Figura 8C).



**Figura 9. Lin28 no se detecta en neuronas en cerebro de Larvas Instar 3 *Wandering*.** (A) Células con marcas positivas para Lin28::mCherry (Rojo) y células con marcas para neuronas ElaV (Verde) en SNC. Células con marcas positivas para Lin28::mCherry (Rojo) y células con marcas para neuronas-ElaV (Verde) en el (B) lóbulo óptico y en el (C) cordón nervioso ventral. Marca nuclear; TO-PRO3 (Azul). Barra = 100 $\mu$ m.

Finalmente, al analizar el marcador de neuronas Embryonic Lethal, Abnormal Vision (ElaV) (Berger y cols., 2007), no se observaron células dobles positivas para Lin28 y el marcador de neurona ElaV, tanto en el Lóbulo Óptico (Figura 9B) como en el Cordón

Nervioso Ventral (Figura 9C). Estos resultados no permiten identificar el tipo celular en el cual se expresa LIN28 en SNC de Larvas Instar 3 *Wandering*, dado que no se observa expresión en Neurona, Glía ni Neuroblasto, este último resultado sugiere que Lin28 cumpliría un papel diferente al reportado en otros tejidos y especies (Chen y cols., 2015; Yang y cols., 2015).

## 5.2. Generación de herramientas para estudiar la ganancia de función de Lin28 durante la metamorfosis de *D. melanogaster*.

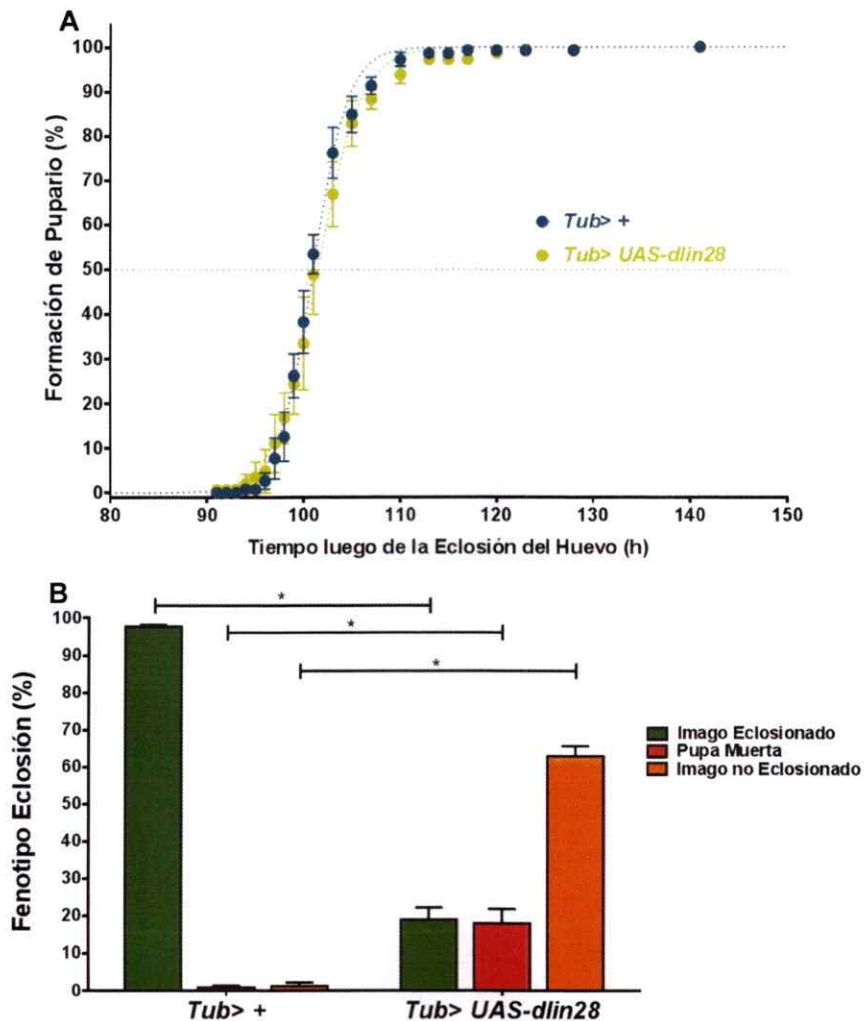
Para estudiar la ganancia de función de Lin28 se utilizó el sistema binario Gal4-UAS. Brevemente, este sistema adaptado de levadura utiliza el activador transcripcional Gal4, cuya expresión es comandada por un promotor específico. Este activador transcripcional se unirá a regiones blanco UAS (del inglés: *Upstream Activating Sequence*) río arriba de la secuencia codificante del gen de interés, induciendo de esta manera su expresión (Brand & Perrimon., 1993; Griffin y cols., 2014). Para hacer uso del sistema Gal4-UAS se clonó la secuencia codificante de *lin28* en un vector pUAS-attb (Bischof y cols., 2007) (Figura 10) con el que se generó la mosca transgénica *UAS-dmlin28* (Best Gene Inc.).



**Figura 10. Vector pUAS-dmlin28.** Esquema del constructo *lin28* en el vector pUAS. Secuencia codificante del gen *lin28* de *D. melanogaster*, en azul. Secuencias UAS, en rojo. Se muestra la posición de los partidores Heat-shock-pUAS-Fw y Rv usados en la secuenciación.

**5.2.1. Sobre-expresión de Lin28 y su efecto en el tiempo de desarrollo de *D. melanogaster* y eclosión del adulto.**

Para estudiar el efecto de la sobre-expresión de Lin28 en la formación de pupario, se utilizó el *driver* ubicuo Tubulina-Gal4 (Tub-Gal4), el que permite expresar Lin28 en todo el animal desde el desarrollo embrionario temprano.



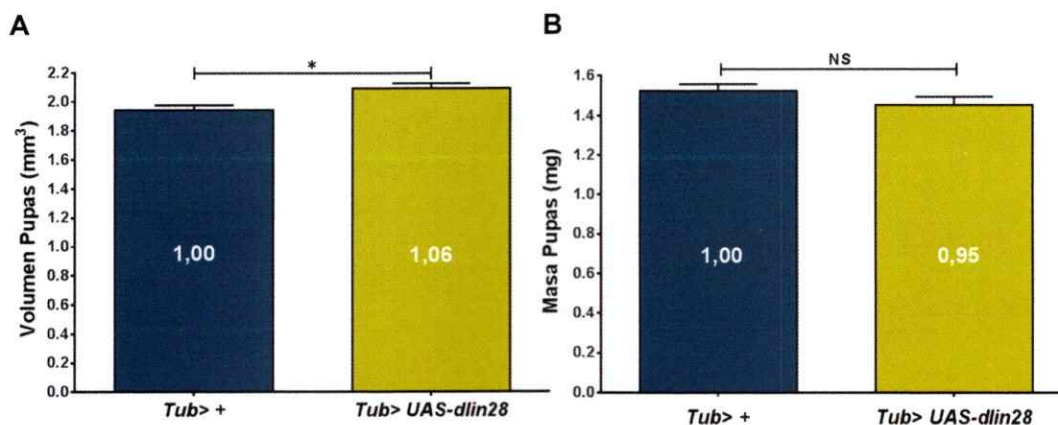
**Figura 11. Curva de formación de pupario con la Ganancia de Lin28. (A)** Gráfica Representativa de 3 experimentos independientes. Se usaron 4 tubos por condición por cada experimento. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *Tub> y<sup>1</sup>W<sup>1118</sup>* N= 423; *Tub>UAS-dmlin28*, N= 454. **(B)** Gráfica resumen de 3 experimentos independientes de fenotipos de eclosión. Cerca del 100% de los animales eclosionó a adulto en los animales *Tub>yw*. El 20% de los animales eclosionó como adulto en los animales *Tub>UAS-dmlin28*. Promedio  $\pm$  Error Estándar. Mann-Whitney (P<0,05).

En estas condiciones no se observaron diferencias en la temporalidad de las curvas de formación de pupario entre los animales *wild-type* y los animales que sobre-expresan Lin28 (Figura 11A). Sin embargo, al analizar el porcentaje de animales que eclosionaron como adulto, se observó que la sobre-expresión de Lin28 generó que solo el 20% de los animales eclosionara como adulto (Figura 11B). Cerca del 20% no alcanzó a evertir la cabeza y el 60% restante se desarrolló como un imago, pero no fue capaz de eclosionar. Esto indica que la sobre-expresión de Lin28 no tiene efecto en la entrada a la metamorfosis (transición larva-pupa), pero afecta la progresión de la metamorfosis.

#### **5.2.2. Efecto de la sobre-expresión de Lin28 en el tamaño de las pupas.**

Debido a que se ha reportado en la literatura que Lin28, mediante la regulación del Receptor de Insulina, comanda las divisiones simétricas de células troncales de intestino adulto en *D. melanogaster* (Chen y cols., 2015), se evaluó si el crecimiento de los animales se ve afectado con la ganancia de función de Lin28. Para esto se seleccionaron grupos de animales, machos y hembras en una proporción 1:1. El volumen de los animales se calculó como el de un elipsoide regular (Delanoue y cols., 2010). Cuando se midió el volumen de las pupas se observó que al sobre-expresar Lin28 éstas fueron un 6% más grandes que los controles. Esta diferencia fue estadísticamente significativa en 4 de 6 experimentos realizados (Figura 12A), sugiriendo que la sobre-expresión de Lin28 tiene un efecto positivo en el tamaño de las larvas y posteriores pupas, el que podría estar dado por la regulación de la expresión del receptor de insulina. Sin embargo, cuando los animales se masaron, no hubo

diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones analizadas (Figura 12B).

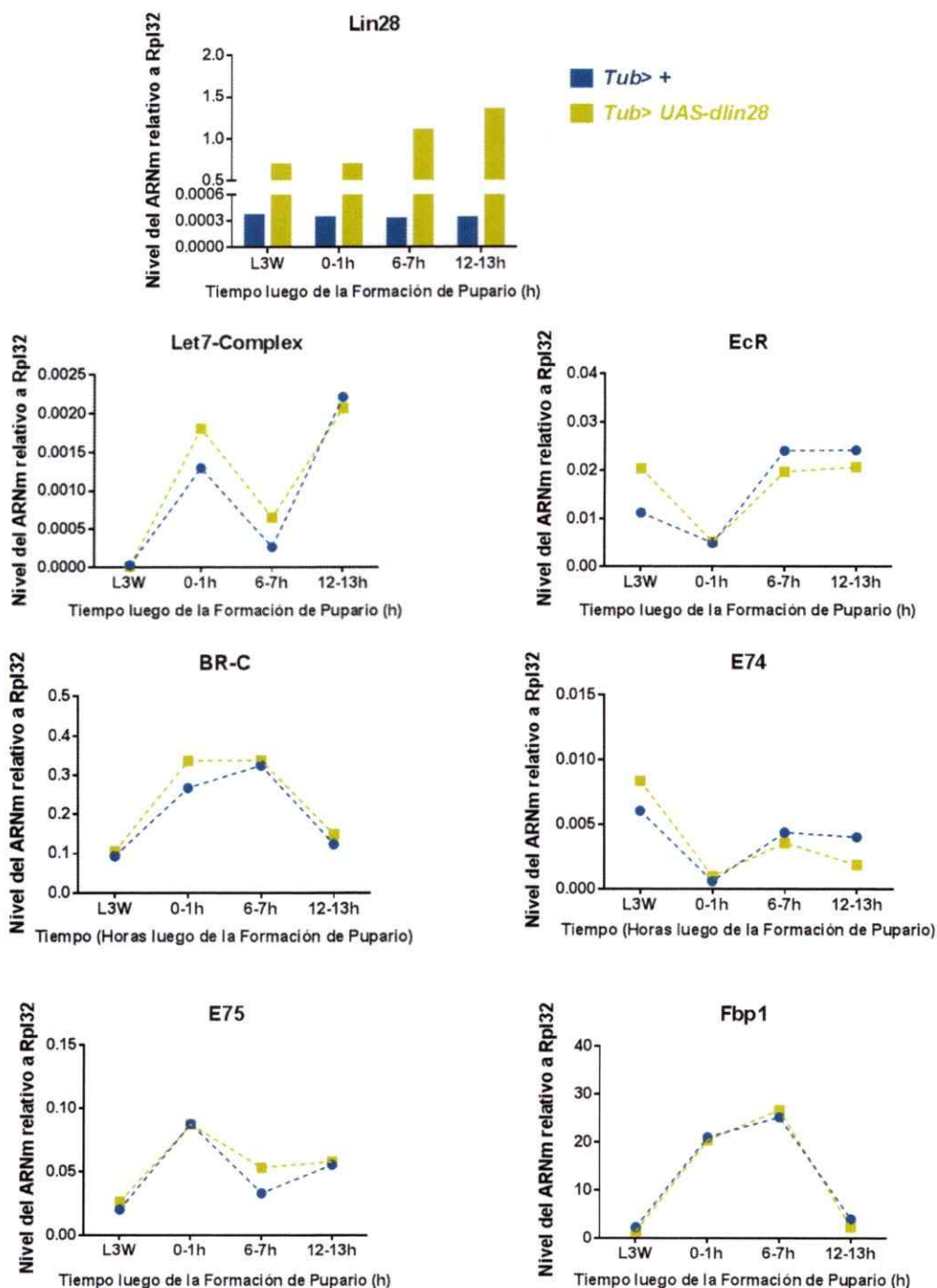


**Figura 12. Sobre-expresión de Lin28 genera un aumento en el tamaño de las pupas. (A)** Gráfica representativa de 6 experimentos independientes. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *Tub> y<sup>1</sup>W<sup>1118</sup>* N= 213; *Tub>UAS-dmlin28* N= 208. **(B)** Gráfica resumen de 3 experimentos independientes. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *Tub> y<sup>1</sup>W<sup>1118</sup>* N= 90; *Tub>UAS-dmlin28*, N= 90. Mann-Whitney (P<0,05).

### 5.2.3. Efecto de Lin28 en la expresión de genes de respuesta a Ecdisona.

Para determinar si la sobre-expresión de *lin28* afecta el desarrollo de *D. melanogaster* a nivel molecular, se evaluaron los niveles de expresión de genes que responden a la hormona ecdisona, principal regulador de la metamorfosis en *D. melanogaster*, tales como: *Receptor de la Hormona Ecdisona (EcR)*, *Broad-Complex (BR-C)*, *Puffs E74 y E75*, *Let7-Complex* y *Fat Body Protein 1 (Fbp1)*. Se midió la expresión de estos genes, mediante qPCR, a tiempos L3W, 0-1 horas, 6-7 horas, 12-13 horas luego de la formación de pupario de animales control y en condiciones de sobre-expresión de Lin28.



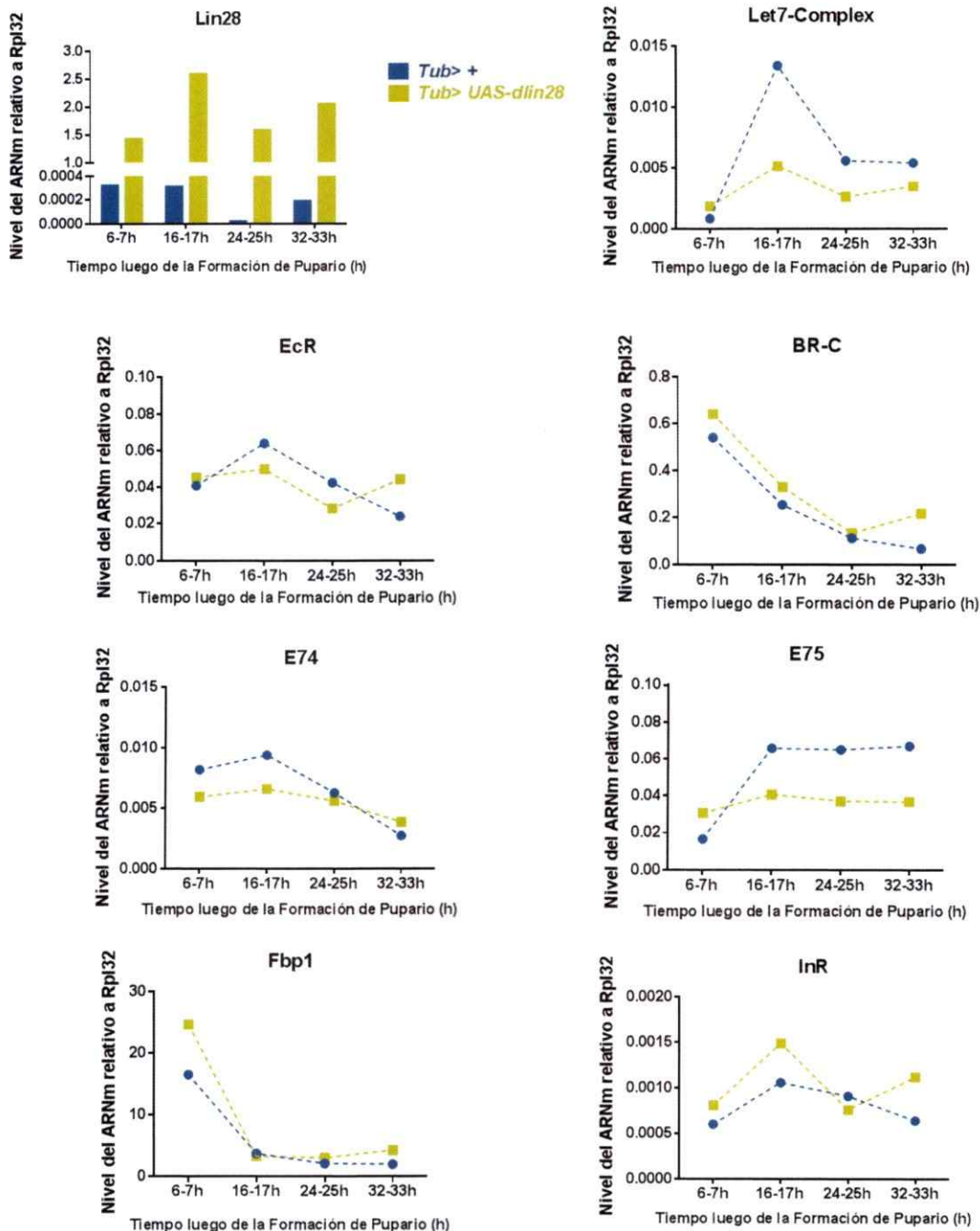


**Figura 13.** Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona L3W, 0-1 h, 6-7 h y 12-13 h después de la formación de pupario. Genes analizados: *lin28*, Receptor de la Hormona Ecdisona (*EcR*), Broad-Complex (*BR-C*), Puffs *E74* y *E75*, *Let7-Complex* y *Fat Body Protein 1* (*Fbp1*). Los transcritos “cuantificados” se controlaron con el gen *Rpl32*. Se graficó el promedio  $\pm$  Desviación Estándar de las réplicas técnicas. Se analizó 1 réplica biológica.

Al analizar una réplica biológica, la transcripción de la secuencia codificante de *lin28* se encuentra elevada con respecto al control, confirmando la sobre-expresión de nuestro constructo transgénico. Por el contrario, los niveles de los genes de respuesta a ecdisona son muy similares al control utilizado (Figura 13).

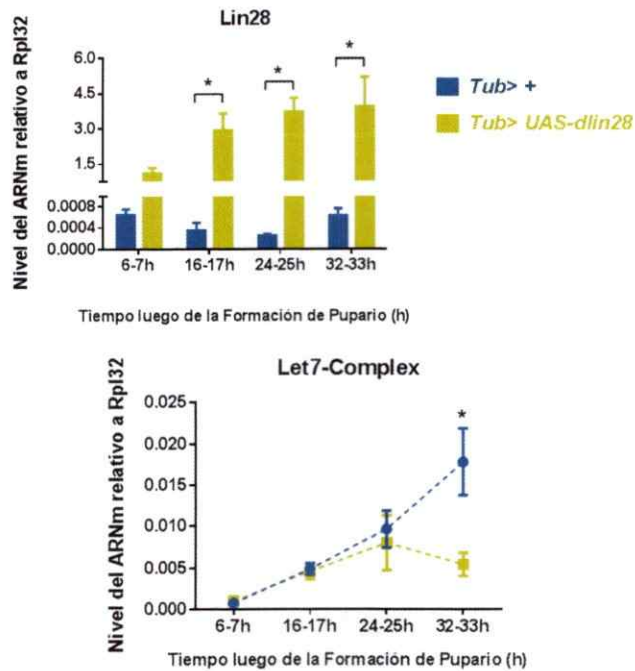
Considerando que el efecto de la sobre-expresión de Lin28 pudiera afectar la expresión de estos genes en tiempos más avanzados en la metamorfosis y que estos cambios generaron el fenotipo de muerte previa a la eclosión del adulto, se analizó la expresión de estos genes a las 6-7 horas, 16-17 horas, 24-25 horas y 32-33 horas después de la formación del pupario (After Puparium Formation; APF).

En la Figura 14 se muestra que en una réplica biológica, la expresión de genes de respuesta a ecdisona analizados, es similar entre los animales control y los animales que sobre-expresan Lin28. Se observó una menor expresión del *let7-Complex* en los animales que sobre-expresan Lin28 comparado con los animales controles al tiempo 16-17 horas en esta réplica biológica. Es por esta razón, que se volvió a analizar la expresión del *let7-Complex* en 3 réplicas biológicas. Se pudo observar, que al sobre-expresar Lin28, la expresión del *let7-Complex* se ve reducida significativamente a las 32-33 horas luego de la formación de pupario, comparada con el control (Figura 15).



**Figura 14.** Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona a 6-7 h, 16-17 h, 24-25 h y 32-33 h después de la formación del pupario. Genes analizados: *lin28*, Receptor de la Hormona Ecdisona (*EcR*), *Broad-Complex* (*BR-C*), *Puffs E74* y *E75*, *Let7-Complex* y *Fat Body Protein 1* (*Fbp1*). Los transcritos “cuantificados” se controlaron con el gen *Rpl32*. Se graficó el Promedio  $\pm$  Desviación Estándar de las réplicas técnicas. Se analizó 1 réplica biológica. (Datos Facilitados por el Dr. Fernando Faunes).



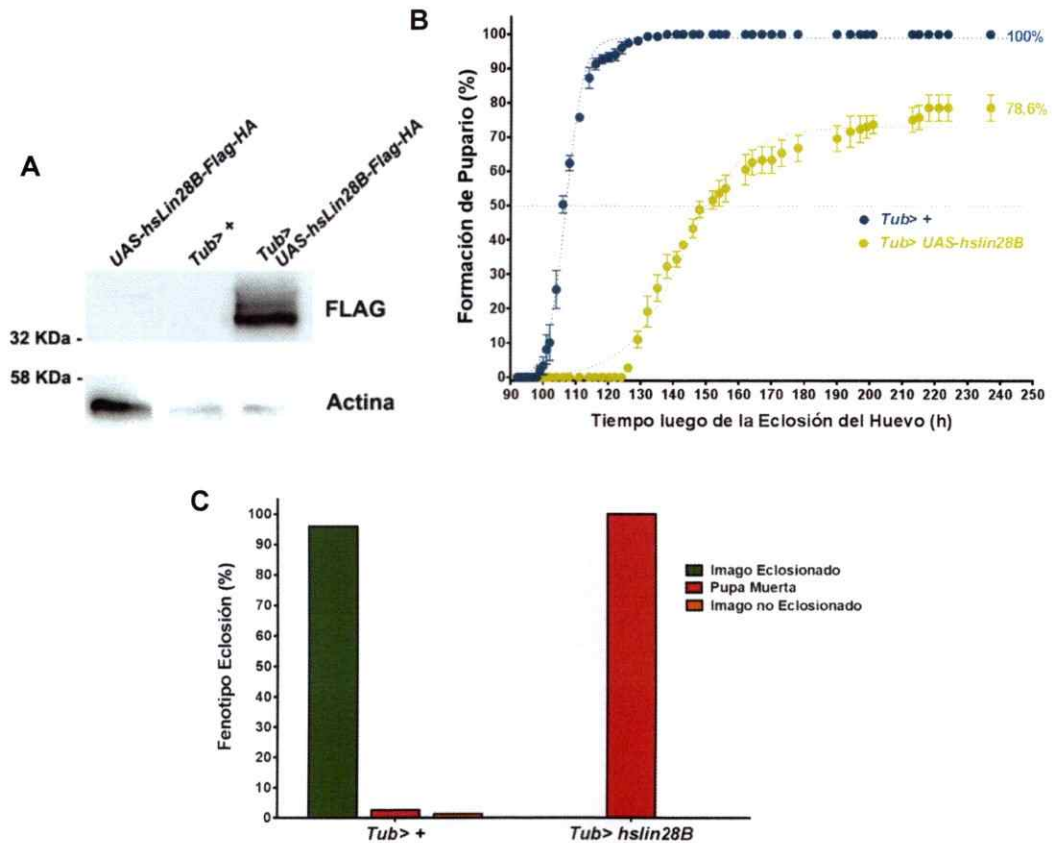


**Figura 15. Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona a 6-7 h, 16-17 h, 24-25 h y 32-33 h después de la formación del pupario.** Genes analizados: *Let7-Complex* y *Lin28*. Los transcritos “cuantificados” se controlaron con el gen *Rpl32*. Se graficó el Promedio  $\pm$  Desviación Estándar de las réplicas técnicas. Se analizaron 3 réplicas biológicas. ANOVA Dos Vías.

#### 5.2.4. Efecto de la sobre-expresión de Lin28B humano en la formación de pupario y eclosión en *D. melanogaster*.

Se ha reportado que la pérdida de función de *lin28* y su efecto en las divisiones simétricas de células troncales de intestino adulto de *D. melanogaster*, puede ser rescatado con la expresión específica de la isoforma B del gen *lin28* humano (*Hslin28B*) (Chen y cols., 2015). Para evaluar el efecto de esta isoforma de *lin28*, se analizó la formación de pupario con la sobre-expresión comandada por el *driver* ubicuo Tubulina-Gal4. Como se muestra por *western blot* en la Figura 16A, se ve que la construcción UAS-hslin28B-Flag-HA se sobre-expresa al utilizar el *drive* ubicuo Tub-Gal4. En la Figura 16B se observa que al sobre-expresar Hslin28B la formación de pupario se retrasó más de 48 horas, asimismo, solo un 78,6% de los animales logró

llegar al estadio de pupa. Cuando se evaluó la eclosión de los adultos, se observó que la sobre-expresión del HsLin28B indujo la muerte del 100% de los animales antes de evertir la cabeza y formar la pupa.

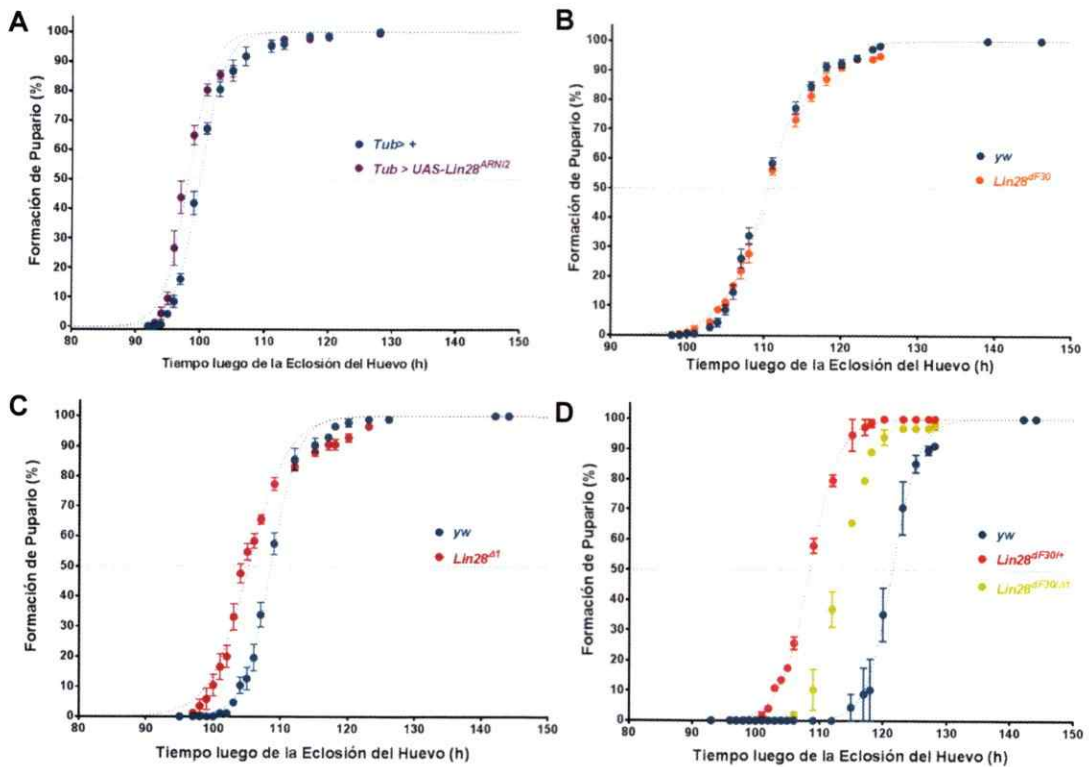


**Figura 16. Curva de formación de pupario y eclosión con la Ganancia de *hsLin28B*.** (A) Western Blot Anti-Flag (Rb) y Anti-Actina (Ms). Se observa un aumento en los niveles de proteína hslin28-Flag-HA con respecto a los controles. (B) Gráfica de 1 experimento. Se usaron 4 tubos por condición por cada experimento. El 76,8% de los animales *Tub-Gal4>UAS-hsLin28B* formó pupario, el resto murió en estadio Larval. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *Tub-Gal4> y<sup>1</sup>W<sup>1118</sup>* N= 149; *Tub-Gal4>UAS-dmlin28* N= 118. (C) Gráfica de 1 experimento de fenotipos de eclosión. Cerca del 100% de los animales eclosionó a adulto en los animales *Tub-Gal4> y<sup>1</sup>W<sup>1118</sup>*. El 100% de los animales murió antes de formar la pupa en los animales *Tub-Gal4>UAS-hsLin28B*. Promedio.

Este resultado sugiere que este gen al ser exógeno, podría estar siendo reconocido por la maquinaria regulatoria de *D. melanogaster* de manera inadecuada, generando un mayor efecto que la sobre-expresión del gen *lin28* de *D. melanogaster* que no genera fenotipo en el tiempo de formación de pupario (Figura 11).

### 5.3. Pérdida de Función de Lin28 y su efecto en la metamorfosis de *D. melanogaster*.

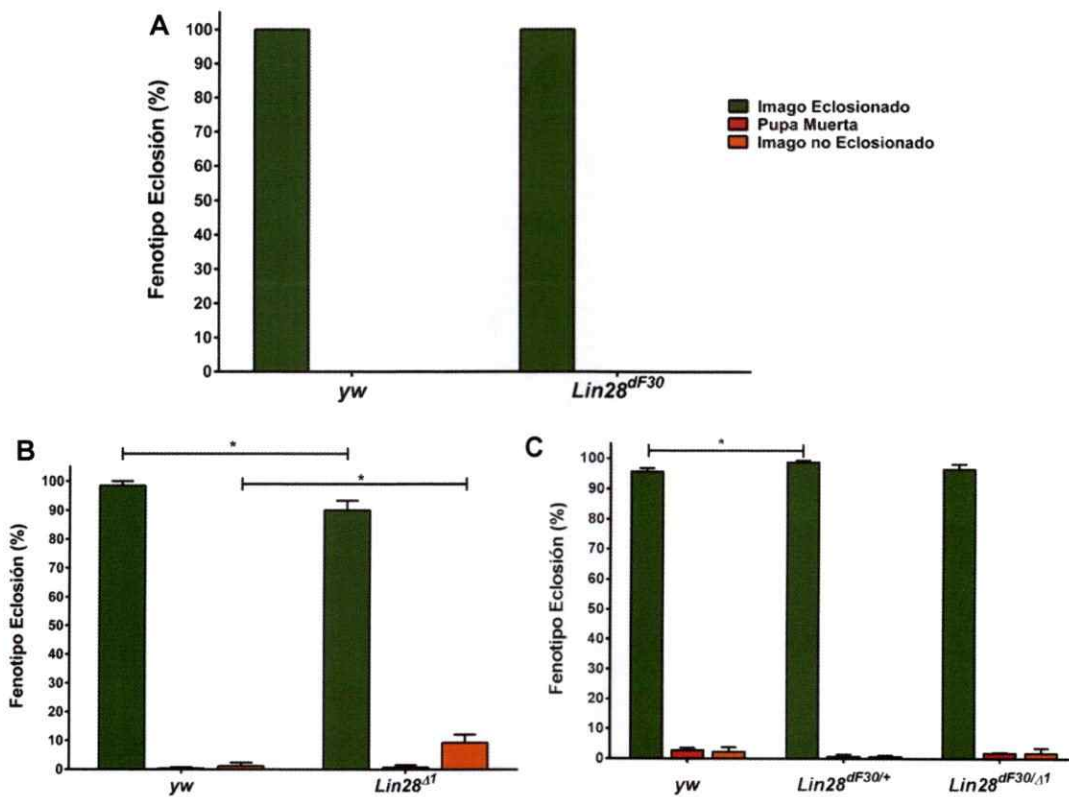
Para estudiar si *lin28* es necesario para la temporalidad de la metamorfosis, se realizaron análisis de pérdida de función mediante dos estrategias. Primero, se utilizó un animal capaz de expresar un ARN interferente (ARNi) contra el transcrito *lin28*. Segundo, se utilizaron dos animales mutantes, descritos como nulos putativos, denominados *Lin28<sup>df30</sup>* (Stratoulis y cols., 2014) y *Lin28<sup>Δ1</sup>* (Chen y cols., 2015).



**Figura 17. Curva de formación de pupario con la pérdida de función de *lin28*.** (A) Gráfica de 1 experimento. Se usaron 4 tubos por condición con 40 animales cada uno. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *Tub>y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>* N= 143; *Tub>UAS-lin28<sup>ARNi2</sup>* N= 157. (B) Gráfica de 1 experimento de fenotipos de eclosión. Se usaron 5 tubos por condición con 40 animales cada uno. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *yw* N= 179; *lin28<sup>df30</sup>* N=172. (C) Gráfica representativa de 3 experimentos independientes. Se usaron 4 tubos por condición con 22 animales cada uno. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>* N= 262; *lin28<sup>Δ1</sup>* N= 260. Diferencia 50%= 3,4  $\pm$  0,85 h. (D) Gráfica representativa de 3 experimentos independientes. Se usaron 2 tubos por condición con 30 animales cada uno. *y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>* N=171; *+/lin28<sup>df30</sup>* N= 181; *lin28<sup>df30/Δ1</sup>* N= 165. Diferencia 50% *y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>* - *+/lin28<sup>df30</sup>* = 10,87  $\pm$  3,44 h; Diferencia 50% *y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>* - *lin28<sup>df30/Δ10</sup>* = 6,23  $\pm$  1,93 h. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar.

De los dos ARNi disponibles se utilizó aquel que presentó un fenotipo más fuerte cuando se analizó el tamaño de los animales (Figura 20A),  $Lin28^{ARNi2}$  (BL-50679).

Al realizar el silenciamiento de *lin28* no se observaron cambios significativos en las curvas de formación de pupario (Figura 17A). Asimismo, cuando se evaluó la formación de pupario en la cepa  $lin28^{dF30}$  (Figura 17B), tampoco se observaron diferencias en las curvas de formación de pupario.



**Figura 18. Porcentajes de Eclosión con la pérdida de función de *lin28*.** (A) Gráfica de 1 experimento de fenotipos de eclosión. Cerca del 100% de los animales eclosionó a adulto en los animales  $y^1w^{1118}$  y en los  $lin28^{dF30}$ . (B) Gráfica resumen de 3 experimentos independientes. Cerca del 100% de los animales eclosionó a adulto en los animales  $y^1w^{1118}$ . En cambio, cerca del 90% eclosionó a adulto en los animales  $lin28^{\Delta 1}$ . El otro 10% formó un imago, pero no fue capaz de eclosionar. (C) Gráfica resumen de 3 experimentos independientes. Cerca del 100% de los animales eclosionó a adulto en los animales  $y^1w^{1118}$ ,  $+/lin28^{dF30}$  y  $lin28^{dF30/\Delta 1}$ . Se graficó Promedio  $\pm$  Desviación Estándar. Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).



La cepa *lin28<sup>df30</sup>* presenta una delección que elimina el Exón 2, 3 y parte del Exón 4 del gen *lin28*. Se describió que este mutante presenta una mortandad cercana al 50% de los animales al momento de eclosionar, aquellos que eclosionan son homocigotos viables y no presenta defectos fenotípicos observables a simple vista (Stratoulías y cols., 2014). La cepa *lin28<sup>Δ1</sup>*, presenta una delección que elimina el Exón 2, 3, 4 y 5, presentan una mortandad cercana al 50% de los animales al momento de eclosionar, aquellos que sobreviven son homocigotos viables y no presentan defectos fenotípicos a simple vista (Chen y cols., 2015).

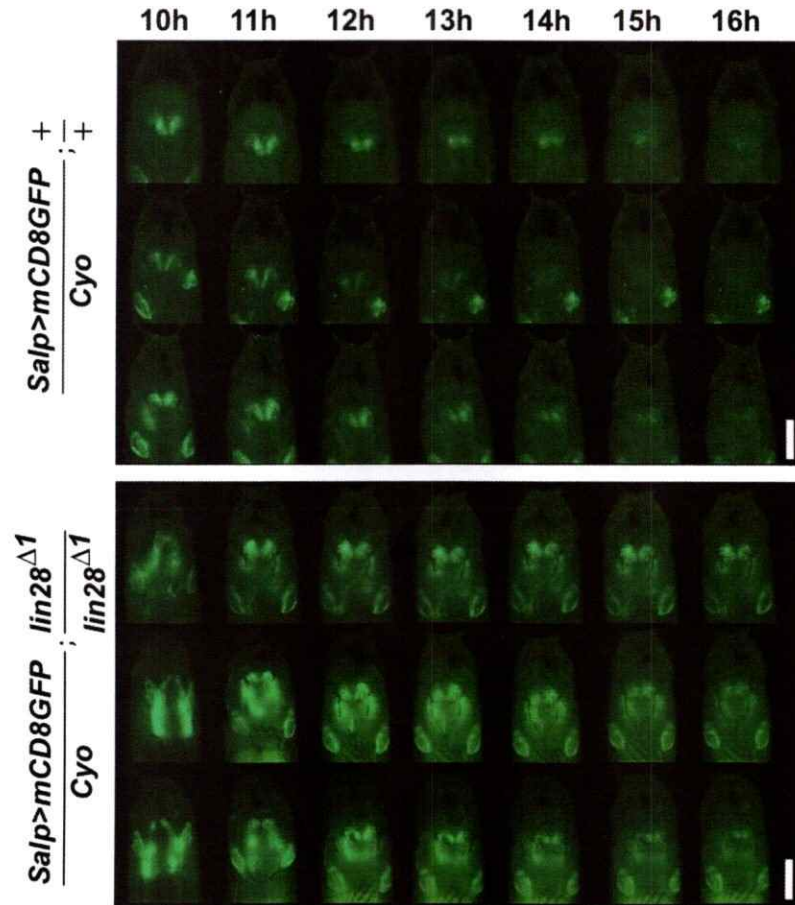
Cuando se midió el tiempo de formación de pupario con la cepa *lin28<sup>Δ1</sup>*, se observó que hubo un adelanto promedio de 3,4 horas. Asimismo, cuando se analizó la formación del pupario en la condición transheterocigótica *lin28<sup>df30</sup>/lin28<sup>Δ1</sup>*, se observó un adelanto de 6,23 horas promedio en la formación del pupario. Sin embargo, el control heterocigoto *lin28<sup>df30</sup>/+* presentó un adelanto de 10,87 horas en la formación del pupario que fue consistente en 3 experimentos independientes.

En la cepa *lin28<sup>df30</sup>* el 100% de los animales eclosionó a adultos (Figura 18A), lo que se contrapone a los resultados reportados en la literatura donde cerca del 50% de los animales muere antes o durante la eclosión (Stratoulías y cols., 2014). En la cepa *lin28<sup>Δ1</sup>* cerca del 90% de los animales eclosionó a adultos, el 10% restante se desarrolló como imago y no fue capaz de eclosionar (Figura 18B). Finalmente, en los animales con ambas mutaciones *lin28<sup>df30</sup>/lin28<sup>Δ1</sup>* cerca de la totalidad de los animales eclosionó a adultos (Figura 18C). Hubo una diferencia del 3% entre la eclosión del control y del heterocigoto *lin28<sup>df30</sup>/+*, la que fue significativa.

Estos resultados en la pérdida de Lin28, en la cepa *lin28<sup>Δ1</sup>* y en los animales transheterocigotos, sugieren que Lin28 participaría en la temporalidad de la entrada a metamorfosis (transición larva-pupa).

### 5.3.1. Generación de herramientas para evaluar el efecto de la Pérdida de función de *lin28* sobre la degradación de la Glándula Salival.

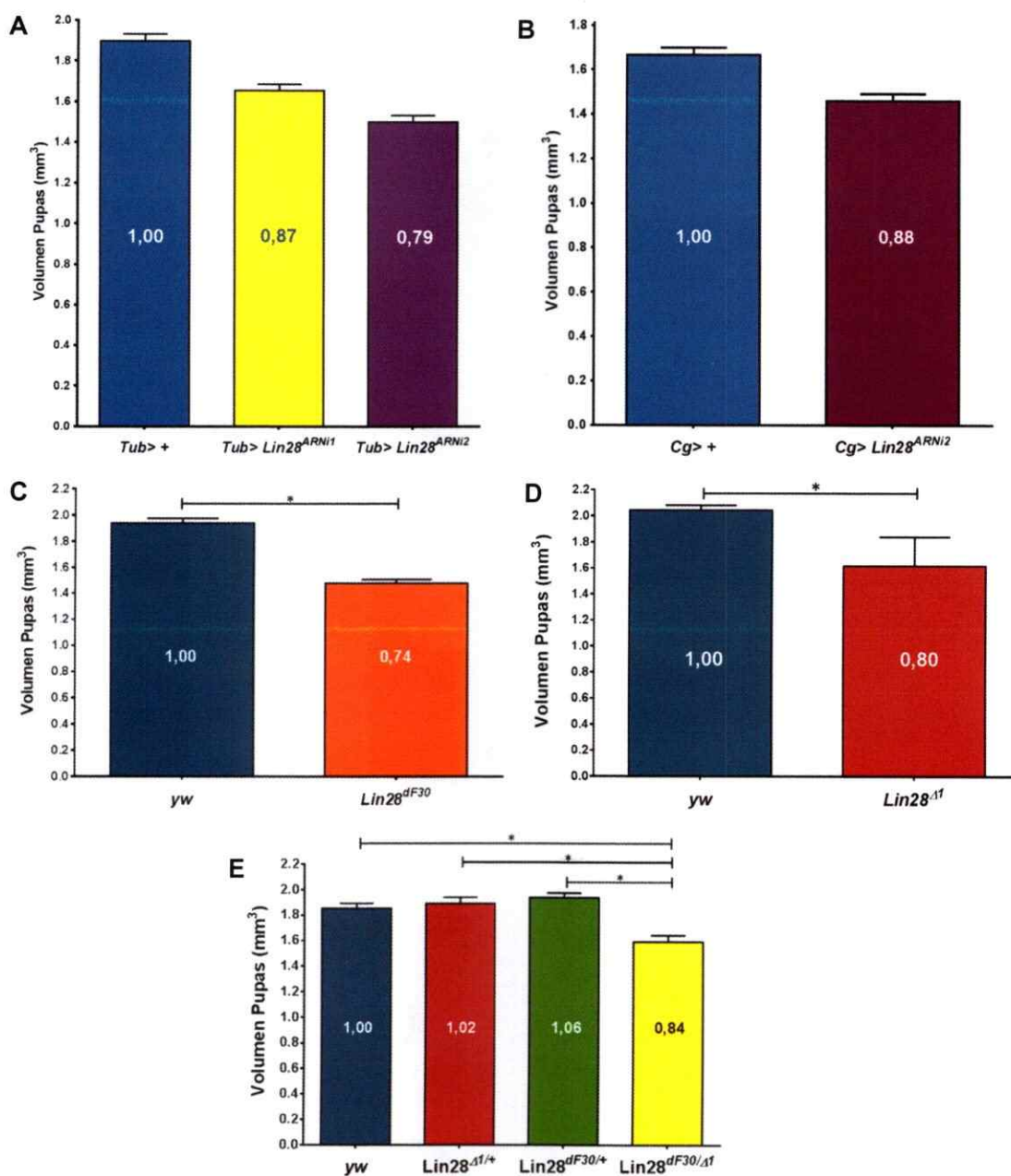
Debido a que el fenotipo de adelanto en el tiempo de formación de pupario con la deficiencia *Lin28*<sup>Δ1</sup> ( $3,4 \pm 0,85$  horas), se analizó la degradación de la glándula salival, otro hito en la metamorfosis de *D. melanogaster*. Como se mencionó previamente, las glándulas salivales comienzan a degradarse posterior a un pulso de hormona ecdisona que ocurre cerca de las 12 horas APF y se degradan completamente alrededor de las 16 horas APF (Jiang y cols., 1997; Martin & Baehrecke., 2004). Es por esta razón, que se generó un animal que expresa un reportero GFP en las glándulas salivales en el *background* de la deficiencia *lin28*<sup>Δ1</sup>, para analizar el tiempo de degradación de las glándulas por el efecto de la pérdida de *lin28*. Al evaluar la degradación de la Glándula Salival en animales *lin28*<sup>Δ1</sup>, se observó un retraso en la degradación de la glándula salival con respecto al control de alrededor de 4horas (Figura 19), indicando que *Lin28* participa en el proceso de degradación de las glándulas salivales mediada por la hormona ecdisona.



**Figura 19. Degradación de la Glándula salival en animales  $lin28^{\Delta 1}$ .** Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Tiempo luego de la formación de pupario. Se observa un retraso de 4h en la degradación de la glándula en los animales  $lin28^{\Delta 1}$  con respecto al control. Control N=13.  $lin28^{\Delta 1}$  N= 15. Barra = 500 $\mu$ m.

### 5.3.2. Efecto de la pérdida de función de $lin28$ en el tamaño y peso de las pupas.

Al igual que con la sobre-expresión de Lin28, se evaluó el efecto de la deficiencia de  $lin28$  en el crecimiento de los animales. Se seleccionaron grupos de animales, machos y hembras en una proporción 1:1. Y se midió el volumen de las pupas y su masa.



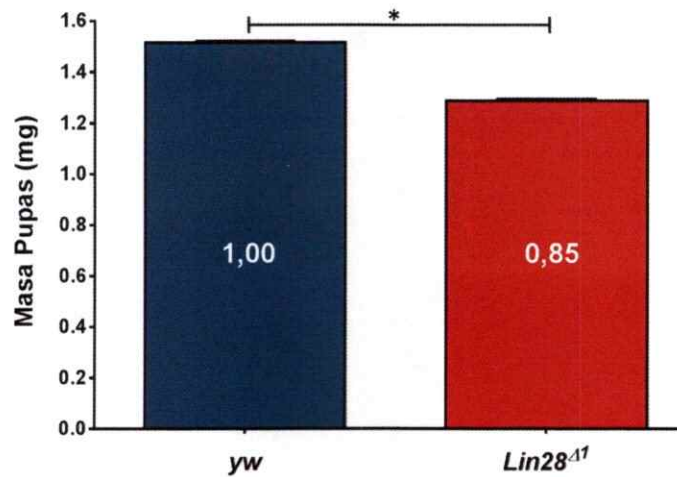
**Figura 20. Pérdida de función de *lin28* genera una disminución en el tamaño de las pupas.** (A) Gráfica de 1 experimento independiente. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *Tub-Gal4> yw<sup>1118</sup>* N= 30; *Tub-Gal4>lin28<sup>ARN1</sup>* N= 30; *Tub-Gal4>lin28<sup>ARN2</sup>* N= 30. (B) Gráfica de 1 experimento independiente. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *Cg-Gal4> +* N= 30; *Cg-Gal4>lin28<sup>ARN2</sup>* N= 30. (C) Gráfica representativa de 3 experimentos independientes. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. Mann-Whitney (P<0,05). *yw<sup>1118</sup>* N= 98; *lin28<sup>dF30</sup>* N= 110. (D) Gráfica representativa de 6 experimentos independientes. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. Mann-Whitney (P<0,05). *yw<sup>1118</sup>* N= 248; *lin28<sup>Δ1</sup>* N= 239. (E) Gráfica representativa de 3 experimentos independientes. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. Anova Una Vía. *yw*, N= 125; *Lin28<sup>Δ1/+</sup>*, N= 103; *Lin28<sup>dF30/+</sup>*, N= 137; *Lin28<sup>dF30/Δ1</sup>*, N= 125.



Al realizar el silenciamiento de este gen, mediante el uso de Tub-Gal4 como *driver* ubicuo, se observó que el volumen de los animales fue entre un 13% y un 21% más pequeños que el control (Figura 20A). Asimismo, cuando se evaluó el ARN interferente más penetrante, utilizando un *driver* específico de cuerpo graso (Cg-Gal4), se observó que el volumen de los animales fue 12% menor que el de los controles (Figura 20B). Al evaluar la cepa  $lin28^{dF30}$ , se observó que las pupas tuvieron una disminución de su tamaño de 26% estadísticamente significativo (Figura 20C), que fue reproducible en 3 experimentos independientes. En cambio, la cepa  $lin28^{\Delta 1}$  tuvo una disminución estadísticamente significativa del 20% en el tamaño de las pupas, reproducible en 6 experimentos diferentes (Figura 20D).

Al analizar los animales transheterocigotos  $lin28^{dF30}/lin28^{\Delta 1}$  se observó que las pupas tuvieron una disminución en su tamaño promedio de un 16% con respecto al control  $y^1w^{1118}$ , diferencia que fue estadísticamente significativa en 2 de 3 experimentos. Asimismo, las diferencias entre los animales heterocigotos  $lin28^{dF30}/+$  y  $lin28^{\Delta 1}/+$  con el control  $y^1w^{1118}$  no fueron estadísticamente significativas en 2 de 3 experimentos (Figura 20E). Finalmente, las pupas de la cepa  $lin28^{\Delta 1}$  tuvieron una disminución de un 15% estadísticamente significativo con respecto a las pupas control (Figura 21).

Estos resultados indican que la pérdida de Lin28 tiene un efecto durante los estadios larvales que se refleja en un menor tamaño de la pupa. Esto podría deberse a una disminución en la tasa de renovación de células troncales intestinales, dada la regulación de la expresión del Receptor de Insulina mediada por Lin28 (Chen y cols., 2015).

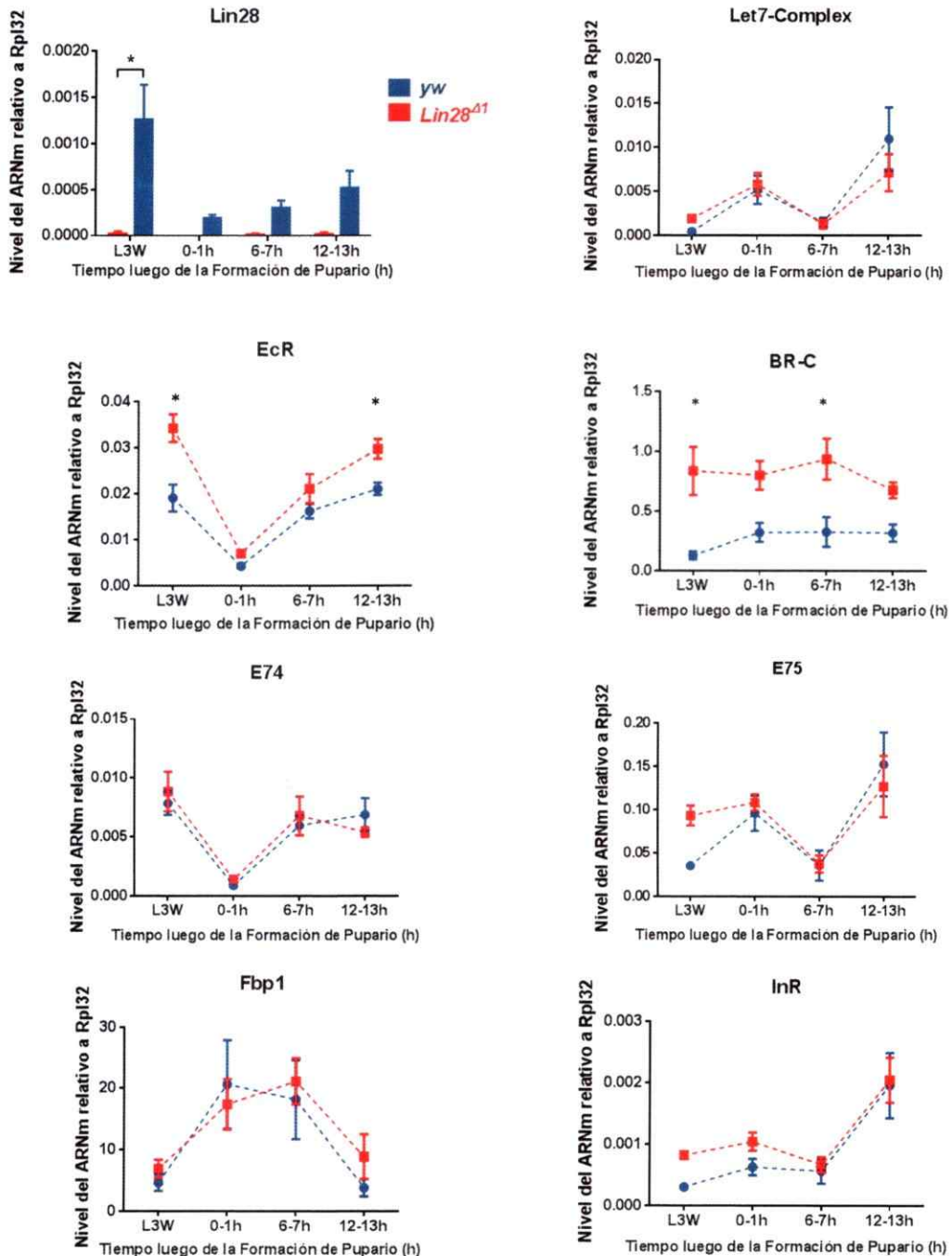


**Figura 21. Pérdida de función de *lin28* genera una disminución en el peso de las pupas.** Gráfica de 3 experimentos independientes. Se graficó Promedio  $\pm$  Error Estándar. *y<sup>1w111B</sup>* N= 90; *lin28<sup>Δ1</sup>* N= 90. Mann-Whitney (P<0,05).

### 5.3.3. Efecto de la deficiencia de Lin28 en la expresión de genes de respuesta a Ecdisona.

Al igual que con la ganancia de función, se quiso determinar si la deficiencia de Lin28 afecta el desarrollo de *D. melanogaster*, evaluando los niveles de expresión de genes que responden a la hormona ecdisona.

Se midió la expresión de estos genes en la cepa *lin28<sup>Δ1</sup>*, mediante qPCR, a tiempos L3W, 0-1 horas, 6-7 horas, 12-13 horas después de la formación de pupario.



**Figura 22.** Perfiles de expresión de genes de respuesta a ecdisona a L3W, 0-1 h, 6-7 h y 12-13 h después de la formación del pupario. Genes analizados: *Lin28*, Receptor de la Hormona Ecdisona (*EcR*), *Broad-Complex* (*BR-C*), *Puffs E74* y *E75*, *let7-Complex* y *Fat Body Protein 1* (*Fbp1*). Los transcritos “cuantificados” se controlaron con el gen *rpl32*. Se graficó el Promedio  $\pm$  Desviación Estándar. Réplicas Biológicas N=3. Anova-Dos Vías.

No se observó la expresión del mensajero *lin28* en el mutante *lin28<sup>Δ1</sup>*, confirmando la delección de *lin28* en esta cepa (Figura 22). Al analizar 3 réplicas biológicas, solo se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *EcR* (a tiempos L3W y 12-13 h) y *BR-C* (L3W y 6-7 h), donde hubo un aumento en su expresión. Por otra parte, el resto de los genes no presentó diferencias significativas (Figura 22). Esto sugiere que la pérdida de función de Lin28 afecta parcialmente la señalización de la hormona ecdisona.

## DISCUSION

La metamorfosis es un proceso de cambios post-embrionarios característico de algunos animales como anfibios e insectos. Este proceso involucra cambios morfológicos drásticos, los cuales están altamente regulados a nivel hormonal. Modelos clásicos de estudio han sido *X. laevis* y *D. melanogaster*.

En *C. elegans*, se descubrió un programa genético para las transiciones larvales durante su desarrollo que corresponde a los genes heterocrónicos, los que se han encontrado en diversas especies, como anfibios, insectos, ratones y humanos. El más conservado y estudiado en esta tesis es el gen *lin28*. Este regula las transiciones larvales en *C. elegans*, regula la metamorfosis de *X. laevis*, participa en la neurogenesis en *D. melanogaster* y ratón (Moss., 2007; Moss & Rougvie., 2013; Büssing y cols., 2008; Faunes y cols., 2017; Yang & Moss., 2003; Syed y cols., 2017; Faunes & Larraín., 2016). Se ha reportado que Lin28 participa en diferenciación, desarrollo, y metabolismo de glucosa, que se expresa en células troncales embrionarias humanas, de ratón y en líneas de carcinoma y que participa en proliferación de células troncales en *D. melanogaster* (Zhu y cols., 2010; Yang y Moss., 2003; Chen y cols., 2015; Faunes & Larraín., 2016). Debido a estos antecedentes, es que en esta tesis se estudió el efecto de *lin28* durante el proceso de metamorfosis de *D. melanogaster*, y estudiar en detalle el patrón espacial de expresión de Lin28.

### 6.1. Patrón de expresión espacial de *lin28* en Sistema Nervioso Central (SNC).

Previa a la realización de este trabajo, se reportó la presencia y función del gen *lin28* durante la ovogénesis, espermatogénesis y en células troncales intestinales adultas (Stratoulas y cols., 2014; Chen y cols., 2015). Tejidos como el Cuerpo Graso y el SNC

participan en la activación de la hormona ecdisona y en la señalización para la secreción de esta hormona respectivamente (Yamanaka y cols., 2013; Faunes & Larraín., 2016). Es por esta razón que se analizó la expresión de Lin28 en tejidos como cuerpo graso y en SNC durante el desarrollo larval de *D. melanogaster*.

Para analizar el patrón de expresión espacial de Lin28, se utilizó un animal que corresponde a un rescate genómico *lin28::mCherry* en el *background* mutante *lin28<sup>Δ1</sup>* recapitulando la expresión endógena del gen *lin28*, donde analizaron su expresión en intestino, ovarios y testículos adultos (Chen y cols., 2015). Cuando se realizaron inmunofluorescencias en cuerpos grasos de animales que expresan una proteína de fusión *Lin28::mCherry*, no se observó marca, es decir, *lin28* no se expresa o no es detectado en Larva Instar 3 (L3) y Larva Instar 3 *wandering* (L3W). Al contrastar este resultado con la base de datos *flybase.org*, no se han reportado antecedentes con respecto a la expresión de *lin28* en este tejido. Por consiguiente, Lin28 no se encontraría presente en cuerpo graso en L3 y L3W.

Al analizar la presencia de Lin28 en SNC, se encontró marca contra esta proteína en cerebro de L3 y L3W, lo que concuerda con los antecedentes presentes en la base de datos *flybase.org*. Sin embargo, se desconoce el tipo celular que expresa *lin28* en este tejido y estadios. Debido a que Lin28 participa en procesos como neurogénesis y proliferación de células troncales, se evaluó su presencia en neuroblastos. Cuando se comparó la expresión de *Lin28::mCherry* y Deadpan (Dpn), un marcador de neuroblastos, se observó que células Dpn+ no presentan marca para Lin28. Este resultado coincide con un artículo publicado durante la realización de este trabajo, que mediante el uso de un reportero *Lin28::GFP* indica que en estadios tempranos de Larva (Larva Instar 1 y 2), *lin28* se expresa en células que expresan Dpn (marcador de neuroblasto), pero al avanzar el desarrollo (L3) estos neuroblastos dejan de expresar

*lin28* (Syed y cols., 2017). Sin embargo, nosotros observamos marca de Lin28 en SNC, indicando que *lin28* se expresa en otro tipo celular en estadio L3W. Al analizar las inmuno-fluorescencias usando el reportero Lin28::mCherry, con el marcador de Glía (Repo) y de manera independiente con el marcador de neuronas (ElaV) no se pudo determinar una co-distribución de los reporteros para Lin28 y Glía, ni para Lin28 y Neurona dada la resolución y el *z-stack* realizado. A pesar de esto, las imágenes sugieren la posible presencia de una sub-población de células Lin28+/Repo+ y una sub-población Lin28+/ElaV+. Esto sugiere que Lin28 se encuentra presente en células diferenciadas en el SNC de Larvas Instar 3 *wandering* y no en células proliferativas como los neuroblastos, lo que coincide con lo observado en intestinos de ratón, donde se ha reportado que Lin28 se expresa en el epitelio intestinal adulto en la zona donde ocurre la transición entre células proliferativas y diferenciadas, manteniendo una sincronía en la renovación de este tejido (Moss., 2007).

Con respecto al intestino en *D. melanogaster*, se ha observado que Lin28 regula la capacidad de las células troncales intestinales de auto-renovarse, mediante la regulación de la expresión del receptor de insulina (Chen y cols., 2015). Esto sugiere que la función de Lin28 varía entre tejidos y que su regulación, por lo tanto, es diferente dependiendo del tejido donde se expresa. Estos resultados indican que se hace necesario realizar inmuno-fluorescencias con mayor resolución que puedan determinar si existe co-distribución de la marca del reportero asociado a Lin28 y los marcadores usados para evaluar Glía (Repo) y Neurona (ElaV).

## 6.2. Efecto de *lin28* en el tiempo de desarrollo de *D. melanogaster*.

Dados los antecedentes de Faunes y cols. 2017, donde se observa que la sobre-expresión de Lin28 retrasa la metamorfosis de *X. laevis*, se quiso estudiar un hito característico dentro del proceso de desarrollo post-embriionario y en particular de la metamorfosis de *D. melanogaster*, que es la formación del pupario.

Como se mencionó previamente, la formación de pupario involucra el paso de un estadio móvil (Larva Instar 3) a uno estático (pupario), donde se genera una cubierta de quitina y ocurre el proceso de metamorfosis (lisis de tejidos, eversión de los discos imaginales y formación del imago) (Thummel., 2001; Stocker & Gallant., 2008).

Para analizar cambios en la temporalidad del proceso de formación de pupario se analizó la ganancia de función de *lin28* en animales diseñados con el sistema Gal4/UAS que expresaron dicha proteína de manera ubicua y se analizó la pérdida de función en animales que expresan un ARN interferente usando el sistema Gal4/UAS y en animales que poseen deleciones del gen *lin28*, *lin28<sup>df30</sup>* y *lin28<sup>Δ1</sup>*.

La ganancia de función con el gen *lin28* de *D. melanogaster* no produce alteraciones en el tiempo de formación de pupario, al igual que la pérdida de función de *lin28* con el interferente *lin28<sup>ARNi2</sup>* y el mutante *Lin28<sup>df30</sup>*. Sin embargo, la ganancia de función del gen *lin28* humano (*hslin28B*), si genera un retraso en la formación de pupario al igual que la ganancia de función de Lin28 de *X. laevis* (Faunes y cols., 2017). Por otra parte, el mutante *lin28<sup>Δ1</sup>*, presenta un adelanto en la formación de pupario de 3 horas reproducible en 3 experimentos independientes. Este adelanto concuerda con lo observado en *C. elegans*, donde el mutante de pérdida de función de *lin28* induce el adelanto del estadio Larval 1 al estadio Larval 3 (Moss & Rougvie., 2013). Esta diferencia entre ambos alelos *lin28<sup>df30</sup>* y *lin28<sup>Δ1</sup>*, podría estar dada por el dominio C-Terminal ausente en *lin28<sup>Δ1</sup>*. Se ha reportado en células humanas (HEK293 y PA-1)



que el dominio C-Terminal de Lin28 recluta a la ARN Helicasa A a los polisomas favoreciendo la traducción de mensajeros. Sin embargo, solo la ausencia de este dominio (presencia del dominio CSD) genera un efecto de dominante negativo debido a que no recluta a la ARN Helicasa, inhibiendo la estimulación en la traducción dada por Lin28 (Jin y cols., 2011). Por otra parte, al realizar el transheterocigoto *lin28<sup>df30</sup>/lin28<sup>Δ1</sup>*, se observó un adelanto promedio de  $6,23 \pm 1,93$  horas, en cambio en el control heterocigoto *lin28<sup>df30</sup>/+* se observó un adelanto promedio de  $10,87 \pm 3,44$  horas. Estos resultados indican que el alelo *lin28<sup>df30</sup>* genera un fenotipo más fuerte en heterocigosis que en homocigosis, sugiriendo la existencia de mecanismos compensatorios en este último caso.

### 6.3. Efecto de *lin28* en la eclosión de adultos.

Al evaluar el hito final de la metamorfosis de *D. melanogaster*, se observó que los animales con la deficiencia de *lin28<sup>df30</sup>* no presentaron fenotipos evidentes, mientras que los animales con la deficiencia *lin28<sup>Δ1</sup>*, el 90% de los animales llegan a adultos. Estos resultados se contraponen con lo observado en Stratoulis y cols., 2014 y en Chen y cols., 2015, donde se observa muerte del 50% de los animales antes de eclosionar en ambas deficiencias. Esto podría deberse a diferencias metodológicas en el manejo de los animales dado que los alimentos utilizados en los artículos y en esta tesis fueron diferentes, debido a la función de *lin28* de regular el receptor de insulina en intestino (Chen y cols., 2015). Esta diferencia también podría deberse a la acumulación de mutaciones supresoras en los stocks de *lin28<sup>df30</sup>* y *lin28<sup>Δ1</sup>*. Al evaluar la eclosión de los animales transheterocigotos *lin28<sup>df30</sup>/Δ1*, se observó que la eclosión fue cercana al 100%. Al utilizar este animal transheterocigoto se descarta el efecto de mutaciones

supresoras presente en los *backgrounds* genéticos de cada deleción. Por lo tanto, estas diferencias podrían deberse a uso de comidas diferentes.

Cuando evaluamos la eclosión de los animales con ganancia de función de Lin28 se observó que cerca del 20% de los animales es capaz de eclosionar a adulto. Este fenotipo se parece a lo observado en Caygill y cols., 2008. En este artículo describieron que cerca 31% de los animales eclosiona a adulto en mutantes con la deficiencia de *let7C* en *D. melanogaster*. Esto podría indicar que la ganancia de función de *lin28* bloquearía la biogénesis de *let7* (Mayr & Heinemann., 2013), generando una pérdida de función de microARN, replicando lo observado en Caygill y cols., 2008. Estos resultados sugieren que Lin28 regula la metamorfosis de *D. melanogaster* mediante su acción sobre *let7*, sin embargo, queda demostrar que la ganancia de función de Lin28 reduce los niveles del microARN *let7*.

#### **6.4. Efecto de *lin28* en el tamaño de los animales.**

Debido a que se ha reportado en la literatura que Lin28 controla las divisiones de células troncales intestinales en el adulto de *D. melanogaster* y que este control está dado por la regulación del receptor de insulina (Chen y cols., 2015), es que se quiso estudiar el efecto de Lin28 en el tamaño de las pupas. Se observó que la ganancia de función de Lin28 genera un aumento en el volumen de las pupas de un 6% y no genera diferencias de masa, mientras que la pérdida de función induce una disminución en el tamaño de los animales independiente de la técnica utilizada (ARNi, deleción o transheterocigoto). Esto sugiere que Lin28 participaría activamente controlando el crecimiento de los animales, lo que podría estar dado por su regulación en la traducción del receptor de insulina. Se ha reportado que el crecimiento de las larvas depende de la tasa en la que estas crecen y el tiempo que permanecen en el periodo

de crecimiento, estos dos factores están regulados por la señalización de insulina y por la ecdisona, respectivamente. Asimismo, se ha reportado que al aumentar la señalización de insulina en la glándula protorácica, se induce un aumento en el tamaño de ésta, generando un menor tamaño en los animales (Orme y cols., 2005; Colombani y cols., 2005), sin afectar el tiempo de pupación (Orme y cols., 2005). Mediante qPCR no se observaron diferencias significativas en los transcritos del Receptor de Insulina (InR) entre el control y la delección *lin28<sup>Δ1</sup>*, sin embargo, se observa una tendencia donde los niveles de transcrito de InR están aumentados con respecto al control en estadio L3 *wandering* (Figura 22). Esto podría sugerir un aumento en la señalización de insulina en la glándula protorácica, justificando el menor tamaño de las pupas con las deficiencias de *lin28*, tal como se ha descrito en la literatura (Orme y cols., 2005 y Colombani y cols., 2005). Sin embargo, los qPCR fueron realizados con ARN de larvas completas impidiendo establecer el “aporte” de cada tejido, es por esta razón que sería interesante analizar los niveles de transcrito de InR específicamente en la glándula protorácica en animales con la deficiencia de Lin28.

Por otra parte, como se mencionó previamente, Lin28 regula los niveles de transcrito de InR, donde la pérdida de función de Lin28 genera una disminución en los niveles de transcrito del InR, disminuyendo la señalización de insulina (Chen y cols., 2015). Asimismo, se ha reportado que la disminución en la señalización de insulina genera una disminución en la biosíntesis de la Hormona Juvenil generando animales más pequeños sin afectar la temporalidad en el desarrollo (Mirth y cols., 2014), lo que podría explicar el fenotipo de disminución de tamaño en los animales con pérdida de función de Lin28. Esto hace que sea interesante analizar el efecto que tiene Lin28 en la señalización de Insulina, Ecdisona y Hormona Juvenil, y su efecto en crecimiento y desarrollo. Sumado a esto, el aumento en el tamaño de los animales con la ganancia

de función de Lin28 podría deberse a un aumento en la incorporación de nutrientes dada por la población de células troncales intestinales que podría estar aumentada (Chen y cols., 2015).

Finalmente, se observó que no hubo diferencias entre la masa de los animales que sobre-expresan Lin28 con su control. Esto podría explicarse debido a que cerca del 70% de los animales están muertos al momento de la medición, lo que se traduce en una deshidratación de las pupas y por ende, en una pérdida de masa de las mismas.

### **6.5. Efecto de *lin28* en la degradación de la glándula salival.**

Dentro del desarrollo de *D. melanogaster* otro hito importante es la degradación de la glándula salival, el cual está regulado por un *peak* de la hormona ecdisona a las 12 horas luego de la formación de pupario (Jiang y cols., 1997; Martin & Baehrecke., 2004). Dado que con la deficiencia *lin28<sup>Δ1</sup>*, se observó un adelanto de aproximadamente 3 horas en la formación de pupario, se quiso evaluar la degradación de la glándula salival. Se observó un retraso de alrededor de 4h en el tiempo de degradación de la glándula salival con la deficiencia de Lin28. Este resultado se contrapone con el adelanto de 3h promedio observado en la formación de pupario con la misma deficiencia. Sin embargo, al ser hitos diferentes del desarrollo, comandados por *peaks* diferentes de la hormona ecdisona, no serían comparables.

Se ha reportado la presencia de un *timer* biológico que controla el *peak* de hormona ecdisona a las 12 horas luego de la formación de pupario, el que gatilla la degradación de la glándula salival. Este *timer* está compuesto principalmente por el represor transcripcional *Blimp1* y el activador transcripcional *βftz-1*. *Blimp1* reprime la expresión de *βftz-1* que a su vez regula positivamente la expresión de *Shade*, enzima encargada

de la conversión de la ecdisona a su forma activa la 20-hidroxiecdisona (Akagi y cols., 2016; Agawa y cols., 2007). Asimismo, se ha reportado que el activador transcripcional DHR3 es necesario y suficiente para activar la expresión de *βftz-1*, el cual al formar un heterodímero con E75B (DHR3/E75B) bloquearía la expresión de *βftz-1* (Thummel C. 2001). Como se observa en la figura 22, hay un aumento en los niveles de transcrito del gen E75 en el estadio de Larva Instar 3 *wandering* el que no es significativo. Sin embargo, esta tendencia podría sugerir que el aumento de E75 induce un aumento en la formación del heterodímero E75B/DHR3, lo que induciría un bloqueo en la expresión de *βftz-1*, lo que a su vez bloquearía la expresión de *Shade* y por ende, retrasaría el *peak* de hormona de las 12h luego de la formación de pupario, lo que explicaría el fenotipo de retraso de 4h en la degradación de la formación de pupario observado en la figura 19.

#### **6.6. Efecto de *lin28* en la expresión de genes de respuesta a ecdisona.**

Al evaluar la expresión de genes de respuesta a ecdisona [Genes analizados: *Receptor de la Hormona Ecdisona (EcR)*, *Broad-Complex (BR-C)*, *Puffs E74 y E75*, *let7-Complex* y *Fat Body Protein 1 (Fbp1)*], se observó que en la ganancia de función, con 1 réplica biológica, no hay diferencias en los genes analizados, entre los tiempos Larva Instar 3 *wandering*, 0-1 horas, 6-7 horas, 12-13 horas, 16-17 horas, 24-25 horas ni 32-33 horas luego de la formación de pupario, con excepción del *let7-Complex*, que con 3 réplicas biológicas se ven disminuidos sus niveles de expresión, con respecto al control, a las 32-33 horas. Esta disminución en el *let7-Complex* podría generar menores niveles del microARN *let7*, lo que justificaría el fenotipo de muerte en la eclosión de los animales con la ganancia de función, que serían similares a la pérdida de función de *let7* (Caygill y cols., 2008). Al evaluar estos mismos genes en la pérdida

de función se observa un aumento en los mensajeros del Receptor de la hormona ecdisona y del Broad-Complex. Este efecto podría estar dado por una inadecuada regulación en la señalización de la ecdisona. No podemos señalar que estos mensajeros están acumulándose por el efecto de “dominante negativo” que podría tener *lin28* sin su C-Terminal reportado en Jin y cols., 2011, dado que la deficiencia utilizada en este objetivo (*lin28<sup>Δ1</sup>*), no posee los dominios de unión a ARN que generarían este efecto, por lo tanto, el aumento en los mensajeros de dichos genes sería producto de la ausencia de *lin28* y no por una función de “dominante negativo”.

#### **6.7. Efecto de la sobreexpresión de *HsLin28B*.**

Teníamos a nuestra disposición animales transgénicos que permiten sobre-expresar las secuencias codificantes de las isoformas del gen *lin28* humano, *hslin28A* y *hslin28B*. Se realizó la sobre-expresión de ambos con el *driver* ubicuo Tub-Gal4 y se observó que los animales hsLin28A no alcanzaban a formar pupario, es decir, fueron letales en Larva Instar 3 (datos no mostrados), a diferencia de los animales hsLin28B que sí forman pupario, con un retraso de más 48 horas con respecto al control (Figura 16). Esto podría sugerir la existencia de una regulación post-transcripcional del gen *lin28* de *D. melanogaster*, que explicaría la falta de fenotipo en la formación de pupario (Figura 11), que no estaría afectando al gen *hslin28B*, o bien, lo estaría reconociendo de manera inadecuada generando este fenotipo de retraso en la formación de pupario y muerte durante la metamorfosis (Figura 16).

## 6.8. Perspectivas.

Dados los resultados de este trabajo, se plantea evaluar el papel de *let7* en los fenotipos observados de ganancia y pérdida de función de *lin28*. Debido a que una de las funciones principales de Lin28 es regular la biogénesis del gen heterocrónico *let7*. De acuerdo a lo anterior, se plantea verificar que los niveles de *let7* se ven afectados a nivel del microARN procesado. Sumado a esto, se ha reportado que Lin28 tendría un papel como activador transcripcional (Zeng y cols., 2016), por lo tanto, sería interesante relacionar los fenotipos observados a esta característica molecular.

El sistema de regulación hormonal de *D. melanogaster* es sumamente complejo (Yamanaka y cols. 2013), dado que además de la hormona ecdisona también se encuentra la hormona juvenil, lo que hace difícil el estudiar el papel de *lin28* en la regulación hormonal de este animal.

Se observó que la pérdida de función de Lin28 en Cuerpo Graso genera una disminución en el crecimiento y, por ende, en el tamaño de las pupas. Sin embargo, Lin28 no se detecta en este tejido en estadios larvales tardíos (Larva Instar 3 y Larva Instar 3 *wandering*). Es debido a esto, que es interesante analizar en qué etapa del desarrollo larval Lin28 se expresa en cuerpo graso y cómo afecta a este tejido generando un fenotipo de disminución en el crecimiento.

La relación entre la expresión de genes heterocrónicos y la regulación hormonal se ha podido realizar de manera parcial en el artículo de Faunes y cols., 2017, donde *lin28* regula la metamorfosis de *X. laevis* actuando río arriba o en paralelo con la hormona tiroidea. Durante el desarrollo de esta tesis, se puede concluir que Lin28 regula la metamorfosis de *D. melanogaster*, dados los fenotipos de adelanto en la formación de pupario con la deficiencia *lin28<sup>A1</sup>* o el fenotipo de muerte en la ganancia de función de Lin28. Sin embargo, el fenotipo más drástico se observó con la ganancia de función de

gen *lin28* humano, sugiriendo una inadecuada regulación post-transcripcional generando el fenotipo deletéreo, que la regulación hormonal en *D. melanogaster* al ser más compleja le quita peso al efecto de Lin28, y que Lin28 participa en crecimiento a través de una regulación de insulina y no en los tiempos de desarrollo post-embrionario en *D. melanogaster*.

Finalmente, sería interesante aclarar el papel que cumple Lin28 durante la regulación hormonal, lo que podría eventualmente estar relacionado a desórdenes endocrinos.



## CONCLUSIONES

Dados los resultados de este trabajo, se puede concluir que:

- Lin28 se detecta en el Sistema Nervioso Central en Larvas Instar 3 *wandering*, pero no así en cuerpo graso.
- La ganancia de función de Lin28 genera un efecto deletéreo en la eclosión del adulto, sin afectar la temporalidad de la formación de pupario. Además, afecta la expresión un gen de respuesta a ecdisona (Let7Complex).
- La pérdida de función de Lin28 "adelantaría" la formación de pupario, siendo necesario para el inicio y desarrollo de la metamorfosis, y para la eclosión del adulto. Además, afecta la expresión de genes de respuesta a Ecdisona (EcR y BR-C).
- Lin28 participa en la regulación del crecimiento larval.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agawa Y., Sarhan M., Kageyama Y., Akagi K., Takai M., Hashiyama K., Wada T., Handa H., Iwamatsu A., Hirose S., Ueda H. 2007. *Drosophila* Blimp-1 is a transient transcriptional repressor that controls timing of the ecdysone-induced developmental pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 27 8739-8747. doi:10.1128/MCB.01304-07.
- Akagi K., Sarhan M., Sultan A-R., Nishida H., Koie A., Nakayama T., Ueda H. 2016. A biological timer in the fat body comprising Blimp-1,  $\beta$ Ftz-1 and Shade regulates pupation timing in *Drosophila melanogaster*. *Development*. 143: 2410-2416. doi:10.1242/dev.133595.
- Ambros V. & Horvitz R. 1984. Heterochronic Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 226: 409-416. DOI: 10.1126/science.6494891.
- Berger C., Renner S., Lür K., Technau G. 2007. The Commonly Used Marker ELAV Is Transiently Expressed in Neuroblasts and Glial Cells in the *Drosophila* Embryonic CNS. *Developmental Dynamics*. 236:3562–3568. DOI 10.1002/dvdy.21372.
- Bischof J., Maeda R., Hediger M., Karch F., Basler K. 2007. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific  $\phi$ C31 integrases. *PNAS*. 4:3312–3317. DOI: 10.1073/pnas.0611511104.
- Brand A. & Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118:401-415.
- Brown D. & Cai L. 2007. Amphibian metamorphosis. *Dev. Biol*. 306: 20–33. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.03.021.
- Büssing I., Slack F., Großhans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 14: 400-409. DOI: 10.1016/j.molmed.2008.07.001.
- Caygill E. & Johnston L. 2008. Temporal Regulation of Metamorphic Processes in *Drosophila* by the let-7 and miR-125 Heterochronic MicroRNAs. *Current Biology*. 18, 943-950. DOI: 10.1016/j.cub.2008.06.020.
- Chawla G. & Sokol N. Hormonal activation of let-7-C microRNAs via EcR is required for adult *Drosophila melanogaster* morphology and function. *Development*. 139, 1788-1797. DOI:10.1242/dev.077743.

- Chen C., Luhur A., Sokol N. 2015. Lin-28 promotes symmetric stem cell division and drives adaptive growth in the adult *Drosophila* intestine. *Development*. 142, 3478-3487. DOI:10.1242/dev.127951.
- Colombani J., Bianchini L., Layalle S., Pondeville E., Dauphin-Villemant C., Antoniewski C., Carré C., Noselli S., Léopold P. Antagonistic Actions of Ecdysone and Insulins Determine Final Size in *Drosophila*. *Science*. 310: 667-670. DOI: 10.1126/science.1119432.
- Delanoue R., Slaidina M., Léopold P. 2010. The Steroid Hormone Ecdysone Controls Systemic Growth by Repressing dMyc Function in *Drosophila* Fat Cells. *Developmental Cell*. 18, 1012–1021. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.05.007.
- Faunes F., Gundermann D., Muñoz R., Bruno R., Larraín J. 2017. The heterochronic gene Lin28 regulates amphibian metamorphosis through disturbance of thyroid hormone function. *Developmental Biology*. 425: 142–151. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.03.026.
- Faunes F. & Larraín J. 2016. Conservation in the involvement of heterochronic genes and hormones during developmental transitions. *Dev. Bio*. 416:3-17. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.06.013.
- FlyMove. 2013. Ciclo de Vida *Drosophila melanogaster*.  
[http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life\\_cycle.jpg](http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life_cycle.jpg)
- Francis V., Zorzano A., Teleman A. 2010. dDOR Is an EcR Coactivator that Forms a Feed-Forward Loop Connecting Insulin and Ecdysone Signaling. *Current Biology* 20, 1799–1808. DOI: 10.1016/j.cub.2010.08.055.
- Griffin R., Binari R., Perrimon N. 2014. Genetic odyssey to generate marked clones in *Drosophila* mosaics. *PNAS*. 111: 4756–4763. DOI: 10.1073/pnas.1403218111.
- Jiang C., Baehrecke E., Thummel C. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development*. 124, 4673-4683.
- Jin J., Jing W., Lei X., Feng C., Peng S., Boris-Lawrie K., Huang T. 2011. Evidence that Lin28 stimulates translation by recruiting RNA helicase A to polysomes. *Nucleic Acids Research*. 39: 3724-3734. DOI:10.1093/nar/gkq1350.

- Kim D, Sarbassov D, Ali S, King J, Latek R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 110:163-175. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5).
- Laudet V. 2011. The Origins and Evolution of Vertebrate Metamorphosis. *Current Biology* 21: 726–737. DOI: 10.1016/j.cub.2011.07.030.
- Majumdar S. & Rio D. 2015. Transposable Elements in *Drosophila* and other Eukaryotic Organisms. *Microbiol Spectr*. 3: 1-25. DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0004-2014.
- Martin D. & Baehrecke E. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development*. 131: 275-284. DOI:10.1242/dev.00933.
- Mayr F. & Heinemann U. 2013. Mechanisms of Lin28-Mediated miRNA and mRNA Regulation-A Structural and Functional Perspective. *Int. J. Mol. Sci*. 14: 16532–16553. DOI: 10.3390/ijms140816532.
- Mirth C., Tang H., Makohon-Moore S., Salhadar S., Gokhale R., Warner R., Koyama T., Riddiford L., Shingleton A. 2014. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. 111: 7018–7023. DOI: 10.1073/pnas.1313058111.
- Moss E. 2007. Heterochronic Genes and the Nature of Developmental Time. *Current Biology* 17: 425–434. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.043>.
- Moss E. & Rougvie A. 2013. Chapter Six – Developmental Transitions in *C. elegans* Larval Stages. In Rougvie A. & O'Connor M. *Developmental Timing*. P: 153–180. Academic Press. The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, UK.
- Moss E. & Tang L. 2003. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Developmental Biology*. 258: 432–442. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00126-X).
- Orme M. & Leever S. 2005. Flies on steroids: The interplay between ecdysone and insulin signaling. *Cell Metab*. 2: 277-278. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2005.10.005>.
- Paris M. & Laudet V. 2008. The History of a Developmental Stage: Metamorphosis in Chordates. *Genesis*. 46:657–672. DOI: 10.1002/dvg.20443.

- Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 29: 2002-2007.
- Ponton F., Chapuis M., Pernice M., Sword G., Simpson S. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 57: 840–850. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.014.
- Stocker H. & Gallant P. 2008. Getting started: an overview on raising and handling *Drosophila*. *Methods Mol Biol*. 420:27-44. DOI: 10.1007/978-1-59745-583-1\_2.
- Stratoulis V., Hieno T., Michon F. 2014. Lin-28 Regulates Oogenesis and Muscle Formation in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE* 9: 1-14. Doi:10.1371/journal.pone.0101141.
- Syed M., Mark B., Doe C. 2017. Steroid hormone induction of temporal gene expression in *Drosophila* brain neuroblasts generates neuronal and glial diversity. *eLife*, 6: 1-23. DOI: 10.7554/eLife.26287.
- Thummel C. 2001. Molecular Mechanisms of Developmental Timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Developmental Cell*. 1: 453-465. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00060-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00060-0).
- Tyler M. 2000. Chapter 8: Development of the Fruit Fly. En Tyler M. *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study*. P. 85–105. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA.
- Varghese J. & Cohen S. 2007. microRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *GENES & DEVELOPMENT*. 21: 2277-2282. DOI: 10.1101/gad.439807.
- Viswanathan S. & Daley G.Q. 2010. Lin28: A MicroRNA Regulator with a Macro Role. *Cell*. 140: 445–449. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.007.
- Yamanaka N., Rewitz K., O'Connor M. 2013. Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from *Drosophila* Research. *Annu. Rev. Entomol*. 58: 497-516. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153608.
- Yang M, Dong H., Moss E. 2003. Temporally Regulated Expression of Lin-28 in Diverse Tissues of the Developing Mouse. *Gene Expr Patterns*. 3:719-726. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00140-6).

Yang M., Yang S., Herrlinger S., Liang C., Dziejatkowska M., Hansen K., Desai R., Naqy A., Niswander L., Moss E., Chen J. 2015. Lin28 Promotes the Proliferative Capacity of Neural Progenitor Cells in Brain Development. *Development*. 142:1616-1627. DOI: 10.1242/dev.120543.

Zeng Y., Yao B., Shin J., Lin L., Kim N., Song Q., Liu S., Su Y., Guo J., Huang L., Wan J., Wu H., Qian J., Cheng X., Zhu H., Ming G., Jin P., Song H. 2016. Lin28A Binds Active Promoters and Recruits Tet1 to Regulate Gene Expression. *Molecular Cell*. 61: 1-8. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.11.020.

Zhu H., Shah S., Shyh-Chang N., Shinoda G., Einhorn W., Viswanathan S., Takeuchi A., Grasmann C., Rinn J., Lopez M., Hirschhorn J., Palmert M., Daley GQ. 2010. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies. *Nat Genet*. 42: 626–630. DOI:10.1038/ng.593.