

Carrera de Bioquímica
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS

Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)

Código de la Materia: 1346

Carga horaria: 50 horas

Profesor –Investigador : María Jose De Rosa

Asistente/Ayudante de docencia: Yanel Andrea Volonté

Asignatura (s) Obligatoria (s): Genética Molecular (cursada) / Bioanalítica II (cursada) / Química Biológica I (cursada)

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)

Título del Proyecto de Investigación Acreditado: Modulación peptidérgica de circuitos neuronales

Código Proyecto: 24/B352

Resumen del Proyecto (no mayor de 250 palabras)

DILP8 (*Drosophila* Insulin-Like Peptide 8) es un péptido del tipo de las relaxinas, perteneciente a la familia de insulina. Actúa como la señal endócrina que coordina el crecimiento de las distintas partes del cuerpo con la maduración durante el desarrollo de la mosca. El receptor LGR3, expresado en un par de neuronas bilaterales del cerebro de *D.melanogaster*, es necesario para la acción de DILP8 modulando la actividad de las glándulas endócrinas que controlan la transición de larva a pupa. Esta vía neuroendocrina también es necesaria para el correcto desarrollo del programa motor de pupariación, en este contexto DILP8 es liberado de la epidermis y actúa sobre neuronas LGR3 positivas ubicadas en el cerebro de *Drosophila*, diferentes a aquellas necesarias para coordinar el crecimiento de los tejidos con la maduración del organismo. Además de ser expresado en tejidos imaginales en regeneración y en epidermis, *dilp8* es transcricionalmente activo en otros tejidos y fases del ciclo de vida de *Drosophila*. En este proyecto proponemos caracterizar nuevas funciones y mecanismos de acción de la vía DILP8-LGR3 en el adulto, evaluando su función en la reproducción, el control del metabolismo energético y la longevidad. Emplearemos herramientas genéticas clásicas y mutantes generados con CRISPR/Cas9. Nos proponemos caracterizar la función de DILP8 en el ovario, el control de su expresión y el tejido blanco sobre el que actúa para finalmente caracterizar la o las vías neuroendocrinas que lo involucran en su rol fisiológico junto a su receptor LGR3.

Plan de trabajo (resumido)

DILP8 es una hormona y como tal, transmite un mensaje de un órgano a otro. La naturaleza del mensaje y los efectos fisiológicos que produce no son propiedades intrínsecas de la hormona, sino que están determinados por las señales moleculares que inducen su producción y liberación, así como por el efecto que desencadena en los tejidos que la reciben. Los mecanismos moleculares que subyacen el accionar de este péptido de la familia de la insulina afectando la expectativa de vida y la capacidad reproductiva de un organismo a través de la comunicación entre el sistema reproductor, los sistemas de almacenamiento de energía y el sistema nervioso central se encuentran poco explorados y es por esto que el objetivo general de este plan es dilucidar la participación de la hormona DILP8 y su receptor LGR3 en el mecanismo de comunicación entre los tejidos antes mencionados y cuál es su efecto sobre la reproducción, el metabolismo energético y la expectativa de vida del organismo adulto.

DILP8 es un péptido con características estructurales que permiten ubicarlo dentro de la familia de péptidos de insulina/IGF/relaxina (insulin-like peptides – ILPs). Previamente describimos su rol y el de su receptor LGR3 en distintos contextos del desarrollo. En principio se describió como la señal, derivada de los discos dañados, que coordina el crecimiento con el tiempo de desarrollo. Posteriormente describimos cómo DILP8 coordina el crecimiento y el tiempo de desarrollo actuando a través del receptor de relaxinas LGR3 en una subpoblación neuronal del sistema nervioso central. Actualmente identificamos un nuevo programa motor que se ejecuta durante el desarrollo, en la transición de larva a pupa en *D. melanogaster*, y es iniciado por DILP8 liberado desde la epidermis, en respuesta a un pico de actividad de la hormona ecdisona. Tanto la coordinación del crecimiento y el tiempo de desarrollo, como la ejecución del programa motor antes mencionadas son llevadas a cabo por la acción de DILP8 sobre su receptor LGR3, receptor acoplado a proteína G que se expresa en casi todo el ciclo de vida de *Drosophila* alcanzando un pico al comienzo del estadio larval y mostrando un interesante dimorfismo sexual en el adulto ya que se observa mayor expresión de *Lgr3* en el cuerpo graso (fat body) de las hembras adultas respecto de los machos, como también un alto nivel transcripcional en útero.

Además de ser expresado en tejidos imaginales en regeneración, y en la epidermis de la larva, dilp8 es transcripcionalmente activo en otros tejidos y fases del ciclo de vida de Drosophila como el ovario y el cuerpo lúteo, con algunas similitudes destacables con la rama de relaxina de la familia de péptidos semejantes a insulina de vertebrados. Nuestras observaciones indican que DILP8 se expresa en el ovario y cerebro de animales adultos de Drosophila por lo que es esperable que cumpla funciones adicionales relacionadas con la fisiología de estos tejidos, funciones que aún se desconocen. Hipotetizamos que DILP8 podría estar actuando en el sistema reproductor de la hembra a través del receptor LGR3, posiblemente vinculado al proceso de ovulación y/o al paso del ovocito por el oviducto; o bien recibiendo la señal de DILP8 a nivel del sistema nervioso para luego desencadenar el programa relacionado con la ovulación.

Planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la participación de DILP8, producido por células foliculares, y su receptor LGR3 en la regulación de la ovogénesis.

Para llevar a cabo estos objetivos proponemos evaluar la producción de ovocitos bajo distintas condiciones nutricionales, en presencia y ausencia de DILP8 y LGR3. También evaluaremos el número de cámaras ováricas, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, en mutante nulos para el dilp8 y en mutantes nulos para Lgr3. Una vez verificada la participación de DILP8 y LGR3 en este bucle regulatorio, identificaremos el órgano blanco empleando el sistema UAS-GAL4. Este sistema permite expresar in vivo un gen, de manera dirigida y específica a cualquier célula y en cualquier momento del desarrollo de la mosca. GAL4 es un factor de transcripción que activa la expresión de genes al unirse a la secuencia reguladora UAS (Upstream Activating Sequences). Cruzando una mosca transgénica que tenga GAL4 bajo una secuencia regulatoria endógena deseada con otra que posea el gen de interés bajo la secuencia UAS, obtendremos la F1 con ambas construcciones y, por lo tanto, la expresión del gen de interés en el tejido deseado.

2. Identificar el rol de DILP8 y LGR3 en el control de la ovulación, ya sea en el proceso de desprendimiento de las células foliculares y/o relajación del oviducto.

Con el propósito de evaluar si DILP8 es necesario para desprender las células foliculares y/o relajar el oviducto para facilitar el pasaje del ovocito hacia el útero, realizaremos ensayos ex vivo. Disecaremos ovarios de hembras vírgenes, control y mutantes nulos para dilp8 y Lgr3, de 5 días de edad, de los cuales aislaremos folículos maduros (marcados con 44E10>RFP, esta línea permite identificar, en rojo, las células foliculares) en medio de cultivo de Grace y agregaremos al medio Octopamina 5 μ M, componente necesario para estimular la ruptura del folículo, proceso que se visualizará fácilmente por la pérdida de la cubierta fluorescente roja.

3. Identificar la participación de DILP8 en el control del metabolismo y la longevidad.

Modificaciones en la dieta y manipulaciones genéticas directas o indirectas en la expresión de los distintos DILPs afectan las vías activadas por insulina mostrando un aumento de la esperanza de vida y la resistencia al ayuno. El objetivo es evaluar, así como ocurre con otros DILPs, si la falta de DILP8 en el ovario podría estar contribuyendo a un aumento en la expectativa de vida bajo situaciones de estrés modificando a su vez los niveles de expresión de otras insulinas como DILP2, 3 y 5, influyendo también en la alimentación de la hembra adulta según su estado reproductivo. Evaluaremos también si esta señalización pudiera estar ocurriendo desde el ovario hacia el cuerpo graso y de allí al cerebro, o directamente señalizando hacia el cerebro regulando la transcripción de insulinas promoviendo así distintos comportamientos frente a la alimentación.

Descripción de las Actividades a realizar:

- Manipulación y cultivo de Drosophila melanogaster como modelo experimental.
- Realización de cruza genéticas y empleo de herramientas genéticas disponibles en D. melanogaster.
- Ensayos metabólicos y de oviposición.
- Técnicas de inmunomarcación y técnicas de biología molecular (extracción de ARN, rt-PCR / q-PCR)
- Empleo de microscopia de fluorescência.
- Análisis de los resultados obtenidos.

Cuatrimestre: Segundo

Cupo de alumnos: 1

Carga horaria semanal: 5 hs

Modalidad de Evaluación:

- Entrega de un informe con formato de trabajo científico
- Exposición Oral: Se *realizará en presencia de todos los alumnos de la materia y los profesores respectivos y al menos un integrante de la CCB (hasta 15 minutos)*