

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.



Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Doctora en Ciencias Biológicas

**“Regulación de la biogénesis de miRNAs y los niveles de  
p53 por Myc y su impacto en la homeostasis intestinal”**

Lic. Maria Paula Gervé

Director de Tesis: Dr. Andrés Dekanty

**Laboratorio de Biología Molecular.  
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL)**

Agradecimientos.

*A la Universidad Nacional del Litoral, y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por permitirme ser parte de la primera generación universitaria de mi familia. Siempre apoyaré la educación pública y gratuita.*

*A CONICET por financiar este posgrado mediante una beca doctoral y por su compromiso con la soberanía nacional.*

*Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y su comunidad por brindarme un espacio de trabajo que favoreció mi crecimiento profesional.*

*Al Dr. Andres Dekanty, por su confianza y apoyo constante en mi desarrollo académico.*

*Al Flyteam, por sus enseñanzas y paciencia infinita.*

*A mi familia, por apoyarme en cada paso, y a Dario, por estar a mi lado siempre.*

*A mis amigas y compañeros de la facultad por su compañía y apoyo incondicional.*

## Aportes Científico-Tecnológicos

1. FOXO-mediated repression of Dicer1 regulates metabolism, stress resistance, and longevity in *Drosophila*.

Autores: Juan A. Sánchez , María C. Ingaramo, María P. Gervé, y Andrés Dekanty

Revista: Proceedings of the National Academy of Sciences; 120(16): 8547-8556

Año: Abril, 2023

2. Myc-regulated miRNAs modulate p53 expression and impact animal survival under nutrient deprivation

Autores: María P. Gervé, Juan A. Sánchez, María C. Ingaramo, Andrés Dekanty

Revista: PLOS Genetics; 18(2): e1010721

Año: Agosto, 2023

## Índice.

|   |           |
|---|-----------|
| Agradecimientos.....  | 1         |
| Aportes Científico-Tecnológicos.....  | 2         |
| Índice.....   | 3         |
| <b>1. Abreviaturas y símbolos.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2. Resúmenes.....</b>  | <b>10</b> |
| 2.1 Resumen.....  | 10        |
| 2.2 Abstract.....   | 11        |
| <b>3. Introducción.....</b>   | <b>13</b> |
| 3.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....                       | 13        |
| 3.2 Ciclo de vida y tejidos de <i>Drosophila melanogaster</i> .....                 | 17        |
| 3.2.1 Cuerpo graso o fat body.....  | 19        |
| 3.2.2 Discos imaginales de ala.....   | 20        |
| 3.2.3 Intestino adulto.....   | 21        |
| 3.3 El Factor de Transcripción Myc.....   | 23        |
| 3.3.1 Myc como factor de transcripción.....   | 26        |
| 3.4 RNAs pequeños.....  | 27        |
| 3.4.1 Biogénesis de miRNAs.....   | 28        |
| 3.4.2 Modo de acción y funciones de los miRNAs.....                                 | 29        |
| 3.4.3 Regulación de la biogénesis de miRNAs.....                                    | 31        |
| 3.5 El Factor de Transcripción P53.....   | 33        |
| 3.5.1 Isoformas de p53.....   | 34        |
| 3.5.2 Regulación de p53.....  | 36        |
| 3.6 Funciones canónicas de p53.....   | 37        |
| 3.7 Funciones no canónicas de p53.....  | 39        |
| 3.7.1 Dmp53 regula la homeostasis metabólica.....                                   | 39        |
| 3.7.2 Rol de p53 en la regulación de células madre.....                             | 41        |
| <b>4. Objetivos.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>5. Materiales y métodos.....</b>   | <b>48</b> |
| 5.1. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> y mantenimiento.....                  | 48        |
| 5.2 Sistema de expresión binario GAL4-UAS y experimentos de mosaicos genéticos..... | 49        |
| 5.3 Inmunoensayos.....  | 50        |
| 5.4. Cuantificaciones de fluorescencia y longitud.....                              | 51        |
| 5.5 Extracción de RNA y PCR en tiempo real.....                                     | 52        |
| 5.6 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y qPCR.....                          | 56        |
| 5.7 Análisis de datos de ChIP-seq.....  | 56        |
| 5.8 Análisis bioinformático.....  | 56        |
| 5.9 Análisis estadísticos.....  | 57        |
| 5.10 Tratamientos.....  | 57        |
| <b>6. Resultados.....</b>   | <b>61</b> |
| Parte 1. miRNAs regulados por dMyc modulan la expresión de Dmp53 e influyen en la   |           |

|   |            |
|---|------------|
| supervivencia del animal bajo condiciones de privación de nutrientes.....   | 61         |
| 6.1.1 Regulación de la transcripción de miRNAs mediada por dMyc en <i>Drosophila melanogaster</i> .....                         | 61         |
| 6.1.2 Asociación de dMyc con la región genómica de miRNAs.....  | 63         |
| 6.1.3 Regulación de dMyc sobre los principales factores de la biogénesis de miRNAs.....   | 65         |
| 6.1.4 Regulación de sensores de la actividad de miRNAs por dMyc en el primordio del ala de <i>Drosophila melanogaster</i> ..... | 67         |
| 6.1.5 dMyc regula la expresión de miR-305 en el cuerpo graso según la disponibilidad de nutrientes.....                         | 69         |
| 6.1.6 La regulación de miR-305 mediada por dMyc y su función en la resistencia a la privación de nutrientes.....                | 71         |
| Parte 2. Dmp53 y su impacto en la homeostasis intestinal.....   | 75         |
| 6.2.1 Dmp53 es un regulador clave de la composición celular del intestino medio.....  | 75         |
| 6.2.1.2 Dmp53 es necesario en el intestino medio para regular el número de ISCs.....  | 77         |
| 6.2.2 Activación de Dmp53 en células madre intestinales.....  | 80         |
| 6.2.3 Dmp53 es clave para la homeostasis en el intestino medio de <i>Drosophila melanogaster</i> .....                          | 82         |
| 6.2.4 Dmp53 modula la respuesta adaptativa al estrés en el intestino medio de <i>Drosophila melanogaster</i> .....              | 85         |
| 6.2.5 El impacto de Dmp53 y Ras en el cáncer colorrectal.....   | 91         |
| <b>7. Discusión.....</b>  | <b>94</b>  |
| 7.1 dMyc regula la expresión y biogénesis de miRNAs.....  | 94         |
| 7.2 dMyc regula la expresión de pri-miR-305 en cuerpo graso en respuesta a estrés nutricional.....                              | 95         |
| 7.3 Dmp53 tiene una función en la regulación de células madre intestinales.....   | 98         |
| 7.4 Mecanismos de regulación de Dmp53 en ISCs.....  | 99         |
| 7.5 Dmp53 como regulador clave en la adaptación intestinal al estrés y su relación con el CRC.....                              | 100        |
| <b>8. Conclusiones.....</b>   | <b>104</b> |
| <b>9. Suplementaria.....</b>  | <b>106</b> |
| <b>10. Bibliografía.....</b>  | <b>115</b> |

## **Abreviaturas y símbolos**

## 1. Abreviaturas y símbolos.

**A:** Anterior

**Ago:** Argonauta, proteína del complejo de silenciamiento de miRNAs

**bHLH-Zip:** dominio de hélice-lazo-hélice-cremallera de leucina.

**CRC:** cancer colorectal

**D:** Dorsal

**Dcr:** Dicer, proteína de la biogénesis de miRNAs

**DBD:** Dominio de unión al DNA central.

**dl:** delta, marcador de ISCs

**Dmp53:** proteína p53 en *Drosophila melanogaster*

**dMyc:** proteína Myc en *Drosophila melanogaster*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EB:** enteroblastos del intestino medio

**EC:** células enterocitas

**EE:** células enteroendocrinas

**EEP:** progenitores enteroendócrinos

**ESCs:** células madre embrionarias

**esg:** escargot, marcador de células progenitoras

**FB:** cuerpo graso en *Drosophila melanogaster*

**FLP/FRT:** Sistema Flipout FRT

**FT:** Factor de transcripción.

**FOXO:** Forkhead box

**GAL80<sup>ts</sup>** : Sistema Gal80 termosensible.

**HexC**: Hexoquinasa-C.

**ISCs**: células madre intestinales

**iPSCs**: células madre pluripotentes inducidas

**miRISC**: complejo de silenciamiento inducido por miRNA.

**miRNA**: micro RNA.

**mir-305**: micro RNA 305

**N**: Notch, vía fundamental en la diferenciación de células del intestino medio.

**NLS**: Señal de localización nuclear.

**OD**: Dominio de oligomerización C-termina

**P**: Posterior

**piRNAs**: RNAs interactuantes con piwi

**PGM**: fosfoglucomutasa

**PM**: membrana peripodial de los discos imaginales de ala de la larva de *Drosophila melanogaster*.

**PQ**: Paraquat

**pre-miRNA**: precursor del micro RNA maduro

**pri-miRNA**: transcrito primario del micro RNA

**RNApol**: Polimerasa de Ácido Ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** : Ácido Ribonucleico mensajero

**RNA<sub>r</sub>**: Ácido Ribonucleico ribosomal.

**RNA<sub>t</sub>**: Ácido Ribonucleico de transferencia

**ROS**: especies reactivas del oxígeno.

**SASP:** fenotipo secretor asociado a la senescencia.

**siRNAs:** RNAs interferentes cortos

**TAD:** Dominio de transactivación N-terminal

**TAGs:** Triacilglicéridos.

**TF:** Factor de transcripción.

**TOR:** Target u objetivo de Rapamicina

**UTR** (Untranslated Region): Región del ARNm que no codifica proteínas, pero regula su traducción, estabilidad y localización.

**UV:** Rayos ultravioletas

**V:** Ventral

**Resumenes**

## 2. Resúmenes.

### 2.1 Resumen.

Myc es un factor de transcripción conservado que regula el crecimiento celular, la proliferación y la apoptosis. En esta tesis, estudiamos el papel de dMyc en la biogénesis de miRNAs en *Drosophila melanogaster*, demostrando que actúa como un regulador clave de su expresión y procesamiento. Análisis de ChIP-Seq revelaron que dMyc se une al 56 % de los genes de miRNAs y modula la expresión de *Drosha* y *Ago-1*. En particular, la expresión de *miR-305* dependiente de dMyc regula los niveles de Dmp53 en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, influyendo en la adaptación al estrés nutricional. La depleción de dMyc en el cuerpo graso prolonga la supervivencia en condiciones de privación de nutrientes, efecto que se revierte con la sobreexpresión de *miR-305* o una versión dominante negativa de Dmp53.

Por otro lado, en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*, Dmp53 desempeña un papel esencial en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células madre intestinales (ISCs). Su deficiencia provoca un aumento en el número de ISCs y una reducción en el tamaño del intestino, afectando la diferenciación celular tanto en condiciones de homeostasis como bajo estrés oxidativo y nutricional. Además, la combinación de la pérdida de Dmp53 con la expresión de RasV12 induce hiperproliferación, sugiriendo un modelo potencial para estudiar el impacto de mutaciones en *p53* en el cáncer colorrectal.

En conjunto, estos hallazgos destacan la relevancia de dMyc y Dmp53 en la regulación de la adaptación metabólica, la respuesta a estrés y la regeneración intestinal, proporcionando nuevas perspectivas sobre la interacción entre la biogénesis de miRNAs, la señalización de *p53* y la homeostasis.

## 2.2 Abstract.

Myc is a conserved transcription factor that regulates cell growth, proliferation, and apoptosis. In this thesis, we demonstrate that in *Drosophila melanogaster*, dMyc is a key regulator of miRNA biogenesis, modulating both their expression and processing. CHIP-Seq analyses revealed that dMyc binds to 56% of annotated miRNA genes and controls the expression of *Drosha* and *Ago-1*. Notably, dMyc-dependent *miR-305* expression modulates Dmp53 levels in a nutrient-dependent manner, influencing the adaptive response to nutritional stress. dMyc depletion in the fat body extends survival under nutrient deprivation, an effect reversed by *miR-305* overexpression or the expression of a dominant-negative form of Dmp53.

In the midgut of *Drosophila melanogaster*, Dmp53 plays a fundamental role in regulating the proliferation and differentiation of intestinal stem cells (ISCs). Its deficiency leads to an increased number of ISCs and a reduction in intestinal size. Consequently, reduced *Dmp53* levels impair cellular differentiation under both homeostatic conditions and stress-induced scenarios, including oxidative and nutritional challenges. Moreover, the combined loss of *Dmp53* and the expression of oncogenic *RasV12* drive excessive ISC proliferation, suggesting a potential model for investigating *p53* mutations in colorectal cancer.

These findings underscore the critical roles of dMyc and *Dmp53* in miRNA biogenesis, metabolic adaptation, and intestinal homeostasis, providing insights into their broader implications in stem cell regulation and tumorigenesis.

# Introducción

### 3. Introducción.

#### 3.1 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo.

A lo largo de la historia, el uso de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo ha impulsado grandes avances en el campo de las ciencias biológicas. *Drosophila melanogaster* se ha utilizado clásicamente para el estudio de la biología celular desde que T.H. Morgan descubriera el gen *white* en la mosca de la fruta hace más de 100 años (Green et al., 2010); sin embargo, en las últimas décadas, *Drosophila melanogaster* ha emergido como un sistema poderoso, especialmente después de que en 2000 se completara su secuenciación genómica (Adams et al., 2000). Desde entonces, se ha utilizado para estudiar áreas como genética, herencia y biología del desarrollo. Además, la anatomía de esta mosca presenta importantes similitudes con la de mamíferos, como un cerebro con miles de neuronas y circuitos discretos, sistema nervioso, corazón, intestino, sistema reproductivo, tejido graso, ojos, extremidades, y sistema inmune innato. Por estas razones, hoy en día se emplea en una amplia variedad de campos de investigación animal, como envejecimiento, modelado de enfermedades humanas como Alzheimer, Parkinson y cáncer, e incluso para comprender procesos biológicos complejos como los ritmos circadianos, el aprendizaje, la memoria y comportamientos como la agresión, fisiología y metabolismo (Cassim et al., 2018; Padmanabha y Baker, 2014).

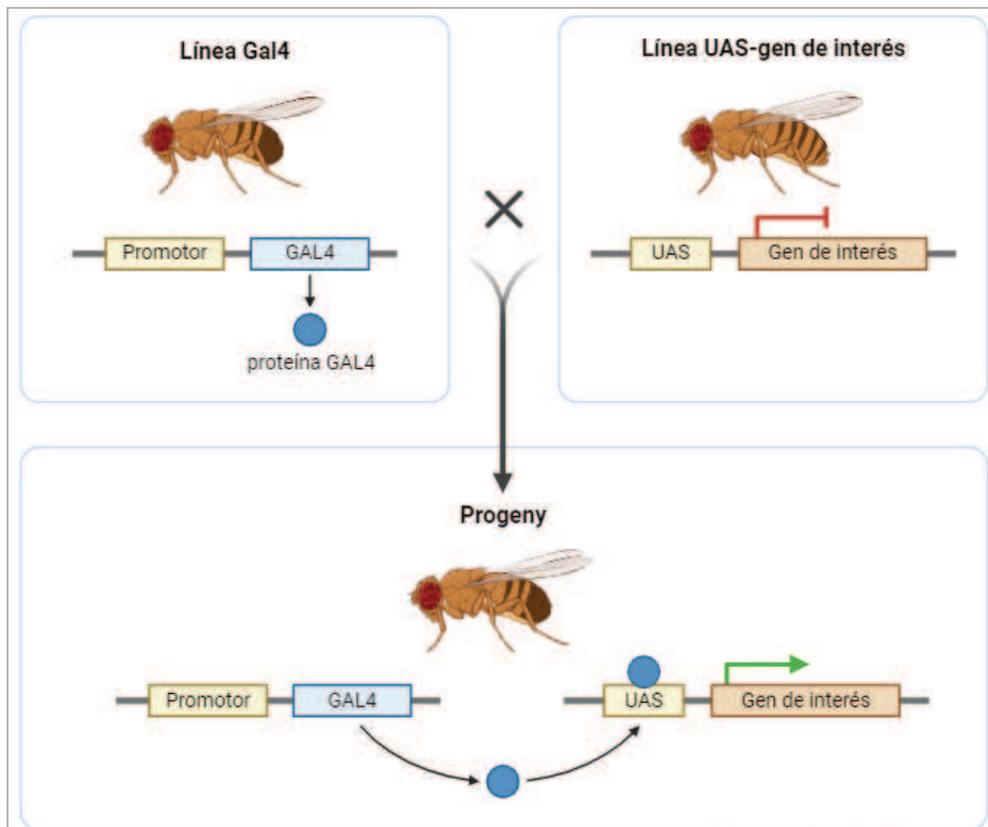
Como organismo modelo, *Drosophila melanogaster* ofrece muchas ventajas, entre ellas que posee un genoma pequeño y baja redundancia génica (cuenta con 4 pares de cromosomas: tres autosomas y los cromosomas sexuales). Además, resulta de interés que el genoma de esta especie contiene genes homólogos para casi el 65 % de los genes relacionados a enfermedades humanas (Chien et al., 2002; Ugur et al., 2016), y el 48 % de las secuencias proteicas presentes en él tienen homólogos en mamíferos (Yamamoto et al., 2014). De hecho, una cantidad significativa de genes relacionados a enfermedades humanas asociadas a tejidos específicos se expresan en tejidos análogos a *Drosophila melanogaster* (Chintapalli et al., 2007). En cuanto a las ventajas técnicas, este organismo presenta altas tasas de fecundidad y un corto tiempo de generación, alrededor de 10 días a 25°C en condiciones de laboratorio. Todos estos aspectos hacen que la mosca de la fruta sea un sistema modelo ampliamente utilizado.

El kit de herramientas genéticas disponibles para este organismo incluye una gran variedad de líneas mutantes, sobrexpresantes, sistemas de expresión tejido específico como el

GAL4/UAS, colecciones de líneas reporteras y “enhancer trap”, cromosomas balanceadores, sistemas inducibles, RNAs de interferencia, mosaicos genéticos, y combinaciones de todos ellos.

Entre las herramientas genéticas que se utilizarán en este trabajo se encuentran:

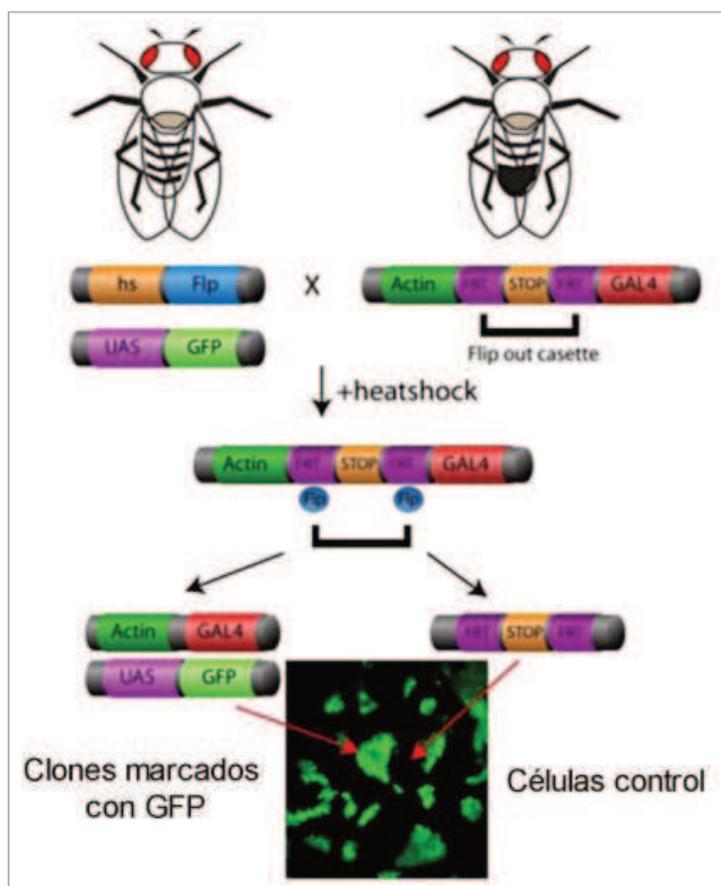
(1) El sistema Gal4/UAS, el cual emplea el factor de transcripción GAL4, derivado de levaduras, para regular la expresión génica. Este sistema se encuentra constituido, en su versión básica, por dos componentes. En primer lugar, consta de un promotor tejido-específico fusionado a la proteína GAL4, capaz de unir secuencias de activación UAS (*Upstream activation sequence*). En segundo lugar, una secuencia UAS fusionada corriente arriba de la construcción a expresar. Mediante la combinación de estos dos elementos, la construcción objetivo se expresará sólo en aquellos tejidos donde el factor de transcripción GAL4 esté activo, lo cual está determinado por los distintos promotores tejido-específicos (Brand et al., 1994) (Figura 1). La ventaja de tener estos dos elementos desacoplados en líneas de moscas independientes es que la misma línea de *Drosophila melanogaster* puede ser utilizada para dirigir la expresión de un transgen en distintos tejidos mediante el mero cruce entre líneas ya existentes. Un tercer elemento clave en la utilización de este sistema es la proteína inhibidora GAL80. El efecto inhibitorio de la expresión de GAL80 se basa en su capacidad de unir la proteína GAL4 e inhibir su unión al sitio UAS, evitando así la expresión del transgen. Existen varias modalidades para su incorporación, entre ellas la expresión de una versión termosensible (GAL80<sup>ts</sup>) que permite un control temporal de la actividad de la proteína GAL4. A bajas temperaturas (18-20°C), GAL80<sup>ts</sup> inhibe a GAL4, lo que impide su capacidad para activar los genes controlados por UAS. En cambio, a altas temperaturas (29-30°C), GAL80<sup>ts</sup> se inactiva por el calor, liberando a GAL4, lo que permite que esta proteína se una a UAS y active la transcripción del gen objetivo (Suster et al., 2004).



**Figura 1. Sistema GAL4 en *Drosophila melanogaster*.** Esquema del sistema GAL4-UAS en *Drosophila melanogaster*. El cruce entre una mosca portadora del factor de transcripción GAL4 y una mosca portadora del transgén UAS con el gen de interés resulta en la expresión del gen bajo el control de GAL4 en la progenie (Adaptado de Southall et al., 2008).

(2) Mosaicos genéticos, que se generan con el sistema FLP/FRT. Por “mosaico genético” se entiende la generación de tejidos portando células de distinto genotipo, originalmente una solución para el estudio de genes con índices elevados de letalidad (Germani et al., 2018). Uno de los principales sistemas disponibles en *Drosophila melanogaster* para la generación de mosaicos genéticos es el sistema FLP (flipasa recombinasa)/FRT (FLP: target de recombinación) (Golic y Lindquist, 1989). Esta herramienta consta de la expresión de una flipasa (Flp), una recombinasa con actividad de topoisomerasa 1B, que provoca la recombinación mitótica entre sitios FRT ubicados en trans en cromosomas homólogos. Una versión modificada de este sistema es la denominada Flp-out donde varios sitios FRT se encuentran, esta vez en cis, a ambos lados de una señal transcripcional de Stop (conformando una secuencia denominada flip-out cassette, Figura 2). En el extremo 5' de esa secuencia se encuentra un promotor constitutivo mientras que en el extremo 3' la secuencia del transgen a

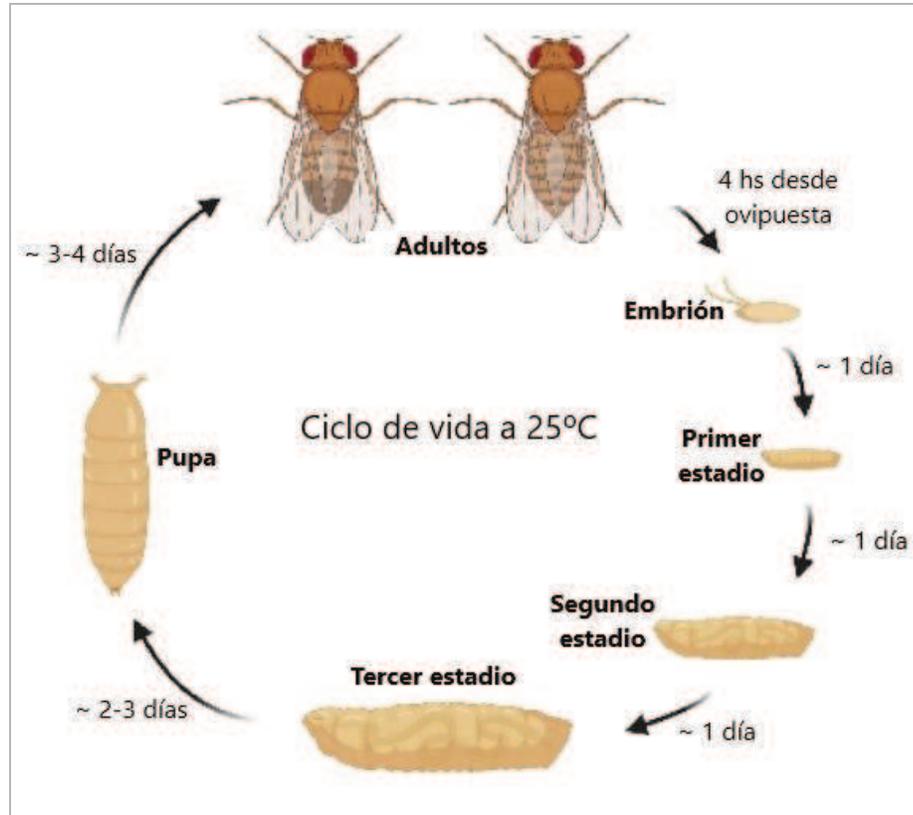
expresar (Figura 2). Cuando la flipasa media la recombinación sitio específica entre los sitios FRT, la señal de Stop se escinde (de aquí el término flip-out) y la secuencia ubicada en el extremo 3' puede ser transcripta bajo la acción del promotor constitutivo (Germani et al., 2018; Griffin et al., 2014). En el caso particular de este trabajo se utilizará el sistema hsFlp, Actin<GAL4. Este sistema involucra una flipasa inducible por calor y el promotor constitutivo de actina, el cual dirige la expresión de la proteína GAL4. A su vez, estos mismos individuos portan una secuencia UAS-RFP que resulta en la marcación por fluorescencia de aquellas células donde ocurrió el evento flip-out y se expresa la proteína GAL4 (denominados clones). De esta manera, al cruzar individuos hsFlp, Actin<GAL4 con individuos portando la secuencia UAS dirigiendo un transgen de interés, éste sólo se expresará en aquellas células o clones de células que coexpresan el marcador de fluorescencia correspondiente.



**Figura 2. Sistema FLP/FRT en *Drosophila melanogaster*.** Un choque de calor (Heat shock) induce la expresión de la flipasa (FLP) y la recombinación mediada por ésta remueve la señal de Stop (señal terminadora de la transcripción) de la construcción. El promotor de actina dirigirá la expresión de la proteína GAL4 quien, a su vez, regula la de los elementos UAS (Adaptado de Amanda Lee et al., 2012).

### 3.2 Ciclo de vida y tejidos de *Drosophila melanogaster*.

En términos generales, el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* dura aproximadamente 10 días bajo condiciones controladas de alimentación, temperatura y humedad (25°C, 60 % de humedad). Éste, a su vez, se encuentra dividido en estadios bien definidos (Figura 3). En el estadio de embrión se establecen los ejes de simetría, seguido de la celularización y segmentación y se producen otros complejos eventos morfogénicos que derivan últimamente en el traspaso al estadio de larva. La larva, además de los tejidos y órganos involucrados en su propio crecimiento y desarrollo, posee tejidos, denominados imagales o imaginales, que son los que darán origen a los órganos del adulto (o imago). Antes de llegar a esta etapa, *Drosophila melanogaster* atraviesa tres estadios larvarios (L1, L2 y L3) separados por ecdisis o mudas de cutícula permitiendo así el crecimiento continuo del animal antes de la metamorfosis. Al final del tercer estadio larvario (L3) las larvas entran en pupariación, una transición que marca el comienzo de la metamorfosis e inicia una fase de intensa remodelación y cambios en la estructura corporal. Dentro de la pupa se conforma un exoesqueleto rígido que limita el desarrollo de cualquier estructura futura en las dimensiones del mismo. Como consecuencia, el crecimiento corporal es restringido al periodo de alimentación durante los estadios larvarios, y la transición de larva a pupa determina el tamaño del futuro adulto. Una vez finalizada la metamorfosis, el estadio de pupa finaliza y se produce la eclosión del adulto. Luego de aproximadamente 8 horas (hs) desde su eclosión, los adultos son sexualmente receptivos para dar un nuevo comienzo al ciclo.



**Figura 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Esquemas de moscas adultas, macho y hembra, y su ciclo de vida a 25°C. Luego del transcurso de un día, el embrión pasa al primer estadio de larva, seguido del segundo y tercer estadio larvario, ambos con duración de un día. Seguido del estadio larvario, durante 3 días se atraviesa el estadio de pupa donde ocurre el proceso de metamorfosis. Finalmente, luego de 4 días, se produce la eclosión del adulto (Adaptado de Hailstock et al., 2023).

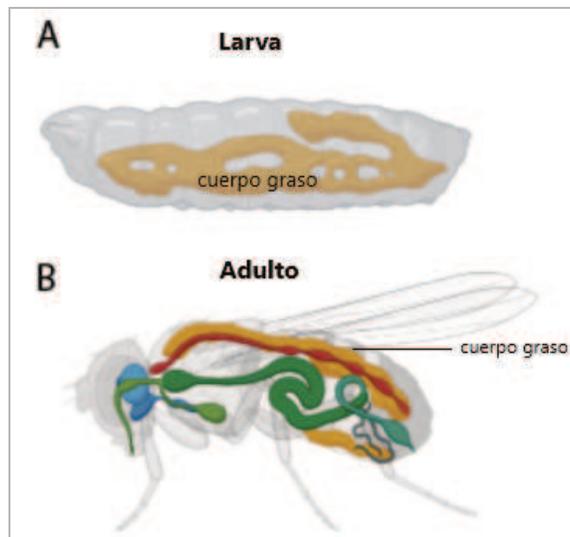
En esta tesis, hemos trabajado con tres tejidos principales. Durante la primera parte, utilizamos el cuerpo graso de *Drosophila melanogaster*, un análogo funcional de los tejidos adiposo y hepático de los vertebrados (Padmanabha & Baker, 2014) para estudiar el papel de el factor de transcripción dMyc y los miRNAs en la respuesta al estrés nutricional. También analizamos la regulación de la biogénesis y la actividad de miRNAs por dMyc en el primordio o disco imaginal de ala. Por último, investigamos la función de Dmp53 en las células madre intestinales del intestino medio de *Drosophila melanogaster*.

### 3.2.1 Cuerpo graso o fat body.

El cuerpo graso (Fat Body, FB) de *Drosophila melanogaster* es un órgano metabólico que juega un papel esencial en el almacenamiento y la utilización de energía, siendo el depósito central de los nutrientes (Padmanabha & Baker, 2014).

En el estadio larvario, el FB se extiende como una monocapa de células, denominadas adipocitos, formando, a cada lado de la larva, una hoja longitudinal expuesta a la hemolinfa (sistema circulatorio interno en invertebrados y análogo a la sangre de vertebrados), rodeando el intestino y órganos reproductivos (Figura 4). Al final del desarrollo larvario, el FB sufre un proceso de remodelación acompañado de autofagia masiva que da inicio a la transición al estadio de pupa. El FB larvario entonces decrece gradualmente durante la metamorfosis y los primeros 3 días luego de la eclosión del adulto, donde sus células son reemplazadas por células del FB adulto (Parra-Peralbo et al., 2021). Bajo condiciones óptimas de alimentación, el FB puede crecer ya sea aumentando el número de células o aumentando el tamaño celular. A diferencia del tejido adiposo del adulto y del ser humano, los adipocitos que componen el FB larvario poseen la característica de ser endoreplicativos. Esta característica les confiere la capacidad de aumentar en gran medida el tamaño de la célula a partir de sucesivas rondas de duplicación génica en ausencia de división celular, permitiendo así un alto crecimiento del tejido en ausencia de células madre (Li et al., 2019).

De forma similar al tejido adiposo blanco en humanos, el crecimiento del FB se encuentra relacionado a su rol en el almacenamiento y la utilización de reservas energéticas. Frente a la falta de nutrientes, los lípidos (principalmente triacilglicéridos o TAGs) junto a reservas en forma de glucógeno, son movilizados hacia la circulación en forma de ácidos grasos libres y trehalosa, respectivamente (Arrese y Soulages, 2010). Además de su papel en el manejo de reservas energéticas, el FB actúa como un sensor directo de nutrientes, capaz de coordinar el metabolismo y el gasto energético según las condiciones nutricionales del organismo (Colombani et al., 2003). En respuesta al sensado directo de nutrientes y/o señales provenientes de otros tejidos, el FB es capaz de regular el metabolismo energético a nivel local y sistémico mediante la producción y secreción de adipoquinas (Colombani et al., 2003; Géminard et al., 2009).

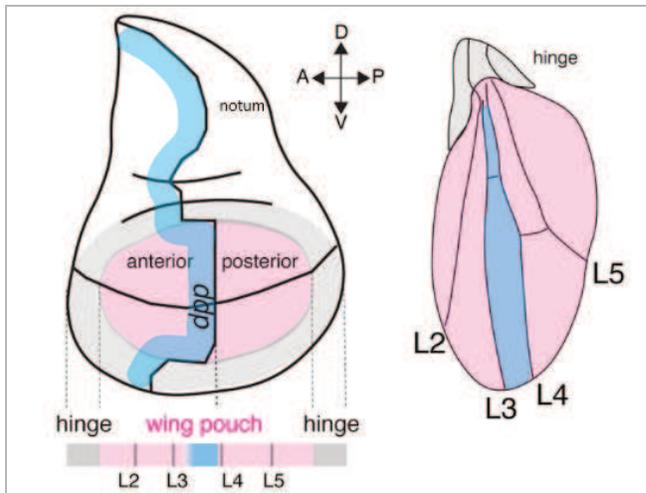


**Figura 4. Cuerpo graso de *Drosophila melanogaster*.** (A) Mosca en estado larvario, se observa resaltado el cuerpo graso, un tejido clave para el almacenamiento de energía y la regulación metabólica. (B) Mosca adulta que presenta el cuerpo graso (amarillo), esencial para la homeostasis energética.

### 3.2.2 Discos imaginales de ala.

Los discos imaginales son invaginaciones de la epidermis larval que forman una vesícula recubierta por una membrana basal. Estos discos crecen formando estructuras plegadas, mientras que el lado opuesto queda cubierto por la membrana peripodial. Los discos imaginales contienen células indiferenciadas pero determinadas, que proliferan hasta el estadio de pupa (Beira et al., 2016).

El disco imaginal de ala comienza con 40-50 células que experimentan aproximadamente 9 rondas de división celular durante los estadios larvarios, hasta alcanzar unas 50,000 células (Wang et al., 2020). Este tejido epitelial tiene una organización apico-basal y está compuesto por una capa de células columnares, con otros tipos celulares, como mioblastos y tráquea, situados externamente. El primordio del ala se subdivide en cuatro compartimentos que no se mezclan entre sí, delimitando fronteras celulares. Los compartimentos anterior y posterior se especifican durante la formación inicial del disco, mientras que los compartimentos dorsal y ventral se definen en el segundo estadio larvario (Wang et al., 2020). Además, durante el desarrollo, se establece el eje próximo-distal y tres regiones distintivas que darán lugar a diferentes estructuras en el adulto: el tórax (notum), la bisagra (hinge) y el ala (wing pouch) (Figura 5).



**Figura 5. Discos imaginales de ala *Drosophila melanogaster*.** Disco imaginal de ala presente en la larva, precursor del ala adulta, con las regiones dorsal, ventral, anterior y posterior claramente delineadas. Además se ven en el ala adulta (derecha) las regiones L2,L3, L4 Y L5 que son generadas a partir de los discos imaginales de ala. (Adaptado de Matsuda et al., 2021).

### 3.2.3 Intestino adulto.

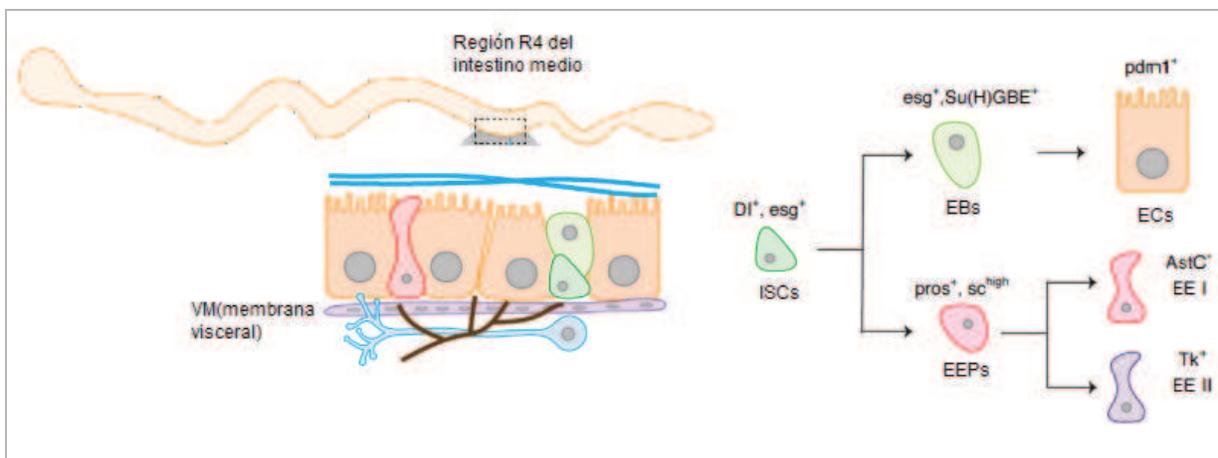
El intestino medio de *Drosophila melanogaster* se ha consolidado como un modelo idóneo para el estudio de células madre, homeostasis de tejidos y envejecimiento (Jiang et al., 2012; Ohlstein et al., 2005). Una de sus características más relevantes es su capacidad de renovación constante, un proceso regulado que permite reemplazar células viejas o dañadas mediante la proliferación y diferenciación de células madre (Jin et al., 2017). Esta renovación ocurre aproximadamente cada 1-2 semanas, aunque la tasa puede variar según la edad, la dieta o daños inducidos en el tejido (Losick et al., 2011). Este proceso es controlado por una red de señalización molecular que responde a las demandas fisiológicas del tejido, manteniendo el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de células madre intestinales. Entre las vías de señalización involucradas, se destacan las vías de Notch, wnt/wingless, JAK/STAT, JNK, etc (Jiang et al., 2009; Xu et al., 2011).

El intestino adulto de *Drosophila melanogaster* comparte similitudes estructurales y funcionales con los intestinos de mamíferos, lo que lo hace especialmente relevante para estudiar la homeostasis y regeneración del epitelio intestinal (Casali et al., 2009; Lucchetta y Ohlstein, 2012). En el intestino medio de *Drosophila melanogaster* se identifican varios tipos celulares: células madre intestinales (*Intestinal Stem Cells*, ISCs), enteroblastos (EBs), enterocitos (EC) y células enteroendocrinas (EE).

Las ISCs son cruciales para la regeneración continua del epitelio intestinal, garantizando un suministro constante de células nuevas. Su división asimétrica da lugar a una nueva ISC, que preserva su potencial de autorrenovación, y a un EB (Jiang et al., 2012; Micchelli et al., 2005, Ohlstein et al., 2007). Los EBs son células progenitoras que, aunque aún no están diferenciadas, tienen el potencial de transformarse en EC y EE. La diferenciación de los EBs es esencial para mantener la funcionalidad del intestino. Los EC, encargados de la absorción de nutrientes, constituyen la mayor parte del epitelio intestinal y se destacan por su extensa superficie cubierta de microvellosidades, lo que les permite absorber de manera eficiente los nutrientes del alimento digerido. Las EE, por su parte, secretan hormonas que regulan diversas funciones digestivas y metabólicas, jugando un papel crucial en la comunicación entre el intestino y otros órganos para coordinar la digestión y absorción de nutrientes (Jiang et al., 2012; Micchelli et al., 2005, Ohlstein et al., 2007).

La determinación del destino celular entre las dos células hijas después de la división de la ISC requiere Delta y Notch (Micchelli y Perrimon, 2006; Ohlstein et al., 2007). Inmediatamente después de la división de la ISC, el nivel más alto de Delta se retiene en la célula que permanece como ISC. El EB vecino recién formado rápidamente pierde Delta. Este nivel asimétrico de Delta provoca la estimulación de la vía de señalización Notch en el nuevo EB. Dependiendo del nivel de Delta en la ISC, la estimulación de Notch en el EB puede dirigir la diferenciación hacia la línea celular de los EC o EE (Ohlstein et al., 2007).

Los diferentes linajes celulares del intestino de *Drosophila melanogaster* se identifican a modo técnico mediante marcadores específicos. En el marco de esta tesis hemos utilizado para dirigir la expresión de genes: escargot (esg)-GAL4 para células progenitoras (ISC y EB), Delta-GAL4 para ISCs, y para marcar linajes celulares: anticuerpos anti-delta (DI) para ISCs; y anticuerpos anti-Prospero para células EE y EBs destinados a EEs (Figura 6).



**Figura 6. Intestino medio adulto de *Drosophila melanogaster* y sus tipos celulares.** La composición celular general del tracto intestinal consiste en una monocapa de células epiteliales en estrecho contacto con el músculo visceral, neuronas y tráquea. Las ISCs proliferan y se diferencian en enteroblastos o progenitores enteroendocrinos, que posteriormente se diferencian terminalmente en enterocitos o células enteroendocrinas, respectivamente. Las EEs se desarrollan en subtipos específicos dependiendo de la expresión combinatoria de factores de transcripción. (Adaptado de Hung et al., 2021)

### 3.3 El Factor de Transcripción Myc.

Myc es un factor de transcripción altamente conservado, perteneciente a la familia de proteínas con dominio de hélice-lazo-hélice-cremallera de leucina (bHLH-Zip), que regula la expresión de aproximadamente el 10-15 % de los genes en humanos. (Eilers et al., 2008). Este factor de transcripción ha sido reconocido durante mucho tiempo como un regulador clave del crecimiento, la proliferación y el metabolismo celular; y su desregulación se ha asociado con el cáncer humano (Balupuri et al., 2020; Dang et al., 2006). Las proteínas Myc están formadas por varios dominios funcionales claves. En su extremo N-terminal, se encuentra un dominio regulador de la transcripción que contiene dos regiones altamente conservadas llamadas "cajas Myc" 1 y 2 (MB1 y MB2). Además, poseen una región central menos definida que incluye otra secuencia conservada conocida como caja Myc 3 (MB3). En el extremo C-terminal, se encuentra un dominio con una región básica-hélice-lazo-hélice-cremallera de leucina (bHLH-Zip), que permite a Myc formar heterodímeros con otra proteína bHLH-Zip, llamada MAX, y unirse al DNA. Los heterodímeros Myc reconocen secuencias específicas de DNA conocidas como E-boxes (CACGTG y variantes), lo que activa la expresión de genes cercanos. (Balupuri et al., 2020; Blackwell et al., 1993).

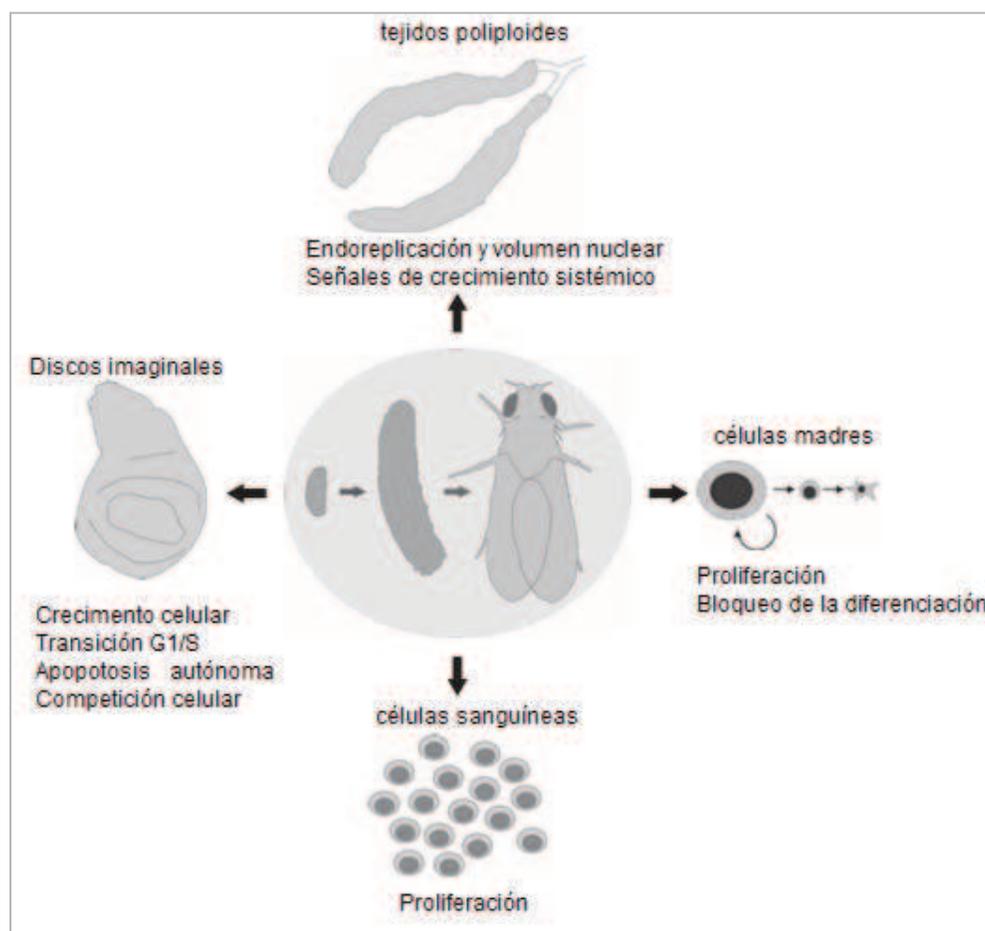
En *Drosophila melanogaster*, existe un único gen que codifica el factor de transcripción dMyc. Al igual que sus homólogos vertebrados, dMyc codifica un factor de transcripción que actúa como un regulador central del crecimiento y/o la proliferación de diversos tipos de células, como las células del disco imaginal, las células poliploides, las células madre y las células sanguíneas (Eilers et al., 2008; Gallant et al., 2013; Gallant et al., 1996) (Figura 7). *Drosophila melanogaster* fue la primera especie en la que se describió un gen Myc, aunque no bajo este nombre. En 1935, Calvin Bridges aisló una mutación en la mosca que resultaba en un tamaño corporal reducido en los adultos, cerdas desproporcionadamente pequeñas y esterilidad femenina, a la cual denominó “diminuta” (Bridges et al., 1935). Más tarde se demostró que esta mutación correspondía a una mutación hipomórfica del gen Myc en *Drosophila melanogaster* (Gallant et al., 1996; Schreiber-Agus et al., 1997).

La función más evidente de dMyc es el control del tamaño del organismo. Cuando dMyc se sobreexpresa de forma ubicua pero moderada, las moscas alcanzan un tamaño mayor que los adultos normales (De la Cova et al., 2014). Por el contrario, las mutaciones hipomórficas de dMyc reducen la tasa de crecimiento larvario, prolongan la duración del desarrollo y dan lugar a moscas adultas pequeñas (Gallant et al., 1996; Johnston et al., 1999; Schreiber-Agus et al., 1997). La eliminación completa de la actividad de dMyc (en una mutación nula) bloquea el crecimiento larvario, de modo que los animales mueren en etapas tempranas de desarrollo (Pierce et al., 2004). Este efecto sobre el tamaño general del organismo puede explicarse por la capacidad de dMyc para promover el crecimiento en varios tejidos, estimulando la biogénesis de los ribosomas y la traducción de proteínas (Grewal et al., 2005).

La sobreexpresión de dMyc en células imaginales promueve un notable crecimiento celular, aumentando el tamaño celular y acelerando la fase G1 sin incrementar la división celular. Las mutaciones hipomórficas reducen el crecimiento y el tamaño celular, sin afectar la proliferación a menos que los niveles de dMyc sean drásticamente bajos (Hulf et al., 2005; Johnston et al., 1999). Por otro lado, el daño a los discos imaginales desencadena un crecimiento regenerativo que depende de niveles elevados de dMyc. Además, cuando las células mutantes de dMyc tienen de vecinas a células de tipo salvaje en los discos imaginales, las células mutantes de crecimiento más lento, son eliminadas mediante competencia celular, un proceso que optimiza la aptitud eliminando células defectuosas (De la Cova et al., 2014; Johnston et al., 1999; Moreno et al., 2004).

En tejidos larvarios que endorrepligan sus genomas, dMyc incrementa el contenido de ADN y el volumen nuclear. En tejidos derivados de células precursoras, sus niveles altos permiten la proliferación, pero su sobreexpresión impide la diferenciación, afectando la regeneración intestinal tras daño si se agota (Betschinger et al., 2006; Jin et al., 2008; Neumuller et al., 2008; Rhiner et al., 2009).

En conjunto, estas observaciones sugieren que dMyc controla el crecimiento celular, la proliferación, la muerte y la diferenciación en muchos tejidos.



**Figura 7. Funciones de dMyc en *Drosophila melanogaster*.** dMyc controla la biogénesis de los ribosomas y la síntesis de proteínas y, como consecuencia, el crecimiento. Según el tipo de tejido, la actividad de dMyc afecta principalmente la cantidad de células, el tamaño de las células o el destino de las células (Adaptado de Gallant et al., 2013).

### 3.3.1 Myc como factor de transcripción.

La versatilidad de Myc radica en su función como factor de transcripción, regulando la expresión de cientos, e incluso miles, de genes diana. Sin embargo, cada uno de estos genes suele estar moderadamente afectado, generalmente en un rango de dos a tres veces. Debido a su papel en el crecimiento celular, Myc es considerado un protooncogén, y su desregulación es un factor crucial en la génesis de neoplasias malignas humanas. (Gallant et al., 2013).

En *Drosophila melanogaster* el grupo más destacado de genes dianas que regula dMyc está involucrado en la biogénesis de los ribosomas (Li et al., 2010; Teleman et al., 2008). Además, dMyc también estimula la transcripción dependiente de la RNA polimerasa I y la RNA polimerasa III del RNA ribosómico y de los RNA pequeños no codificantes (por ejemplo, RNAt y RNAr 5S). dMyc también controla la expresión de varios reguladores del ciclo celular. Así, se ha propuesto que dE2F1, RBF, Stg/Cdc25, varias ciclinas y Cdks están controladas transcripcionalmente por dMyc (Duman-Scheel et al., 2004; Hulf et al., 2005; Orian et al., 2003) y la ciclina E a nivel postranscripcional (Prober et al., 2000).

Por otro lado, se ha identificado a dMyc como un factor de transcripción importante en respuesta al estrés nutricional. Se ha descrito que dMyc actúa corriente abajo de la quinasa TOR (*Target of Rapamycin*), un regulador central del crecimiento celular que integra señales de nutrientes, energía y factores de crecimiento. dMyc, el regulador de la biogénesis ribosomal, es esencial para el crecimiento de los tejidos impulsado por la vía TOR, pero no es suficiente para impulsar el crecimiento en ausencia de actividad TOR en condiciones de estrés nutricional. Estudios recientes sugieren que la función de dMyc en este contexto no se limita únicamente a la regulación de la transcripción de genes ribosomales, sino que también abarca la regulación de genes involucrados en el metabolismo celular y la síntesis de ácidos nucleicos (Teleman et al., 2008).

Finalmente, evidencias emergentes han demostrado que dMyc también es capaz de regular la expresión de RNA no codificantes, entre ellos miRNAs (Dang et al., 2006, Deng et al., 2014, He et al., 2005, Herter et al., 2015). En células humanas se ha comprobado que Myc activa la expresión del grupo miR-17-92, un conjunto protumoral de seis miRNAs (He et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). La expresión del grupo miR-17-92 se observa frecuentemente en tumores, promueve la proliferación en líneas celulares y acelera la tumorigénesis en modelos de ratón de linfoma y cáncer de colon inducido por Myc (He et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que Myc reprime un gran conjunto de miRNAs en modelos

humanos y de ratón de linfoma de células B (Chang et al., 2007). Curiosamente, la expresión de los miRNAs reprimidos por Myc afecta notablemente el crecimiento de las células de linfoma in vivo (Chang et al., 2007). También se ha comprobado que Myc modula el procesamiento de miRNAs a través de la regulación transcripcional de Drosha en la línea de células B humanas P493-6 (Wang et al., 2013). A pesar de que aún no se comprende completamente, estas observaciones apuntan a Myc como un regulador clave en la biogénesis de miRNAs y sugieren que la activación y/o represión de miRNAs específicos dependientes de Myc es un componente fundamental del programa tumorigénico de Myc. Al igual que su homólogo humano, dMyc también desempeña un papel esencial en el control del crecimiento y la proliferación celular a través de la regulación transcripcional de un gran número de genes diana (Bellosta et al., 2010). Aunque se ha demostrado que dMyc regula la expresión de miRNAs específicos (Daneshvar et al., 2013; Li et al., 2020), el papel exacto de dMyc en la regulación de la expresión y/o el procesamiento de miRNA sigue siendo en gran medida desconocido.

### 3.4 RNAs pequeños.

La regulación post-transcripcional de la expresión génica ha ganado relevancia en los últimos años. Los RNAs pequeños juegan un papel crucial en la regulación génica en varios organismos, y se dividen en tres clases principales: microRNAs (miRNAs), RNAs interferentes cortos (siRNAs) y RNAs interactuantes con piwi (piRNAs). Los piRNAs se diferencian en que son exclusivos de animales, predominan en la línea germinal, se originan de precursores de RNA cadena sencilla y se asocian con proteínas Piwi, en contraste con los miRNAs y siRNAs que se unen a proteínas Argonauta (Ago) (Ishizu et al., 2012; Malone et al., 2009). Los siRNAs, generalmente exógenos, provienen de virus, transposones o transgenes, se procesan a partir de precursores de RNA de doble cadena largos y se cargan en proteínas Argonauta 2 (Ago-2) formando un dúplex perfecto con sus objetivos en un solo sitio (Carthew et al., 2009; Gomes et al., 2013; Tomari et al., 2005).

Por otro lado, los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA no codificante de un largo ~20-23 nucleótidos. Son generados por productos endógenos derivados del genoma del propio organismo, de cadena sencilla, presentes en plantas, animales y algunos virus, involucradas en el control post-transcripcional de la expresión génica. Los miRNAs se unen a sus objetivos por complementariedad imperfecta en múltiples sitios (Carthew et al., 2009; Gomes et al., 2013; Tomari et al., 2005).

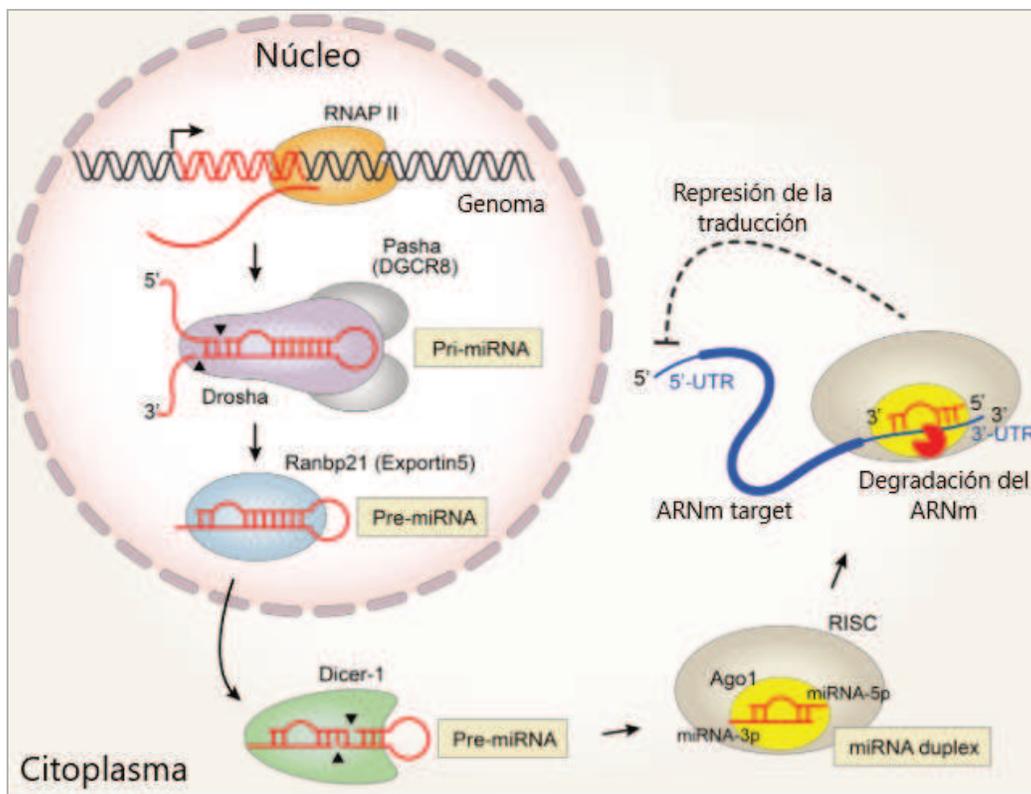
### 3.4.1 Biogénesis de miRNAs.

En invertebrados, la generación de miRNAs sigue un proceso similar al de los mamíferos, comenzando en el núcleo y finalizando en el citoplasma, con cuatro etapas principales: transcripción, corte, exportación nuclear y procesamiento. Finalmente, el miRNA maduro se carga en el complejo de silenciamiento inducido por miRNAs (miRISC) para regular la expresión del gen objetivo (Kim et al., 2009) (Figura 8).

La biogénesis inicia con la producción del pri-miRNA (transcrito primario de miRNA), que puede medir varios miles de nucleótidos y es mayormente transcrito por la RNA polimerasa II, aunque algunos miRNAs asociados a secuencias repetitivas son transcritos por la RNA polimerasa III (Borchert et al., 2006; Lee et al., 2004). Los miRNAs pueden derivar de regiones intergénicas o intragénicas y surgir de transcritos monocistrónicos, bicistrónicos o policistrónicos (Lee et al., 2002).

En el núcleo, el pri-miRNA se corta por el complejo Microprocesador para formar un pre-miRNA de ~70 nt. En *Drosophila melanogaster*, el complejo Microprocesador de ~500 kDa está formado por una enzima de tipo RNasa III, Drosha, y su cofactor de unión al ARN de cadena doble, Pasha. (Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003). Posteriormente, el pre-miRNA es exportado al citoplasma por Exportin-5 (Lund et al., 2004), donde la enzima Dicer-1 (Dcr-1) lo procesa para formar un dúplex miRNA-miRNA\* de ~22 nt, en un proceso que requiere la proteína Loquacious (Saito et al., 2005). Este dúplex se incorpora al miRISC, con Ago-1 (Argonauto-1) como componente central (Okamura et al., 2009; Okamura et al., 2004; Yang y Lai, 2011).

Es importante destacar que, aunque la mayoría de los miRNAs en animales se generan a través de la vía canónica de biogénesis impulsada por las enzimas Dcr-1 y Drosha (Carthew y Sontheimer, 2009; Kim et al., 2009; Ruby et al., 2007), también se han estudiado una variedad de mecanismos alternativos que generan miRNAs funcionales (Kim et al., 2009; Tétreault y De Guire, 2013; Yang y Lai, 2011).



**Figura 8 . Vía canónica de biogénesis de miRNAs.** Brevemente, los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II para generar los transcritos primarios o pri-miRNAs en el núcleo, donde el complejo Microprocesador formado por Drosha/Pasha los procesa para generar el pre-miRNA, el cual es exportado al citoplasma Exportina-5, donde Dcr-1 realizará un segundo corte para producir el dúplex de miRNA. Luego, en *Drosophila melanogaster*, Dcr-1/Argonaute 1/Loquacious formarán el miRISC y una hebra del dúplex permanecerá en la proteína Ago-1 como miRNA maduro. De esta manera, el miRNA maduro ejerce su función al reprimir el ARNm objetivo, ya sea mediante su degradación o a través de la inhibición de su traducción (Adaptado Jang et al., 2024).

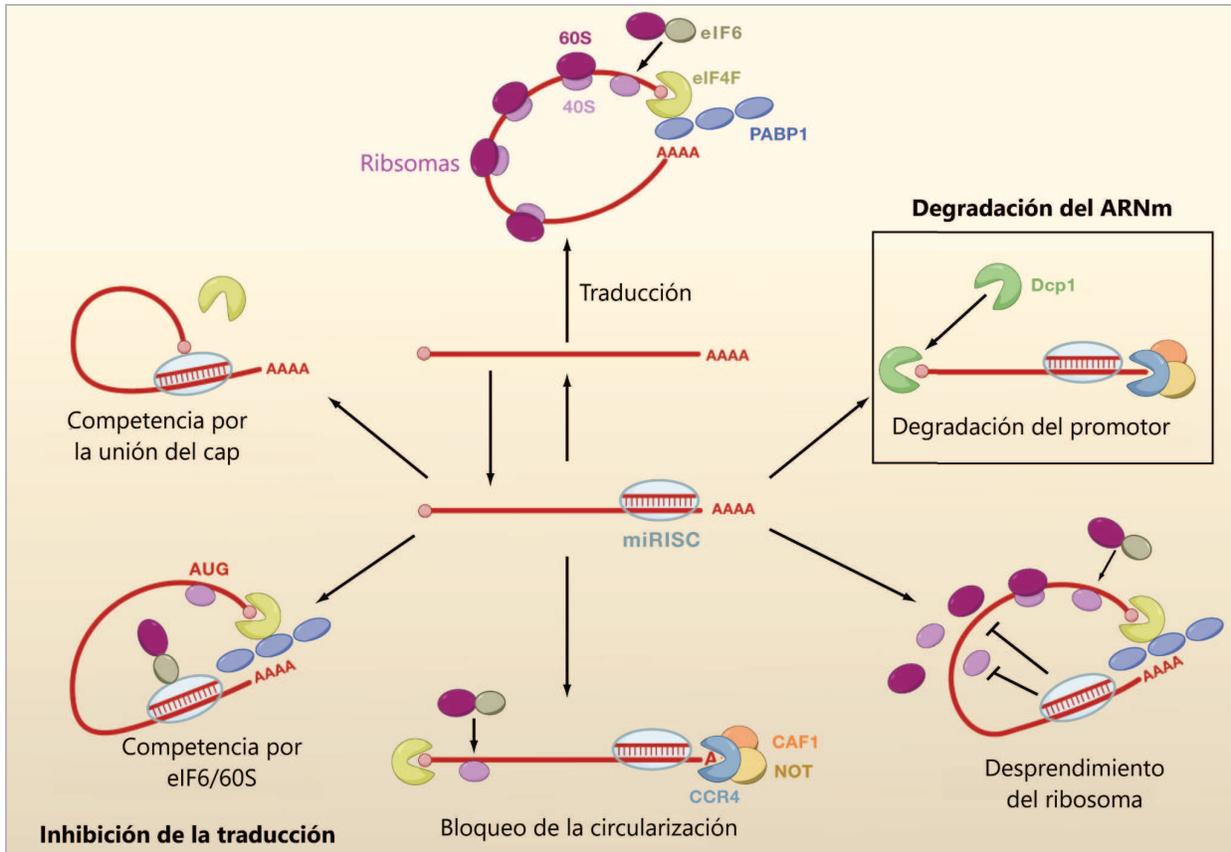
### 3.4.2 Modo de acción y funciones de los miRNAs.

Los miRNAs son una importante familia de reguladores génicos. Un gen puede ser regulado por múltiples miRNAs, lo que les otorga un gran potencial de amplificación de señal de regulación. De esta manera, se estima que los miRNAs afectan más del 30 % de los mRNAs en una célula. (Friedman et al., 2009; Lai et al., 2003; Lim et al., 2003). Se ha reconocido que los miRNAs juegan roles cruciales en una amplia gama de procesos biológicos, como apoptosis, proliferación y diferenciación celular, metabolismo, comportamiento y regulación de la heterocromatina (Ambros, 2003; Dumortier et al., 2013; Jaubert et al., 2007; Krützfeldt y Stoffel, 2006; Ruby et al., 2007). También son esenciales en el desarrollo, la respuesta al

estrés, la inmunidad, el envejecimiento, y están implicados en enfermedades como el cáncer (Di Leva et al., 2014; van Kouwenhove et al., 2011).

Los miRNAs maduros cargados en el miRISC guían a la proteína Ago-1 hacia los mRNAs complementarios para silenciarlos post-transcripcionalmente (Lewis et al., 2005). Este proceso puede involucrar tanto la inhibición de la traducción como la degradación del mRNA, dependiendo de características específicas del dúplex miRNA-mRNA, como el número total de sitios de unión del miRNA, su ubicación en el 3' UTR, y la presencia de proteínas complementarias asociadas al mRNA objetivo (Eulalio et al., 2007; Grimson et al., 2007; Pillai et al., 2007).

En animales, la represión mediada por miRNAs puede ocurrir antes o después de la iniciación de la traducción, afectando distintos procesos como la elongación, degradación co-traducciona l de proteínas, y la terminación prematura (Carthew y Sontheimer, 2009; Eulalio et al., 2008; Huntzinger e Izaurralde, 2011). Además, los miRNAs pueden inducir la degradación del mRNA objetivo. En la mayoría de las circunstancias, la degradación del mRNA en animales ocurre a través de la vía general de decaimiento del mRNA, donde se ha demostrado que los miRNAs aceleran la deadenilación y el decapado de sus objetivos (Eulalio et al., 2008; Filipowicz et al., 2008; Huntzinger e Izaurralde, 2011; Pillai et al., 2007) (Figura 9).



**Figura 9. Posibles mecanismos de represión mediada por miRNA.** Los mRNAs reclutan factores de iniciación y subunidades ribosómicas, formando estructuras circularizadas que mejoran la traducción (parte superior). Los miRISCs pueden reprimir la traducción uniéndose a los mRNAs en el paso de reconocimiento del cap (arriba a la izquierda) o durante el reclutamiento de la subunidad 60S (abajo a la izquierda). También pueden inducir la deadenilación del mRNA, inhibiendo su circularización (parte inferior), o reprimir la traducción post-iniciación al inducir la disociación de ribosomas (abajo a la derecha) o ralentizar la elongación. Además, los miRISCs pueden promover la degradación del mRNA mediante deadenilación seguida de decapado (arriba a la derecha) (Adaptado de Carthew y Sontheimer, 2009).

### 3.4.3 Regulación de la biogénesis de miRNAs.

La biogénesis de miRNAs está regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Bensaad et al., 2006; Berkers et al., 2013) y muchos factores de transcripción regulan la expresión de miRNAs de manera positiva o negativa, específica para cada tejido o etapa del desarrollo (Brodsky et al., 2000; Lozy et al., 2012). Además, varios activadores y represores regulan la biogénesis de miRNAs a través de interacciones proteína-proteína o proteína-RNA (Barrio et al., 2014; Ollman et al., 2000). Como se mencionó

anteriormente, se ha demostrado que Myc, también regula directamente la expresión de miRNAs a nivel transcripcional (Efeyan et al., 2015; Gonzalez et al., 2013; Hermeking et al., 2012; Lozy et al., 2012).

Otro de los factores que regula la biogénesis de miRNAs es la proteína quinasa TOR, que forma parte del complejo TORC1. TORC1 es fundamental para regular el metabolismo y el crecimiento celular, respondiendo a la disponibilidad de nutrientes e insulina. Su función principal es estimular procesos que promueven el crecimiento, como la síntesis de proteínas, mientras inhibe procesos que degradan componentes celulares, como la autofagia (Efeyan et al., 2015). Se ha descubierto que el tratamiento de células tumorales con Rapamicina (que bloquea la acción de TOR), modifica el perfil de miRNAs (Totary-Jain et al., 2013). El mecanismo molecular que une TORC1 con la maquinaria de biogénesis de miRNAs no se conoce (Efeyan et al., 2015; Totary-Jain et al., 2013). Adicionalmente, investigaciones recientes han mostrado que los niveles de la proteína Drosha están regulados por nutrientes como la glucosa y los aminoácidos en cultivos celulares (Ye et al., 2015).

Trabajos previos del equipo de trabajo, han demostrado que los niveles de mRNA de Dcr-1, se modulan en función de la presencia de aminoácidos y la actividad de TOR en el tejido adiposo de *Drosophila melanogaster*, lo que sugiere un mecanismo regulador conservado (Barrio et al., 2014). Además, hemos estudiado que Dcr-1 es regulado en condiciones de estrés nutricional por FOXO, un factor de transcripción que se activa en respuesta a la privación de nutrientes. En estas condiciones, FOXO reprime directamente la transcripción de Dcr-1 al unirse a su región promotora, lo cual es crucial para la adaptación metabólica del organismo durante el estrés. Esta represión de Dcr-1 disminuye la producción de miRNAs, lo que permite al organismo conservar energía y aumentar su resistencia al estrés (Sánchez et al., 2023).

Adicionalmente, se ha observado que la privación de nutrientes no solo reduce los niveles de Dcr-1, sino también los de Drosha y Ago-1, componentes claves en la maquinaria de miRNAs, lo que sugiere un mecanismo de regulación general de la biogénesis de miRNAs bajo condiciones de estrés nutricional. Este mecanismo de reducción de la actividad y de los niveles de miRNAs bajo estrés es un fenómeno que también se observa en otras condiciones de estrés, como hipoxia, autofagia, radiación UV y estrés oxidativo, lo que sugiere que es un mecanismo conservado de adaptación a situaciones adversas (Blandino et al., 2012; Gibbings et al., 2012; Ho et al., 2012). En estrés nutricional, el descenso coordinado de la maquinaria de miRNA es acompañado por una reducción en los niveles generales de miRNAs, esta regulación

que se produce en estrés nutricional tiene como objetivo la desrepresión de Dmp53, contribuyendo así a la resistencia del organismo frente a la privación de nutrientes (Barrio et al., 2014).

### 3.5 El Factor de Transcripción P53

El factor de transcripción p53 es un regulador esencial de las respuestas celulares al estrés y un importante gen supresor de tumores en humanos, cuya alteración en su señalización se encuentra presente en más del 50 % de todos los cánceres humanos (Muller et al., 2013). De acuerdo con su función como supresor de tumores, la mutación de la línea germinal de p53 está asociada con el síndrome hereditario de Li-Fraumeni, caracterizado por el inicio temprano de la tumorigénesis (Malkin et al., 1993). Además, la mutación de p53 en ratones knockout los hace propensos a desarrollar tumores espontáneos e inducidos por daños (Kastenhuber y Lowe, 2017).

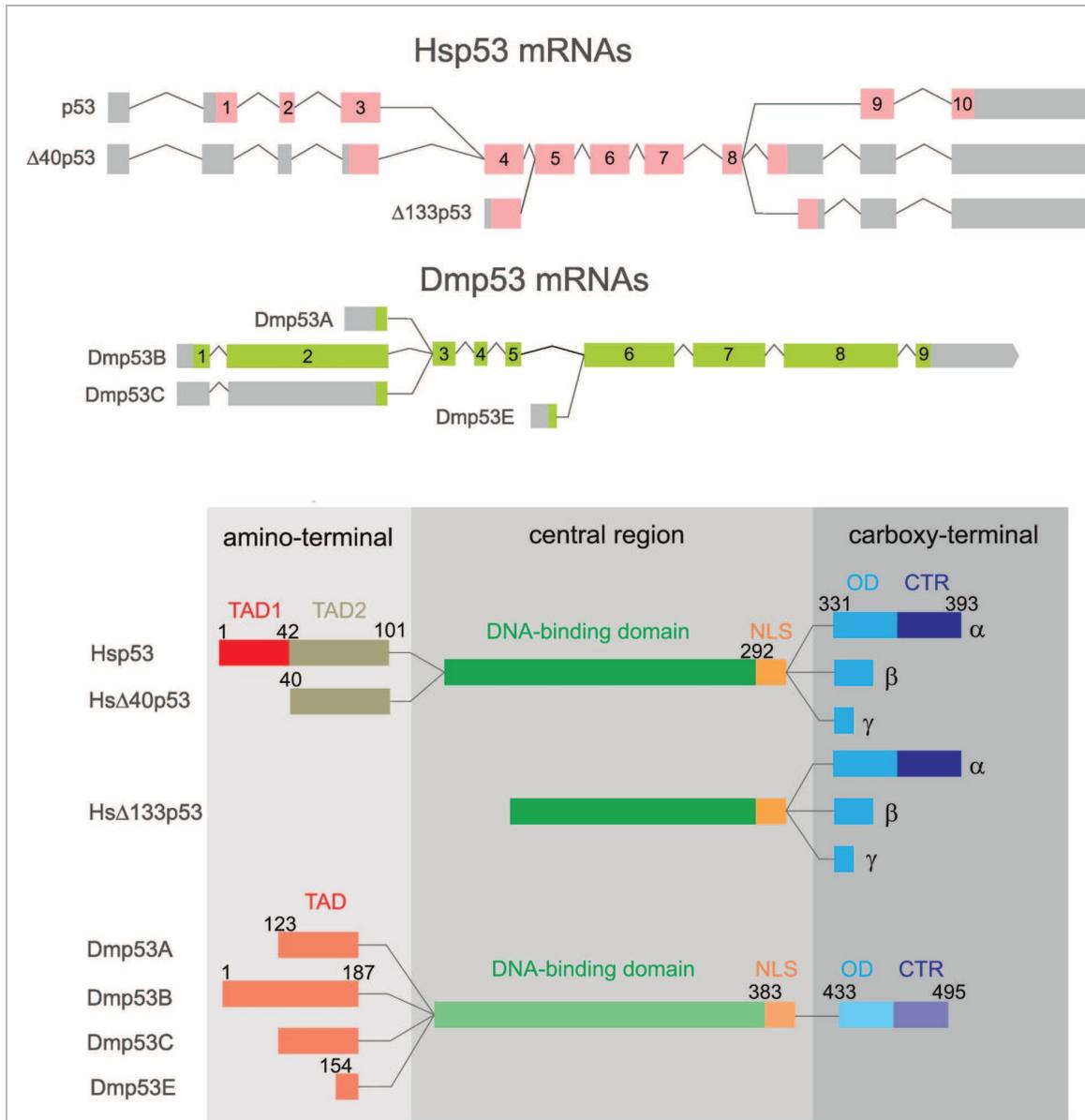
La proteína de humanos, al igual que en *Drosophila melanogaster*, une el DNA en forma de tetrámero y su secuencia consta de 4 dominios, un dominio de transactivación (*transactivation domain*, TAD), un dominio de unión al DNA (*DNA-binding domain*, DBD), una señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS) junto a un dominio de oligomerización (*oligomerization domain*, OD) y un dominio C-terminal regulatorio (*C-terminal regulatory domain*, CTR). El DBD de *Drosophila melanogaster* comparte un 25 % de identidad y un 43 % de similitud de secuencia con su contraparte en humanos y ambos adoptan una estructura tridimensional similar (Brodsky et al., 2000; Herzog et al., 2012). Interesantemente, distintos análisis estructurales han mostrado que muchas mutaciones “hot-spot” reportadas en distintos tipos de cáncer se corresponden estructuralmente con herramientas de pérdida de función de p53 conteniendo mutaciones puntuales y desarrolladas en *Drosophila melanogaster* (Herzog et al., 2012).

El único ortólogo de p53 en *Drosophila melanogaster* (Dmp53) comparte importantes características estructurales y funcionales con el p53 humano (Hp53). De hecho, Dmp53 es capaz de unir la secuencia consenso de unión de Hp53 y activar la transcripción de genes blanco de Hp53 (Brodsky et al., 2000; Jin et al., 2000; Ollmann et al., 2000).

### 3.5.1 Isoformas de p53.

El descubrimiento de isoformas de la proteína p53 en vertebrados y en *Drosophila melanogaster* ha revelado una mayor complejidad en su regulación y función. La expresión de cada isoforma de p53 es regulada diferencialmente y juega un rol crítico en el control de las distintas respuestas celulares. En este sentido, la expresión anormal y abundancia relativa de las distintas isoformas de este gen contribuyen a la tumorigénesis y tienen profundos efectos en la respuesta de tumores a las distintas terapias (Marcel et al., 2011; Zhang et al., 2015). Las isoformas presentes en humanos pueden ser divididas principalmente en dos grupos: isoformas transactivadoras (p53) e isoformas sin actividad transcripcional truncadas de forma N-terminal ( $\Delta 40p53$  y  $\Delta 133p53$ ). Las isoformas truncadas carecen completamente del dominio TAD. (Figura 10, Khoury y Bourdon, 2010) .

En *Drosophila melanogaster*, la mayoría de los estudios se han centrado en la isoforma truncada en el extremo amino, Dmp53A (también conocida como  $D\Delta Np53$ ), que es la más abundante y principal mediadora de la apoptosis inducida por radiación ionizante (Chakravarti et al., 2022). No obstante, se ha demostrado que la isoforma Dmp53B, cuando se sobreexpresa, induce una apoptosis masiva y participa en la proliferación celular desencadenada por apoptosis (Dichtel-Danjoy et al., 2012; Zhang et al., 2015). Mientras que las isoformas Dmp53A y Dmp53E carecen de un dominio de activación completo, la isoforma Dmp53B lo posee. De esta manera, Dmp53B actúa como un transactivador, promoviendo la activación de la transcripción, mientras que Dmp53A funciona principalmente inhibiendo la transcripción. (Wylie et al., 2022; Zhang et al., 2015). La represión transcripcional mediada por Dmp53A opera de manera continua en las primeras etapas del desarrollo y está asociada con marcas de cromatina locales, como H3K9me3, pudiendo ocurrir sin estrés celular. Estos hallazgos sugieren que las isoformas de p53 pueden interactuar entre ellas de muchas maneras (Wylie et al., 2022; Zhang et al., 2015) (Figura 10).



**Figura 10. Estructura del gen p53 en humano y *Drosophila melanogaster*.** (A) Múltiples variantes de ARNm e isoformas proteicas son generadas a partir del gen p53 de *Homo Sapiens* (Hs) y *Drosophila melanogaster* (Dm). Hsp53 codifica al menos 9 isoformas proteicas. El transcrito completo codifica para p53 y Δ40p53, mientras que las variantes Δ133p53 son generadas a partir de un promotor interno. Adicionalmente, el splicing alternativo del exón 9 produce las isoformas α, β y γ. El gen Dmp53 genera 3 potenciales isoformas proteicas. El transcrito completo codifica para Dmp53B y Dmp53C, mientras que Dmp53A se genera a partir de un promotor interno. Los exones están representados por cajas (los exones no codificantes se presentan en color gris). (B) Esquema mostrando las isoformas de p53 donde se indican las posiciones de los aminoácidos que definen los distintos dominios dentro de cada variante. La proteína p53 de secuencia completa incluye: un dominio de transactivación (transactivation domain, TAD, en colores rojo y marrón), un dominio de unión al DNA (DNA-binding domain, DBD, en color verde), una señal de localización nuclear (nuclear localization signal, NLS, en color anaranjado), un dominio de

oligomerización (oligomerization domain, OD, en color celeste) y un dominio C-terminal regulatorio (C-terminal regulatory domain, CTR, en azul). Dmp53B incluye un TAD completo equivalente a la versión completa Hsp53 $\alpha$ ; Dmp53A (también conocida como D $\Delta$ Np53) contiene un TAD truncado pareciéndose a las versiones de p53  $\Delta$ 133p53 y  $\Delta$ 40p53 en *Homo sapiens*. Dmp53E (también conocida como Dmp53 $\Delta$ C) es codificada por un transcripto de corta longitud derivando en una isoforma putativa conteniendo una versión truncada del TAD (Adaptado de Ingaramo et al., 2018)

### 3.5.2 Regulación de p53

Diversas señales de estrés convergen en p53, provocando distintas respuestas celulares. En mamíferos, varios mecanismos controlan la actividad, estabilidad y localización subcelular de p53, involucrando proteínas reguladoras que afectan sus modificaciones post-traduccionales. Las principales modificaciones post-transcripcionales de p53 incluyen fosforilación, ubiquitinación, acetilación, metilación y sumoilación, concentradas en el dominio regulador C-terminal, que son importantes para su activación o represión (Dai y Gu, 2010; Horn y Vousden, 2007).

La ubiquitinación, promovida por ligasas como MDM2, controla la estabilidad y la localización subcelular de p53 al facilitar su exportación nuclear (Hock y Vousden, 2014; Shi y Gu, 2012). En *Drosophila melanogaster*, la ligasa E3 que regula a Dmp53 es Synoviolin, y en esta especie la regulación por ubiquitinación está menos comprendida en comparación con los mamíferos (Yamasaki et al., 2007). Además de la ubiquitinación, Dmp53 puede ser regulado por sumoilación en dos residuos específicos, lo que impacta su actividad transcripcional y su capacidad para inducir apoptosis (Mauri et al., 2008; Stehmeier y Muller, 2009). La fosforilación en sitios específicos, mediada por quinasas como ATM y Chk2, también aumenta la estabilidad de p53 y promueve su activación transcripcional. En *Drosophila melanogaster*, la regulación de Dmp53 en respuesta al daño en el DNA depende de la quinasa Mnk/Chk2 (Brodsky et al., 2004; Jaklevic et al., 2006; Peters et al., 2002). Finalmente, la desacetilación de p53 por Sirt2 tiene un impacto negativo en su actividad transcripcional, y en *Drosophila melanogaster*, Sirt2 parece regular a Dmp53 de manera similar a su función en mamíferos (Bauer et al., 2009).

Por otra parte, los miRNAs emergen como reguladores post-transcripcionales importantes. Reportes previos demuestran que la expresión de p53, tanto en vertebrados como en mamíferos se regula por miRNAs, indicando un mecanismo regulatorio conservado (Fan et al., 2014; Hermeking et al., 2012; Hermeking et al., 2007; Hu et al., 2010; Kumar et al., 2010; Le et

al., 2009; Takwi y Li, 2009). Experimentos realizados en cultivos de células de mamíferos demuestran que la expresión ectópica de varios miRNAs, entre ellos miR-33, miR-125 y miR-504, reducen los niveles de p53 y en consecuencia bloquean la inducción de apoptosis y/o el arresto del ciclo celular en respuesta a daños al DNA o lesiones oncogénicas (Hermeking et al., 2012). Por tal motivo, aquellos miRNAs capaces de modular la expresión de p53 se consideran potenciales oncogenes, ya que alteraciones genéticas o epigenéticas en esta red regulatoria podrían contribuir a la iniciación y/o progresión tumoral.

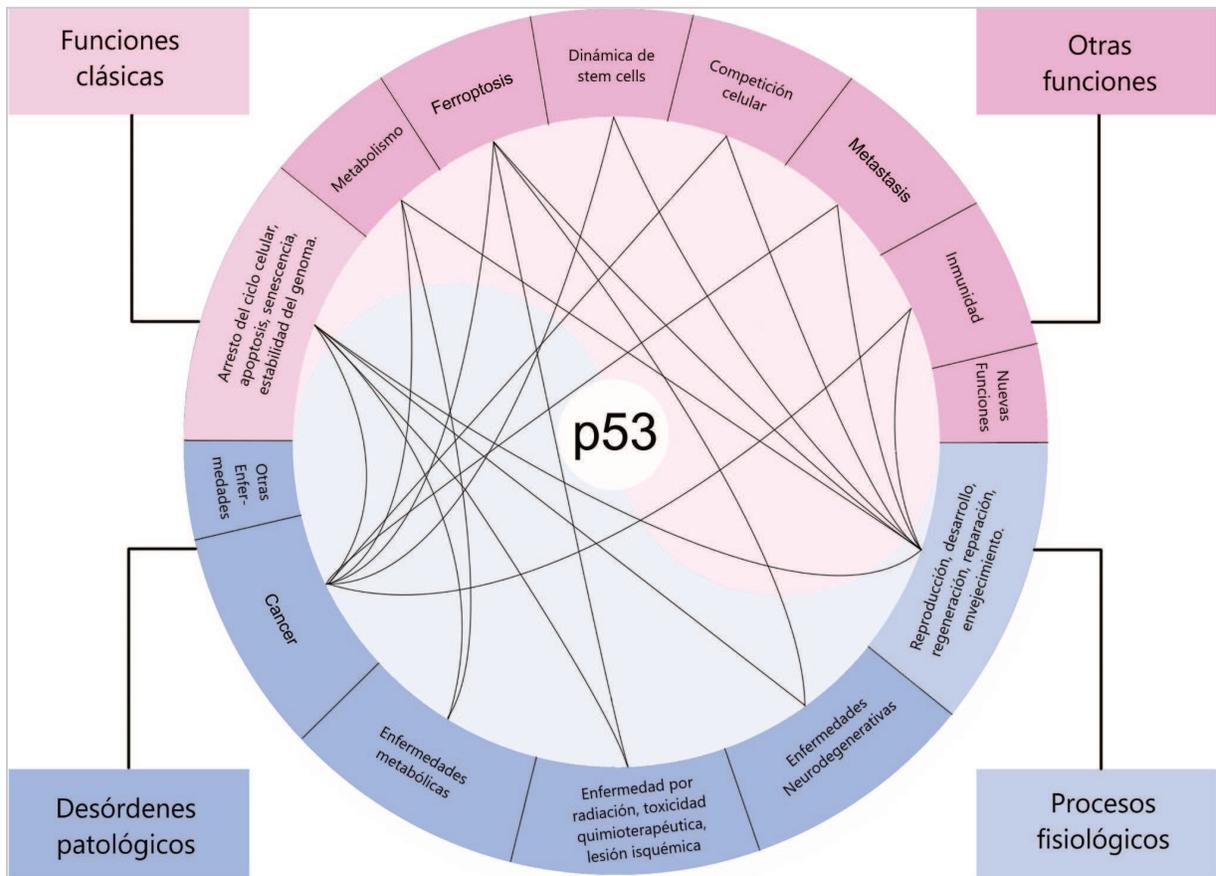
### 3.6 Funciones canónicas de p53.

En condiciones normales, la proteína p53 se encuentra inactiva. Sin embargo, en respuesta a señales de estrés celular, como daño en el DNA, hipoxia o activación de oncogenes, p53 es estabilizada y activada por diversas modificaciones post-traduccionales. Una vez activada, p53 induce la expresión de genes responsables de la detención del ciclo celular, reparación del DNA o apoptosis (Figura 11). (Dai y Gu, 2010).

El control de la progresión del ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis son las funciones de p53 más intensamente estudiadas y conservadas (Ingaramo et al., 2018). En *Drosophila melanogaster*, Dmp53 regula la apoptosis inducida por daño en el DNA activando genes proapoptóticos como *hid*, *reaper* y *grim* (Brodsky et al., 2000; Ollmann et al., 2000). Esta activación desencadena caspasas que promueven la apoptosis (Xu et al., 2009). Dmp53 también activa la vía JNK en respuesta al daño genotóxico, potenciando la apoptosis (Shlevkov y Morata, 2012), y regula la vía Hippo para inducir la muerte celular tras el daño en el DNA (Colombani et al., 2006).

El papel de Dmp53 en la detención del ciclo celular es más limitado y controvertido (Brodsky et al., 2004; Brodsky et al., 2000; Jaklevic y Su, 2004). Dmp53 participa en la reparación del DNA, mejorando la reparación por escisión de nucleótidos y la respuesta al daño por radiación ionizante, induciendo genes clave en la recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos (Brodsky et al., 2004; Jassim et al., 2003; Wells y Johnston, 2012). A diferencia de los mamíferos, Dmp53 no elimina células aneuploides en *Drosophila melanogaster*, lo que indica diferencias en la regulación de la apoptosis por inestabilidad cromosómica (Dekanty et al., 2014; Mcnamee y Brodsky, 2009).

Además, en *Drosophila melanogaster*, la activación de Ras y la disfunción mitocondrial inducen senescencia en células epiteliales, con participación de Dmp53, que regula la estabilidad de *Cyclin E* y contribuye al arresto del ciclo celular (Nakamura et al., 2014; Ohsawa et al., 2012). Esto sugiere que la senescencia y el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) están conservados en insectos, con Dmp53 jugando un rol crucial en este proceso.



**Figura 11. Funciones de p53.** Entre las funciones clásicas y conservadas de p53 se encuentran detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia y estabilidad del genoma. Sin embargo, se han revelado funciones adicionales de p53 en procesos incluyendo su papel en la regeneración de tejidos y en la proliferación inducida por apoptosis, la coordinación del crecimiento, la competencia celular y las respuestas adaptativas al estrés nutricional a nivel del organismo (Adaptado de Liu et al., 2024).

### 3.7 Funciones no canónicas de p53

Aunque el rol de p53 en apoptosis y el control del ciclo celular es crucial, investigaciones recientes han revelado funciones adicionales de p53 en procesos incluyendo su papel en la regeneración de tejidos y en la proliferación inducida por apoptosis, la coordinación del crecimiento, la competencia celular y las respuestas adaptativas al estrés nutricional a nivel del organismo (Barrio et al., 2014; De la Cova et al., 2014; Dichtel-Danjoy et al., 2012; Ingaramo et al., 2018; Mesquita et al., 2010; Wells y Johnson, 2012; Wells et al., 2006). En esta tesis nos enfocamos principalmente en dos funciones no canónicas de p53: la regulación de la homeostasis metabólica y de células madre.

#### 3.7.1 Dmp53 regula la homeostasis metabólica.

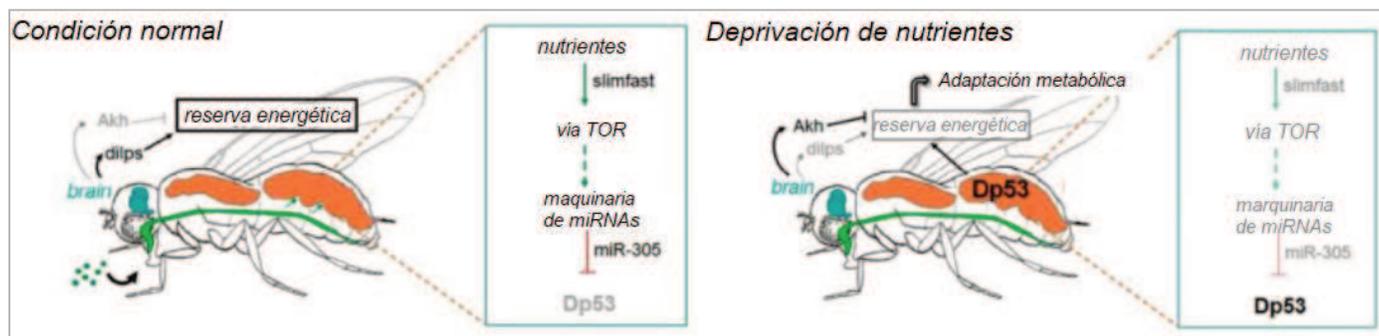
Junto con su papel como 'guardián del genoma', algunos trabajos han aportado información novedosa sobre el nexo de p53 con otros procesos celulares que podrían ser importantes no solo por su papel como supresor de tumores sino también para funciones de p53 no asociadas al cáncer (Ingaramo et al., 2018).

Dmp53 es esencial para la supervivencia de animales en condiciones de privación de nutrientes, ya que las moscas mutantes para Dmp53 muestran una mayor sensibilidad al estrés nutricional y mueren antes que las moscas de control. En estudios previos, demostramos que Dmp53 se activa específicamente en el FB de *Drosophila melanogaster* en ausencia de nutrientes, y que esta activación es crucial para permitir la supervivencia del animal durante un período de inanición (Barrio et al., 2014).

Se ha reportado que para promover la supervivencia celular tras la privación de nutrientes, p53 media los cambios metabólicos en las células mediante la regulación de varias vías metabólicas, tales como glucólisis y fosforilación oxidativa (Berkers et al., 2013; Vousden y Ryan, 2009). En ausencia de nutrientes, el FB suministra energía y metabolitos al resto del cuerpo mediante la movilización de las principales reservas energéticas, glucógeno y triacilglicéridos. En *Drosophila melanogaster*, se sabe que la reducción de los niveles y/o la actividad de Dmp53 específicamente en las células del FB aceleran el consumo de glucógeno y TAGs y reduce los niveles de azúcares en el animal (Barrio et al., 2014). En mutantes de Dmp53, se observó una desregulación en la expresión de enzimas claves de esta vía metabólica, como la fosfoglucomutasa (PGM) y la Hexoquinasa-C (HexC), lo que lleva a un consumo acelerado de azúcares y a la depleción rápida de las reservas energéticas (Barrio et

al., 2014). Este efecto es consistente con estudios en células de mamíferos, donde p53 también regula negativamente la PGM (Kondoh et al., 2005), lo que indica un rol conservado de p53 en la regulación de la glucólisis tanto en vertebrados como en invertebrados.

La regulación de Dmp53 por miRNAs ha sido descrita como modulable en respuesta a diferentes situaciones de estrés, principalmente ante la privación de nutrientes (Barrio et al., 2014). En este contexto, los miRNAs miR-219, miR-283 y miR-305 son capaces de reprimir la actividad de Dmp53. De estos, solo el miR-305 se expresa en el FB y desempeña un papel clave al modular los niveles de Dmp53 de manera dependiente de nutrientes, del transportador de aminoácidos Slimfast y de la quinasa TOR (Barrio et al., 2014). No obstante, como se mencionó anteriormente, se ha observado una disminución general en los niveles de miRNAs maduros y en la maquinaria de procesamiento de miRNAs durante periodos de ayuno (Barrio et al., 2014). De esta manera, en condiciones nutricionales óptimas, la vía de señalización TOR promueve la inhibición de Dmp53 por medio de miR-305. Por el contrario, en condiciones de privación de nutrientes, la biogénesis de miRNAs disminuye, y en consecuencia los niveles y la actividad de Dmp53 aumentan. De esta manera, la activación de Dmp53 en el tejido adiposo induce una reprogramación del metabolismo energético y promueve la supervivencia del animal a un período de hambre (Figura 12).



**Figura 12. Regulación de Dmp53 por miRNAs en respuesta al estrés nutricional en *Drosophila melanogaster*.**

Dmp53, regulado por miRNAs, juega un rol central en la respuesta adaptativa a estrés nutricional en *Drosophila melanogaster*. En condiciones nutricionales óptimas, la vía de señalización de TOR promueve la inhibición de Dmp53 por miR-305 en el FB. En condiciones de privación de nutrientes, la biogénesis de miRNAs disminuye y en consecuencia los niveles y la actividad de Dmp53 aumentan.

### 3.7.2 Rol de p53 en la regulación de células madre.

Las células madre son esenciales para el desarrollo, el crecimiento y el mantenimiento de órganos y tejidos a lo largo de la vida de un organismo (Beumer et al., 2024). El equilibrio entre la proliferación y diferenciación de las células madre es esencial para mantener la homeostasis de órganos y tejidos, y su alteración puede desencadenar diversas enfermedades. Sin embargo, aún se desconoce cómo se coordinan dichos procesos y qué factores endógenos intervienen (Beumen et al., 2024). En los últimos años, se ha revelado el papel crucial de p53 en el control de las células madre, tanto en ratón como en humanos (Beumen et al., 2024).

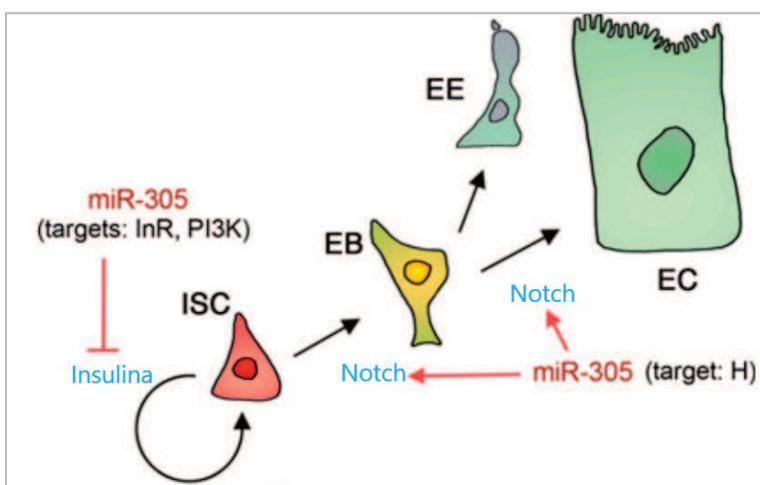
Uno de los primeros indicios de la función de p53 en la reprogramación celular en mamíferos se observó cuando se demostró que p53 puede suprimir la reprogramación de células somáticas diferenciadas a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (Hanna et al., 2009; Krizhanovsky et al., 2009; Sarig et al., 2010). Esta capacidad de p53 para limitar la reprogramación se debe en parte a su influencia en la restricción del ciclo celular mediante la inducción de *Cdkn1a*, y a la inducción de apoptosis (Hanna et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Marión et al., 2009; Yi et al., 2012). Además, genes diana de p53, como *mir34a-c*, bloquean la reprogramación mediada por p53, lo que sugiere que este factor de transcripción también actúa inhibiendo genes esenciales para la pluripotencia, que son objetivos conocidos de *mir-34a* (Choi et al., 2011). p53 refuerza esta función inhibidora de la pluripotencia mediante la transactivación directa de *mir-145*, que también regula negativamente los factores de pluripotencia (Lin et al., 2012).

Este control de reprogramación dependiente de p53 es crucial para la supresión tumoral. De hecho, la pérdida de p53 en cánceres humanos se correlaciona con el desarrollo de tumores no diferenciados y altamente agresivos, que muestran perfiles de expresión génica similares a los de células madre embrionarias (ESCs) o iPSCs, sugiriendo que p53 inhibe la formación de células madre tumorígenas (Pant et al., 2012; Zhao et al., 2010). Con lo cual, la función de p53 en limitar la reprogramación de células diferenciadas está en consonancia con su papel general en la biología. A pesar de estos avances, la relevancia fisiológica de la regulación de p53 en el contexto de un órgano complejo in vivo y el mecanismo molecular subyacente aún no se han dilucidado completamente (Bieging et al., 2014).

En planarias, la falta de p53 se relaciona con un aumento en el número y la proliferación de células madre, así como en una inhibición de su capacidad regenerativa (Pearson y Sánchez Alvarado, 2010). En vertebrados como anfibios y peces, bajos niveles de p53

promueven la formación y proliferación del blastema en las etapas iniciales de la regeneración, mientras que niveles altos de p53 promueven la diferenciación celular (Yun et al., 2013). Estas evidencias sugieren que, en el contexto de la regeneración, p53 actuaría regulando el equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular. En el mismo sentido, ratones mutantes p53 muestran una expansión del pool de células madre en diferentes tejidos (sangre, glándula mamaria y cerebro), lo que sugiere una función central conservada de p53 en regular el comportamiento de células madre (Bieging et al., 2014).

En *Drosophila melanogaster* se demostró que miR-305 regula la proliferación de las células madre intestinales y la homeostasis del intestino adulto en respuesta a nutrientes mediante su acción sobre las vías de señalización de Notch e Insulina. La deficiencia de miR-305 en ISCs provoca un aumento en la actividad de la vía de insulina, lo que conlleva a una expansión de la población de ISC a expensas de la diferenciación. Esto simula una respuesta adaptativa a entornos ricos en nutrientes, pero también puede causar displasia intestinal prematura y muerte temprana, incluso en condiciones normales (Foronda et al., 2014) (Figura 13). Como *dmp53* es un gen objetivo de miR-305, sería interesante saber si Dmp53 así como en mamíferos, tiene una función en regular la homeostasis de intestino en *Drosophila melanogaster*.



**Figura 13. Autorrenovación y diferenciación de las ISCs regulada por miR-305.** Esquema del intestino medio de *Drosophila melanogaster* que muestra las células EB, EC y EE. La vía Notch regula la diferenciación y es clave para la identidad celular. Se presentan los objetivos de miR-305 en las vías de señalización que regulan la autorrenovación y diferenciación de las ISCs (Adaptado de Foronda et al., 2014).

Por último, el cáncer colorrectal (CRC) se encuentra entre los tipos más comunes de cáncer humano y es una de las principales causas de mortalidad, representando aproximadamente 1 de cada 10 muertes por cáncer (Bell et al., 2014; Boyle et al., 2000). Se han logrado avances significativos en la identificación de algunos oncogenes y genes supresores de tumores claves que están mutados en el cáncer colorrectal (Bienz et al., 2000; Kinzler y Vogelstein, 1996). La mutación más común en el cáncer colorrectal es la inactivación del supresor tumoral adenomatous polyposis coli (APC). Otro ~5 % de los cánceres colorrectales presentan mutaciones activadoras en el oncogén beta-catenina (CTNNB1) (Bienz et al., 2000; Kinzler y Vogelstein, 1996; Muzny et al., 2012). Además de estas mutaciones, alrededor del 40 % de los cánceres de colon exhiben mutaciones de ganancia de función en el oncogén K-RAS, el 10 % muestra mutaciones de ganancia de función en el oncogén BRAF y aproximadamente el 50 % son homocigotos para mutaciones de pérdida de función en el gen supresor de tumores p53 (Bienz et al., 2000; Kinzler y Vogelstein, 1996; Thiel et al., 2013).

Existen importantes similitudes entre los intestinos de mamíferos y de *Drosophila melanogaster* (Apidianakis et al., 2011; Casali et al., 2009). En *Drosophila melanogaster*, los clones compuestos por las mutaciones Apc-Ras, pero no aquellos que presentan las mutaciones individuales, se expanden como crecimientos tumorales agresivos similares a los tumores intestinales. Estas lesiones reproducen muchas de las características del CRC humano, como la proliferación aumentada, el bloqueo de la diferenciación y la polaridad celular, así como la alteración de la arquitectura tisular. Este proceso es seguido por la expresión de marcadores tumorales presentes en las lesiones humanas (Martorell et al., 2014). Dada la posible función de Dmp53 en el intestino medio de *Drosophila melanogaster* y las similitudes con los intestinos de mamíferos, se puede especular que la alteración combinada de Dmp53 y RasV12 en el intestino medio adulto podría replicar eventos de hiperproliferación observados en el cáncer colorrectal (CRC).

## **Objetivos**

## 4. Objetivos

El papel de p53 en el control del metabolismo energético celular es un aspecto central de su función como supresor de tumores. Sin embargo, los mecanismos específicos de activación de p53 en respuesta a estrés metabólico aún no están completamente esclarecidos. En trabajos previos, se ha descrito que Dmp53 se regula negativamente por el miR-305 en el tejido adiposo de *Drosophila melanogaster* en función del estado nutricional del animal (Barrio et al., 2014). Esta regulación por nutrientes, principalmente glucosa y aminoácidos, sugiere un mecanismo conservado, ya que evidencias recientes en cultivo de células humanas indican que la biogénesis de miRNAs también se modula por estos nutrientes (Biegging et al., 2014). Estos hallazgos sugieren una relación funcional entre el estado nutricional, la vía TOR y la biogénesis de miRNAs que podría estar conservada entre *Drosophila melanogaster* y humanos. Por otra parte, se sabe que dMyc, un factor de transcripción clave en crecimiento, se encuentra regulado por la vía TOR y la disponibilidad de nutrientes en *Drosophila melanogaster* (Li et al., 2010). Dado que dMyc es capaz de regular una gran variedad de genes en respuesta al estrés nutricional (Li et al., 2010; Teleman et al., 2008), nos planteamos como hipótesis que dMyc regule vía miRNAs los niveles de expresión de Dmp53 y de esta manera la supervivencia de organismos frente a estrés nutricional.

Por otra parte, el equilibrio entre la proliferación y diferenciación de las células madre es esencial para mantener la homeostasis de órganos y tejidos, y su alteración puede llevar a diversas enfermedades (Krizhanovsky et al., 2009). Aunque se ha avanzado en la comprensión del rol de p53 en la regulación de células madre, todavía no se conoce completamente cómo se coordinan estos procesos y qué factores endógenos intervienen. En los últimos años, se ha destacado el papel crucial de p53 en el control de células madre en modelos de ratón y humanos. Estudios in vitro indican que p53 inhibe su autorrenovación, induce la diferenciación y promueve la división asimétrica en células madre mamarias (Casali et al., 2009). Además, niveles elevados de p53 bloquean la reprogramación de células madre pluripotentes inducidas (Jiang et al., 2012). Estas evidencias destacan la importancia de entender a fondo el papel de p53 en la regulación de las células madre en diversos contextos biológicos. El intestino medio de *Drosophila melanogaster* se ha establecido como un modelo valioso para el estudio de la homeostasis del tejido y su capacidad regenerativa, dada su sorprendente similitud con los sistemas digestivos de mamíferos en términos de composición celular y control genético

(Lucchetta et al., 2012). Dado estos antecedentes, nos proponemos a estudiar el posible rol de Dmp53 en células madre intestinales.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

**Objetivo 1.** Estudiar la regulación de la biogénesis de miRNAs y los niveles de Dmp53 por el factor de transcripción dMyc.

**Objetivo 2.** Estudiar la regulación transcripcional del miR-305 por el factor de transcripción dMyc y su relevancia fisiológica.

**Objetivo 3.** Estudiar el rol de Dmp53 en la regulación de las células madre intestinales.

## **Materiales y métodos**

## 5. Materiales y métodos.

### 5.1. Líneas de *Drosophila melanogaster* y mantenimiento.

Todas las líneas de moscas (Tabla 1) fueron mantenidas a 25°C en un medio alimenticio estándar que contiene: 40 g/L de sacarosa, 40 g/L de levadura, 1 % agar, 30 g/L de polenta, 25 g/L de harina, 4,5 ml/L de ácido propiónico y 1,2 g/L de nipagin. Otras condiciones de temperatura o comida utilizadas son indicadas en el texto.

**Tabla 1.** Líneas de moscas utilizadas. Las líneas que tienen código que comienza con BL provienen de *Bloomington Drosophila Stock Center* y VDRC de *Vienna Drosophila Resource Center*.

| Línea                      | Procedencia         | Observación  |
|----------------------------|---------------------|--|
| ptc-Gal4                   | BL2007              | Expresión en límite anteroposterior del disco imaginal del ala   |
| GSG162                     | BL40260             | Gal-4 inducible con hormona RU-486 en larva.   |
| GSG132                     | BL8527              | Gal-4 inducible con hormona RU-486 en moscas adultas, utilizada en cuerpo graso.   |
| Lsp2-Gal4                  | BL6357              | Expresión en cuerpo graso  |
| cg-Gal4                    | BL7011              | Expresión en cuerpo graso  |
| esg-Gal4                   | H. Hayashi          | Expresa en células madre y enteroblastos en el intestino medio.  |
| delta-Gal4                 | BL67047             | Expresa en células madre intestinales.   |
| Hs-Flp;act>cd2>GAL4;UASRFP | BL 90923            | Línea para clones (mosaico genético).  |
| UAS-myc <sup>RNAi</sup>    | VDRC2947            | RNA de interferencia contra RNAm dMyc  |
| UAS-Myc                    | BL9674              | Sobrexpresión de dMyc.   |
| tub-Myc                    | Moreno et al., 2004 | Expresa una copia extra de dMyc bajo el promotor de tubulina.  |
| UAS-p53 <sup>H159N</sup>   | BL8421-BL8420       | Versión dominante negativa de Dmp53 con la mutación H159N generada por una mutación puntual en el dominio de unión al DNA (Ollmann et al., 2000) |
| UAS-p53.ct                 | BL6583              | Versión dominante negativa de Dmp53  |

|  |                          |   |
|--|--------------------------|---|
|  |                          | con mutación en c-terminal  |
| UAS-miR-305                                      | BL41152                  | Expresa el microRNA miR-305.  |
| UAS-miR-305sponge                                | BL61423                  | Esponja de interferencia para el miR-305.   |
| p53 3'UTR-sensor                                 | Cedido por M.Milán       | Sensor de la actividad de Dmp53 mediada por miRNAs.   |
| p53 $\Delta$ 305 3'UTR-sensor                    | Cedido por M.Milán       | Sensor de la actividad de Dmp53 sin el sitio de unión de mir-305.   |
| myc 3'UTR-sensor                                 | Ferreira et al., 2014    | Sensor de la actividad de dMyc mediada por miRNAs.  |
| meiP26 3'UTR-sensor                              | Herranz et al., 2010     | Sensor de la actividad de meiP26 mediada por miRNAs.  |
| p53 <sup>5A14</sup>                              | BL6815                   | Mutante nula de Dmp53.  |
| hid-GFP5'Fw                                      | BL50751                  | Reportero de la actividad de Hid, target de Dmp53   |
| rpr-EGFP.p53R.nls                                | BL98117                  | Reportero de la actividad de rpr, target de Dmp53.  |
| Notch Responser Element (NRE)                    | BL30727                  | Elemento de respuesta de Notch.   |
| RasV12   | cedida por Marco Milán   | Mutante de Ras que se usa en estudios de señalización.  |
| esg-Gal4 UAS-CD8::GFP; UAS-H2B::RFP              | Christensen et al., 2023 | Línea utilizada para análisis clonal en intestino medio mediante el sistema G-TRACE (Evans et al., 2009)  |
| esg-Gal4,UAS-CFP,Su(H)Gbenl sGFP; ubi-his2av-RFP | Christensen et al., 2023 | Marcadora de linaje celular que permite realizar seguimiento de poblaciones celulares en intestino medio. |
| w <sup>118</sup>                                 | BL 3605                  | Línea control. Mutante del gen white  |

## 5.2 Sistema de expresión binario GAL4-UAS y experimentos de mosaicos genéticos.

Se utilizó el sistema binario GAL4/UAS para dirigir la expresión de distintos transgenes en diferentes tejidos de *Drosophila melanogaster* (Brand y Perrimon, 1993). Los cruces

experimentales se llevaron a cabo a 25°C, usando la línea  $w^{118}$  como control a no ser que se indique lo contrario.

Para los experimentos que emplearon el sistema GeneSwitch, se recolectaron embriones que contenían GS-Gal4 y el transgén utilizado. Se mantuvieron en condiciones normales durante 24 hs. Para inducir la expresión transgénica, las larvas en estadio L2 se transfirieron a alimento que contenía 50 µg/ml de RU-486 (Sigma) o un volumen equivalente de agua MilliQ como control. Tras 72 hs, se utilizaron larvas completas o tejidos diseccionados para la extracción de RNA.

El control temporal de la expresión de transgenes en moscas adultas se logró mediante  $tubGal80^{ts}$ . Las moscas fueron mantenidas a 18°C durante su desarrollo y hasta 4-7 días después de la eclosión, permitiendo la maduración del intestino y del cuerpo graso. Luego se trasladaron a 29°C para inducir la expresión mediada por Gal4 de manera específica en cada tipo celular. La duración de la inducción de UAS varió según el experimento: en ensayos de supervivencia, se mantuvo hasta el final del experimento, en los experimentos de inmunotinción a inducción a 29°C duró 7 días, a excepción de los experimentos de linaje celular de  $esg^{ReDDM^{ts}}$  donde la inducción se llevó a cabo por 20 días. En todos los casos los cambios de medio fresco fueron cada dos días.

Las moscas  $hsFLP; act>y +>Gal4, UAS-RFP$  se cruzaron con las líneas transgénicas correspondientes a 25°C, analizando eventos de recombinación espontáneos en el cuerpo graso antes del inicio de la endoreplicación (Britton et al., 2002).

### 5.3 Inmunoensayos.

Las larvas de estadio L3 (cuerpo graso) y L3 tardío (discos de ala) se diseccionaron en PBS frío y se fijaron en formaldehído al 4%/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos fueron lavados 3 veces durante 15 minutos con PBT (PBS + 0,1 % de Tritón X-100) y bloqueados durante 1 hs en BBT (PBT + BSA 0,3 % + 250 mM NaCl). Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario diluido en BBT, se lavaron tres veces (15 minutos cada uno) en PBT y se incubaron con anticuerpos secundarios en BBT durante 1,5 hs a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBT (15 minutos cada uno), los tejidos diseccionados se colocaron en un medio de montaje (80 % de glicerol/PBS con 0,05 %

de galato de n-propilo). Se utilizó DAPI para contrateñir los núcleos. Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 2.

Los intestinos medios de las hembras adultas se diseccionaron en PBS frío y se fijaron en formaldehído al 4%/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron y permeabilizaron en PBT (Triton X 100 al 0,2 % en PBS) durante 10 minutos. Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario diluido en BBT, se lavaron tres veces (10 minutos cada uno) en PBT y se incubaron con anticuerpos secundarios en BBT durante 2 hs a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBT (10 minutos cada uno), los tejidos diseccionados se colocaron en un medio de montaje (80 % de glicerol/PBS con 0,05 % de galato de n-propilo). Se utilizó DAPI para contrateñir los núcleos. Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en tinciones inmunohistoquímica.

| Anticuerpo                        | Identificador                    | Concentración |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------|
| Anti-GFP de ratón                 | DSHB (12A6)                      | 1/20          |
| Anti-dMyc de ratón                | DSHB (P4C4-B10)                  | 1/20          |
| Anti-Dmp53 de ratón               | DSHB (7A4)                       | 1/20          |
| Anti- Phospho histona 3 de conejo | Cell Signalling Technology(9701) | 1/500         |
| Anti-delta de ratón               | DSHB (C594.9B)                   | 1/20          |
| Anti-Próspero de ratón            | DSHB (MR1A)                      | 1/100         |
| Anti-ratón IgG-Alexa Fluor 488    | Jackson InmunoResearch           | 1/200         |
| Anti-ratón IgG-Alexa Fluor 594    | Jackson InmunoResearch           | 1/200         |
| Anti-conejo IgG Alexa Fluor 488   | Jackson InmunoResearch           | 1/200         |
| Anti-conejo IgG Alexa Fluor 594   | Jackson InmunoResearch           | 1/200         |

#### 5.4. Cuantificaciones de fluorescencia y longitud.

Se tomaron imágenes confocales utilizando un microscopio confocal Leica SP8 manteniendo configuraciones de microscopio idénticas para las muestras de control y

experimentales. El análisis de imágenes y las cuantificaciones se realizaron utilizando el software de código abierto FIJI (Schindelin et al., 2012).

Para la cuantificación de la fluorescencia en discos imaginales de ala, se midió la intensidad de la fluorescencia dentro de áreas definidas del dominio *ptc* o *dpp*, donde se expresa el gen de interés, y posterior y se representó como una relación *ptc*/posterior.

Para mediciones cuantitativas de células, se adquirieron apilamientos z con un objetivo de 20x en la región R4bc para cada intestino montado. Los apilamientos z adquiridos se convirtieron en proyecciones de máxima intensidad, y el número de células positivas para DAPI, *delta*, *esg*, *Notch* y *Pros* se contó manualmente utilizando el complemento CellCounter de Fiji. Se normalizó al número total de células DAPI contadas. Para las cuantificaciones de PH3, se contaron los números de células positivas para PH3 para cada uno de los intestinos.

El análisis y la generación de gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism 8.30. El método estadístico utilizado se indica en las leyendas de los paneles respectivos.

Para las cuantificaciones de los tamaños del intestino, se adquirieron imágenes de todo el intestino medio con un objetivo de 2.5x de una Lupa Leica de fluorescencia DFC7000T. La longitud se midió en Fiji trazando una línea segmentada a lo largo del centro de cada intestino medio.

## 5.5 Extracción de RNA y PCR en tiempo real.

Para experimentos del análisis de la expresión de genes y ChIP-qPCR (Inmunoprecipitación de la cromatina-qPCR), se siguió el siguiente protocolo:

Extracción de RNA: Se extrajo RNA de: el cuerpo graso de 10 larvas en estadio L3, o de 5 larvas enteras. En cada caso se obtuvo tres muestras por genotipo y condición. El protocolo para la extracción de RNA fue el siguiente:

- Homogeneizar las muestras en 500µl de Trizol.
- Incubar 5 min a temperatura ambiente, agregar 100 µl de cloroformo. Agitar vigorosamente durante 15 segundos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 min a 4° C, velocidad máxima. Transferir con cuidado el sobrenadante (180-200 µl) en un tubo nuevo. No tocar la interfaz.
- Añadir 1 volumen de isopropanol (180-200 µl), agitar vigorosamente e incubar 5 min en hielo.
- Centrifugar 30 min a 4° C, velocidad máxima. No alterar el sedimento después de la centrifugación.

- Retirar con cuidado el sobrenadante. Lavar con 300 µl de EtOH al 75 % mediante agitación con vortex.
- Centrifugar 10 min a 4° C, velocidad máxima. No alterar el sedimento después de la centrifugación.
- Eliminar con cuidado el sobrenadante completamente pipeteando.
- Añadir 100µl de agua e incubar 10 min a temperatura ambiente. Vortex durante 1 min, agregar 10 µl de NaAc 3 M (viene con PelletPaint), agitar. Añadir 250 µl de EtOH helado e incubar 1 hora a -20° C. La precipitación aquí descrita es obligatoria para eliminar el fenol restante.
- Centrifugar 30 min a 4° C, velocidad máxima. No alterar el sedimento después de la centrifugación.
- Retirar con cuidado el sobrenadante. Lavar con 300 µl de EtOH al 75 % mediante agitación.
- Centrifugar 10 min a 4° C, velocidad máxima. No alterar el sedimento después de la centrifugación.
- Eliminar con cuidado el sobrenadante completamente pipeteando. Dejar que seque el pellet durante 5 minutos a temperatura ambiente en el tubo abierto.
- Añadir 20µl de agua comercial libre de RNAsa (ni milliQ ni agua tratada con DEPC) sin pipetear. Dejar 5 min a temperatura ambiente. Vortex durante 1 min, centrifugar brevemente. Pipetear hacia arriba y bajar, girar rápidamente y cuantificar mediante Nanodrop.

Retrotranscripción (RT) y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR): Para cuantificar los niveles de RNAm, se trató el RNA total con DNAasa (Thermo Scientific) y se llevó a cabo la retrotranscripción para obtener el DNA complementario (DNAc). En primer lugar, se utilizaron entre 1 y 5 µg de RNA total como molde para la síntesis de DNAc, empleando oligo-dT como iniciador (0,1 µM) y la enzima transcriptasa reversa MMLV (Revert-Aid, Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNAc resultante se utilizó como molde para las reacciones de PCR, en las que se emplearon oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes a analizar.

Para medir los miRNAs maduros, la PCR cuantitativa se realizó de la siguiente manera: (Schmittgen et al., 2008)

- (1) RT con un cebador de bucle de tallo específico de miRNA, seguido de

(2) PCR cuantitativa utilizando un cebador directo específico de miRNA y un cebador inverso universal (Schmittgen et al., 2008)(Tabla 3).

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando Master Mix So Advanced universal SYBR Green Supermix (Biorad) según protocolo del fabricante (volumen de reacción final de 10  $\mu$ l) y las reacciones se realizaron en un termociclador qPCR Step-One Plus 96 (Applied Biosystems). Los niveles de transcripción se normalizaron a Actina. La fluorescencia se midió a 70°C durante 40 ciclos y los niveles relativos de expresión se determinaron utilizando el método de Ct comparativo. Se recogieron tres muestras independientes de cada condición y genotipo, y se realizaron mediciones por duplicado. Todos los pares de oligos utilizados se tabulan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en determinaciones por PCR cuantitativa

| Gen/<br>transcripto | Anotación      | Forward                  | Reverse                |  |
|---------------------|----------------|--------------------------|------------------------|--|
| <b>Myc</b>          | <b>CR43018</b> | AGCCAGAGATCCGCAACATC     | CGCGCTGTAGAGATTCGTAGAG |  |
| <b>Ago-1</b>        | <b>CG6671</b>  | ATGGAAACCGAACCAACCT      | GCGGCAGATACCCTATGATG   |  |
| <b>Dcr-1</b>        | <b>CG4792</b>  | CATTGCGTTCACCTCCAAG      | TACTGCCGCTCGTTAGCATT   |  |
| <b>droscha</b>      | <b>CG8730</b>  | TTTCACCCACTTGACCCTTG     | ATTCCCAAATCATCGCAAAC   |  |
| <b>pri bantam</b>   | <b>CR43018</b> | GAAAAACGGAAAAACGAACGA    | ACCATCGGAATGTGGAATGT   |  |
| <b>pri mir 1</b>    | <b>CR43027</b> | ATCCAAAACAAAGACCATCCCA   | CGCCAGATTTGCTCCATAC    |  |
| <b>pri mir 2a</b>   | <b>CR42899</b> | ATTATGTGGCGGGAGGTATT     | TGGGCTCTCAAAGTGTTGT    |  |
| <b>pri mir 6</b>    | <b>CR43047</b> | AGAGGGAATAGTTGCTGTGCT    | CCCTTGGGTAAAAACGGCA    |  |
| <b>pri mir 8</b>    | <b>CR42988</b> | TCTTACCGGGCAGCATTAGA     | AAGGTTAAGGACACGGACGA   |  |
| <b>pri mir 124</b>  | <b>CR42937</b> | CGACATAAAGCCCAAGTGTC     | CATTCACCGCGTGCCTTATG   |  |
| <b>pri mir 184</b>  | <b>CR42925</b> | TCAGTTCTCCGTCCAGTTGTC    | AGAAAAGTGTGCAAATCAGTGG |  |
| <b>pri mir 219</b>  | <b>CR42897</b> | CGGAGCGAAAATAAATAAATTTGG | TATTTGAGCCGCGATGCC     |  |
| <b>pri mir 275</b>  | <b>CR43020</b> | AGTGACCGGGGCTGGTTT       | CTGCGAGCATTTGCTTATT    |  |
| <b>pri mir 279</b>  | <b>CR43015</b> | GGACTGGAGCTGGAATTGG      | CGAATGAAGTACACGCGAAG   |  |
| <b>pri mir 283</b>  | <b>CR42980</b> | CACGATTCTCAAAGGTAATATCAG | CGCTTATGGTGATCAAATGC   |  |
| <b>pri mir 305</b>  | <b>CR43032</b> | ATCAGGTGCTCTGGTGTGTCT    | CTTGATCGGTCGCTTTCGT    |  |
| <b>pri mir 306</b>  | <b>CR42914</b> | AAACCCTGGATCACAAATGG     | CAGCACAGGCACAGAGTGA    |  |

|                        |                          |   |                             |                          |
|------------------------|--------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|
| prebantam              | CR43018                  | TTTCATACAAGTGAGATCAT                                  | TTGACAAAATCAGCTTTCAAA       |                          |
| pre mir 1              | CR43027                  | AGCCTTTGAGAGTTCCATGCT                                 | Reverse pri mir 1           |                          |
| Pre mir 2a             | CR42899                  | AAGCTCATCAAAGCTGGCTG                                  | Reverse pri mir 2a          |                          |
| pre mir 6              | CR43047                  | Reverse pri mir 6                                     | AAGAACAGCCACTGTGATAT        |                          |
| pre mir 8              | CR42988                  | Forward pri mir 8                                     | AAGGACACGGACGACATCTTT       |                          |
| pre mir 124            | CR42937                  | TTGGTACGTTTTTCTCCTGGT                                 | Reverse pri mir 124         |                          |
| pre mir 184            | CR42925                  | CCGGTGCATTCTGACCCTTA                                  | AGCCCTTATCAGTTCTCCGTC       |                          |
| pre mir 219            | CR42897                  | AGCTATGATTGTCCAAACGCA                                 | Reverse pri mir 219         |                          |
| pre mir 275            | CR43020                  | Forward pri mir 275                                   | ACCACGCGCGCTACTTCAGG        |                          |
| pre mir 279            | CR43015                  | TGTTTTAGTGGGTGGGGGT                                   | TGAGTGTGGATCTAGTCACAAA<br>T |                          |
| pre mir 283            | CR42980                  | Forward pri mir 283                                   | TCGATACCAACTGAAATCCGA       |                          |
| pre mir 305            | CR43032                  | Forward pri mir 305                                   | CAACATGTGCCGGTTACGA         |                          |
| pre mir 306            | CR42914                  | CACTCGATGGCTCAGGTA                                    | Reverse pri mir 306         |                          |
| Rps15AaCHIP            | CG2033                   | TCCGGCAAAGATCGTTGTCAA                                 | GAGGTGGTGAGCACAACGTA        |                          |
| ago1CHIP_              | CG6671                   | ATGAGGGCAAAGCACTCTCG                                  | GATGACCGCCGATGGTTGTA        |                          |
| dcr1CHIP_              | CG4792                   | CATCGTGGCTGAGGGGATTC                                  | GGCCAATGAAGTGAACCTCG        |                          |
| droshaCHIP_            | CG8730                   | CACTGGCTACAGCGTAAAACG                                 | GTTTACATTCGCACATCCGGC       |                          |
| 305CHIP_               | CR43032                  | AGCATTGATCGCCAACAGC                                   | TCCTGCCACAGAGATAAACC        |                          |
| 283CHIP_               | CR42980                  | AGCGTAGCTCGACTTTAGAGAA                                | ACAGATGGCGGAATAAGGA         |                          |
| 8CHIP_                 | CR42988                  | TCCAAACTGAAACCACTTCCCT                                | CACGATGTTTGCTGCGTGAC        |                          |
| 2ACHIP_                | CR42899                  | AGAGTACAATTCGTTGTGTCGC                                | AGCACTGATTTTTATGCTGCCT      |                          |
| 279CHIP_               | CR43015                  | GTTTTCTGCGTATGGCGGGA                                  | TCCGTTCTGATTTCATCGGCG       |                          |
| bantamCHIP_            | CR43018                  | ACGCTGATGTACGACCGATG                                  | GAGCTTATCCACTCCCACCC        |                          |
| <b>Gene transcript</b> | <b>Annotation symbol</b> | <b>RT</b>   | <b>Forward</b>              | <b>universal Reverse</b> |
| mir8                   | CR42988                  | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG<br>TATTCGCACTGGATACGAGACATC | CTGTCAGGTAAAGATGTC          | GTGCAGGGTCCGAGGT         |
| mir219                 | CR42897                  | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG<br>TATTCGCACTGGATACGAAGAATT | TTGTCCAAACGCAATTCT          | GTGCAGGGTCCGAGGT         |

|        |         |  |                    |                  |
|--------|---------|--|--------------------|------------------|
| mir283 | CR42980 | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG<br>TATTCGCACTGGATACGACCAGAA  | ATCAGCTGGTAATTCTGG | GTGCAGGGTCCGAGGT |
| mir305 | CR43032 | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG<br>TATTCGCACTGGATACGACCAGAGC | ACTTCATCAGGTGCTCTG | GTGCAGGGTCCGAGGT |

## 5.6 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y qPCR.

El ensayo de inmunoprecipitación se realizó con anti-dMyc específico (P4C4-B10, DSHB) y anticuerpos anti-GFP (12A6, DSHB) en larvas de control L3 ( $w^{118}$ ) siguiendo el protocolo de modENCODE (Landt et al., 2012; Sanchez et al., 2019). El DNA inmunoprecipitado específico se detectó mediante PCR cuantitativa utilizando cebadores enumerados en la Tabla 3.

## 5.7 Análisis de datos de ChIP-seq.

La base de datos de ChIP-seq modENCODE (ENCSR191VCQ) de larvas de estadio L3 se utilizó para identificar supuestos genes de miRNAs regulados por dMyc considerando picos ubicados cerca de 5 kb de un TSS (sitio de inicio de transcripción) en experimentos por encima del umbral óptimo de IDR (tasa de descubrimiento de irreproducibilidad) (<https://epic.gs.washington.edu/modERN/>). La unión de dMyc a la región genómica de genes de miRNA también se predijo a través de las bases de datos TransmiR ChIP-seq (ERX242709 y SRX160967; <https://www.cuilab.cn/transmir>). Se utilizaron R (versión 4.0.2) y Bioconductor (versión 3.16) para definir las ubicaciones genómicas de los miRNA y calcular distancias al pico dMyc más cercano (TxDB: 10.18129/B9.bioc.TxDB.Dmelanogaster.UCSC.dm6.ensGene; Lawrence et al., 2013).

## 5.8 Análisis bioinformático.

El paquete FIMO de MEME suite (<https://meme-suite.org/meme/tools/fimo>) fue utilizado para analizar la presencia de secuencias de E-box en regiones de DNA que se superponen con picos de dMyc. Se utilizaron los siguientes motivos Myc obtenidos de la base de datos JASPAR (Castro-Mondragón et. al 2022) : (1) secuencia de E-box canónica (CACGTG) correspondiente a Myc humano (MA0147.3), heterodímero Myc:Max humano (MA0059.1) y MycN (MA0104.4); y (2) secuencias de E-box no canónicas (CACATG) correspondientes al sitio de unión Max

humano (MA0058.2). Se identificó además una secuencia *de novo* utilizando MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>). Para ello, se utilizaron para el análisis secuencias de DNA de los picos dMyc más significativos de modENCODE (enriquecimiento de señal superior al 95 % correspondiente a 800 picos). El motivo enriquecido obtenido se denominó MEME y se utilizó para el análisis (Figura S1).

## 5.9 Análisis estadísticos.

Para los ensayos de sensibilidad al hambreado, las estadísticas se realizaron utilizando GraphPad Prism6, que utiliza Kaplan-Meier para calcular fracciones de supervivencia, así como la mediana y el máximo valores de supervivencia. Las curvas se compararon mediante la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). El valor-p de dos colas indica el valor de la diferencia entre las dos distribuciones de supervivencia en comparación.

Graphpad Prism6 se utilizó para análisis estadísticos y representaciones gráficas basadas en tres o más réplicas para cada experimento. Todas las pruebas de significancia se realizaron con Pruebas t de Student de dos colas no apareadas. Valores de P de significancia: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns p > 0,05.

## 5.10 Tratamientos.

### Tratamientos de hambreado y experimentos de sobrevida.

Todos los experimentos de hambreado fueron realizados siguiendo los protocolos (Géminard et al., 2009; Palanker et al., 2009; Rajan y Perrimon, 2012). El hambreado genera una restricción de dieta que pone a prueba la capacidad del animal para movilizar los nutrientes almacenados para sobrevivir.

### Tratamiento de hambreado en larvas.

Para los tratamientos de inanición en larvas, los animales fueron sincronizados para ello se recolectaron huevos durante intervalos de 8 hs y las larvas se transfirieron a viales que contenían alimento estándar inmediatamente después de la eclosión (larvas de primer estadio, L1) a una densidad de 50 larvas por tubo. Luego, las larvas se criaron a 25° C durante 72 hs antes del ensayo de inanición. Las larvas L3 se lavaron con PBS y se colocaron en placas de Petri invertidas de 60 mm con solución salina tamponada con fosfato (PBS) empapada en papel Whatman (inanición, STV) o mantenida en alimentos estándar (bien alimentados, WF).

Cada placa se selló con parafilm y se incubó a 25°C durante la duración del experimento. Después del período de inanición, larvas completas o cuerpos grasos diseccionados se utilizaron para inmunotinción o extracción de RNA.

#### Tratamiento de sensibilidad al hambre en adultos.

Para ensayos de sensibilidad al hambre utilizando un Gal4 de cuerpo graso, se utilizaron moscas adultas de 5-7 días, para descartar posibles efectos del cuerpo graso en la remodelación durante la metamorfosis y adultos jóvenes. Se realizaron ensayos de sensibilidad a la inanición en animales criados en condiciones sin hacinamiento, transfiriendo de 15 a 20 moscas de cada género a tubos que contenían 0,5 % de agar y 0 % de sacarosa. Las moscas se transfirieron a tubos nuevos todos los días y las moscas muertas se contaron cada 6 hs. Se utilizaron al menos 100 individuos por genotipo. Los animales de control siempre fueron analizados en paralelo en cada condición experimental. El número de individuos utilizados en cada experimento se detalla en la Tabla S2. Para ensayos de sensibilidad a la inanición utilizando el Línea GSG132-Gal4, los adultos fueron transferidos a alimentos suplementados con 50 µg/ml de RU-486 (Sigma). Después de 5 a 7 días, las moscas de cada genotipo se transfirieron a viales que contienen agar al 0,5 % en PBS junto con 50 µg/ml de RU-486.

Para evaluar la generación de nuevas células ECs tras un tratamiento de realimentación posterior al estrés nutricional, se utilizó la línea *esg<sup>ReDDM</sup> ts*. Se seleccionaron moscas hembras de 3-5 días de edad criadas a 18°C durante el desarrollo, se agruparon 10 moscas por vial, y se transfirieron a 29°C durante 20 días antes de la disección. El tratamiento de estrés nutricional consistió en someter a las moscas a una dieta de agar al 0.5 % durante 24 hs, 7 días antes de la disección.

En el experimento para medir las longitudes intestinales bajo condiciones de estrés nutricional, se seleccionaron moscas de entre 3-5 días de edad. Se aplicaron tratamientos de 24 hs de estrés nutricional, seguidos de 24 hs de realimentación, y se compararon con un grupo control alimentado con comida normal.

#### Tratamientos de sensibilidad al estrés oxidativo

Para evaluar la regeneración por el estrés oxidativo utilizando la línea *esg<sup>ReDDM</sup> ts*, se seleccionaron moscas hembras de 3-5 días de edad criadas a 18°C durante el desarrollo, se agruparon 10 moscas por vial y se transfirieron a 29°C durante 20 días antes de la disección. El tratamiento de estrés oxidativo se realizó con Paraquat a una concentración de 2,5 mM durante 18 hs, 7 días antes de la disección.

Para el experimento de longitudes de intestino, se realizaron tratamientos de 24 hs con Paraquat 2.5 mM, y 24 hs de Paraquat 2.5 mM + 24 hs de recuperación, y se compararon con el tratamiento control de comida normal .

## **Resultados**

## 6. Resultados.

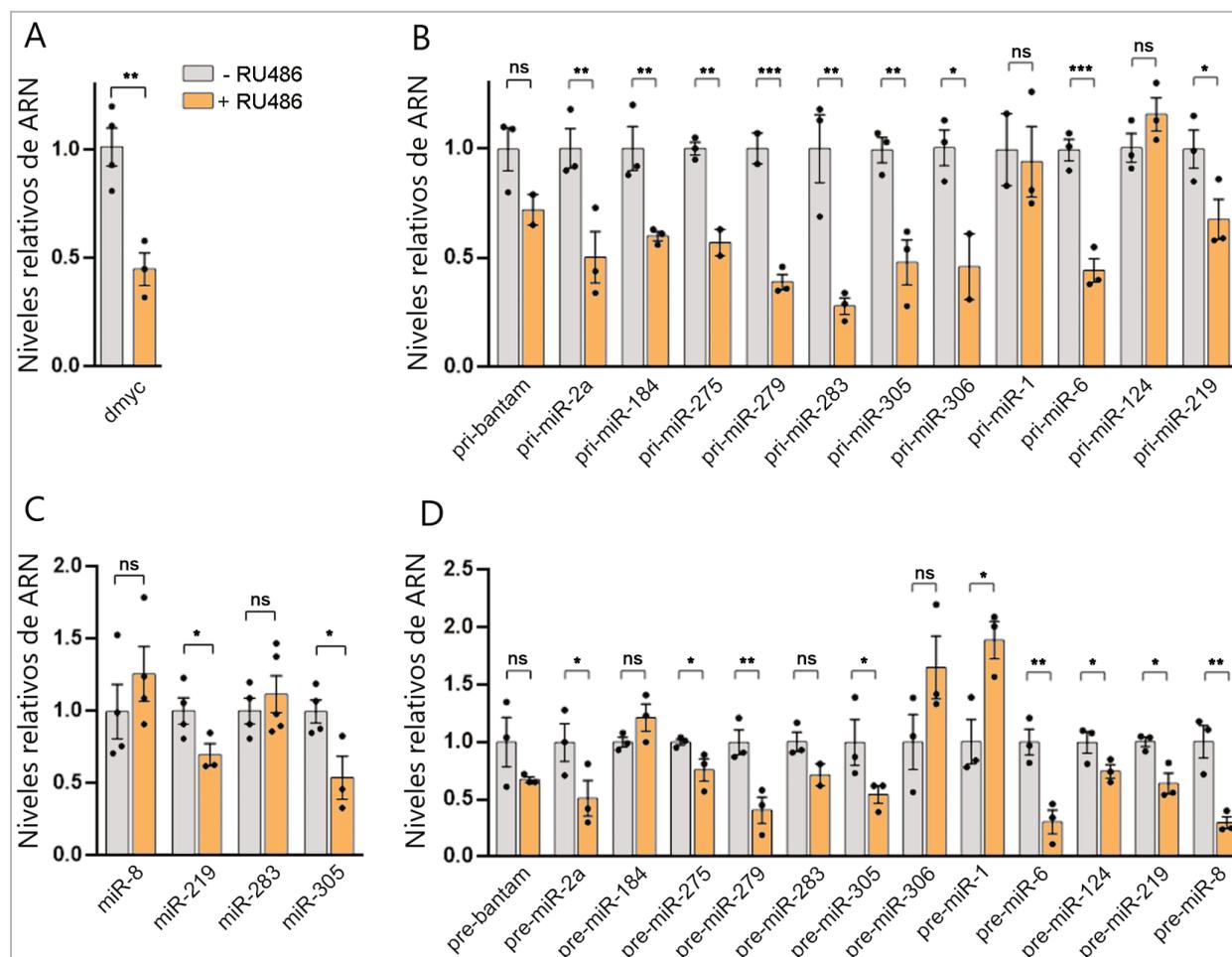
Parte 1. miRNAs regulados por dMyc modulan la expresión de Dmp53 e influyen en la supervivencia del animal bajo condiciones de privación de nutrientes.

Para abordar el objetivo general y los dos primeros objetivos específicos de esta tesis, se estudió inicialmente si el factor de transcripción dMyc regulaba tanto la expresión como la biogénesis de miRNAs. Además, se analizó específicamente la regulación transcripcional del miR-305 mediada por dMyc. Esta línea de estudio fue de particular importancia, ya que permitió explorar la posible regulación de Dmp53 por dMyc a través del miR-305, así como su importancia fisiológica en respuesta al estrés nutricional.

### 6.1.1 Regulación de la transcripción de miRNAs mediada por dMyc en *Drosophila melanogaster*.

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, hay evidencia que respalda el rol de Myc en la regulación de los miRNAs (Chang et al., 2007; Dews et al., 2006; Ma et al., 2010; O'Donnell et al., 2005). En base a estos antecedentes, se propuso analizar en larvas de *Drosophila melanogaster* la regulación a nivel transcripción de miRNAs por dMyc. Para ello, se midieron los niveles de transcritos de un grupo representativo de miRNAs bajo condiciones de pérdida de función de dMyc. El experimento se llevó a cabo expresando un RNA de interferencia específico para dMyc (*myc<sup>RNAi</sup>*) utilizando un sistema inducible por hormonas (*gene switch-Gal4; GS-Gal4*) (Nicholson et al., 2008). En este sistema, la proteína de fusión GAL4-receptor de progesterona se expresa bajo un promotor ubicuo y se activa solo en presencia del activador RU-486. Como se observa en la Figura 14, los animales *GSG >myc<sup>RNAi</sup>* tratados con RU-486 durante 72 hs mostraron niveles reducidos de transcritos de *dmyc* en comparación con el control (larvas *GSG >myc<sup>RNAi</sup>* en ausencia de hormona). Además, se observó una disminución en los niveles de miRNAs primarios (pri-miRNA) y de algunos precursores y miRNAs maduros, como

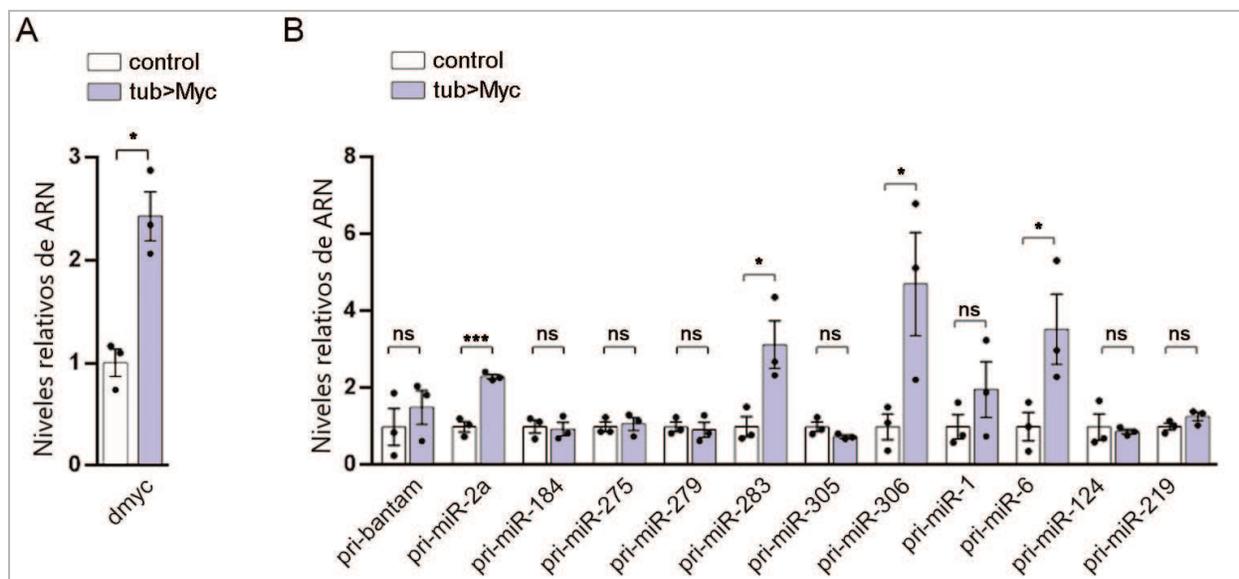
*miR-219* y *miR-305* (Figura 14 B, D y C). Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de *miR-8* y *miR-283*, lo que podría atribuirse a su estabilidad.



**Figura 14. Niveles de miRNAs en presencia y ausencia de dMyc.** (A) qRT-PCR que muestra los niveles de transcritos de *dmyc* en larvas de *GSG>myc<sup>RNAi</sup>* en ausencia o presencia de RU-486. (B-D) qRT-PCR que muestra los niveles relativos de pri-miRNAs (B), pre-miRNAs (D) o mi-RNAs maduros (C) en larvas del genotipo *GSG >myc<sup>RNAi</sup>* en ausencia o presencia de RU-486. Los resultados se expresan como cociente respecto al control. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada genotipo y condición. Media ± SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \* p<0.05; \*\* p<0.01; ns: no significativo.

Posteriormente, realizamos experimentos de ganancia de función de dMyc utilizando moscas transgénicas que expresan *dmyc* bajo el control del promotor de tubulina (*tubulin myc*). Esta línea nos permitió incrementar los niveles de transcritos de *dmyc* entre dos y tres veces (Figura 15A). En este experimento, se observó una regulación positiva de algunos pri-miRNAs, como *pri-miR-283*, *pri-miR-306*, *pri-miR-6* y *pri-miR-2a* (Figura 15B). Sin embargo, la

sobreexpresión de dMyc no mostró efectos significativos en otros pri-miRNAs, lo que podría indicar una saturación en la capacidad de dMyc para unirse a los promotores de dichos genes.



**Figura 15. Niveles de miRNAs en experimentos de ganancia de función de dMyc** (A) qRT-PCR que muestra los niveles de mRNA de *dmyc* en larvas control (*w<sup>118</sup>*) y *tub>dMyc*. (B) qRT-PCR que muestra la expresión de pri-miRNAs en larvas control (*w<sup>118</sup>*) y *tub>dMyc*. Los resultados se expresan como cociente respecto al control. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada genotipo y condición. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: no significativo.

En conjunto, estos resultados destacan el papel regulador de dMyc en la expresión de un grupo de miRNAs en *Drosophila melanogaster*.

### 6.1.2 Asociación de dMyc con la región genómica de miRNAs.

Para determinar si los genes de miRNAs regulados por dMyc son objetivos directos de este factor de transcripción, analizamos datos de modENCODE, una base de datos curada de sitios de unión de diversos factores de transcripción, entre ellos dMyc, obtenidos mediante secuenciación genómica de experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-Seq) en larvas de estadio 3 (L3) de *Drosophila melanogaster* (<http://epic.gs.washington.edu/modERN>) (Kudron et al., 2018). Nos enfocamos en los 253 genes de miRNAs registrados en la base de datos de miRNAs de *Drosophila melanogaster* (miRBase Release 22.1, <http://www.mirbase.org>) y encontramos 111 sitios de unión de dMyc que potencialmente cubren 119 miRNAs (Figura 16A y Tabla S1; ver Materiales y Métodos Sección 5.7 para más detalles).

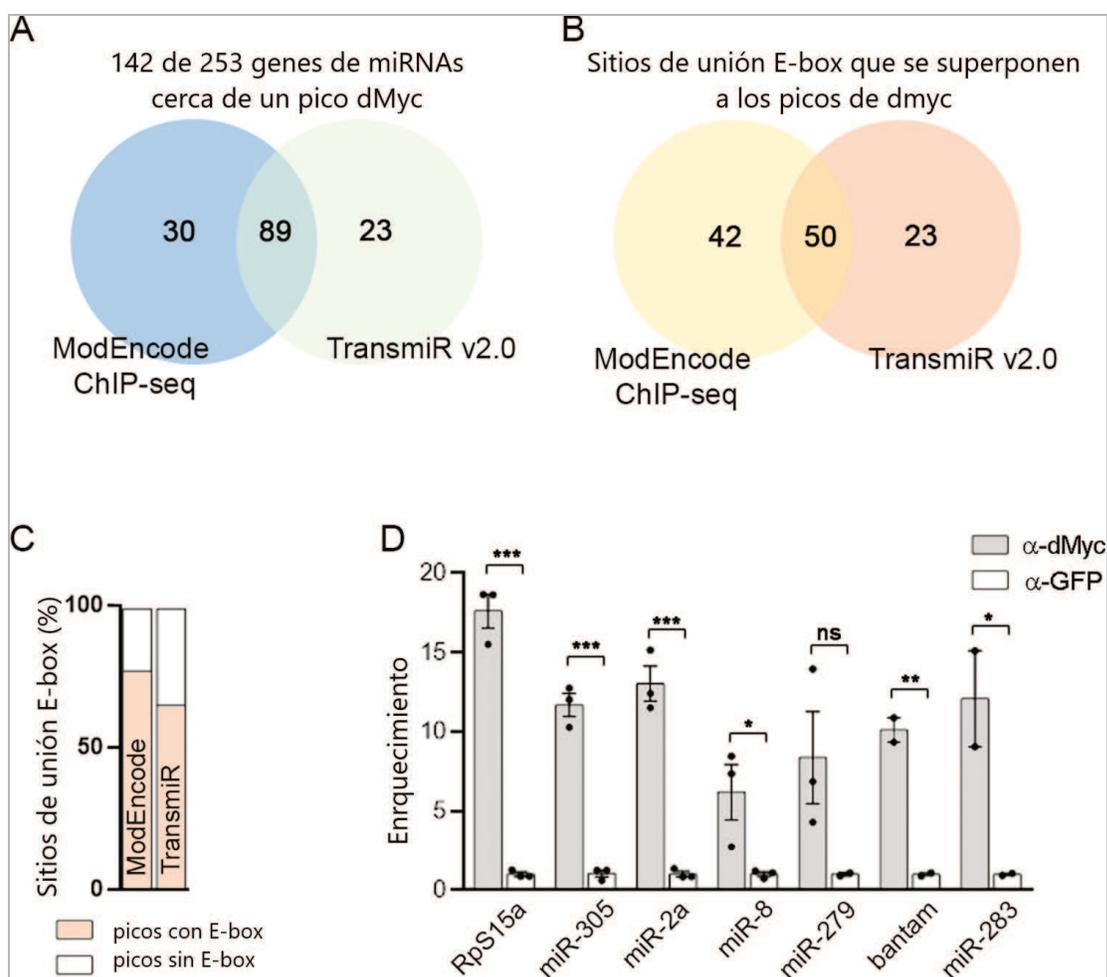
Obtuvimos resultados similares al utilizar conjuntos de datos de ChIP-Seq de dMyc en células cultivadas de *Drosophila melanogaster*, disponibles en la base de datos TransmiR v2.0 (Tong et al., 2019) (Figura 16A). En total, identificamos 142 miRNAs potencialmente regulados por dMyc que aparecen en al menos uno de estos conjuntos de datos, lo que representa el 56 % de los transcritos de miRNAs del genoma de *Drosophila melanogaster*.

Realizamos una caracterización adicional sobre las regiones genómicas asociadas a dMyc, la cual reveló una alta presencia de secuencias E-box, tanto canónicas como no canónicas, así como un motivo putativo enriquecido de unión a dMyc identificado mediante un descubrimiento de motivos *de novo* no sesgado utilizando MEME (Figura S1; ver Materiales y Métodos Sección 5.8 para más detalles), lo que sugiere un papel directo de dMyc en la regulación de la expresión de miRNAs (Figuras 16B-C y Tabla S1).

Para analizar si el grupo de genes de miRNAs se encuentra sobrerrepresentado dentro de la lista de genes totales que dMyc es capaz de unir, realizamos un análisis de enriquecimiento basado en la distribución hipergeométrica. Este análisis evalúa la probabilidad de obtener una cantidad igual o mayor de genes de miRNAs en un grupo específico, asumiendo una selección aleatoria. Los resultados mostraron un enriquecimiento significativo de genes de miRNAs, con un incremento de 2.64 veces en comparación con lo esperado al azar (valor p hipergeométrico =  $7.7e-25$ ). Este hallazgo refuerza la asociación significativa entre dMyc y los genes de miRNAs.

Confirmamos la unión de dMyc al locus genómico de un grupo seleccionado de genes de miRNAs mediante experimentos de ChIP-qPCR, utilizando un anticuerpo anti-dMyc previamente validado (Herter et al., 2015). Observamos un enriquecimiento significativo de los genes de miRNAs seleccionados y del control positivo RpS15a (Herter et al., 2015) en las muestras de ChIP de dMyc, en comparación con el control negativo (Figura 16D).

En conjunto, estos hallazgos demuestran la asociación de dMyc a los loci de 115 miRNAs que, además, presentan secuencias E-box, proporcionando una fuerte evidencia de que estos miRNAs están regulados directamente por dMyc.

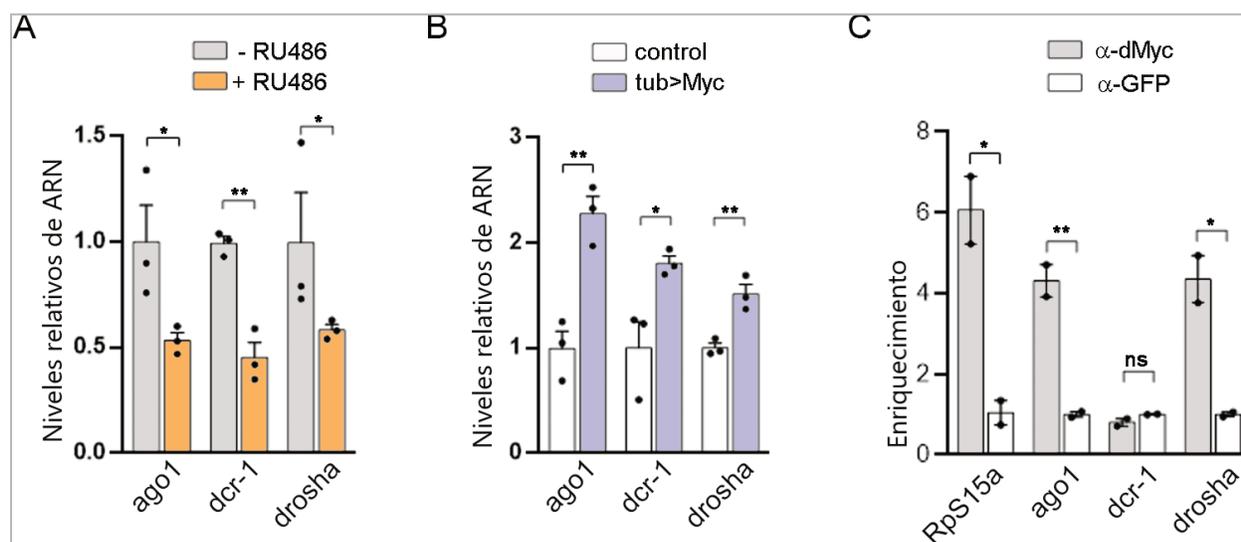


**Figura 16. Identificación de miRNAs regulados directamente por dMyc en *Drosophila melanogaster*.** (A) Diagramas de Venn que muestran la superposición entre las bases de datos de CHIP-seq para dMyc (Kudron et al., 2018; Tong et al., 2019) (B-C) Gráfico de enriquecimiento de secuencias E-box canónicas y no canónicas que se superponen con los picos de dMyc en el locus de los genes de miRNAs candidatos regulados por dMyc. (D) Ensayos de CHIP-qPCR que muestran la unión de dMyc al locus de los genes indicados. Los resultados se expresan como enriquecimiento en comparación con las muestras de control anti-GFP. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t de dos colas no apareadas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: no significativo.

### 6.1.3 Regulación de dMyc sobre los principales factores de la biogénesis de miRNAs.

De estudios previos en cultivos de células de mamíferos, se sabe que Myc puede regular la expresión de Drosha, una enzima clave en el procesamiento nuclear de pri-miRNAs (Wang et al., 2013). De esta manera, analizamos larvas de genotipo  $GSG >myc^{RNAi}$  y observamos que los niveles de transcripto de *dcr-1*, *drosha* y *ago-1* disminuyeron significativamente en animales

tratados con RU-486 en comparación a los no tratados (Figura 17A). Mientras que, en sentido opuesto, los niveles de mRNAs de dichos genes se vieron aumentaron en animales *tub>dMyc* (Figura 17B). Luego, evaluamos la unión de dMyc al locus genómico de estos genes mediante ChIP-qPCR, y encontramos una asociación significativa de dMyc con la región promotora de *ago-1* y *drosha* (Figura 17C). Sin embargo, no se detectó un enriquecimiento significativo de dMyc en el promotor de *dcr-1*, lo que sugiere que los menores niveles de expresión de *dcr-1* debido a la deficiencia de dMyc podría deberse a un efecto indirecto.



**Figura 17. Regulación de la maquinaria de miRNAs por dMyc.** (A-B) qRT-PCR que muestra los niveles de mRNA de *dcr-1*, *drosha* y *ago-1* en larvas *GSG>myc<sup>RNAi</sup>* con y sin RU-486 (A), y en en larvas *tub>dMyc* (B). Los resultados se expresan como cociente respecto al control. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada genotipo y condición. (C) Ensayos de ChIP-qPCR que muestran la unión de dMyc a la región promotora de los genes indicados. Los resultados se expresan como enriquecimiento en relación con las muestras de control anti-GFP. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t de dos colas no apareadas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns: no significativo.

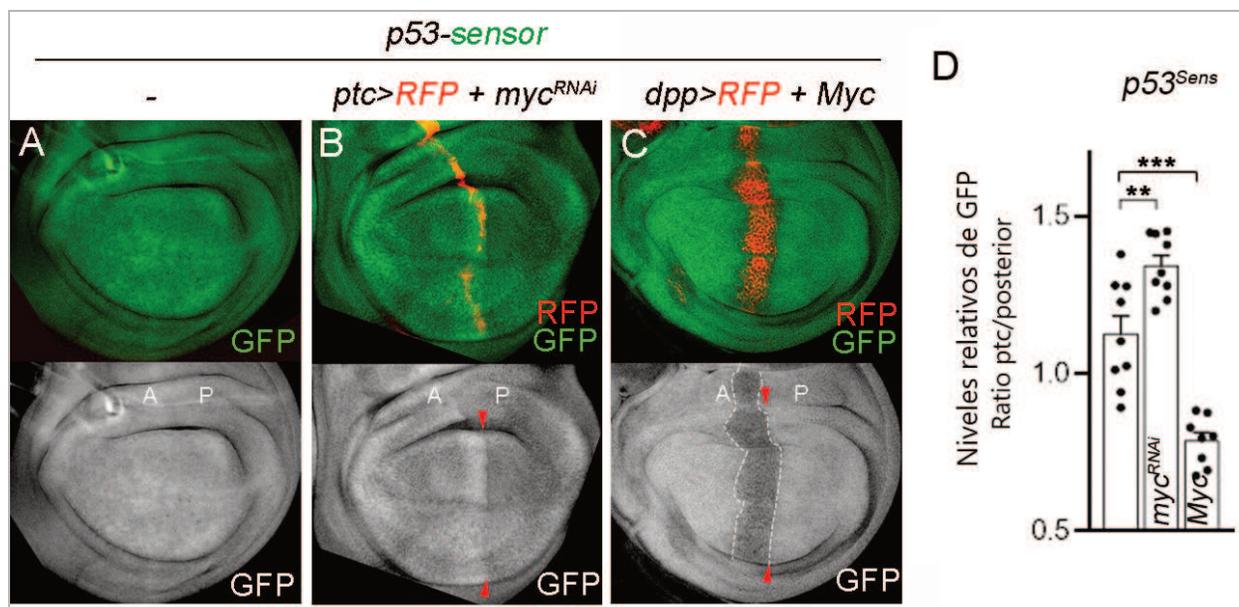
Estos resultados indican que la actividad de dMyc es esencial para la biogénesis de miRNAs, ya que regula tanto la expresión de pri-miRNAs como los componentes claves de la maquinaria de miRNAs.

#### 6.1.4 Regulación de sensores de la actividad de miRNAs por dMyc en el primordio del ala de *Drosophila melanogaster*.

Se ha demostrado previamente que la expresión de Dmp53, está regulada por miRNAs tanto en el disco imaginal de ala como en el cuerpo graso (Barrio et al., 2014). Es interesante destacar que tres miRNAs específicos (miR-283, miR-219, miR-305), identificados previamente como reguladores de la expresión de Dmp53 en el primordio del ala (Barrio et al., 2014), mostraron niveles reducidos al expresar *myc<sup>RNAi</sup>* (Figura 14B) y presentaron unión de dMyc a su región genómica (Figura 16D y Tabla S1).

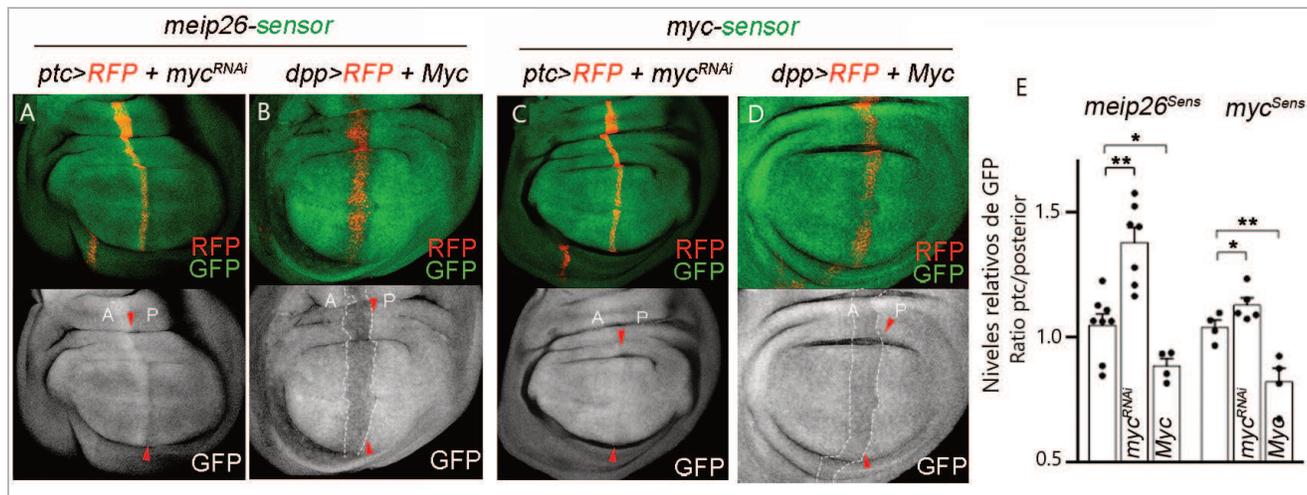
Los resultados descritos anteriormente sugieren que dMyc no solo regula la expresión de ciertos miRNAs, sino que también influye de manera más general en su procesamiento y actividad, al controlar elementos claves involucrados en su biogénesis. Para profundizar en el análisis del papel de dMyc en la regulación de la función de los miRNAs, utilizamos un sensor de actividad de miRNAs, el cual se basa en la regulación de la expresión de Dmp53 (y otros genes) mediada por miRNAs en el primordio del ala de *Drosophila melanogaster*. El sensor *p53-3'UTR* consiste en la región 3'UTR de *dmp53* clonada corriente abajo del gen reportero *EGFP*, cuya expresión está regulada por el promotor de tubulina. Este sensor permite detectar alteraciones en la maquinaria de miRNAs, ya que la interferencia con dicha maquinaria resulta en un aumento de los niveles de expresión de GFP (Figura S2A; Barrio et al., 2014).

En línea con un papel de dMyc en la regulación de la biogénesis de miRNAs, la expresión de *myc<sup>RNAi</sup>* en una franja de células anteriores adyacentes al borde anteroposterior (AP), utilizando *ptc-Gal4*, resultó en niveles aumentados de GFP en el sensor *p53-3'UTR* (Figura 18A-B, ver también Figura 18D para cuantificaciones de los niveles de intensidad de GFP). Por el contrario, la sobreexpresión de dMyc utilizando *dpp-Gal4* resultó en una reducción significativa de la señal de GFP (Figura 18C-D).



**Figura 18. Regulación de la actividad del sensor *p53-3'UTR* por dMyc en el primordio del ala.** (A-C) Discos imaginales de ala que contienen el sensor *p53-3'UTR* junto con los transgenes indicados, teñidos para visualizar GFP (en verde o blanco). (D) Niveles relativos de intensidad de GFP entre los dominios *ptc*(patched) y posterior de discos imaginales de ala de los genotipos indicados. Los discos imaginales de ala en (B) expresaron *myc<sup>RNAi</sup>* bajo el control de *ptc-Gal4* (marcado por la expresión de RFP, en rojo). Los discos imaginales de ala en (C) expresaron *dmyc* bajo el control de *dpp-Gal4* (marcado por la expresión de RFP, en rojo). Las flechas rojas indican el límite anterior-posterior (A-P). A: anterior; P: posterior. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , ns: no significativo.

Ampliamos nuestro análisis para incluir sensores de miRNAs alternativos (miR-GFP) basados en la región 3'UTR de los genes *meip26* (*meip26 sensor*) y *dmyc* (*myc sensor*), ambos regulados por miRNAs en el primordio de ala de *Drosophila melanogaster* (Ferreira et al., 2014; Herranz et al., 2010). Consistente con un rol general de dMyc en regular la biogénesis de miRNAs, la depleción de este FT resultó en un aumento de la expresión de dichos sensores (Figura 19A y 19C). Por el contrario, la sobreexpresión de dMyc resultó en una fuerte reducción de los niveles de GFP (Figura 19B y 19D).



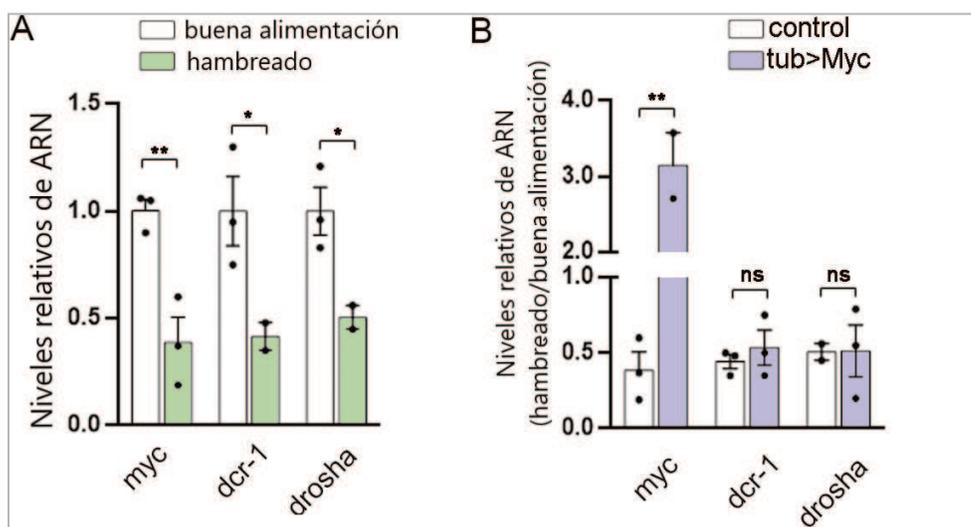
**Figura 19. Regulación de la actividad de sensores de miRNAs por dMyc en el primordio del ala.** (A-D) Discos imaginales de ala que llevan el sensor *meip26* (A-B) o el sensor *myc* (C-D) junto con los transgenes indicados, teñidos para visualizar GFP (en verde o blanco). (E) Niveles relativos de intensidad de GFP entre los dominios *ptc*(patched) y posterior de discos imaginales de ala de los genotipos indicados. Los discos imaginales de ala en (A,C) expresaron *myc<sup>RNAi</sup>* bajo el control de *ptc-Gal4* (marcado por la expresión de RFP, en rojo). Los discos imaginales de ala en (B,D) expresaron *dMyc* bajo el control de *dpp-Gal4* (marcado por la expresión de RFP, en rojo). Las flechas rojas indican el límite anterior-posterior (A-P). A: anterior; P: posterior. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , ns: no significativo.

Estos hallazgos indican que dMyc es capaz de regular los niveles de miRNAs, más allá de solo aquellos que regulan Dmp53. Además, estos resultados indican que dMyc juega un papel crucial en la regulación de la biogénesis de miRNAs en el primordio del ala de *Drosophila melanogaster*, influyendo tanto en la expresión de genes de miRNAs como en su procesamiento.

### 6.1.5 dMyc regula la expresión de miR-305 en el cuerpo graso según la disponibilidad de nutrientes.

Se ha demostrado que la expresión de componentes claves de la maquinaria de miRNAs está influenciada por la disponibilidad de nutrientes en el FB de animales sometidos a privación de alimentos (Barrio et al., 2014). Durante el ayuno, la disminución de los niveles de *dcr-1* y la biogénesis alterada de miRNAs resultan en la activación de Dmp53, lo cual favorece la homeostasis metabólica y la supervivencia frente al estrés por la falta de nutrientes (Barrio et al., 2014; Ingaramo et al., 2020).

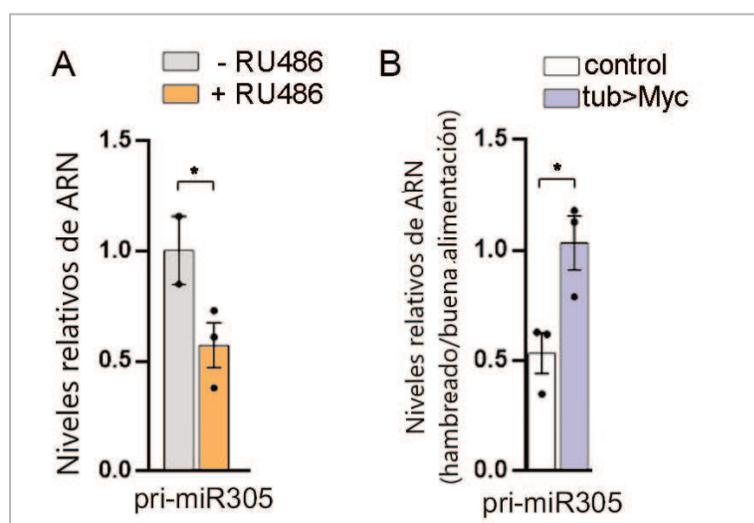
Dado que la expresión de *dcr-1* y *drosha* se redujo drásticamente en larvas que expresaban *myc<sup>RNAi</sup>* (Figura 17A), la reducción en la expresión de los genes de biogénesis de miRNAs frente al ayuno podría ser una consecuencia directa de alteraciones en niveles de dMyc. De hecho, los niveles de mRNA de *dmyc* se ven drásticamente disminuidos en el FB de animales *w<sup>118</sup>* privados de nutrientes (Figura 20A). Para comprobar si la restauración de los niveles de dMyc podría revertir estos efectos, se utilizó la línea *tub>dMyc*, la cual mostró niveles sostenidos de dMyc tras 24 hs de ayuno. A pesar de esto, los resultados mostraron que la expresión ubicua de dMyc no fue suficiente para rescatar los niveles reducidos de *dcr-1* y *drosha* en el FB de animales privados de alimentos (Figura 20B).



**Figura 20. dMyc no regula a nivel transcripcional la biogénesis de miRNAs en el FB.** (A) qRT-PCR mostrando los niveles de RNA mensajero de *myc*, *dcr-1* y *drosha* en el FB de larvas sometidas a condiciones de alimentación o de privación de alimento. (B) qRT-PCR mostrando los niveles de transcritos de *myc*, *dcr-1* y *drosha* en el FB de larvas de los genotipos indicados sometidas a condiciones de buena alimentación o hambreado. Los resultados se expresan

como cociente respecto al control (A) y como ratio de niveles de RNA en hambreado/buena alimentación. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns: no significativo.

Entre los tres miRNAs que previamente se identificaron como reguladores de la expresión de Dmp53 en el primordio del ala, sólo miR-305 ha demostrado reprimir la expresión de Dmp53 en el FB (Barrio et al., 2014). Curiosamente, la expresión de *pri-miR-305* se redujo significativamente en animales con deficiencia de dMyc (Figura 14B), y se demostró la unión de dMyc a su región promotora (Figuras 16A y 16D), lo que sugiere que la expresión de miR-305 podría estar comprometida bajo privación de nutrientes y podría depender de dMyc. Para corroborar esto, se midieron los niveles de *pri-miR-305* en el FB de larvas *w<sup>118</sup>* privadas de alimentos, observándose una disminución significativa (Figura 21A). Posteriormente, se evaluó si la sobreexpresión de dMyc podría revertir esta disminución. Utilizando la línea *tub>myc*, se observó que la sobreexpresión de dMyc durante 24 hs de ayuno restauró los niveles de *pri-miR-305* a valores normales (Figura 21B).



**Figura 21. dMyc regula a nivel transcripcional el pri-miR-305 en el FB.** (A) qRT-PCR mostrando los niveles de *pri-miR-305* en el FB de larvas *GSG162>myc<sup>RNAi</sup>* en ausencia o presencia de RU-486. (B) qRT-PCR mostrando los niveles de transcritos de *pri-miR-305* en el FB de larvas de los genotipos indicados sometidas a condiciones de buena alimentación o hambreado. Los resultados se expresan como cociente respecto al control (A) y como ratio de niveles de RNA en hambreado/buena alimentación. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; ns: no significativo.

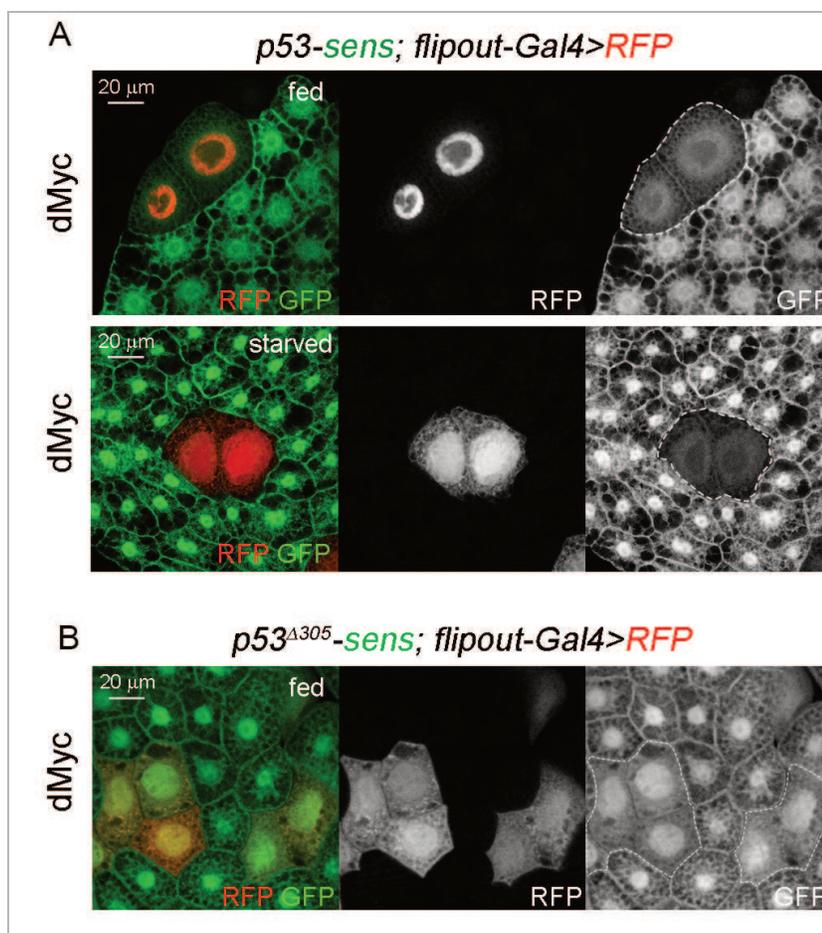
Estos hallazgos sugieren que en el FB bajo privación de nutrientes, la transcripción de miR-305 está directamente regulada por dMyc, mientras que la expresión de *dcr-1* y *droscha* por un mecanismo independiente de dMyc. Un estudio reciente de nuestro laboratorio indica que el

factor de transcripción FOXO reprime los niveles de expresión de *dcr-1* bajo privación de nutrientes, lo que sugiere la existencia de vías regulatorias alternativas (Sanchez et al., 2023). Se necesita más investigación para determinar el mecanismo de regulación de Drosha bajo estrés nutricional.

### 6.1.6 La regulación de miR-305 mediada por dMyc y su función en la resistencia a la privación de nutrientes.

Decidimos estudiar las consecuencias funcionales de la regulación de miR-305 por dMyc sobre los niveles de Dmp53 y la supervivencia del organismo bajo estrés nutricional. Comenzamos monitoreando la represión de Dmp53 mediada por miR-305, utilizando el sensor *p53-3'UTR* y el sensor *p53Δ305-3'UTR*, el cual carece del sitio de unión para miR-305 (Barrio et al., 2014). Previamente se demostró que al exponer a las larvas a la privación de nutrientes, el sensor *p53* mostró niveles elevados de GFP, mientras que el sensor *p53Δ305* no presentó cambios en este parámetro, indicando que el miR-305 sería relevante en la regulación de Dmp53 en estrés nutricional (Barrio et al., 2014).

En línea con el papel de dMyc en reprimir la expresión de Dmp53 vía mir-305, las células que sobreexpresaban dMyc mostraron niveles reducidos del sensor *p53* en las células del FB de animales bien alimentados y privados de alimento, pero no tuvieron efecto sobre la expresión del sensor *p53Δ305* (Figuras 22A-B). Las células que expresan dMyc están marcadas por la expresión de proteína fluorescente roja.



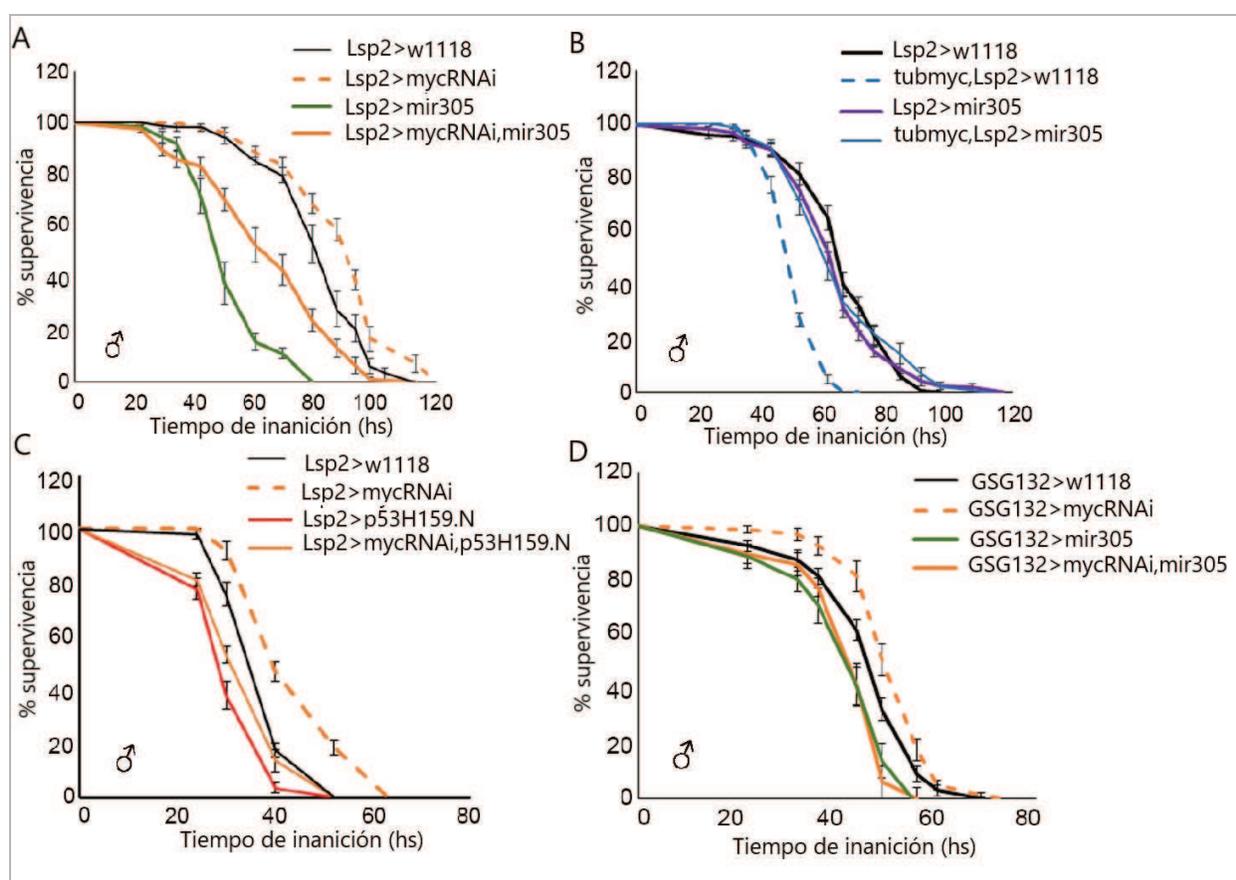
**Figura 22. dMyc regula la expresión de miR-305 en el FB bajo estrés nutricional.** (A-B) Línea flipout-Gal4 utilizada para la sobreexpresión de dMyc en células individuales del FB. Las células que sobreexpresan dMyc están marcadas con RFP, en rojo o blanco. Se muestra el sensor de *p53* en animales alimentados y privados de alimento (A; en verde o blanco), y el sensor *p53<sup>Δ305</sup>* (B; en verde o blanco). Escala: 20 μm.

Se ha descrito que menores niveles de dMyc resultan en la extensión de la sobrevivencia (Greer et al., 2011; Hoffman et al., 2015), lo que nos llevó a preguntarnos si este efecto podría estar mediado a través de miR-305 y Dmp53. Para ello, evaluamos las tasas de supervivencia de las moscas adultas sometidas a privación de nutrientes. La expresión dirigida de *myc<sup>RNAi</sup>* en células del FB (moscas *Lsp2>myc<sup>RNAi</sup>*) aumentó las tasas de supervivencia de moscas adultas, sometidas a privación de nutrientes en comparación con las moscas control (Figuras 23A y 23C, y Tabla S2). Curiosamente, las tasas de supervivencia extendidas se revirtieron al coexpresar miR-305 (Bejarano et al., 2012) (*Lsp2>myc<sup>RNAi</sup>, mir-305*; Figura 23A y Tabla S2) o la versión dominante negativa de Dmp53 (*p53<sup>H159.N</sup>*), generada por una mutación puntual en el dominio de unión al DNA (Ollmann et al., 2000) (*Lsp2>myc<sup>RNAi</sup>, p53<sup>H159.N</sup>*; Figura 23C y Tabla S2).

Por el contrario, mientras que la expresión ubicua de dMyc (moscas *tub>dMyc*) redujo las tasas de supervivencia de las moscas adultas expuestas a condiciones de inanición (Figura 23B

y Tabla S2), la reducción de la actividad de miR-305 mediante la expresión de una construcción esponja de miR-305 (Fulga et al., 2015) en el FB revirtió completamente la sensibilidad a la inanición causada por la sobreexpresión de dMyc (moscas *tubMyc; Lsp2>miR-305 esponja(sp)*; Figura 23B y Tabla S2). Resultados similares se obtuvieron al modular los niveles de dMyc o miR-305 específicamente en el tejido graso adulto usando *GSG-Gal4* en presencia de RU-486 (Figura 23D y Tabla S2).

En conjunto, estos resultados indican que dMyc regula la expresión de miR-305 en el FB de manera dependiente de nutrientes, influyendo en los niveles de Dmp53 y en la resistencia al estrés por privación de nutrientes.



**Figura 23. Resistencia a la privación de nutrientes tras la modulación específica de dMyc, miR-305 y Dmp53 en el FB.** (A-E) Tasas de supervivencia a la privación de nutrientes de moscas adultas de los genotipos indicados, comparadas con moscas control sometidas al mismo procedimiento. En (A,B y C) se utilizó *Lsp2-Gal4*. En (D) se utilizó la línea *GSG132-Gal4* para expresar *dmyc* o *miR-305* específicamente en el FB adulto. Los adultos recién emergidos de cada genotipo se transfirieron a un alimento suplementado con 50  $\mu\text{g/ml}$  de RU-486 (Sigma). Después de 5 a 7 días, las moscas se transfirieron a frascos que contenían 2 % de agar en PBS junto con 50  $\mu\text{g/ml}$  de RU-486. Consulte la Tabla S2 para n, valor p, mediana y valores.

## Parte 2. Dmp53 y su impacto en la homeostasis intestinal.

Estudios previos han demostrado que miR-305 juega un papel en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*, regulando la homeostasis del tejido a través de la vía Notch (Foronda et al., 2014). Dado que *dmp53* es un gen blanco del miR-305 en el FB de la mosca, en esta segunda parte de la tesis nos propusimos investigar el posible rol de Dmp53 en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*, así como la importancia fisiológica de su regulación por el miR-305 en dicho tejido.

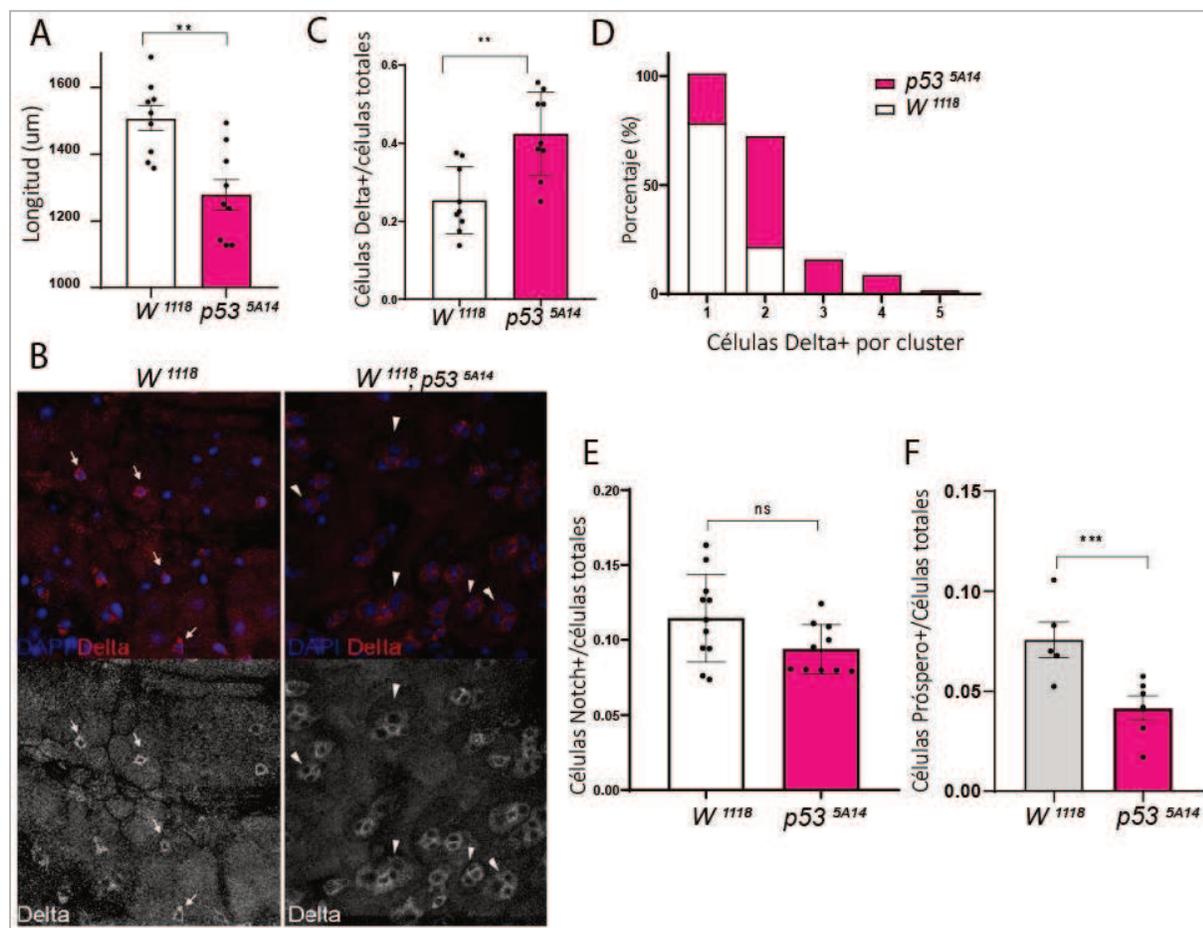
### 6.2.1 Dmp53 es un regulador clave de la composición celular del intestino medio.

Para investigar el papel de Dmp53 en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*, inicialmente analizamos la longitud del intestino. Para todas las disecciones, salvo que se especifique lo contrario, se fijaron intestinos de moscas adultas hembras (5-7 días de edad) crecidas en condiciones normales de alimentación. Comparamos el grupo control ( $w^{118}$ ) con moscas mutantes para Dmp53 (homocigotas para el alelo nulo  $p53^{5A14}$  que consiste en una delección de 3,3 kb cubriendo casi todo el gen (Rong et al., 2002)). Observamos que la reducción en los niveles de Dmp53 resultó en intestinos de menor tamaño en comparación con el control (Figura 24A).

Analizamos la composición celular de los intestinos  $w^{118}$  y  $p53^{5A14}$ . Para ello, marcamos las ISCs por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-Delta. Como se observa en la Figura 24B-C, el número de ISCs en los intestinos de moscas  $p53^{5A14}$  es significativamente mayor que en las moscas control. Aún más interesante, el número de células Delta+ observadas por cada clúster de células madre es considerablemente mayor en moscas  $p53^{5A14}$  (Figura 24D). Mientras que en moscas control la mayor parte de los clústeres de ISCs están compuestos por 1 única célula (78 % de los casos), en ausencia de Dmp53 solo el 24 % de los clústeres cae en esta categoría versus el 76 % que posee entre 2-5 células Delta+ por cluster (Figura 24D).

Como se comentó en la introducción, las ISCs se dividen asimétricamente, generando una nueva ISC y un enteroblasto (EB), que luego se diferencian a células enterocitos (ECs) y

enteroendócrinas (EE) (Figura 6). Es por eso que analizamos la composición de los EBs, y luego de EEs en el intestino. Para ello, utilizamos una línea de moscas transgénica que posee el reportero de la vía Nocht: *Notch Response Element (NRE)-GFP*, que nos permite identificar progenitores EBs. Si bien se observa un menor número de EBs en moscas  $p53^{5A14}$ , estas diferencias no fueron significativas. (Figura 24E). También, utilizando un anticuerpo anti-Próspero cuantificamos que en la mutante  $p53^{5A14}$  hay menos células EEs con respecto al control (Figura 24F).



**Figura 24. Aumento del número de ISCs en moscas mutantes para Dmp53.** (A) Comparación del tamaño del intestino en moscas adultas de los genotipos  $w^{1118}$  y  $p53^{5A14}$ . N=8-10 intestinos por genotipo (B) Inmunohistoquímica que muestra las ISCs (marca Delta+, en rojo) en animales control ( $w^{1118}$ ) y mutantes para Dmp53 ( $w^{1118}, p53^{5A14}$ ). Las flechas señalan células individuales, mientras que las cabezas de flecha indican clústeres con más de dos células. (C) Cuantificación de células Delta+ en relación con el número total de células (DAPI+) por intestino. N=8-10 intestinos por genotipo y condición. (D) Cuantificación del número de células Delta+ por cada clúster de ISCs. (E) Cuantificación de células Notch+ en relación con el número total de células (DAPI+) por intestino. N=8-10 intestinos por genotipo y condición. (F) Cuantificación de células Próspero+ / células totales de intestinos de moscas adultas de genotipo  $w^{1118}$  y  $p53^{5A14}$ . Los resultados se expresan como Longitud (um) (A), células Delta+ / Células totales (C) y % de células Delta+

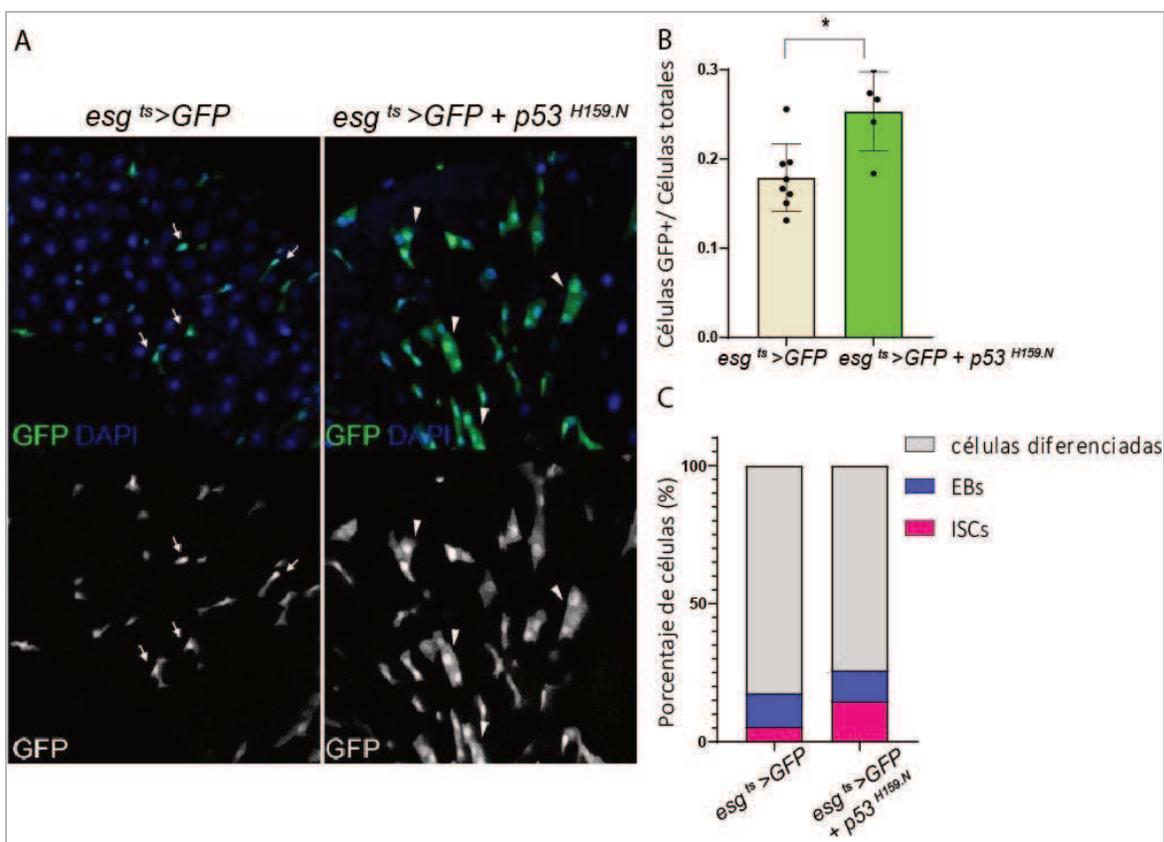
por cluster (D), células Notch+/Células totales (E), y células Prospero +/- células totales (F). Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns: no significativo.

Estos resultados sugieren que Dmp53 podría estar modulando la actividad de las ISCs en el intestino adulto de la mosca, lo que podría influir en la morfología intestinal. Esto se evidencia por la reducción en el tamaño del intestino, así como por la menor proporción de células EEs observada en las moscas mutantes para Dmp53.

### 6.2.1.2 Dmp53 es necesario en el intestino medio para regular el número de ISCs.

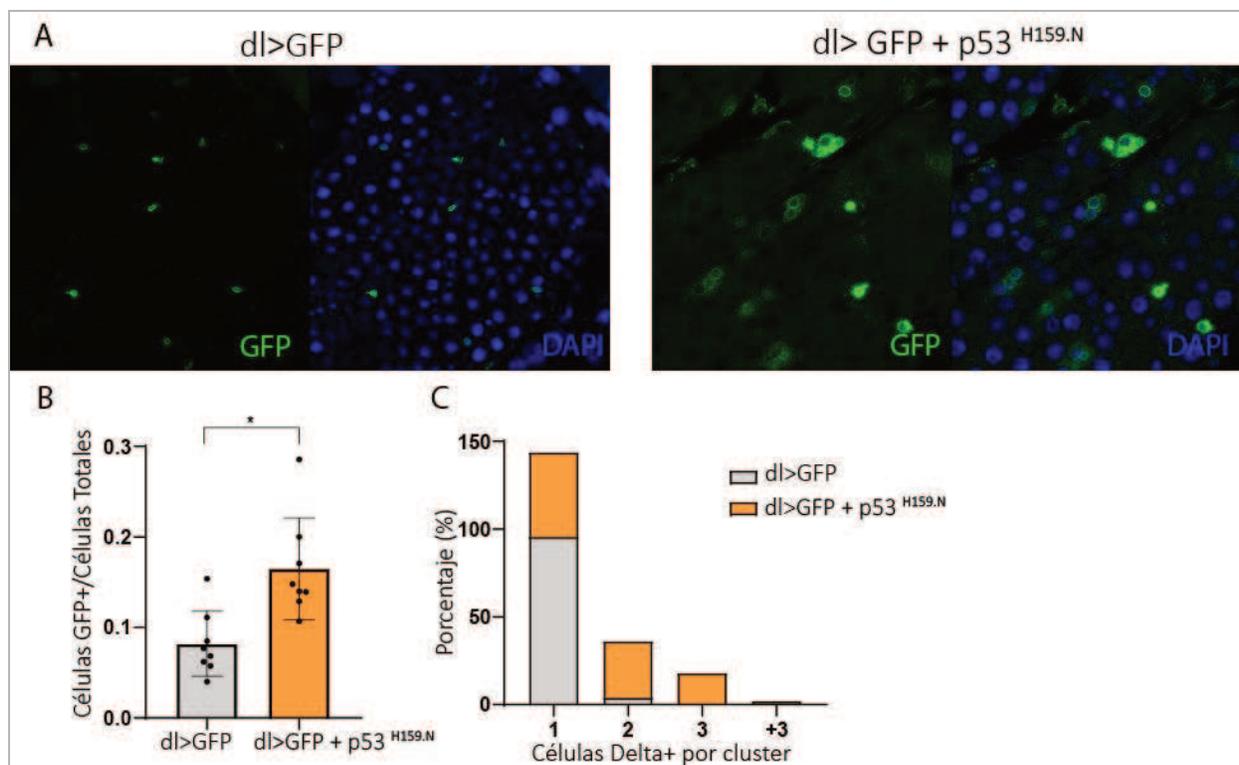
Para comenzar a indagar en qué linaje celular Dmp53 desempeña su función, decidimos expresar la versión dominante negativa de Dmp53 ( $p53^{H159.N}$ ) utilizando el sistema termosensible de expresión génica *esg-Gal4-Gal80<sup>ts</sup>/UAS* (ver Materiales y métodos Sección 5.2 para más detalles). Al expresar  $p53^{H159.N}$  (junto a GFP) en células progenitoras (ISC + EB) del intestino adulto observamos un aumento significativo en el número de progenitores en comparación con moscas control (Figura 25A-B).

Para comprender el impacto de la depleción de Dmp53 en la dinámica celular del intestino, se cuantificó la composición celular del mismo, utilizando *esg<sup>ts</sup>>GFP* para marcar progenitores (ISC + EB) y anticuerpo anti-Delta para marcar específicamente las ISCs. Observamos como resultado que la expresión de  $p53^{H159.N}$  resulta en un mayor porcentaje de ISCs, y un menor número relativo de EBs y células diferenciadas con respecto al control (Figura 25C).



**Figura 25. La expresión de  $p53^{H159.N}$  en progenitores intestinales altera la composición celular del intestino medio en *Drosophila melanogaster*.** (A) Inmunohistoquímica para visualizar ISC+EBs (GFP+) en intestinos de animales *esg<sup>ts</sup>>GFP* (control) y *esg<sup>ts</sup>>GFP + p53<sup>H159.N</sup>*. Las células progenitoras se marcan con GFP. Las flechas indican células individuales; las cabezas de flecha indican clústeres con más de 2 células. (B) Cuantificación de células GFP+ en relación al número total de células (DAPI+) por intestino. N=5-10 intestinos por genotipo y condición. (C) Cuantificación de la composición celular de cada linaje en intestinos de animales *esg<sup>ts</sup>>GFP* y *esg<sup>ts</sup>>GFP + p53<sup>H159.N</sup>*. Las células ISCs fueron marcadas por el anticuerpo anti-Delta. Los resultados se expresan como células GFP+/células totales (B) y % de tipos celulares ISCs,EBs y células diferenciadas según genotipo (C). Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; ns: no significativo.

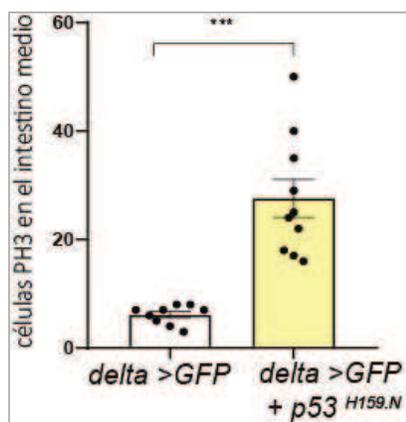
Para determinar en qué linaje celular (ISC vs EB) Dmp53 ejerce su función, expresamos  $p53^{H159.N}$  (junto con GFP) específicamente en las ISC utilizando la línea *Delta-Gal4*. Similar a lo observado anteriormente, la expresión de  $p53^{H159.N}$  mostró un aumento significativo tanto en el número total de ISCs como en el número de células madre por clúster (Figura 26A-C). Validamos este resultado utilizando *p53.ct*, una versión dominante negativa de Dmp53 que tiene deletada la región c-terminal, obteniendo resultados en la misma dirección (Figura S3).



**Figura 26. La expresión de p53<sup>H159.N</sup> en ISCs incrementa el número total de células madre en el intestino medio.** (A) Inmunohistoquímica para visualizar ISCs (GFP+) en intestinos de animales *delta>GFP* (control) o *delta>GFP + p53<sup>H159.N</sup>* (B) Cuantificación de células GFP+ en relación al número total de células (DAPI+) por intestino. N=5-10 intestinos por genotipo y condición. (C) Cuantificación del número de células Delta+ por cada clúster de ISCs. Los resultados se expresan como células Delta+/Células totales (B) y % de células Delta+ por cluster según genotipo (C). Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; ns: no significativo.

En conjunto estos hallazgos indican que Dmp53 es necesario en las ISCs para regular su número. Este proceso es esencial para mantener el equilibrio en la cantidad de ISCs, probablemente a través de la regulación de la proliferación y/o diferenciación celular.

Para evaluar si la ausencia de Dmp53 afecta la proliferación celular, cuantificamos las células en mitosis mediante la detección de la fosforilación de histona H3 (PH3), un marcador específico de esta fase del ciclo celular. Los resultados muestran que la pérdida de Dmp53 provoca un aumento significativo en el número de células en división (Figura 27), lo que sugiere que Dmp53 regula la proliferación de las ISCs y, en consecuencia, su número en el intestino.



**Figura 27. Dmp53 regula la proliferación de ISCs.** Cuantificación de células que se encuentran en mitosis (PH3+) por intestino en animales *delta>GFP* (control) y *delta> GFP + p53<sup>H159.N</sup>*. Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ ; ns: no significativo.

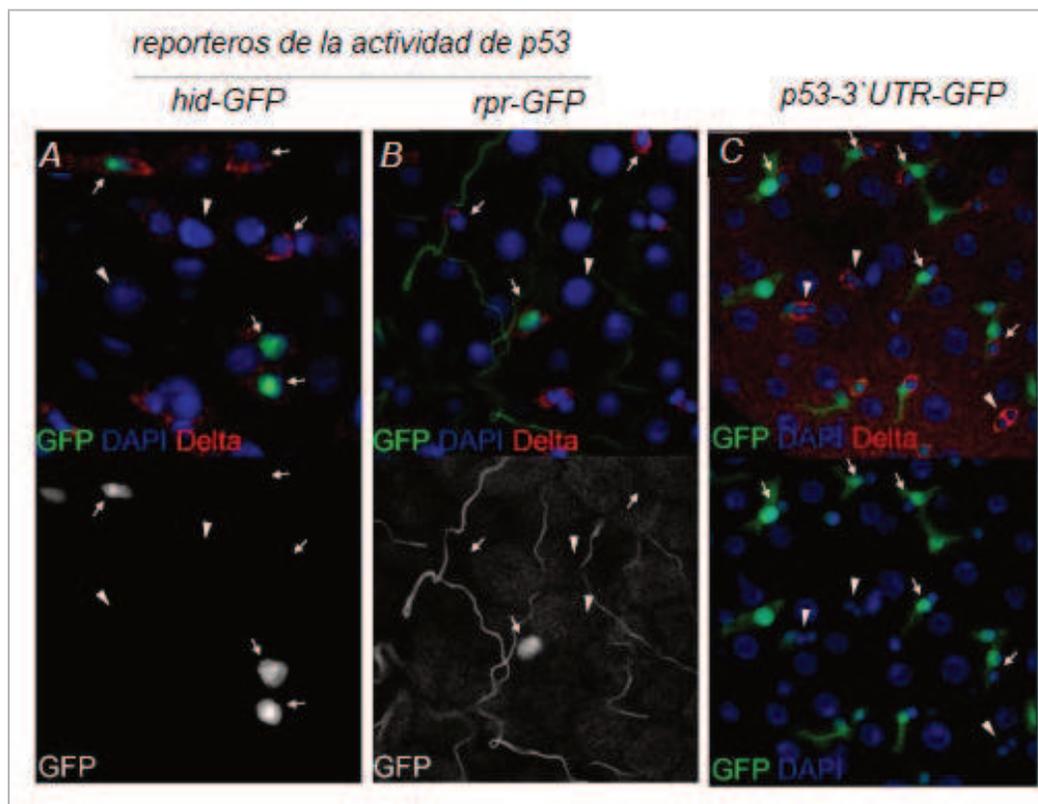
### 6.2.2 Activación de Dmp53 en células madre intestinales.

Para profundizar sobre la función de Dmp53 en las ISCs, analizamos la activación de este factor de transcripción en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*. Para ello, analizamos líneas reporteras que reflejan su actividad transcripcional *in vivo*. Usamos dos reporteros inducibles por Dmp53 que expresan GFP bajo el control de los promotores de *hid* (*hid-GFP*) y *rpr* (*rpr-GFP*). Para ambas líneas reporteras de la actividad transcripcional de Dmp53, se observó un incremento de GFP en las células Delta+, indicando la activación específica de Dmp53 en las ISCs (Figura 28A-B). Es importante destacar que no todas las ISCs presentaron activación del reportero GFP, lo que sugiere una regulación dinámica de Dmp53. Esto podría estar relacionado con la fase del ciclo celular en la que se encuentran las ISCs. Por otro lado, datos de transcriptómica de célula única (scRNA-seq) indican niveles similares de mRNA de Dmp53 en los diferentes linajes celulares del intestino, lo que apunta hacia una posible regulación postranscripcional de Dmp53.

Para evaluar una posible regulación post-transcripcional de Dmp53 por miRNAs, utilizamos el sensor *p53-3'UTR-GFP* basado en la expresión del gen reportero GFP fusionado a la secuencia 3'UTR de *dmp53*, como se describió en la Parte 1. Curiosamente, observamos un patrón de expresión bien definido de *p53-3'UTR-GFP*; sin embargo, las células con altos niveles de GFP no coincidieron con las células *Delta+* (Figura 28C). Por el contrario, la posición y el tamaño de estas células GFP+/Delta- sugieren que corresponden a EBs.

Estos resultados contrastan con los resultados previos sobre los niveles del scRNAseq y la actividad de Dmp53 en las ISCs, lo que podría atribuirse a las limitaciones del reportero

*p53-3'UTR-GFP*. Aunque esta herramienta es valiosa para estudiar la regulación mediada por la región 3'UTR de *dmp53*, carece de otros elementos regulatorios que podrían ser críticos para su modulación en el intestino.



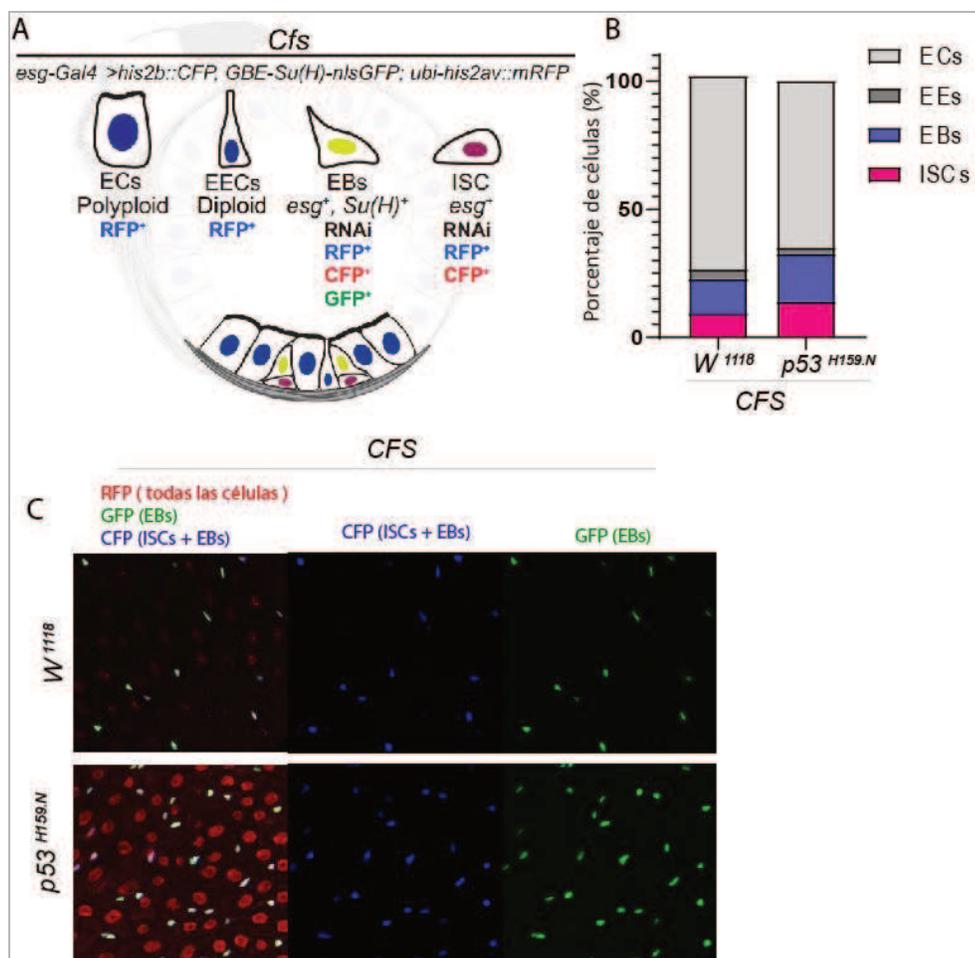
**Figura 28. Regulación dinámica de Dmp53 en ISCs.** (A-C) Inmunohistoquímica para visualizar los niveles de GFP de distintas herramientas genéticas en intestinos de moscas control. (A-B) Ambos reporteros reflejan la actividad transcripcional de Dmp53. (C) *p53-3'UTR-GFP* evidencia la regulación de Dmp53 vía miRNAs. En (A-C), las flechas indican ISC; las cabezas de flecha indican ECs. En (C), las flechas indican divisiones asimétricas, donde los EBs muestran altos niveles de GFP; las cabezas de flecha indican divisiones simétricas.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que Dmp53 tiene una regulación dinámica en las ISCs, posiblemente dependiente de la fase del ciclo celular. A diferencia de lo observado en el cuerpo graso, esta regulación no parece estar mediada por miRNAs. Aunque se ha reportado que *miR-305* participa en la homeostasis del intestino medio (Foronda et al., 2014), nuestros resultados indican que su papel en la regulación de Dmp53 no es relevante en este contexto en *Drosophila melanogaster*.

### 6.2.3 Dmp53 es clave para la homeostasis en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*.

El intestino medio de *Drosophila melanogaster* es un tejido altamente dinámico que mantiene su equilibrio mediante un proceso continuo de recambio celular, el cual garantiza la homeostasis del tejido en condiciones normales. Dado que Dmp53 tiene una función en regular la proliferación de ISCs, evaluamos el efecto en la regeneración de los diferentes tipos celulares del intestino.

Como mencionamos anteriormente, luego de la división asimétrica, las ISCs permanecen como tal, y los EBs se diferencian a ECs y EEs (Figura 6). Utilizamos una línea que expresa un sensor de destino celular *Cell Fate Sensor* (*CFS: esg-Gal4,UAS-CFP,Su(H)GbenIsGFP; ubi-his2av-RFP*) diseñado para monitorear la dinámica de las poblaciones celulares (ISCs, EBs y ECs). Este sensor permite distinguir en un mismo tejido las diferentes poblaciones mediante marcadores específicos: RFP+ en todas las células, GFP+ en los EBs y CFP+ en ISCs y EBs. Al comparar el número de células entre los genotipos *CFS>w<sup>118</sup>* y *CFS>p53<sup>H159.N</sup>*, identificamos una alteración en la composición relativa de los diferentes tipos celulares. En el genotipo *p53<sup>H159.N</sup>*, se observó que la composición de células diferenciadas EEs y ECs es menor que el control (Figura 29B-C).

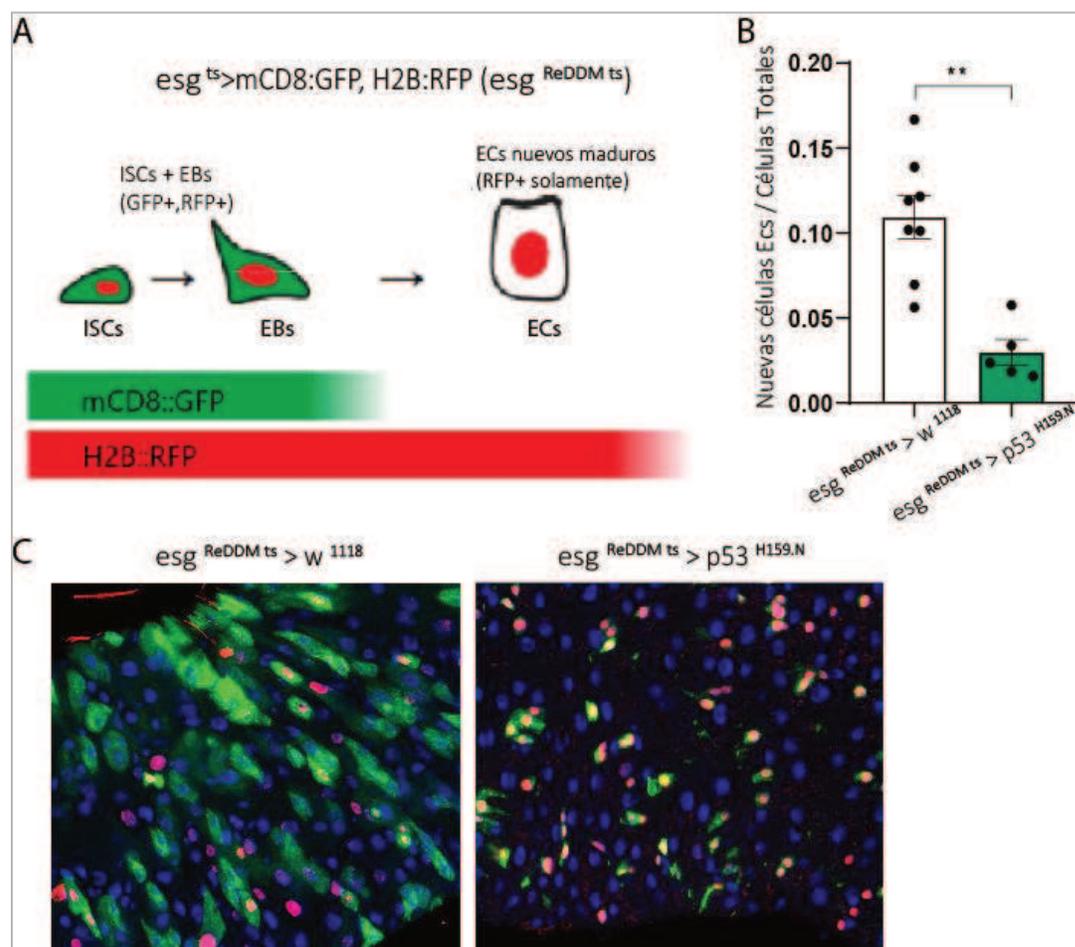


**Figura 29. La deficiencia de Dmp53 genera intestinos con menor proporción de células diferenciadas.** (A) Esquema del sistema *Cfs* utilizado para distinguir poblaciones celulares del intestino medio. Las ISCs y EBs se visualizan mediante la expresión en el núcleo de *UAS-his2b::CFP* con *esg-Gal4*. Los EBs se marcan con *GBE-Su(H)-nlsGFP* nuclear, mientras que *Ubi-his2av::mRFP* hace que todas las células expresen RFP nuclear. Así, las ISCs y los EBs están marcados con CFP, pero solo los EBs son positivos para GFP, mientras que los ECs maduros y las EEs están marcadas con RFP pero se distinguen por el tamaño nuclear. (B) Composición de los tipos celulares en el intestino medio de los genotipos *Cfs>w<sup>118</sup>* y *Cfs>p53<sup>H159.N</sup>*. (C) Imágenes representativas de intestinos *Cfs>w<sup>118</sup>* y *Cfs>p53<sup>H159.N</sup>*. Los resultados se expresan como porcentaje de células (B). Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: no significativo.

Además, analizamos la generación de nuevos ECs mediante la línea *esg<sup>ReDDMts</sup>* (*esg-Gal4<sup>ts</sup> UAS-CD8::GFP; UAS-H2B::RFP*) tras 20 días de inducción a 29°C. Este sistema permite expresar en células progenitoras (ISCs/EBs) una histona de vida media larga (His2B-RFP, 28 días) y una GFP de vida media corta, de tal manera que las células progenitoras estarán marcadas tanto con RFP como con GFP, y los ECs nuevos, generados durante el periodo de

inducción a 29°C, estarán marcados únicamente con His2B-RFP, la cual permanece estable hasta 28 días después de que se apaga su expresión en los ECs. Al emplear  $p53^{H159.N}$ , observamos una disminución en la producción de ECs en comparación con los controles (Figura 30B-C).

Estos resultados sugieren que Dmp53 es necesario en las células progenitoras para mantener tasas normales de regeneración del tejido en condiciones de homeostasis.



**Figura 30. Dmp53 es clave para la homeostasis en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*.** (A) Esquema del sistema  $esg^{ReDDM ts}$  que utiliza CD8::GFP en membrana y H2B::RFP en núcleo para marcar específicamente ISCs y EBs. Al diferenciarse, las células pierden GFP rápidamente mientras RFP persiste, permitiendo identificar las células maduras EC positivas para RFP y negativas para GFP. Adaptado de Christensen et al., 2024 (B) Cuantificación de ECs recién generados tras 20 días de inducción a 29 °C, identificados como células positivas para His2B-RFP pero negativas para GFP, expresado en función del total de células. Se comparan los genotipos control  $esg^{ReDDM ts} > W^{1118}$  y  $esg^{ReDDM ts} > p53^{H159.N}$ . (C) Imágenes representativas de intestinos  $esg^{ReDDM ts} > W^{1118}$  y  $esg^{ReDDM ts} > p53^{H159.N}$ . Los resultados se expresan como ECs generados sobre células totales (B). Media ± SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns: no significativo.

En resumen, estos resultados sugieren que la ausencia de Dmp53 resulta en defectos en la diferenciación de las ISCs, evidenciados por una menor proporción de células diferenciadas y una reducción en la generación de nuevas ECs. Quedan pendientes experimentos para determinar el posible papel de Dmp53 en la diferenciación de células EBs o en la división asimétrica de las ISCs, lo que podría explicar el fenotipo observado.

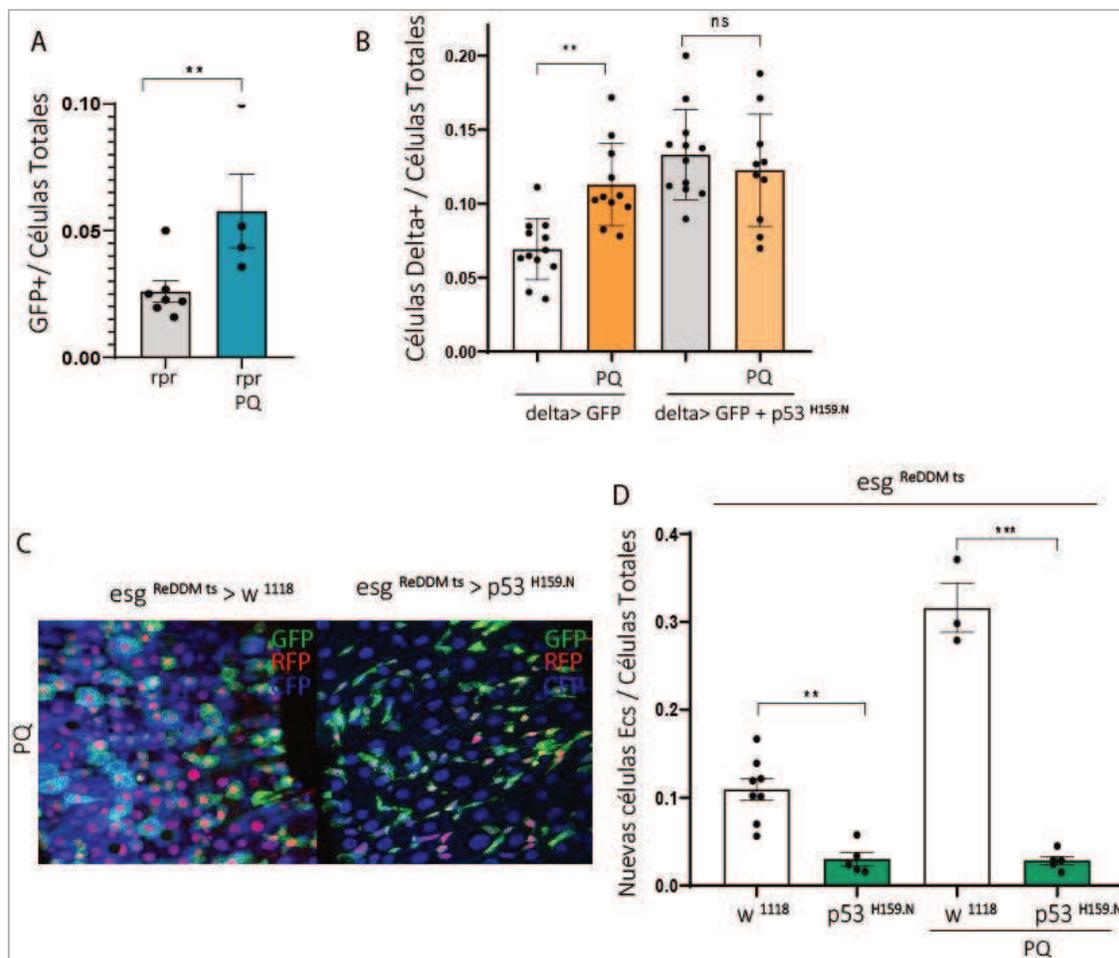
#### 6.2.4 Dmp53 modula la respuesta adaptativa al estrés en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*.

Como nombramos anteriormente, el intestino medio de *Drosophila melanogaster* se encuentra en condiciones de homeostasis en continuo recambio celular. Sin embargo, ante situaciones de estrés, como daño oxidativo, el intestino responde incrementando temporalmente la actividad de ISCs, lo que genera un pico en el recambio celular destinado a reparar el tejido y restaurar su capacidad funcional (Jiang et al., 2009; Micchelli y Perrimon, 2005).

Dado el papel de Dmp53 en la regulación del recambio celular del intestino en condiciones basales, decidimos investigar una posible función de Dmp53 en la respuesta adaptativa al estrés. Para ello, utilizamos el daño oxidativo como primer modelo de estrés, inducido mediante la exposición a Paraquat (PQ), un herbicida conocido por generar estrés oxidativo a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. En el intestino medio, el tratamiento con PQ provoca que, tras el daño celular, se inicie un proceso de apoptosis en las células dañadas, lo que a su vez estimula la proliferación de ISCs para generar nuevas células que reemplazan a las dañadas (Amcheslavsky et al., 2009).

Los tratamientos con PQ se realizaron a una concentración de 2.5 mM durante 18 hs, utilizando moscas de 3 a 5 días de edad. Observamos como resultado que, en respuesta a este tratamiento, aumenta la actividad de Dmp53 en las ISCs, evidenciada mediante el reportero *rpr-GFP* (Figura 31A). Además, detectamos un incremento en la cantidad de ISCs en los intestinos de moscas control (*delta>GFP*) en respuesta a PQ. Sin embargo, en moscas *delta>GFP+p53<sup>H159.N</sup>*, los niveles de ISCs permanecieron elevados, similar a los niveles observados antes del tratamiento (Figura 31B).

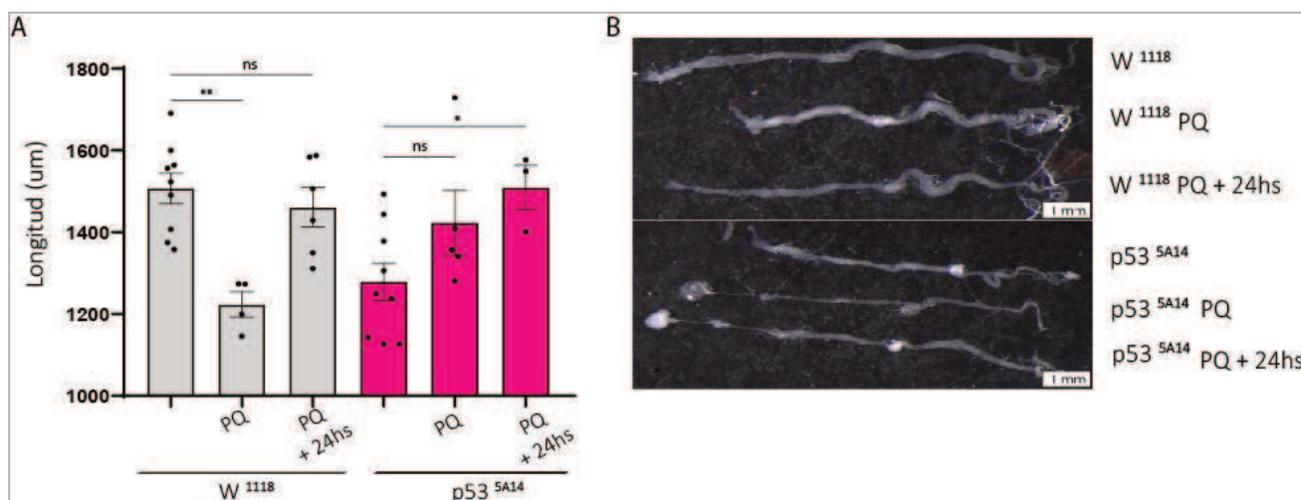
Para estudiar el efecto de Dmp53 en la regeneración del intestino en respuesta al estrés se utilizó la línea *esg<sup>ReDDMts</sup>*. Las moscas fueron mantenidas a 29°C durante 20 días, con un tratamiento de PQ aplicado durante 18 hs. Los resultados se evaluaron 7 días después del tratamiento (ver Materiales y métodos Sección 5.10 para más detalles). En línea con los resultados obtenidos en condiciones de homeostasis, se observó que la expresión de *esg<sup>ReDDMts</sup>>p53<sup>H159.N</sup>* está asociada con una disminución en la producción de ECs en respuesta al daño inducido por PQ, en comparación con el control (Figura 31C-D).



**Figura 31. Dmp53 regula la regeneración de tejido en respuesta a daño por Paraquat en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*.** (A) Cuantificación de células GFP+/Células totales en moscas adultas que contienen el reportero *rpr* frente a estrés oxidativo (B) Cuantificación de células Delta+/Células totales en moscas adultas *delta>w<sup>118</sup>* y *delta>p53<sup>H159.N</sup>*, frente a estrés oxidativo (C) Imágenes representativas de *esg<sup>ReDDMts</sup>>w<sup>118</sup>* y *esg<sup>ReDDMts</sup>>p53<sup>H159.N</sup>*, 7 días después de un tratamiento de estrés oxidativo (D) Cuantificación de ECs recién generados tras 20 días de inducción a 29 °C, identificados como células positivas para His2B-RFP pero negativas para GFP, expresado en función del total de células. Se comparan los intestinos *esg<sup>ReDDMts</sup>>w<sup>118</sup>* y *esg<sup>ReDDMts</sup>>p53<sup>H159.N</sup>* de moscas adultas 7 días después de un tratamiento de estrés oxidativo. Los resultados se expresan como células GFP+/Células totales

(A), células Delta+/Células totales (B), ECs generados sobre células totales (D). Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas (A,B) y ANOVA (D): \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: no significativo.

También evaluamos el tamaño del intestino como un indicador del recambio celular en el intestino medio, dado que este órgano ajusta su tamaño en respuesta a las demandas fisiológicas (Christensen et al., 2024). Para ello, expusimos a hembras adultas de 5 días de edad a un ciclo de 24 hs de estrés oxidativo, seguido de 24 hs de recuperación con comida normal. En moscas  $w^{118}$ , un día de estrés fue suficiente para reducir significativamente el tamaño del intestino, mientras que un período de recuperación de 24 hs permitió alcanzar un tamaño cercano al inicial. Sin embargo, en las moscas mutantes  $p53^{5A14}$ , el tamaño del intestino no disminuyó tras el tratamiento; por el contrario, mostró un leve aumento incluso después de las 24 hs de recuperación (Figura 32A-B). Estos resultados sugieren que la reducción de los niveles de Dmp53 podrían estar asociados con una disminución en la apoptosis en respuesta al daño, lo cual enmascara en cierta medida el análisis propuesto.

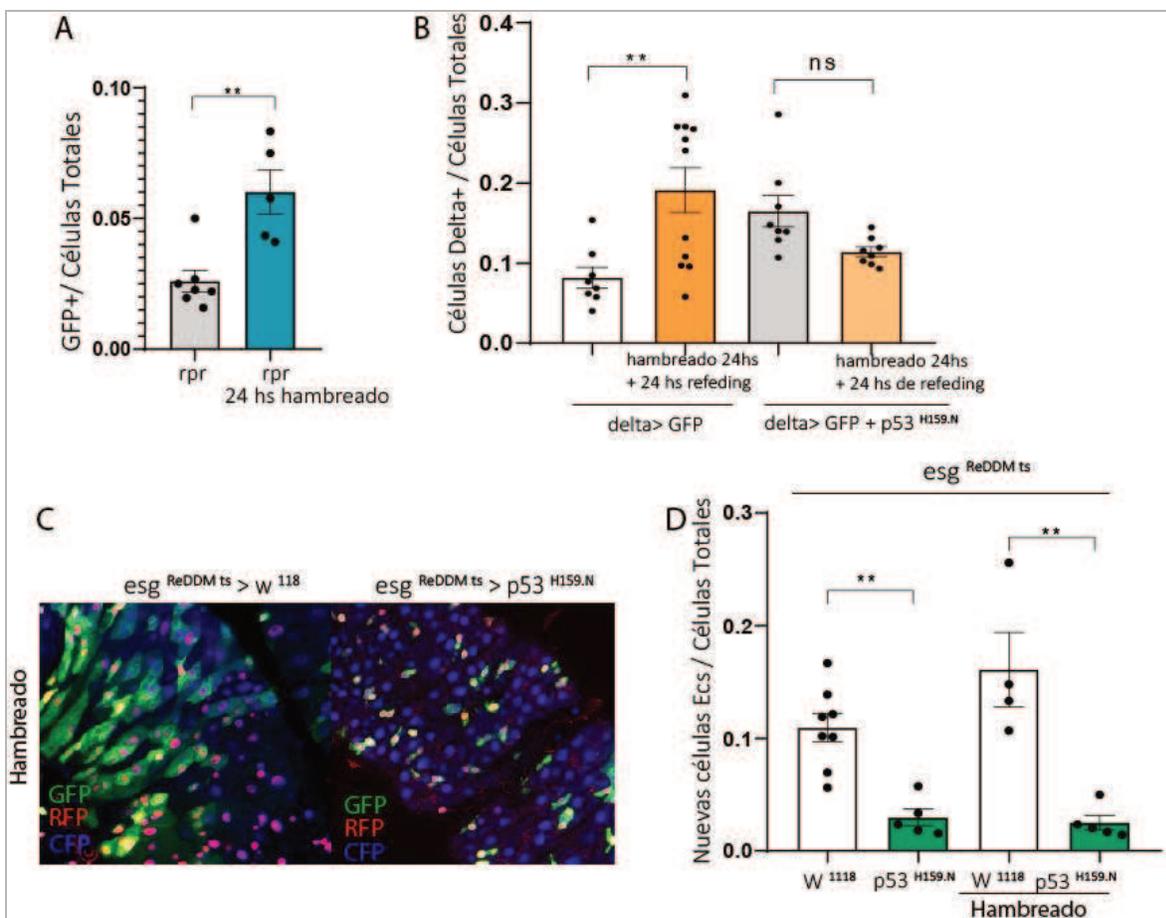


**Figura 32. Dmp53 modula la plasticidad del intestino medio en *Drosophila melanogaster* frente a PQ (A-B)** Cuantificación (A) e imágenes (B) de la longitud de intestinos  $w^{118}$  y  $p53^{5A14}$  en condiciones control, 24 hs de estrés con PQ 2.5mM, y 24 hs PQ 2.5 mM+ 24 hs de recuperación en comida normal. Los resultados se expresan como Longitud(um) (A). Media  $\pm$  SEM. Prueba ANOVA: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: no significativo.

Estos resultados demuestran que el daño celular inducido por Paraquat desencadena un aumento en la proliferación de las ISC's y en el recambio celular. Dmp53 juega un papel clave en esta respuesta adaptativa, como lo indica el incremento de su actividad transcripcional tras la exposición al estrés oxidativo. En condiciones de homeostasis, Dmp53 actúa como un inhibidor

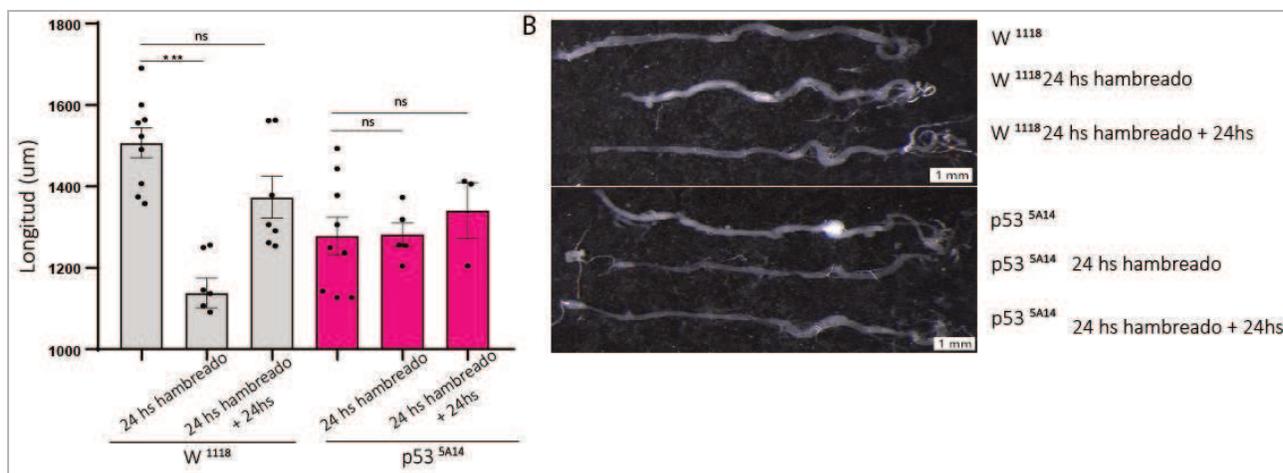
de la proliferación de ISCs; sin embargo, su función específica frente al daño inducido por Paraquat aún no es clara. Además, la pérdida de Dmp53 afecta la diferenciación celular, lo que se refleja en una menor producción de células y en alteraciones en el ajuste del tamaño intestinal. Aún queda por determinar en qué medida estos efectos dependen de la regulación de la proliferación o diferenciación celular por parte de Dmp53.

Por otro lado, dado que se ha demostrado el papel de Dmp53 en la respuesta al estrés nutricional en el FB (Barrio et al., 2014), analizamos como modelo de estrés 24h de ayuno (ver Materiales y métodos Sección 5.10 para más detalles). Frente a restricción nutricional, el intestino tiende a reducir el recambio celular, y de esta manera el tamaño del intestino como forma de preservar energía, mientras que luego de una realimentación se promueve la proliferación celular (Christensen et al., 2024). De manera similar a lo observado previamente en el FB frente al estrés nutricional, se detectó un incremento en la actividad de Dmp53, lo cual se evidenció por un aumento en el número de células GFP+ al utilizar el sensor *rpr-GFP*, 24 horas después de la inducción del estrés (Figura 33A). Por otra parte, en el control *delta>w<sup>118</sup>*, se detectó un incremento de las ISCs tras un tratamiento de realimentación 24 hs luego del estrés nutricional, mientras que en moscas *delta>p53<sup>H159.N</sup>*, los niveles de ISCs permanecieron elevados como antes del tratamiento (Figura 33B). Además, analizamos la producción de nuevas células utilizando la línea *esg<sup>ReDDM ts</sup>*, y observamos a 7 días del hambreado, que la reducción de los niveles de Dmp53 expresando *esg<sup>ReDDM ts</sup>>p53<sup>H159.N</sup>* se asoció con una disminución en la producción de ECs en comparación con el control (Figura 33C-D).



**Figura 33. Dmp53 regula la respuesta adaptativa al estrés nutricional en el intestino medio de *Drosophila melanogaster*.** (A) Cuantificación de células GFP+/Células totales en moscas adultas que contienen el reportero *rpr* frente a tratamiento de 24 hs de hambreado (B) Cuantificación de células Delta+/Células totales en moscas adultas *delta>w<sup>118</sup>* y *delta>p53<sup>H159.N</sup>* frente a un tratamiento de 24 hs de hambreado + 24 hs de recuperación con comida normal. (C) Imágenes representativas de intestinos de moscas *esg<sup>ReDDM ts</sup> >w<sup>118</sup>* y *esg<sup>ReDDM ts</sup> >p53<sup>H159.N</sup>*, 7 días después de un tratamiento de 24 hs estrés nutricional. (D) Cuantificación de ECs recién generados tras 20 días de inducción a 29 °C, identificados como células positivas para His2B-RFP pero negativas para GFP, expresado en función del total de células. Se comparan intestinos *esg<sup>ReDDM ts</sup> >w<sup>118</sup>* y *esg<sup>ReDDM ts</sup> >p53<sup>H159.N</sup>* de moscas adultas, 7 días después de un tratamiento de 24 hs estrés nutricional. Los resultados se expresan como células GFP+/Células totales(A), células Delta+/Células totales (B), ECs generados sobre células totales (D). Media ± SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas (A,B) y ANOVA (D): \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; ns: no significativo.

Estudiando el tamaño del intestino en condiciones de estrés nutricional, observamos que en moscas control la privación de nutrientes redujo significativamente el tamaño del intestino, recuperándose tras 24 hs de realimentación. Sin embargo, en moscas mutantes *p53<sup>5A14</sup>*, el tamaño intestinal se mantuvo igual en todas las condiciones (Figura 34A-B).



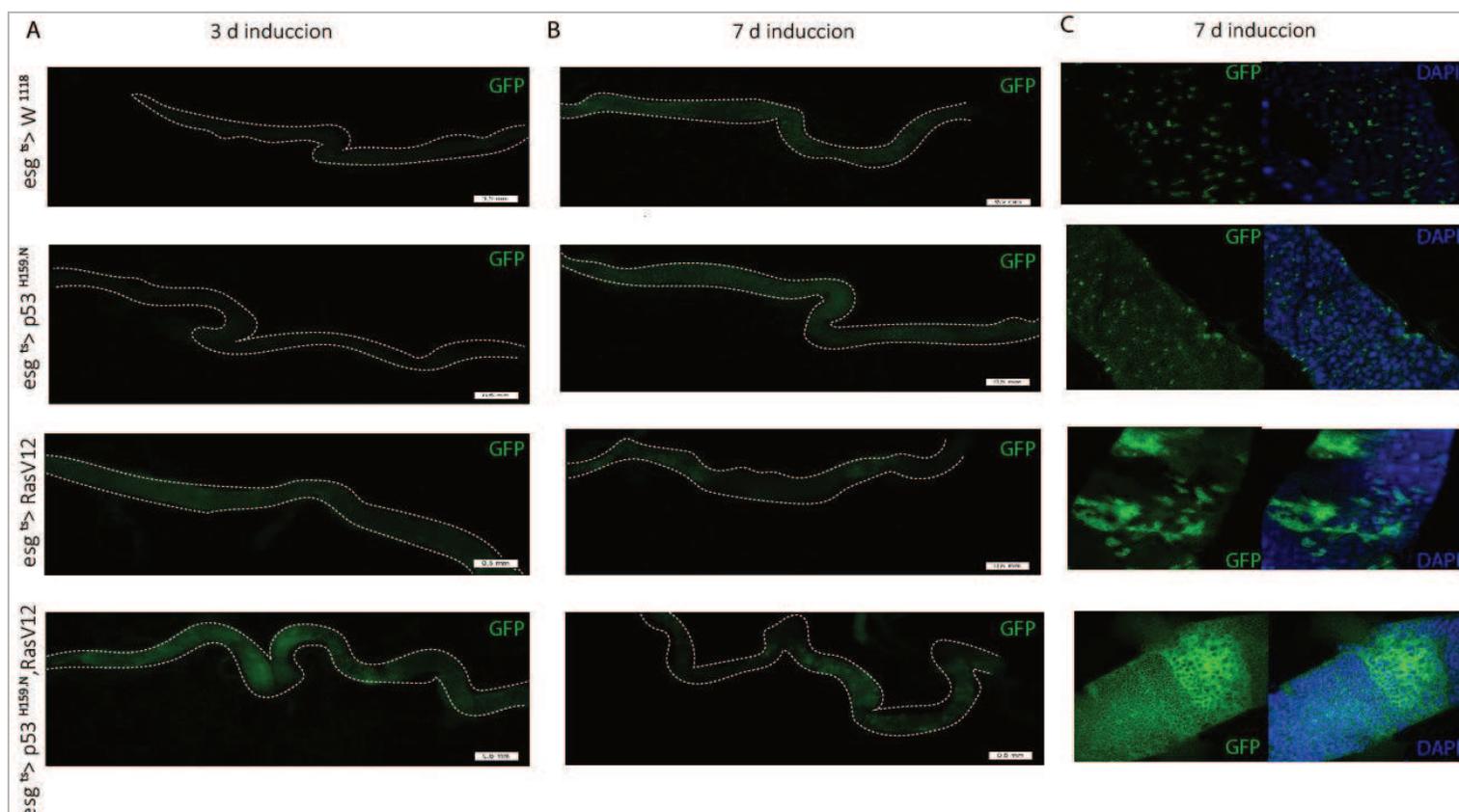
**Figura 34. Dmp53 modula la plasticidad del intestino medio en *Drosophila melanogaster* frente a estrés nutricional.** (A-B) Imágenes y cuantificación (B) de la longitud de intestinos  $w^{1118}$  y  $p53^{5A14}$  en condiciones control, 24 hs de hambreado con 0.5% de agar y 24 hs hambreado + 24hs de realimentación en comida normal. Los resultados se expresan como Longitud(um) (B). Media  $\pm$  SEM. Prueba ANOVA: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: no significativo.

Estos resultados demuestran que Dmp53 desempeña un papel crucial en la respuesta adaptativa frente al estrés nutricional del intestino medio de *Drosophila melanogaster*, similar a lo observado en el FB (Barrio et al., 2014). Dmp53 se activa en células del intestino tras 24 hs de ayuno y la ausencia de p53 resulta en una alteración de la respuesta de las ISC, con un impacto significativo en la composición celular y el tamaño del tejido tanto frente a la privación de nutrientes como de realimentación.

### 6.2.5 El impacto de Dmp53 y Ras en el cáncer colorrectal.

En humanos, el cáncer colorrectal es uno de los más comunes y mortales, impulsado por mutaciones en genes como *APC*, *K-RAS*, *BRAF* y *TP53* (Bienz et al., 2000; Kinzler et al., 1996; Thiel et al., 2013). *Drosophila melanogaster* se ha establecido como modelo para estudiar aspectos clave del cáncer (Dekanty et al., 2012; Mirzoyan et al., 2019; Rudrapatna et al., 2011; Vidal et al., 2006). En particular, mutaciones combinadas como *Apc-Ras* generan crecimientos tumorales agresivos similares a los observados en humanos (Martorell et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento no se había evaluado el rol de p53 y su potencial uso para modelar CRC.

Dado que niveles reducidos de Dmp53 promueven una mayor proliferación de células madre intestinales, y considerando las similitudes entre los intestinos de mamíferos y *Drosophila melanogaster*, decidimos evaluar si la expresión conjunta de  $p53^{H159.N}$  y  $RasV12$  en el intestino medio adulto de *Drosophila melanogaster* podrían replicar las etapas iniciales del CRC. Para evaluar esta hipótesis, utilizamos la línea  $esg-Gal4^{ts}$ , que permite dirigir específicamente la expresión de  $RasV12$  y  $p53^{H159.N}$  en las ISC y EBs. Las moscas adultas con esta combinación genética fueron sometidas a inducción a 29°C por 3 y 7 días. El análisis reveló que los intestinos que expresaban  $p53^{H159.N} + RasV12$  presentaban una hiperproliferación celular, evidenciada por un incremento en el número de células GFP+ en el intestino medio, en comparación con moscas control y aquellas que solo expresaban  $RasV12$ , o  $p53^{H159.N}$  individualmente (Figura 35A-C).



**Figura 35. El impacto de Dmp53 y Ras en el cáncer colorrectal.** Imágenes representativas de intestinos  $esg^{ts}$  que incluyen la combinación genética  $RasV12 + p53^{H159.N}$ , así como los controles individuales  $RasV12$ ,  $w^{118}$  y  $p53^{H159.N}$  con 3 (A) y 7 (B-C) días de inducción a 29°C.

Concluimos que la pérdida combinada de Dmp53 y Ras, induce un crecimiento de tipo tumoral que no se alcanza cuando estas alteraciones genéticas ocurren de manera individual.

La hiperproliferación observada en el modelo *esg<sup>ts</sup>>RasV12, p53<sup>H159.N</sup>* ofrece una herramienta valiosa para estudiar las etapas iniciales del CRC en *Drosophila melanogaster*. Esto abre la posibilidad de ampliar la plataforma de evaluación de mutaciones específicas de Dmp53, empleando modelos humanizados de *Drosophila melanogaster* para analizar alelos de Dmp53 asociadas al cáncer (D'Brot et al., 2017).

## **Discusión**

## 7. Discusión.

### 7.1 dMyc regula la expresión y biogénesis de miRNAs.

Myc es un factor de transcripción clave en la regulación del crecimiento celular, la proliferación y la apoptosis. En humanos, controla la expresión de aproximadamente el 10-15 % del genoma (Eilers et al., 2008). Su desregulación está asociada con diversas patologías, y su activación anormal es uno de los eventos más frecuentes en el desarrollo del cáncer (Nesbit et al., 1999).

En humanos, la represión de miRNAs desempeña un papel clave en la tumorigénesis mediada por Myc, ya que la pérdida de función, mutaciones o deleciones de numerosos miRNAs regulados por este factor de transcripción se han asociado con el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Calin et al., 2004; Kobayashi et al., 2005). Aunque se ha demostrado que Myc actúa como un regulador negativo global de la expresión de miRNAs (Chang et al., 2008), también activa la expresión de otros miRNAs de manera directa (Dews et al., 2010; Ma et al., 2010; O'Donnell et al., 2005). Esta dualidad refleja una función compleja y contexto-dependiente de Myc en la regulación de miRNAs.

Dado el papel central de Myc y los miRNAs en el desarrollo tumoral, ambos han sido propuestos como objetivos terapéuticos en distintos tipos de cáncer (Desi et al., 2021; Frenzel et al., 2010; Shams et al., 2020). Sin embargo, su regulación en modelos genéticos simples, como *Drosophila melanogaster*, sigue siendo poco explorada.

En este trabajo, utilizando enfoques bioinformáticos y experimentales, demostramos que dMyc se asocia a las regiones regulatorias de un amplio grupo de miRNAs. La reducción de los niveles de dMyc resulta en una disminución generalizada de la expresión de estos miRNAs. Entre ellos, once habían sido previamente identificados como regulados por dMyc a través de análisis *in silico* de sus promotores (Li et al., 2020), y dos (miR-277 y miR-308) han sido validados como objetivos directos de dMyc (Daneshvar et al., 2013; Li et al., 2020).

Estudios previos han sugerido que Myc no solo regula la transcripción de miRNAs, sino también su procesamiento a través de la proteína Drosha (Wang et al., 2013). En esta tesis, demostramos que dMyc modula la biogénesis y la actividad de los miRNAs al regular transcripcionalmente los niveles de Drosha y Ago-1.

Nuestros resultados sugieren que dMyc promueve la expresión de genes de miRNAs, los cuales regulan múltiples genes diana involucrados en procesos clave del desarrollo, como el

crecimiento y la apoptosis (Jang et al., 2024). Esto abre la posibilidad de que la regulación de miRNAs por dMyc sea relevante en otros contextos a los que estudiamos en esta tesis, como la competición celular.

La competición celular, dirigida por dMyc, es un mecanismo que mejora la aptitud del tejido al eliminar células menos competentes y favorecer el crecimiento de células más viables. Si bien se han identificado algunas señales involucradas en este proceso, los miRNAs podrían ser mediadores clave en la comunicación celular necesaria para su ejecución (De la Cova et al., 2004; Johnston et al., 1999; Moreno et al., 2004).

## 7.2 dMyc regula la expresión de pri-miR-305 en cuerpo graso en respuesta a estrés nutricional.

En situaciones de estrés metabólico, como la inanición, el organismo depende de reservas de triacilglicéridos y glucógeno para obtener energía (Arrese y Soulages, 2010). En *Drosophila melanogaster*, Dmp53 controla los cambios metabólicos al regular la utilización de los recursos energéticos en las células del FB y fomentar la glucólisis para asegurar la supervivencia (Barrio et al., 2013; Vousden y Ryan, 2009). En este contexto, Dmp53 facilita la adaptación metabólica mediante la regulación de las enzimas glucolíticas PGM y Hex-C, cuyos niveles disminuyen durante el ayuno (Barrio et al., 2013). Este mecanismo parece conservado, ya que p53 también regula negativamente PGM en células de mamíferos (Kondoh et al., 2005).

Respecto a la regulación de p53 en el tejido adiposo, estudios previos han demostrado que miR-305 actúa como un regulador negativo de Dmp53 en condiciones normales de alimentación (Barrio et al., 2013). Sin embargo, el estrés nutricional, los niveles reducidos del transportador de aminoácidos Slimfast o la disminución de la señalización TOR alteran esta regulación de Dmp53 mediada por miR-305 (Barrio et al., 2013).

En esta tesis, hemos demostrado que dMyc promueve el silenciamiento mediado por miRNAs en diferentes tejidos. En particular, observamos que la expresión de miR-305 y los niveles de Dmp53 son regulados por dMyc en el FB en función de la disponibilidad de nutrientes. Además, la sobreexpresión de dMyc es capaz de rescatar los niveles reducidos de pri-miR-305 en el FB de animales sometidos a condiciones de estrés nutricional, lo que sugiere un rol fisiológico relevante. Por otro lado, la reducción de dMyc en el FB extiende la supervivencia de los animales bajo condiciones de privación de nutrientes, y este efecto se

revierte con la expresión de miR-305 o una versión dominante negativa de Dmp53. Estos resultados sugieren que la regulación de miRNA por dMyc tiene importantes funciones específicas de tejido y está estrechamente vinculada al estado nutricional del organismo (Foronda et al., 2014; Li et al., 2020; Ueda et al., 2018).

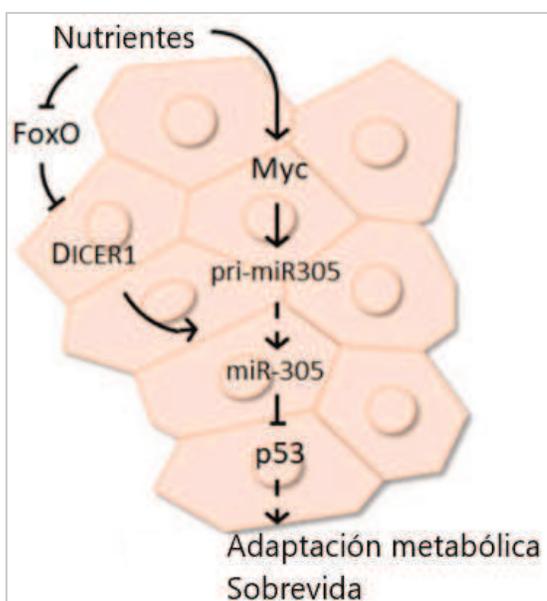
Trabajos previos indican que dMyc actúa corriente abajo de la vía TOR, regulando la transcripción y expresión de genes metabólicos dependientes de aminoácidos, especialmente relacionados con la biogénesis ribosomal y la función mitocondrial (Li et al., 2010). La inhibición de la vía insulina/TOR ante bajos niveles de aminoácidos resulta en una reducción de la actividad de dMyc, lo que a su vez limita el crecimiento debido al alto costo energético de estos procesos (Teleman et al., 2008). Esta relación entre dMyc, los miRNAs y el estado nutricional en *Drosophila melanogaster* también se observa en otros organismos. En humanos, la expresión de *myc* en el hígado está regulada por el estado nutricional, afectando el metabolismo, como la captación de glucosa y la gluconeogénesis (Corcos et al., 1987; Valera et al., 1995; Riu et al., 1996).

Por otro lado, en condiciones de estrés nutricional, no solo se desregulan los niveles de miR-305, sino que también se observa una reducción general en los niveles de miRNAs maduros en el FB. Este efecto podría estar asociado a la disminución en la expresión de Drosha y Dcr-1, dos enzimas clave en el procesamiento de miRNAs, en respuesta a la privación de nutrientes. Un impacto similar en la actividad de la maquinaria de miRNA se ha registrado en diversas condiciones de estrés, como hipoxia, autofagia, radiación UV y estrés oxidativo (Blandino et al., 2012; Gibbins et al., 2012; Ho et al., 2012). Por lo tanto, la desregulación de la maquinaria de miRNAs por el estrés parece ser un mecanismo conservado que contribuye a la desrepresión de genes específicos involucrados en las respuestas biológicas al estrés, en este caso particular, a la privación de nutrientes.

Aunque nuestros datos indican que dMyc puede modular la expresión de pri-miR-305 y de los principales componentes de la biogénesis de miRNAs (Figura 17), su influencia parece limitada frente a la regulación de Dcr-1 y Drosha bajo estrés nutricional, lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulador alternativo. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado que el factor de transcripción FOXO, activado por la vía de JNK, reprime la expresión de *dcr-1* en el FB bajo privación de nutrientes (Sanchez et al., 2023). Esta regulación disminuye el procesamiento de miRNAs, como miR-305, lo que favorece la activación de Dmp53.

A partir de estos resultados, proponemos un modelo en el cual, en condiciones normales, dMyc promueve la transcripción de pri-miR-305, lo que conduce a la represión de la expresión

de *dmp53* en el FB de animales alimentados. Sin embargo, ante la privación de nutrientes, los niveles de dMyc disminuyen, afectando la expresión de *miR-305*. Además, la activación de FOXO provoca una reducción significativa de Dcr-1 y *miR-305*. La disminución de *miR-305* favorece la activación de Dmp53, promoviendo la adaptación metabólica necesaria para la supervivencia durante el estrés nutricional (Figura 36). Aunque este mecanismo destaca la interacción entre FOXO y Dcr-1 en la regulación metabólica, todavía no está claro si otras proteínas involucradas en el procesamiento de miRNAs, como Drosha, también son reguladas de manera similar bajo condiciones de estrés nutricional. Se necesita más investigación para explorar si Drosha experimenta una regulación negativa en este contexto.



**Figura 36. dMyc regula miR-305 en *Drosophila melanogaster* en respuesta a estrés nutricional.** dMyc estimula la transcripción de pri-miR-305, lo que conduce a la represión de la expresión de Dmp53 en el FB de animales alimentados. Bajo condiciones de privación de nutrientes, los niveles de dMyc disminuyen y FOXO se activa, lo que afecta la expresión y el procesamiento del miR-305. Como consecuencia, Dmp53 se activa permitiendo la supervivencia del animal durante el estrés nutricional.

### 7.3 Dmp53 tiene una función en la regulación de células madre intestinales.

Entre las funciones no canónicas de p53, se incluye la regulación de las células madre, los mecanismos y consecuencias de esta función aún no se comprenden completamente (Boutelle

et al., 2021; Jain et al., 2018; Spike et al., 2011). En mamíferos, se ha destacado el papel de p53 en la regulación de la función de las células madre, particularmente en la inhibición de la reprogramación de células somáticas diferenciadas a células madre pluripotentes inducidas (Hanna et al., 2009; Sarig et al., 2010). Los miRNAs de la familia miR-34 (miR-34a, miR-34b y miR-34c), regulados por p53, son fundamentales para suprimir la reprogramación somática, ya que, inducidos durante este proceso, inhiben la expresión de genes clave para la pluripotencia (Choi et al., 2011). Además, p53 regula negativamente la pluripotencia al promover la expresión de miR-145, un miRNA que reprime genes esenciales para el mantenimiento de las células madre. De esta manera, al activar miR-145, p53 restringe la reprogramación celular y limita la proliferación, reforzando su función en la supresión tumoral y previniendo la tumorigénesis (Biegging et al., 2014; Lin et al., 2012). En planarias, se ha descrito que p53 tiene un papel en el control de la proliferación de células madre, la autorenovación y la especificación del linaje celular (Pearson y Sánchez Alvarado, 2010). Este papel conservado de p53 en diversas especies subraya la importancia de este regulador en la homeostasis celular.

En *Drosophila melanogaster* existen indicios de la función de Dmp53 en células madre. Se ha observado que Dmp53 se activa selectivamente en células madre de la línea germinal tras la exposición a factores estresantes o en contextos de crecimiento hiperplásico inducido por la oncoproteína RasV12 o por programas de diferenciación fallidos (Wylie et al., 2014). Además, resultados recientes sugieren que Dmp53 es capaz de regular la división asimétrica de células madre neuronales por medio de la regulación transcripcional de factores claves involucrados en este proceso (Manzanero-Ortiz et al., 2024). Dado que hasta el momento no se ha descrito la función de Dmp53 en las células madre intestinales de *Drosophila melanogaster*, nos propusimos investigar el posible papel de este factor de transcripción en dicho contexto.

Nuestros resultados destacan el papel clave de Dmp53 en la regulación de las células madre intestinales en moscas adultas. Al analizar moscas control y moscas deficientes de Dmp53 (p53<sup>5A14</sup>), observamos que este factor de transcripción regula tanto el número de ISCs como el tamaño total del intestino, sin afectar significativamente la composición de EBs. Además, mientras que en las moscas control la mayoría de los clústeres de ISCs están formados por una sola célula, en ausencia de Dmp53 se generan clústeres más grandes, con entre 2-5 células Delta+(ISCs). Mediante el uso de *esg-Gal4<sup>ts</sup>*, *delta-Gal4* y p53<sup>H159.N</sup>, confirmamos que el efecto de Dmp53 es específico en las ISCs, consolidando su papel en la homeostasis del epitelio intestinal. Dado que la deficiencia de Dmp53 conduce a la

acumulación de ISC, investigamos su posible función en la regulación de la proliferación de estas células. Utilizando anticuerpos anti-PH3, confirmamos que Dmp53 desempeña un papel en el control de la proliferación de ISCs. Estos hallazgos, en conjunto con estudios previos sobre la función de p53 en la regulación de células madre, refuerzan la hipótesis de un vínculo evolutivo temprano entre p53 y el mantenimiento de la homeostasis en poblaciones de células madre (Pearson y Sánchez Alvarado, 2010; Mandal et al., 2011; Sperka et al., 2012; Wylie et al., 2014).

#### 7.4 Mecanismos de regulación de Dmp53 en ISCs.

Para profundizar en la función de Dmp53 en ISC, analizamos la activación de este factor de transcripción en el intestino de *Drosophila melanogaster*. Nuestros resultados muestran que solo algunas células ISCs presentan activación de los reporteros de genes blanco de Dmp53, lo que sugiere una regulación dinámica y específica de la activación de este factor de transcripción en las ISC. P53 desempeña un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, especialmente en la fase G1, donde regula la respuesta al daño genético y evita que las células avancen a la fase S en presencia de errores en el ADN (Miettinen et al., 2001). Esta función de p53 es crucial para prevenir la proliferación celular descontrolada y la formación de tumores (Otsuka et al., 2014; Spurgers et al., 2006). En células madre embrionarias de ratón (ESCs), la vía p53/p21 juega un rol esencial en la regulación de la duración de la fase G1. En presencia de suero, las ESCs presentan una fase G1 extremadamente corta debido a la inhibición de la vía p53/p21, mientras que en condiciones libres de suero, la activación de p53 prolonga la fase G1 a través de la regulación de la proteína del retinoblastoma (ter Huurne et al., 2020). Esta regulación del ciclo celular sería clave en el control de la pluripotencia de las ESC. Dado entonces el papel central de p53 en la regulación del ciclo celular, planteamos que Dmp53 podría estar vinculado a una fase específica del ciclo celular en las ISCs. No obstante, aún es necesario realizar experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

Estudios previos han demostrado que miR-305 es esencial para mantener la homeostasis adaptativa en el intestino (Foronda et al., 2014). Este miRNA regula la vía Notch en las células madre intestinales, un aspecto clave que define la identidad celular de los progenitores del intestino, equilibrando la autorrenovación y la diferenciación de las células madre. Además, la expresión de miR-305 en estas células está modulada por el estado nutricional a través de la

vía de insulina, lo que establece un vínculo directo entre la regulación de la actividad de la vía Notch y el control nutricional (Foronda et al., 2014).

Durante el desarrollo de este trabajo, investigamos la posible regulación de p53 por miRNAs en el intestino adulto de *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, nuestros resultados no respaldan una regulación de Dmp53 por miR-305 en las ISCs. Utilizando el sensor *p53-3'UTR-GFP*, observamos un patrón de expresión claro, con altos niveles de GFP en los enteroblastos (EBs). Estos niveles elevados de GFP podrían indicar una menor actividad de miRNAs y, por lo tanto, una mayor expresión de Dmp53. Sin embargo, este hallazgo no se correlaciona con los niveles más altos de actividad de Dmp53 observados en las ISCs. Esto sugiere que, a diferencia de lo observado en cuerpo graso, donde Dmp53 está regulado por miR-305, en el intestino esta relación podría no ser la misma. Además, aún queda por investigar un posible efecto específico de Dmp53 y su regulación por miRNAs en los EBs.

## 7.5 Dmp53 como regulador clave en la adaptación intestinal al estrés y su relación con el CRC.

El tracto intestinal adulto está constantemente expuesto a diversos estímulos, y una regeneración tisular inadecuada puede dar lugar a enfermedades inflamatorias y cáncer (Amcheslavsky et al., 2009). Para mantener la homeostasis tisular, es crucial el equilibrio entre la eliminación de células muertas y la producción de nuevas células (Nystul y Spradling, 2006; Metcalfe y Ferguson, 2008). En *Drosophila melanogaster*, los enterocitos maduros del epitelio intestinal se reemplazan aproximadamente cada semana (Micchelli y Perrimon, 2005), lo que resalta la importancia de una renovación celular constante para la homeostasis. Este proceso está influenciado por diversos factores, como el estado nutricional y la acumulación de daños, los cuales modulan tanto la velocidad de renovación de las células madre como su diferenciación (Amcheslavsky et al., 2009).

Dado el rol de Dmp53 en la regulación de la proliferación de ISCs, analizamos cómo esta regulación afecta la homeostasis del epitelio intestinal. Nuestros estudios muestran que, en condiciones basales, la reducción de los niveles de Dmp53 compromete la generación de nuevos enterocitos. Estos resultados sugieren que la ausencia de Dmp53 no sólo afecta la proliferación de las ISCs, sino también su diferenciación. Recientemente se ha descrito que Dmp53 regula transcripcionalmente genes como Numb, Brat y Traf4, que son reguladores

conservados en mamíferos y participan en la división asimétrica de las células madre neuronales. Este hallazgo es relevante, aunque en el intestino medio, la diferenciación celular depende principalmente de la vía Notch (Manzanero-Ortiz et al., 2024). En el futuro, planeamos realizar experimentos para explorar un posible rol de Dmp53 en la división asimétrica y/o diferenciación de EBs.

También evaluamos la posible función de Dmp53 en la respuesta adaptativa del intestino bajo dos condiciones de estrés: oxidativo y nutricional. Inicialmente, los resultados mostraron un aumento en la actividad de Dmp53 tras ambos tratamientos, lo que sugiere una activación específica de Dmp53 en respuesta al estrés. En animales control, frente al daño oxidativo, las células diferenciadas del intestino entran en apoptosis, lo que, a su vez, estimula la proliferación de las ISCs para reemplazar las células dañadas (Amcheslavsky et al., 2009). En contraste, los experimentos genéticos realizados indican que, en ausencia de Dmp53, se pierde la capacidad de regeneración del epitelio intestinal. Los defectos en la proliferación y diferenciación de las ISCs observados en mutantes Dmp53 persisten frente al estrés, lo que compromete una respuesta regenerativa adecuada.

De forma similar, la ausencia de Dmp53 compromete la respuesta adaptativa frente al ayuno. Durante la restricción nutricional, el intestino reduce el recambio celular y disminuye su tamaño, mientras que tras la realimentación, se promueve la proliferación y diferenciación celular, y se recupera el tamaño del tejido (Christensen et al., 2024). Por el contrario, en ausencia de Dmp53, el intestino no logra ajustar su tamaño según las necesidades fisiológicas. De manera similar, moscas mutantes Dmp53 sometidas al ayuno mantienen altas tasas de proliferación de las ISCs y defectos en su diferenciación. Esta pérdida de la plasticidad del intestino frente al estrés nutricional evidencia un rol clave de Dmp53 en el mantenimiento de la homeostasis y regeneración intestinal.

En humanos, varios genes clave están asociados al desarrollo de cáncer colorectal (CRC). Entre ellos se encuentran APC, que regula la vía Wnt; CTNNB1, que codifica para la  $\beta$ -catenina, un mediador crítico de esta vía; K-RAS y BRAF, oncogenes involucrados en la proliferación celular a través de la vía MAPK; y TP53, cuyo papel como supresor tumoral es esencial para la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al daño en el ADN (Bienz et al., 2000; Kinzler et al., 1996; Muzny et al., 2012). En *Drosophila melanogaster*, se ha desarrollado un modelo para el estudio del CRC que incluye los genes APC y RAS, que desempeñan funciones homólogas a las observadas en humanos en la regulación de la

proliferación y diferenciación celular (Martorell et al., 2014). Sin embargo, el papel específico de Dmp53 en CRC en *Drosophila melanogaster* aún no ha sido establecido.

En esta tesis, decidimos investigar si la combinación de Dmp53-Ras en el intestino medio adulto podría inducir una hiperproliferación asociada posiblemente a CRC. Mediante la coexpresión de la versión dominante negativa de *Dmp53 (p53H159.N)* y *Ras (RasV12)* en ISCs y EBs, observamos una marcada hiperproliferación celular en el intestino medio, reflejada en un aumento significativo en el número de células *esg-GFP+* en comparación con los controles. Estos resultados sugieren que la combinación de la pérdida de función de Dmp53 y la activación de Ras es suficiente para inducir crecimientos de tipo tumoral, replicando características del CRC humano, como la proliferación aumentada. Aunque no se analizaron en esta tesis, otras características del CRC humano, que incluyen el bloqueo de la diferenciación, la alteración de la polaridad celular y la arquitectura tisular (Martorell et al., 2014).

Estos resultados son interesantes, ya que *Drosophila melanogaster* conforma un modelo valioso para el estudio de tratamientos de medicina personalizada (Bangsi et al., 2016). Además, se ha desarrollado una plataforma para estudiar alelos humanizados de p53 en *Drosophila*, lo que permite investigar variantes de este gen asociadas al cáncer (D'Brot et al., 2017). Por lo tanto, nuestro estudio podría contribuir al avance de modelos experimentales para investigar el CRC humano.

**Conclusiones**

## 8. Conclusiones.

### Regulación de miRNAs por dMyc

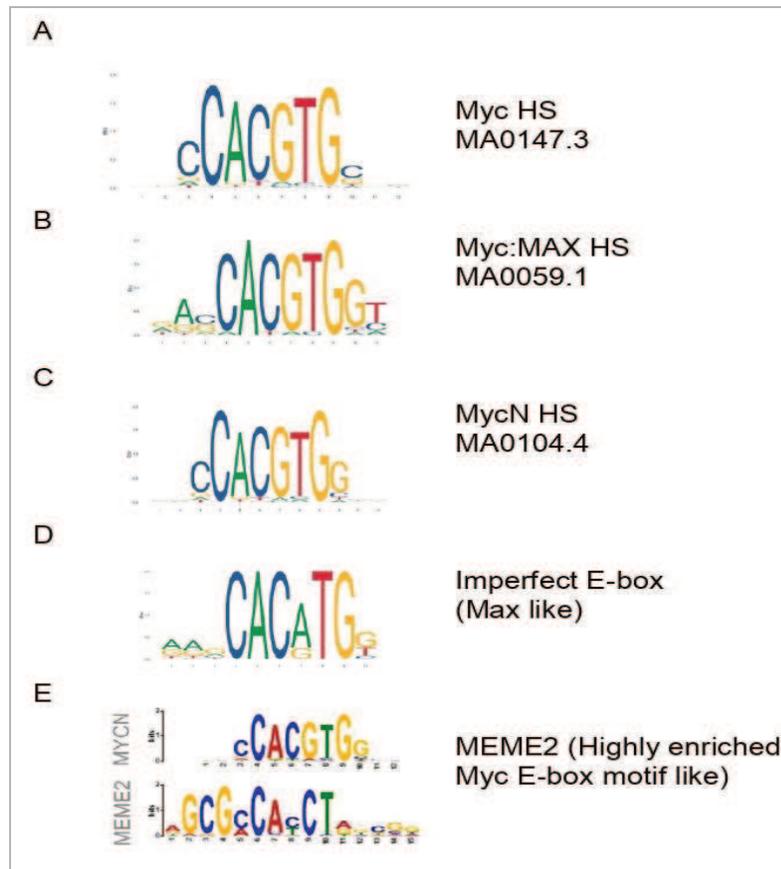
- dMyc desempeña un papel clave en la expresión de un conjunto significativo de miRNAs en *Drosophila melanogaster*.
- dMyc regula de manera directa el 56 % de los transcritos de miRNAs anotados en su genoma de *Drosophila melanogaster*.
- La actividad de dMyc es esencial para la biogénesis de miRNAs, modulando tanto la expresión de pri-miRNAs como la de componentes centrales de la maquinaria de procesamiento de miRNAs.
- En el primordio del ala, dMyc regula la biogénesis de miRNAs influyendo en su transcripción y procesamiento.
- La transcripción de *miR-305* está directamente regulada por dMyc, mientras que la expresión de *Dcr-1* y *Drosha* en el cuerpo graso bajo privación de nutrientes opera mediante un mecanismo independiente de dMyc.
- En el cuerpo graso, dMyc regula la expresión de *miR-305* de manera dependiente de nutrientes, influyendo así en los niveles de Dmp53 y en la resistencia al estrés nutricional.

### Función de Dmp53 en la homeostasis intestinal

- Dmp53 es esencial para regular la proliferación y el número de células madre intestinales (ISCs) en el intestino de moscas adultas. Su ausencia provoca un aumento significativo en el número y tamaño de los clústeres de ISCs.
- La activación de Dmp53 en ISCs ocurre de manera dinámica, probablemente en función del ciclo celular e independiente de la regulación por miRNAs.
- Dmp53 es crucial para la regeneración tisular, ya que promueve la generación de nuevas células y mantiene la composición celular del intestino medio en condiciones de homeostasis.
- Su función es determinante en la respuesta adaptativa al estrés, ajustando las tasas de regeneración tisular y el tamaño del órgano según las necesidades fisiológicas.
- La combinación de pérdida de Dmp53 con la expresión de RasV12 induce una hiperproliferación de tipo tumoral, un efecto que no se observa cuando estas alteraciones ocurren de manera individual.

**Supplementaria**

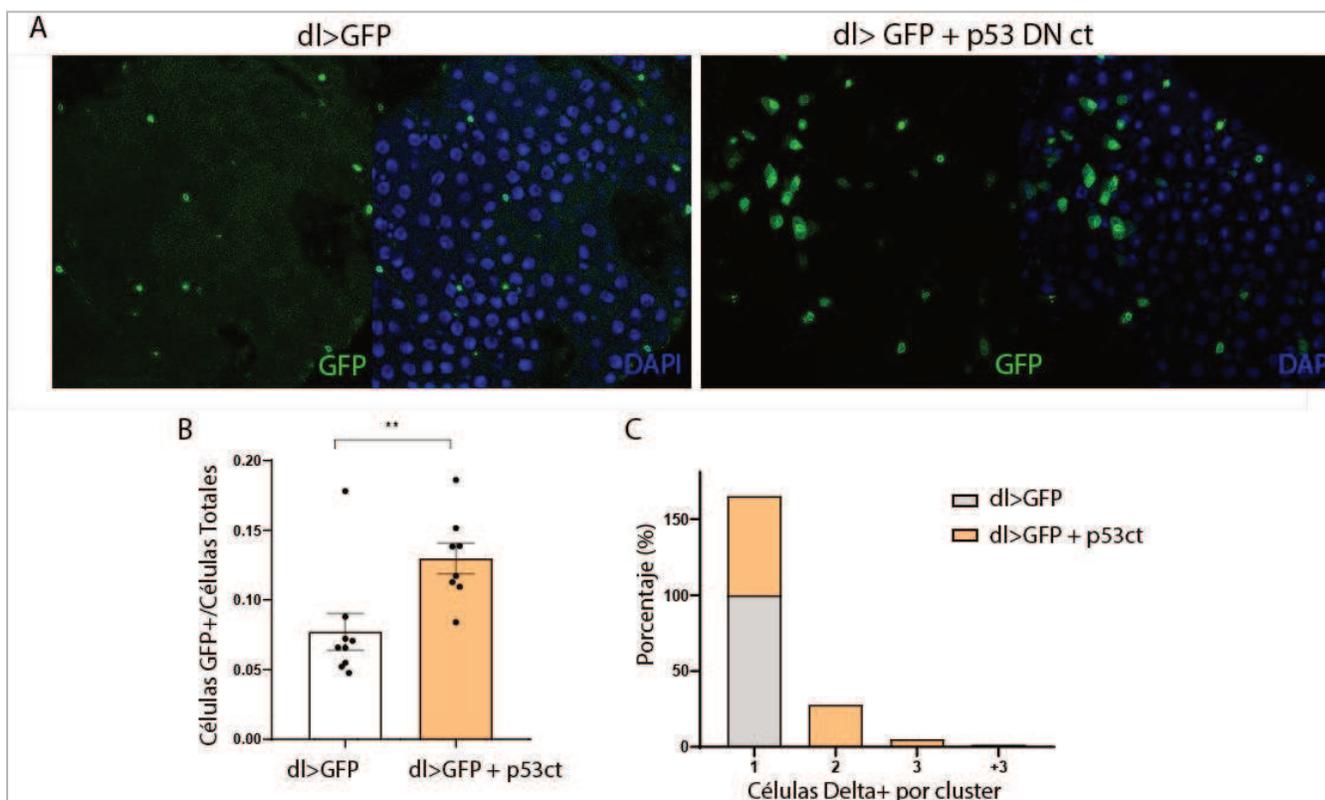
## 9. Suplementaria



**Figura S1.** (A-D) Secuencias canónicas (A-C) y no canónicas (D) de cajas E-box de unión a Myc. (E) Motivo putativo enriquecido de unión a Myc identificado mediante un descubrimiento de motivos *de novo* no sesgado utilizando MEME (ver Materiales y métodos para más detalles).



**Figura S2.** Controles de los sensores de miRNAs en discos imaginales de ala. Discos imaginales de alas que portan el sensor *p53* y expresan *dcr-1<sup>RNAi</sup>* bajo el control de *ptc-Gal4* (marcados por la expresión de RFP, en rojo) con tinción para visualizar GFP (en verde o blanco). Las flechas rojas indican el límite anterior-posterior (A-P). A: anterior; P: posterior.



**Figura S3. Expresión de Dmp53<sup>ct</sup> en ISCs incrementa el número total de células madre en el intestino medio.**

(A) Inmunohistoquímica para visualizar células progenitoras (GFP+) en animales delta>GFP (control) o delta>p53ct. (B) Cuantificación de células GFP+ en relación al número total de células (DAPI+) por intestino. N=5-10 intestinos por genotipo y condición. (C) Cuantificación del número de células Delta+ por cada clúster de ISCs. (D) Cuantificación de células que se encuentran en mitosis (PH3+) por intestino en animales delta>GFP (control) o delta>p53ct. Los resultados se expresan como células Delta+/Células totales (B) y % de células Delta+ por cluster según genotipo (C). Media  $\pm$  SEM. Pruebas t no emparejadas y de dos colas: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; ns: no significativo.

**Tabla S1.** Tabla que compila los genes de miRNA de *Drosophila melanogaster* considerando las bases de datos Modencode y TransmiR, su ubicación genómica, el sitio de unión más cercano de dMyc y las secuencias de E-box.

| miRNAs IDs  | símbolo del gen | seq nombre | Localización del miRNA |          |         |       | Característica genómica                  |                                   |                    | Myc sobre los promotores de genes de miRNAs |                    |                            |                                      |                            |
|-------------|-----------------|------------|------------------------|----------|---------|-------|--|-----------------------------------|--------------------|---|--------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
|             |                 |            | comienzo               | fin      | ta maño | hebra | Región intragenica exonica (Gen Huesped) | mirtron intragenico (Gen Huesped) | Region Intergenica | ChIP ModENCODE                              | Ubicación del pico | Sitio de union (ModENCODE) | Trans mi r Data base                 | Sitio de unión (Transmi r) |
| FBgn0262411 | mir-92a         | chr3R      | 25646506               | 25646600 | 95      | +     |  | FBgn0039350                       |                    | chr3 R : 25646786 - 25647280                | downstream         | HS MYC                     | chr3 R: 25646842-25647011(score=577) | MYCN                       |

Supplementaria.

|             |           |       |          |          |     |   |                             |             |     |                                  |                       |                  |   |         |
|-------------|-----------|-------|----------|----------|-----|---|-----------------------------|-------------|-----|----------------------------------|-----------------------|------------------|---|---------|
| FBgn0262388 | mir-92b   | chr3R | 25651398 | 25651497 | 100 | + | FBgn0039350,<br>FBgn0267577 |             |     | chr3 R : 25646786 -<br>25647280  | upstream              | HS MYC           | chr3 R: 2564684-25647011(score=577)     | MYCN    |
| FBgn0263537 | mir-4951  | chr3R | 21316716 | 21316865 | 150 | + | FBgn0001234                 |             |     | chr3 R : 21296253 / chr3 R : 212 | downstream            | MYC:MAX/ MYC:MAX | chr3R:<br>21295756-21296164(score=1000) | MYC:MAX |
| FBgn0262451 | mir-ban   | chr3L | 642208   | 642288   | 81  | + | FBgn0286827                 |             |     | chr3L : 648077 -<br>648546       | downstream            | MYC:MAX          | chr3L: 628268-628483(score=340)         | MYC:MAX |
| FBgn0262432 | mir-8     | chr2R | 16831432 | 16831518 | 87  | + | FBgn0263659                 |             |     | chr2R : 16830386 -<br>16830629   | upstream              | MYC:MAX          | chr2R: 16824139-16824282(score=667)     | MYC:MAX |
| FBgn0262407 | mir-308   | chr2R | 14215802 | 14215864 | 63  | - |                             | FBgn0033912 |     | chr2R : 14216481 -<br>14216872   | upstream              | MYC:MAX          | chr2R: 14216537-14216694(score=622)     | MYC:MAX |
| FBgn0263542 | mir-4954  | chrX  | 2029004  | 2029094  | 91  | - |                             | FBgn0000667 |     | chrX : 2042031 / chrX : 2042     | upstream              | MEME2/ MEME2     | chrX: 2041288-2041583(score=388)        | MYC:MAX |
| FBgn0263529 | mir-4977  | chr2R | 7406733  | 7406837  | 105 | - | FBgn0033166                 |             |     | chr2R : 7395853 -<br>7396112     | downstream            | MEME2            | chr2R: 7407768-7407995(score=1000)      | MYC:MAX |
| FBgn0262424 | mir-10    | chr3R | 6809506  | 6809582  | 77  | - | FBgn0261503                 |             |     | chr3 R : 6806632 -<br>6807098    | downstream            | HS MYC           | chr3R: 6820339-6820592(score=714)       | MYC:MAX |
| FBgn0263538 | mir-4965  | chrX  | 16606108 | 16606194 | 87  | + |                             | FBgn0061200 |     | chrX : 16599363 / chrX : 1661    | downstream            | MYC:MAX          | chrX: 16599145-16599281(score=490)      | MYC:MAX |
| FBgn0262315 | mir-2493  | chr3R | 15130754 | 15130859 | 106 | - |                             | FBgn0261859 |     | chr3 R : 15131836 -<br>15132205  | upstream              | -                | chr3R:<br>15131891-15132109(score=1000) | MYC:MAX |
| FBgn0262393 | mir-33    | chr3L | 19797961 | 19798059 | 99  | + |                             | FBgn0261283 |     |                                  |                       |                  | chr3L: 19793495-19793808(score=767)     | MYC:MAX |
| FBgn0263562 | mir-4948  | chr3R | 31051098 | 31051203 | 106 | - |                             |             | YES |                                  |                       |                  | chr3 R: 31053859-31054040(score=704)    | MYC:MAX |
| FBgn0263530 | mir-4917  | chrX  | 14199545 | 14199621 | 77  | + | FBgn0004649                 | FBgn0004649 |     |                                  |                       |                  | chrX: 14200090-14200240(score=544)      | MYC:MAX |
| FBgn0283553 | mir-9379  | chr2R | 13852845 | 13852901 | 57  | - |                             |             | YES |                                  |                       |                  | chr2R: 13854256-13854422(score=315)     | MYC:MAX |
| FBgn0262438 | mir-1006  | chr2L | 16724795 | 16724858 | 64  | - |                             | FBgn0027779 |     | chr2L : 16719705 -<br>16719871   | downstream            | MYCN             | chr2L: 16727783-16727918(score=474)     | MEME2   |
| FBgn0263531 | mir-4955  | chrX  | 2544740  | 2544908  | 169 | - | FBgn0284408                 | FBgn0284408 |     | chrX : 2547077 -<br>2547473      | upstream              | MYC:MAX          | chrX: 2545357-2545534(score=364)        | MEME2   |
| FBgn0262420 | mir-318   | chr3R | 10408302 | 10408369 | 68  | + |                             |             | YES | chr3 R : 10413103 -<br>10413283  | downstream            | MYC:MAX          | chr3 R: 10407256-10407405(score=623)    | MEME2   |
| FBgn0262223 | mir-994   | chr3R | 10408137 | 10408227 | 91  | + |                             |             | YES | chr3 R : 10413103 -<br>10413283  | downstream            | MYC:MAX          | chr3 R: 10407256-10407405(score=623)    | MEME2   |
| FBgn0263558 | mir-4980  | chr2R | 7786322  | 7786443  | 122 | + |                             | FBgn0015614 |     | chr2R : 7785837 -<br>7786088     | upstream              | MYC:MAX          | chr2R: 7782561-7782681(score=475)       | MEME2   |
| FBgn0262405 | mir-998   | chr3R | 21621879 | 21622021 | 143 | - |                             | FBgn0011766 |     | chr3 R : 21619234 - 216201       | downstream / upstream | MEME2/ MEME2     | chr3 R: 21626624-21626804(score=985)    | MEME2   |
| FBgn0263534 | mir-4960  | chrX  | 569903   | 570003   | 101 | + |                             | FBgn0000108 |     | chrX : 529828 -<br>530242        | upstream              | MEME2            | chrX: 529800-530123(score=1000)         | MEME2   |
| FBgn0263548 | mir-4957  | chrX  | 15319954 | 15320037 | 84  | - |                             |             | YES | chrX : 15323398 -<br>15323680    | upstream              | MEME2            | chrX: 15319360-15319509(score=570)      | MEME2   |
| FBgn0283554 | mir-9371  | chr3R | 9989120  | 9989180  | 61  | + | FBgn0267336                 |             |     | chr3 R : 9985935 -<br>9986712    | upstream              | MEME2            | chr3R: 9986205-9986452(score=1000)      | MEME2   |
| FBgn0262444 | mir-1013  | chr3R | 30791636 | 30791696 | 61  | - |                             | FBgn0011739 |     | chr3 R : 30808296 -<br>30808657  | upstream              | MEME2            | chr3 R: 30806574-30806713(score=563)    | MEME2   |
| FBgn0262290 | mir-iab-8 | chr3R | 16856275 | 16856342 | 68  | - |                             | FBgn0264857 |     | chr3 R : 16869106 -<br>16869605  | within                | MEME2            | chr3R:<br>16857116-16857297(score=1000) | MEME2   |
| FBgn0263633 | mir-3644  | chr3R | 15192297 | 15192357 | 61  | - |                             | FBgn0038296 |     | chr3 R : 15196318 -<br>15197315  | upstream              | MEME2            | chr3 R: 15196419-15196614(score=579)    | MEME2   |
| FBgn0262419 | mir-277   | chr3R | 10100022 | 10100121 | 100 | + | FBgn0263413                 |             |     | chr3 R : 10100452 -<br>10100989  | within                | MEME2            | chr3R:<br>10100527-10100930(score=1000) | MEME2   |
| FBgn0262459 | mir-34    | chr3R | 10100936 | 10101034 | 99  | + | FBgn0263413                 |             |     | chr3 R : 10100452 -<br>10100989  | within                | MEME2            | chr3R:<br>10100527-10100930(score=1000) | MEME2   |

Supplementaria.

|             |          |       |          |          |     |   |             |             |   |                       |                |                                      |        |
|-------------|----------|-------|----------|----------|-----|---|-------------|-------------|---|-----------------------|----------------|--------------------------------------|--------|
| FBgn0262461 | mir-315  | chr3L | 18860971 | 18861054 | 84  | + | FBgn0266937 |             | chr3L : 18848384 - 18848820                           | upstream              | MEME2          | chr3L: 18848462-18848698(score=1000) | MEME2  |
| FBgn0263572 | mir-4981 | chr2R | 8015249  | 8015343  | 95  | + |             | YES         | chr2R : 8014165 - 8014698                             | upstream              | MEME2          | chr2R: 8014272-8014619(score=1000)   | MEME2  |
| FBgn0262370 | mir-7    | chr2R | 20606067 | 20606154 | 88  | + | FBgn0267791 |             | chr2R : 20603197 - 20603629                           | upstream              | MEME2          | chr2R: 20603245-20603567(score=1000) | MEME2  |
| FBgn0263515 | mir-4983 | chr2R | 19637414 | 19637521 | 108 | + |             | YES         | chr2R : 19632613 - 19633280                           | upstream              | MEME2          | chr2R: 19632924-19633166(score=1000) | MEME2  |
| FBgn0262403 | mir-278  | chr2R | 15657066 | 15657163 | 98  | + | FBgn0260429 |             | chr2R : 15657746 - 15658097                           | downstream            | MEME2          | chr2R: 15657786-15658045(score=1000) | MEME2  |
| FBgn0263544 | mir-4949 | chr3R | 31219274 | 31219372 | 99  | - | FBgn0039830 | FBgn0039830 | - 31218995/chr3R : 31219274                           | upstream / downstream | HS MYC / MEME2 | chr3R: 31219580-31219853(score=1000) | MEME2  |
| FBgn0262260 | mir-2282 | chr3L | 3412145  | 3412251  | 107 | - | FBgn0014388 |             | chr3L : 3418321 - 3418647                             | upstream              | HS MYC         | chr3L: 3417871-3418090(score=866)    | MEME2  |
| FBgn0263532 | mir-4962 | chrX  | 3777382  | 3777505  | 124 | + | FBgn0283657 |             | chrX : 3773378 - 3773741                              | upstream              | CACATG         | chrX: 3719653-3720031(score=1000)    | MEME2  |
| FBgn0283559 | mir-9377 | chrX  | 12665217 | 12665268 | 52  | + | FBgn0011837 |             | chrX : 12664044 - 12664510                            | upstream              | CACATG         | chrX: 12658855-12659210(score=1000)  | MEME2  |
| FBgn0262203 | mir-967  | chr2L | 12460004 | 12460100 | 97  | - | FBgn0259176 |             | chr2L : 12454995 - 12455476                           | downstream            | CACATG         | chr2L: 12484273-12484425(score=321)  | MEME2  |
| FBgn0262379 | mir-1012 | chr3R | 26861349 | 26861407 | 59  | - | FBgn0051072 |             | chr3R : 26863123 - 26863334                           | upstream              | -              | chr3R: 26866704-26866966(score=1000) | MEME2  |
| FBgn0266076 | mir-276a | chr3L | 10365228 | 10365325 | 98  | + | FBgn0267668 |             | chr3L : 10321627 - 10322195                           | upstream              | -              | chr3L: 10363851-10364105(score=626)  | MEME2  |
| FBgn0263561 | mir-4984 | chr2L | 8141540  | 8141662  | 123 | - | FBgn0031990 |             | chr2L : 8159499 - 8159968                             | upstream              | -              | chr2L: 8162361-8162543(score=666)    | MEME2  |
| FBgn0263523 | mir-4972 | chr2L | 3636967  | 3637073  | 107 | - | FBgn0000721 |             | chr2L : 3633032 / chr2L : 3633032                     | downstream / upstream | -              | chr2L: 3657348-3657681(score=1000)   | MEME2  |
| FBgn0262447 | mir-14   | chr2R | 9553762  | 9553824  | 63  | + | FBgn0263660 |             |   |                       |                | chr2R: 9552667-9552880(score=310)    | MEME2  |
| FBgn0263629 | mir-3643 | chr2R | 17766393 | 17766460 | 68  | - | FBgn0034277 |             |   |                       |                | chr2R: 17766949-17767137(score=874)  | MEME2  |
| FBgn0263526 | mir-4971 | chr2L | 3463290  | 3463400  | 111 | - | FBgn0005616 |             |   |                       |                | chr2L: 3469972-3470129(score=735)    | MEME2  |
| FBgn0262185 | mir-995  | chr3R | 20735923 | 20736012 | 90  | + | FBgn0004107 |             |   |                       |                | chr3R: 20735494-20735647(score=729)  | MEME2  |
| FBgn0262317 | mir-966  | chr2L | 6045627  | 6045713  | 87  | - | FBgn0000052 |             | chr2L : 6045796 - 6046466                             | upstream              | MYCN           | chr2L: 6045885-6046183(score=1000)   | HS Myc |
| FBgn0262448 | mir-279  | chr3R | 29215585 | 29215684 | 100 | + | FBgn0051044 | FBgn0051044 | chr3R : 29219852 - 29220360                           | upstream              | MYC:MAX        | chr3R: 29215132-29215348(score=495)  | HS Myc |
| FBgn0262404 | mir-996  | chr3R | 29217184 | 29217280 | 97  | + | FBgn0051044 | FBgn0051044 | chr3R : 29219852 - 29220360                           | upstream              | MYC:MAX        | chr3R: 29215132-29215348(score=495)  | HS Myc |
| FBgn0262442 | mir-2501 | chr3L | 8111107  | 8111177  | 71  | + | FBgn0027549 |             | chr3L : 8110526 / chr3L : 8110526                     | upstream / downstream | HS MYC/MYC:MAX | chr3L: 8110279-8110426(score=643)    | HS Myc |
| FBgn0262453 | mir-275  | chr2L | 7425795  | 7425892  | 98  | + | FBgn0264439 |             | chr2L : 7423726 / chr2L : 7423726                     | upstream              | HS MYC/MYC:MAX | chr2L: 7423488-7423782(score=1000)   | HS Myc |
| FBgn0262458 | mir-305  | chr2L | 7425972  | 7426044  | 73  | + |             | YES         | chr2L : 7423378 - 7423726 / chr2L : 7424485 - 7424636 | upstream              | HS MYC/MYC:MAX | chr2L: 7423488-7423782(score=1000)   | HS Myc |
| FBgn0283549 | mir-9372 | chrX  | 633691   | 633751   | 61  | - | FBgn0020381 |             | chrX : 629371 - 629887                                | downstream            | HS MYC         | chrX: 637047-637267(score=675)       | HS Myc |
| FBgn0263631 | mir-3645 | chrX  | 5622280  | 5622416  | 137 | - | FBgn0004687 |             | chrX : 5622417 - 5622790                              | upstream              | HS MYC         | chrX: 5622503-5622686(score=719)     | HS Myc |
| FBgn0263557 | mir-4967 | chr2R | 10012093 | 10012199 | 107 | - | FBgn0022382 |             | chr2R : 10026659 - 10026975                           | upstream              | HS MYC         | chr2R: 10026687-10026912(score=737)  | HS Myc |
| FBgn0262252 | mir-965  | chr2L | 243035   | 243141   | 107 | - | FBgn0266557 |             | chr2L : 250862 - 251207                               | upstream              | HS MYC         | chr2L: 251003-251181(score=727)      | HS Myc |

Supplementaria.

|             |           |       |          |          |     |   |             |                |     |                                 |            |               |   |        |
|-------------|-----------|-------|----------|----------|-----|---|-------------|----------------|-----|---------------------------------|------------|---------------|---|--------|
| FBgn0263546 | mir-4985  | chr2R | 24294231 | 24294331 | 101 | + |             | FBgn0034999    |     | chr2R : 24293218 -<br>24293726  | upstream   | CACATG        | chr2R: 24291097-24291267(score=894)     | HS Myc |
| FBgn0262463 | mir-100   | chr2L | 18471434 | 18471533 | 100 | + | FBgn0263049 |                |     |                                 |            |               | chr2L: 18454512-18454738(score=1000)    | HS Myc |
| FBgn0262457 | mir-1015  | chr3R | 24339232 | 24339295 | 64  | + |             | FBgn0039184    |     |                                 |            |               | chr3R:<br>24333248-24333484(score=1000) | HS Myc |
| FBgn0262456 | mir-125   | chr2L | 18472315 | 18472424 | 110 | + | FBgn0263049 |                |     |                                 |            |               | chr2L: 18454512-18454738(score=1000)    | HS Myc |
| FBgn0262189 | mir-2500  | chr3L | 16998457 | 16998524 | 68  | - | FBgn0036684 | FBgn0036684    |     |                                 |            |               | chr3L: 17012532-17012646(score=390)     | HS Myc |
| FBgn0263521 | mir-4969  | chr3R | 21798514 | 21798671 | 158 | - |             | FBgn0013759    |     |                                 |            |               | chr3 R: 21822614-21822806(score=738)    | HS Myc |
| FBgn0283555 | mir-9373  | chr3R | 19621080 | 19621138 | 59  | - | FBgn0038720 | FBgn0038720    |     |                                 |            |               | chr3 R: 19620140-19620236(score=361)    | HS Myc |
| FBgn0262331 | mir-999   | chr3R | 21798227 | 21798331 | 105 | - |             | FBgn0013759    |     |                                 |            |               | chr3 R: 21822614-21822806(score=738)    | HS Myc |
| FBgn0262406 | mir-let7  | chr2L | 18472034 | 18472111 | 78  | + | FBgn0263049 |                |     |                                 |            |               | chr2L: 18454512-18454738(score=1000)    | HS Myc |
| FBgn0263547 | mir-4944  | chr3R | 10513005 | 10513133 | 129 | - |             | FBgn0001235    |     | chr3 R : 10675146 -<br>10675520 | upstream   | MYC:MAX       | chr3R:<br>10614334-10614668(score=1000) | CACATG |
| FBgn0262194 | mir-2489  | chr2L | 13609974 | 13610068 | 95  | + | FBgn0259984 | FBgn0259984    |     | - 13642393-chr2L : 136          | downstream | MEME2/MEME2   | chr2L: 13549196-13549345(score=397)     | CACATG |
| FBgn0262327 | mir-2281  | chr3R | 14396399 | 14396501 | 103 | - |             | FBgn0285955    |     | - 14391736/ chr3R : 144         | / upstream | MEME2/ HS MYC | chr3 R: 14481605-14481996(score=785)    | CACATG |
| FBgn0262286 | mir-1001  | chr3R | 27642466 | 27642555 | 90  | - | FBgn0266579 | FBgn0266579    |     | - 27652066/ chr3R : 276         | / upstream | CACATG / -    | chr3R:<br>27651780-27652024(score=1000) | CACATG |
| FBgn0263513 | mir-4953  | chr3R | 22774140 | 22774232 | 93  | + |             | 039025, FBgn00 |     | chr3 R : 22793723 -<br>22794731 | downstream | CACATG        | chr3 R: 22750755-22750902(score=404)    | CACATG |
| FBgn0263556 | mir-4940  | chr3L | 9144593  | 9144697  | 105 | + | FBgn0263456 |                |     | - 9134784/ chr3L : 913          | upstream   | -             | chr3L: 9133313-9133509(score=652)       | CACATG |
| FBgn0283638 | mir-9388  | chr3L | 22945116 | 22945207 | 92  | + |             |                | YES |                                 |            |               | chr3L: 22940335-22940543(score=1000)    | CACATG |
| FBgn0262375 | mir-1005  | chr2L | 4343696  | 4343756  | 61  | + |             | FBgn0020762    |     | - 4333918/ chr2L : 434          | / upstream | MYC:MAX/MEME2 | chr2L: 4331861-4332058(score=677)       | -      |
| FBgn0263630 | mir-3641  | chrX  | 2171086  | 2171154  | 69  | + |             | FBgn0023540    |     | chrX : 2170308 -<br>2170775     | upstream   | MYC:MAX       | chrX: 2158964-2159126(score=554)        | -      |
| FBgn0262377 | mir-2a-1  | chr2L | 19569897 | 19569972 | 76  | - |             | FBgn0005672    |     | chr2L : 19565232 -<br>19565906  | upstream   | MYC:MAX       | chr2L: 19571963-19572113(score=555)     | -      |
| FBgn0262460 | mir-2a-2  | chr2L | 19569490 | 19569561 | 72  | - |             | FBgn0005672    |     | chr2L : 19565232 -<br>19565906  | upstream   | MYC:MAX       | chr2L: 19571963-19572113(score=555)     | -      |
| FBgn0262449 | mir-2b-2  | chr2L | 19570182 | 19570264 | 83  | - |             | FBgn0005672    |     | chr2L : 19565232 -<br>19565906  | upstream   | MYC:MAX       | chr2L: 19571963-19572113(score=555)     | -      |
| FBgn0263555 | mir-4943  | chr2L | 16528375 | 16528491 | 117 | - | FBgn0032587 | FBgn0032587    |     | chr2L : 16507669 -<br>16507999  | downstream | MYC:MAX       | chr2L: 16533418-16533557(score=351)     | -      |
| FBgn0262434 | mir-11    | chr3R | 21622497 | 21622571 | 75  | - |             | FBgn0011766    |     | chr3R : 21619234 - 216201       | / upstream | MEME2/ MEME2  | chr3 R: 21626624-21626804(score=985)    | -      |
| FBgn0283637 | mir-9370  | chrX  | 11710252 | 11710301 | 50  | - | FBgn0030328 |                |     | chrX : 529828 -<br>530242       | upstream   | MEME2         | chrX: 11709931-11710079(score=450)      | -      |
| FBgn0262390 | mir-303   | chrX  | 4366179  | 4366248  | 70  | - |             |                | YES | chrX : 4366149 -<br>4366544     | upstream   | MEME2         | chrX: 4366224-4366476(score=1000)       | -      |
| FBgn0262339 | mir-982   | chrX  | 4365806  | 4365898  | 93  | - |             |                | YES | chrX : 4366149 -<br>4366544     | upstream   | MEME2         | chrX: 4366224-4366476(score=1000)       | -      |
| FBgn0262235 | mir-983-1 | chrX  | 4368309  | 4368399  | 91  | - |             |                | YES | chrX : 4366149 -<br>4366544     | downstream | MEME2         | chrX: 4366224-4366476(score=1000)       | -      |
| FBgn0262282 | mir-984   | chrX  | 4368646  | 4368735  | 90  | - |             |                | YES | chrX : 4366149 -<br>4366544     | downstream | MEME2         | chrX: 4366224-4366476(score=1000)       | -      |
| FBgn0262180 | mir-2283  | chr3R | 9517524  | 9517599  | 76  | + |             | 037703, FBgn00 |     | chr3 R : 9513101 -<br>9513324   | upstream   | MEME2         | chr3R: 9515849-9516068(score=1000)      | -      |

Suplementaria.

|             |           |       |          |          |     |   |             |                |                             |                             |            |                                     |                                      |   |
|-------------|-----------|-------|----------|----------|-----|---|-------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| FBgn0263569 | mir-4968  | chr3L | 11552539 | 11552693 | 155 | - |             | FBgn0259481    |                             | chr3L : 11523110 - 11523912 | downstream | MEME2                               | chr3L: 11565033-11565201(score=543)  | - |
| FBgn0262427 | mir-1016  | chr2R | 14233130 | 14233187 | 58  | - |             | FBgn0261276    |                             | chr2R : 14235303 - 14235794 | upstream   | MEME2                               | chr2R: 14235357-14235554(score=699)  | - |
| FBgn0262300 | mir-988   | chr2R | 12158872 | 12158970 | 99  | - |             | FBgn0033688    |                             | chr2R : 12162781 - 12163336 | upstream   | MEME2                               | chr2R: 12162944-12163211(score=1000) | - |
| FBgn0262177 | mir-375   | chr2L | 857542   | 857632   | 91  | + | FBgn0266884 |                | chr2L : 852339 - 852998     | upstream                    | MEME2      | chr2L: 855338-855527(score=1000)    | -                                    |   |
| FBgn0262392 | mir-1004  | chr2L | 3767621  | 3767688  | 68  | + |             | FBgn0263846    |                             | chr2L : 3762718 - 3763147   | upstream   | HS MYC                              | chr2L: 3762869-3763008(score=531)    | - |
| FBgn0263563 | mir-4956  | chrX  | 7085737  | 7085853  | 117 | - | FBgn0264270 |                | chrX : 7098055 - 7098188    | upstream                    | -          | chrX: 7098043-7098294(score=1000)   | -                                    |   |
| FBgn0263571 | mir-4959  | chrX  | 19169131 | 19169248 | 118 | - | FBgn0030989 |                | chrX : 19170890 - 19171195  | upstream                    | -          | chrX: 19170907-19171114(score=1000) | -                                    |   |
| FBgn0263516 | mir-4958  | chrX  | 16080923 | 16081056 | 134 | - | FBgn0028397 | FBgn0028397    | chrX : 16091540 - 16092417  | upstream                    | -          | chrX: 16091521-16091648(score=259)  | -                                    |   |
| FBgn0262395 | mir-12    | chrX  | 15509473 | 15509546 | 74  | + |             | FBgn0027287    |                             | chrX : 15511543 - 15511860  | downstream | -                                   | chrX: 15482258-15482406(score=599)   | - |
| FBgn0262426 | mir-283   | chrX  | 15507956 | 15508055 | 100 | + |             | FBgn0027287    |                             | chrX : 15511543 - 15511860  | downstream | -                                   | chrX: 15482258-15482406(score=599)   | - |
| FBgn0262409 | mir-304   | chrX  | 15508959 | 15509046 | 88  | + |             | FBgn0027287    |                             | chrX : 15511543 - 15511860  | downstream | -                                   | chrX: 15482258-15482406(score=599)   | - |
| FBgn0263520 | mir-4945  | chr3R | 11442192 | 11442306 | 115 | - |             | FBgn0051374    |                             | chr3R : 11451915 - 11452523 | upstream   | -                                   | chr3R: 11452140-11452350(score=1000) | - |
| FBgn0263539 | mir-4978  | chr2R | 14005860 | 14006006 | 147 | - |             |                | YES                         | chr2R : 14009254 - 14009628 | upstream   | -                                   | chr2R: 14008442-14008553(score=403)  | - |
| FBgn0263564 | mir-4914  | chr2L | 2737568  | 2737661  | 94  | + |             | FBgn0031449    |                             | chr2L : 2724413 - 2724853   | upstream   | -                                   | chr2L: 2724516-2724745(score=1000)   | - |
| FBgn0283561 | mir-9374  | chr2L | 21238301 | 21238361 | 61  | + | FBgn0261239 |                | chr2L : 21237048 - 21237215 | upstream                    | -          | chr2L: 21237062-21237268(score=952) | -                                    |   |
| FBgn0262191 | mir-2497  | chr2L | 16678240 | 16678335 | 96  | + | FBgn0001185 | FBgn0001185    | chr2L : 16680066 - 16680703 | downstream                  | -          | chr2L: 16677061-16677228(score=887) | -                                    |   |
| FBgn0262386 | mir-306   | chr2L | 16698404 | 16698488 | 85  | + |             | FBgn0261278    |                             | chr2L : 16680066 - 16680703 | upstream   | -                                   | chr2L: 16677061-16677228(score=887)  | - |
| FBgn0262452 | mir-79    | chr2L | 16698554 | 16698650 | 97  | + |             | FBgn0261278    |                             | chr2L : 16680066 - 16680703 | upstream   | -                                   | chr2L: 16677061-16677228(score=887)  | - |
| FBgn0262413 | mir-9b    | chr2L | 16698744 | 16698834 | 91  | + |             | FBgn0261278    |                             | chr2L : 16680066 - 16680703 | upstream   | -                                   | chr2L: 16677061-16677228(score=887)  | - |
| FBgn0262430 | mir-9c    | chr2L | 16697924 | 16698015 | 92  | + |             | FBgn0261278    |                             | chr2L : 16680066 - 16680703 | upstream   | -                                   | chr2L: 16677061-16677228(score=887)  | - |
| FBgn0262421 | mir-13b-2 | chrX  | 9091230  | 9091299  | 70  | + |             | FBgn0030086    |                             |                             |            |                                     | chrX: 9089363-9089502(score=522)     | - |
| FBgn0262391 | mir-184   | chr2R | 13329402 | 13329501 | 100 | - | FBgn0265104 |                |                             |                             |            |                                     | chr2R: 13344329-13344500(score=581)  | - |
| FBgn0262204 | mir-2279  | chr2R | 2552170  | 2552282  | 113 | - |             | FBgn0058263    |                             |                             |            |                                     | chr2R: 2565377-2565513(score=373)    | - |
| FBgn0263632 | mir-3642  | chr3L | 11629505 | 11629580 | 76  | + |             | FBgn0042138    |                             |                             |            |                                     | chr3L: 11623696-11623873(score=630)  | - |
| FBgn0263518 | mir-4975  | chr2R | 6707163  | 6707273  | 111 | - |             | 033095, FBgn02 |                             |                             |            |                                     | chr2R: 6716036-6716222(score=572)    | - |
| FBgn0283560 | mir-9380  | chr3R | 8348702  | 8348778  | 77  | - |             |                | YES                         |                             |            |                                     | chr3R: 8349705-8349866(score=519)    | - |
| FBgn0262269 | mir-955   | chr3L | 3299055  | 3299151  | 97  | + |             |                | YES                         | chr3L : 3302896 - 3303538   | downstream | MYC:MAX                             |                                      | - |
| FBgn0283557 | mir-9385  | chr4  | 400703   | 400765   | 63  | - |             |                | YES                         | chr4 : 406830 - 407234      | upstream   | MEME2                               |                                      | - |

|             |           |       |          |          |     |   |             |             |     |  |                       |                |  |  |
|-------------|-----------|-------|----------|----------|-----|---|-------------|-------------|-----|--|-----------------------|----------------|--|--|
| FBgn0283558 | mir-9375  | chr3R | 6451551  | 6451609  | 59  | - | FBgn0037445 |             |     | chr3R: 6456430 - 6457254                                 | upstream              | MEME2          |  |  |
| FBgn0262174 | mir-993   | chr3R | 6776333  | 6776451  | 119 | + | FBgn0261638 | FBgn0261638 |     | 6768624/ chr3R : 678                                     | downstream / upstream | MEME2          |  |  |
| FBgn0262462 | mir-iab-4 | chr3R | 16856275 | 16856342 | 68  | + | FBgn0020546 |             |     | chr3R : 16869106 - 16869605                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262378 | mir-317   | chr3R | 10091126 | 10091217 | 92  | + |             |             | YES | chr3R : 10100452 - 10100989                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262211 | mir-2498  | chr2R | 20584709 | 20584820 | 112 | - |             |             | YES | chr2R : 20582072 - 20582818                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262436 | mir-310   | chr2R | 20583752 | 20583840 | 89  | - |             |             | YES | chr2R : 20582072 - 20582818                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262402 | mir-311   | chr2R | 20583877 | 20583960 | 84  | - |             |             | YES | chr2R : 20582072 - 20582818                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262450 | mir-312   | chr2R | 20584056 | 20584121 | 66  | - |             |             | YES | chr2R : 20582072 - 20582818                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262441 | mir-313   | chr2R | 20584190 | 20584260 | 71  | - |             |             | YES | chr2R : 20582072 - 20582818                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262227 | mir-991   | chr2R | 20585200 | 20585295 | 96  | - |             |             | YES | chr2R : 20582072 - 20582818                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262334 | mir-992   | chr2R | 20585314 | 20585405 | 92  | - |             |             | YES | chr2R : 20582072 - 20582818                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262428 | mir-87    | chr2L | 9950418  | 9950516  | 99  | - |             |             | YES | chr2L : 9947508 - 9948402/ chr2L : 9954125 - 9954372     | upstream / downstream | MEME2          |  |  |
| FBgn0263107 | mir-bft   | chr2L | 11953410 | 11953503 | 94  | - | FBgn0263019 |             |     | chr2L : 11948282 - 11949223                              | downstream            | MEME2          |  |  |
| FBgn0262431 | mir-1003  | chr3R | 24658605 | 24658660 | 56  | + |             | FBgn0039215 |     | chr3R : 24661998 - 24662447                              | downstream            | HS MYC         |  |  |
| FBgn0262422 | mir-1011  | chr3R | 20853305 | 20853358 | 54  | - |             | FBgn0259215 |     | chr3R : 20850312 - 20851075                              | downstream            | HS MYC         |  |  |
| FBgn0262368 | mir-282   | chr3L | 3251022  | 3251118  | 97  | + | FBgn0263617 |             |     | chr3L : 3253807 - 3254339                                | downstream            | HS MYC         |  |  |
| FBgn0286006 | mir-281-1 | chr2R | 12170373 | 12170462 | 90  | - | FBgn0267913 | FBgn0014184 |     | chr2R : 12168853/ chr2R : 121                            | upstream / downstream | HS MYC         |  |  |
| FBgn0286007 | mir-281-2 | chr2R | 12170153 | 12170244 | 92  | - | FBgn0267913 | FBgn0014184 |     | chr2R : 12168853/ chr2R : 121                            | upstream / downstream | HS MYC         |  |  |
| FBgn0262215 | mir-989   | chr2R | 14145351 | 14145524 | 174 | - |             |             | YES | chr2R : 14140820 - 14141499/ chr2R : 14142596 - 14142826 | upstream / downstream | CACATG/MYC:MAX |  |  |
| FBgn0262454 | mir-1007  | chrX  | 21296385 | 21296449 | 65  | - |             | FBgn0031170 |     | chrX : 21306498 - 21307144                               | upstream              | CACATG         |  |  |
| FBgn0263559 | mir-2535b | chrX  | 21298275 | 21298345 | 71  | - |             | FBgn0031170 |     | chrX : 21306498 - 21307144                               | upstream              | CACATG         |  |  |
| FBgn0262330 | mir-193   | chr3L | 21574014 | 21574121 | 108 | + |             |             | YES | chr3L : 21568740 - 21569391/ chr3L : 21573949 - 21574680 | within / upstream     | CACATG         |  |  |
| FBgn0262369 | mir-31b   | chrX  | 8993305  | 8993431  | 127 | - |             | FBgn0264384 |     | chrX : 9007124 - 9007490                                 | upstream              | -              |  |  |
| FBgn0263519 | mir-4964  | chrX  | 8965801  | 8965912  | 112 | + |             | FBgn0261549 |     | chrX : 9007124 - 9007490                                 | downstream            | -              |  |  |
| FBgn0262373 | mir-9a    | chr3L | 19565131 | 19565208 | 78  | + | FBgn0267576 |             |     | chr3L : 19569057 - 19569345                              | downstream            | -              |  |  |
| FBgn0262381 | mir-276b  | chr3L | 10319785 | 10319883 | 99  | + | FBgn0267666 |             |     | chr3L : 10321627 - 10322195                              | downstream            | -              |  |  |
| FBgn0262213 | mir-2495  | chr2L | 5068570  | 5068684  | 115 | + | FBgn0028572 | FBgn0028572 |     | chr2L : 5070814 - 5071002                                | downstream            | -              |  |  |

|             |          |       |          |          |     |   |             |                                |            |   |
|-------------|----------|-------|----------|----------|-----|---|-------------|--------------------------------|------------|---|
| FBgn0263568 | mir-4946 | chr2L | 18867046 | 18867161 | 116 | - | FBgn0003896 | chr2L : 18859185 -<br>18859529 | downstream | - |
|-------------|----------|-------|----------|----------|-----|---|-------------|--------------------------------|------------|---|

**Tabla S2.** Tabla que compila el número de individuos (n), los valores de p según la prueba de Mantel-Cox, y los valores de supervivencia mediana y máxima (h) correspondientes a los diferentes genotipos de todos los experimentos de supervivencia ante la privación de nutrientes presentados.

| Tabla 2                         | n   | Mediana de Supervivencia | Máxima de supervivencia | Test Mantel-Cox       |                          |                             |
|---------------------------------|-----|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Figura 23A (machos)</b>      |     |                          |                         | <i>lsp2&gt;w118</i>   | <i>lsp2&gt;mycRNAi</i>   | <i>lsp2&gt;miR305</i>       |
| <i>lsp2&gt;w118</i>             | 101 | 87                       | 113                     | -                     | <b>0.0012</b>            | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <i>lsp2&gt;mycRNAi</i>          | 103 | 93                       | 120                     | <b>0.0012</b>         | -                        | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <i>lsp2&gt;miR305</i>           | 101 | 50                       | 79                      | <b>&lt;0.0001</b>     | <b>&lt;0.0001</b>        | -                           |
| <i>lsp2&gt;mycRNAi, miR305</i>  | 104 | 69                       | 113                     | <b>&lt;0.0001</b>     | <b>&lt;0.0001</b>        | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <b>Figura 23B (machos)</b>      |     |                          |                         | <i>lsp2&gt;w118</i>   | <i>lsp2&gt;miR305sp</i>  | <i>tubMyc, lsp2&gt;w118</i> |
| <i>lsp2&gt;w118</i>             | 204 | 66                       | 97                      | -                     | <b>0.0038</b>            | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <i>lsp2&gt;miR305sp</i>         | 245 | 66                       | 114                     | <b>0.0038</b>         | -                        | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <i>tubMyc, lsp2&gt;w118</i>     | 109 | 52                       | 66                      | <b>&lt;0.0001</b>     | <b>&lt;0.0001</b>        | -                           |
| <i>tubMyc, lsp2&gt;miR305sp</i> | 133 | 61                       | 114                     | <b>0.0451</b>         | <b>ns</b>                | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <b>Figura 23C (machos)</b>      |     |                          |                         | <i>lsp2&gt;w118</i>   | <i>lsp2&gt;mycRNAi</i>   | <i>lsp2 &gt;p53H159.N</i>   |
| <i>lsp2&gt;w118</i>             | 101 | 40                       | 52                      | -                     | <b>&lt;0.0001</b>        | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <i>lsp2&gt;mycRNAi</i>          | 102 | 40                       | 52                      | <b>&lt;0.0001</b>     | -                        | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <i>lsp2&gt;p53H159.N</i>        | 85  | 30                       | 52                      | <b>&lt;0.0001</b>     | <b>&lt;0.0001</b>        | -                           |
| <i>lsp2&gt;myci+p53H159.N</i>   | 73  | 40                       | 52                      | <b>0.0114</b>         | <b>&lt;0.0001</b>        | <b>0.0248</b>               |
| <b>Figura 23D (machos)</b>      |     |                          |                         | <i>GSG132&gt;w118</i> | <i>GSG132&gt;mycRNAi</i> | <i>GSG132&gt;miR305</i>     |
| <i>GSG132&gt;w118</i>           | 98  | 49                       | 69                      | -                     | <b>0.0163</b>            | <b>0.0005</b>               |
| <i>GSG132&gt;mycRNAi</i>        | 122 | 49                       | 73                      | <b>0.0163</b>         | -                        | <b>&lt;0.0001</b>           |
| <i>GSG132&gt;miR305</i>         | 70  | 44                       | 56                      | <b>0.0005</b>         | <b>&lt;0.0001</b>        | -                           |
| <i>GSG132&gt;myci, miR305</i>   | 73  | 44                       | 56                      | <b>0.0002</b>         | <b>&lt;0.0001</b>        | <b>ns</b>                   |

## **Bibliografía**

## 10. Bibliografía.

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Craig Venter, J. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, *287*(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5461.2185>
- Amanda Lee, J. E., Cranna, N. J., Chahal, A. S., & Quinn, L. M. (2012). Genetic systems to investigate regulation of oncogenes and tumour suppressor genes in *Drosophila*. *Cells*, *1*(4), 1183–1196. <https://doi.org/10.3390/CELLS1041182>
- Ambros, V. (2003). MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, *113*(6), 673–676. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00428-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00428-8)
- Amcheslavsky, A., Jiang, J., & Ip, Y. T. (2009). Tissue Damage-Induced Intestinal Stem Cell Division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*, *4*(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.016>
- Apidianakis, Y., & Rahme, L. G. (2011). *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Disease Models & Mechanisms*, *4*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1242/DMM.003970>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, *55*(Volume 55, 2010), 207–225. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-112408-085356/CITE/REFWORKS>
- Baluapuri, A., Wolf, E., & Eilers, M. (2020). Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2020 21:5*, *21*(5), 255–267. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0215-2>
- Bangi, E., Murgia, C., Teague, A. G. S., Sansom, O. J., & Cagan, R. L. (2016). Functional exploration of colorectal cancer genomes using *Drosophila*. *Nature Communications* *2016 7:1*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/ncomms13615>
- Barrio, L., Dekanty, A., & Milán, M. (2014). MicroRNA-Mediated Regulation of Dp53 in the *Drosophila* Fat Body Contributes to Metabolic Adaptation to Nutrient Deprivation. *Cell Reports*, *8*(2), 528–541. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.020>
- Bauer, J. H., Morris, S. N. S., Chang, C., Flatt, T., Wood, J. G., & Helfand, S. L. (2009). dSir2 and Dmp53 interact to mediate aspects of CR-dependent life span extension in *D. melanogaster*. *Aging (Albany NY)*, *1*(1), 38. <https://doi.org/10.18632/AGING.100001>

- Beira, J. v., & Paro, R. (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*, *125*(4), 573–592. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>
- Bejarano, F., Bortolamiol-Becet, D., Dai, Q., Sun, K., Saj, A., Chou, Y. T., Raleigh, D. R., Kim, K., Ni, J. Q., Duan, H., Yang, J. S., Fulga, T. A., van Vactor, D., Perrimon, N., & Lai, E. C. (2012). A genome-wide transgenic resource for conditional expression of *Drosophila* microRNAs. *Development*, *139*(15), 2821–2831. <https://doi.org/10.1242/DEV.079939>
- Bell, G. P., & Thompson, B. J. (2014). Colorectal cancer progression: Lessons from *Drosophila*? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *28*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2014.02.007>
- Bellosta, P., & Gallant, P. (2010). Myc Function in *Drosophila*. *1*(6), 542–546. <https://doi.org/10.1177/1947601910377490>
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N. C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., & Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell*, *126*(1), 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036>
- Berkers, C. R., Maddocks, O. D. K., Cheung, E. C., Mor, I., & Vousden, K. H. (2013). Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metabolism*, *18*(5), 617–633. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.06.019/ASSET/4F1CBD7C-3AA8-4D2F-AC9E-B2C06F59FECB/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>
- Betschinger, J., Mechtler, K., & Knoblich, J. A. (2006). Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Cell*, *124*(6), 1241–1253. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.038>
- Beumer, J., & Clevers, H. (2024). Hallmarks of stemness in mammalian tissues. *Cell Stem Cell*, *31*(1), 7–24. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2023.12.006/ASSET/6CB776F4-1F42-4FAC-BF30-20215BB1049/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>
- Biegging, K. T., Mello, S. S., & Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 14, Issue 5, pp. 359–370). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3711>
- Bienz, M., & Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, *103*(2), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00122-7/ASSET/20F14673-EADF-42F5-987A-36A632BF529C/MAIN.ASSETS/GR4.JPG](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00122-7/ASSET/20F14673-EADF-42F5-987A-36A632BF529C/MAIN.ASSETS/GR4.JPG)
- Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., & Weintraub, H. (1993). Binding of Myc Proteins to Canonical and Noncanonical DNA Sequences. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(9), 5216–5224. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.9.5216-5224.1993>

- Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., Sacconi, A., Biagioni, F., Cortese, G., Galanti, S., Manetti, C., Citro, G., Muti, P., & Strano, S. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature Communications* 2012 3:1, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms1859>
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006 13:12, 13(12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Boutelle, A. M., & Attardi, L. D. (2021). p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends in Cell Biology*, 31(4), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.12.011>
- Boyle, P., & Langman, J. S. (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 321(Suppl S6), 805–808. <https://doi.org/10.1136/SBMJ.0012452>
- Brand, A. H., Manoukian, A. S., & Perrimon, N. (1994). Chapter 33 Ectopic Expression in *Drosophila*. *Methods in Cell Biology*, 44(C), 635–654. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60936-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60936-X)
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Bridges, C. B. (1935). *Drosophila melanogaster*: legend for symbols, mutants, valuations. *Drosoph. Inf. Serv*, 3, 5–19.
- Britton, J. S., Lockwood, W. K., Li, L., Cohen, S. M., & Edgar, B. A. (2002). *Drosophila*'s Insulin/PI3-Kinase Pathway Coordinates Cellular Metabolism with Nutritional Conditions. *Developmental Cell*, 2(2), 239–249. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00117-X)
- Brodsky, M. H., Weinert, B. T., Tsang, G., Rong, Y. S., McGinnis, N. M., Golic, K. G., Rio, D. C., & Rubin, G. M. (2004). *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 Regulate Multiple DNA Repair and Apoptotic Pathways following DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 24(3), 1219–1231. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.3.1219-1231.2004>
- Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M., & Abrams, J. M. (2000). *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*, 101(1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80627-3/ASSET/497A4F7D-CE58-4C5C-9645-930594C17AB3/MAIN.ASSETS/GR7.JPG](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80627-3/ASSET/497A4F7D-CE58-4C5C-9645-930594C17AB3/MAIN.ASSETS/GR7.JPG)
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2999–3004. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0307323101/SUPPL\\_FILE/07323TABLE6.XLS](https://doi.org/10.1073/PNAS.0307323101/SUPPL_FILE/07323TABLE6.XLS)

- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Casali, A., & Batlle, E. (2009). Intestinal Stem Cells in Mammals and Drosophila. *Cell Stem Cell*, *4*(2), 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.009>
- Cassim, J., Kolkman, F., & Helmer, M. (2018). Designs for Flies + of Mice and Men: Design Approaches to Drosophila melanogaster. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1076*, 289–305. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_16)
- Chakravarti, A., Thirimanne, H. N., Brown, S., & Calvi, B. R. (2022). Drosophila p53 isoforms have overlapping and distinct functions in germline genome integrity and oocyte quality control. *ELife*, *11*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61389>
- Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y. S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., Dang, C. v., Thomas-Tikhonenko, A., & Mendell, J. T. (2007). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics* *2008 40*:1, *40*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.30>
- Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E., & Gribskov, M. (2002). Homophila: human disease gene cognates in Drosophila. *Nucleic Acids Research*, *30*(1), 149–151. <https://doi.org/10.1093/NAR/30.1.149>
- Chintapalli, V. R., Wang, J., & Dow, J. A. T. (2007). Using FlyAtlas to identify better Drosophila melanogaster models of human disease. *Nature Genetics* *2007 39*:6, *39*(6), 715–720. <https://doi.org/10.1038/ng2049>
- Choi, Y. J., Lin, C. P., Ho, J. J., He, X., Okada, N., Bu, P., Zhong, Y., Kim, S. Y., Bennett, M. J., Chen, C., Ozturk, A., Hicks, G. G., Hannon, G. J., & He, L. (2011). miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nature Cell Biology* *2011 13*:11, *13*(11), 1353–1360. <https://doi.org/10.1038/ncb2366>
- Christensen, C. F., Laurichesse, Q., Loudhaief, R., Colombani, J., & Andersen, D. S. (2024). Drosophila activins adapt gut size to food intake and promote regenerative growth. *Nature Communications*, *15*(1), 273. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44553-9>
- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C. E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., di Fiore, P. P., & Pelicci, P. G. (2009). The Tumor Suppressor p53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. *Cell*, *138*(6), 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.048>
- Colombani, J., Polesello, C., Josué, F., & Tapon, N. (2006). Dmp53 Activates the Hippo Pathway to Promote Cell Death in Response to DNA Damage. *Current Biology*, *16*(14), 1453–1458. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.059>

- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., & Léopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell*, *114*(6), 739–749. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00713-X/ATTACHMENT/E4F4FAEE-BBE0-47AC-B1E8-019F55CCAE2B/MMC3.JPG](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00713-X/ATTACHMENT/E4F4FAEE-BBE0-47AC-B1E8-019F55CCAE2B/MMC3.JPG)
- Corcos, D., Vaulont, S., Denis, N., Lyonnet, S., Simon, M. P., Kitzis, A., Kahn, A., & Kruh, J. (1987). Expression of c-myc is under dietary control in rat liver. *Oncogene Research*, *1*(2), 193–199. <https://europepmc.org/article/med/3329714>
- Dai, C., & Gu, W. (2010). P53 post-translational modification: Deregulated in tumorigenesis. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(11), 528–536. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2010.09.002/ASSET/A99E4B8D-F576-4B29-A5F3-F48B42D712C5/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Daneshvar, K., Nath, S., Khan, A., Shover, W., Richardson, C., & Goodliffe, J. M. (2013). MicroRNA miR-308 regulates dMyc through a negative feedback loop in *Drosophila*. *Biology Open*, *2*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1242/bio.20122725>
- Dang, C. v., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., & Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*, *16*(4), 253–264. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2006.07.014>
- D'Brot, A., Kurtz, P., Regan, E., Jakubowski, B., & Abrams, J. M. (2016). A platform for interrogating cancer-associated p53 alleles. *Oncogene* *2017* *36*:2, *36*(2), 286–291. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.48>
- De la Cova, C., Senoo-Matsuda, N., Ziosi, M., Wu, D. C., Bellosta, P., Quinzii, C. M., & Johnston, L. A. (2014). Supercompetitor status of drosophila Myc cells requires p53 as a Fitness sensor to reprogram metabolism and promote viability. *Cell Metabolism*, *19*(3), 470–483. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.012>
- De la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., & Johnston, L. A. (2004). *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell*, *117*(1), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00214-4)
- Dekanty, A., Barrio, L., & Milán, M. (2014). Contributions of DNA repair, cell cycle checkpoints and cell death to suppressing the DNA damage-induced tumorigenic behavior of *Drosophila* epithelial cells. *Oncogene* *2015* *34*:8, *34*(8), 978–985. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.42>
- Dekanty, A., Barrio, L., Muzzopappa, M., Auer, H., & Milán, M. (2012). Aneuploidy-induced delaminating cells drive tumorigenesis in *Drosophila* epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(50), 20549–20554. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1206675109/SUPPL\\_FILE/PNAS.201206675SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1206675109/SUPPL_FILE/PNAS.201206675SI.PDF)
- Deng, K., Guo, X., Wang, H., & Xia, J. (2014). The lncRNA-MYC regulatory network in cancer. *Tumor Biology*, *35*(10), 9497–9503. <https://doi.org/10.1007/S13277-014-2511-Y/METRICS>

- Desi, N., Teh, V., Tong, Q. Y., Lim, C. Y., Tabatabaeian, H., Chew, X. H., Sanchez-Mejias, A., Chan, J. J., Zhang, B., Pitcheshwar, P., Siew, B. E., Wang, S., Lee, K. C., Chong, C. S., Cheong, W. K., Lieske, B., Tan, I. J. W., Tan, K. K., & Tay, Y. (2021). MiR-138 is a potent regulator of the heterogenous MYC transcript population in cancers. *Oncogene* 2021 41:8, 41(8), 1178–1189. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02084-x>
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E. E., Lee, W. M., Enders, G. H., Mendell, J. T., & Thomas-Tikhonenko, A. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature Genetics* 2006 38:9, 38(9), 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/ng1855>
- di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9(1), 287–314. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104715>
- Dichtel-Danjoy, M. L., Ma, D., Dourlen, P., Chatelain, G., Napoletano, F., Robin, M., Corbet, M., Levet, C., Hafsi, H., Hainaut, P., Ryoo, H. D., Bourdon, J. C., & Mollereau, B. (2012). Drosophila p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. *Cell Death & Differentiation* 2013 20:1, 20(1), 108–116. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.100>
- Duman-Scheel, M., Johnston, L. A., & Du, W. (2004). Repression of dMyc expression by Wingless promotes Rbf-induced G1 arrest in the presumptive Drosophila wing margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(11), 3857–3862. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0400526101>
- Dumortier, O., Hinault, C., & van Obberghen, E. (2013). MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell Metabolism*, 18(3), 312–324. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.06.004/ASSET/84181B31-E551-47DA-B699-179146C769EF/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Efeyan, A., Comb, W. C., & Sabatini, D. M. (2015). Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 2015 517:7534, 517(7534), 302–310. <https://doi.org/10.1038/nature14190>
- Eilers, M., & Eisenman, R. N. (2008). Myc's broad reach. *Genes & Development*, 22(20), 2755–2766. <https://doi.org/10.1101/GAD.1712408>
- Eulalio, A., Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2008). Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell*, 132(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.024>
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S. F., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., & Izaurralde, E. (2007). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes & Development*, 21(20), 2558–2570. <https://doi.org/10.1101/GAD.443107>

- Evans, C. J., Olson, J. M., Ngo, K. T., Kim, E., Lee, N. E., Kuoy, E., Patananan, A. N., Sitz, D., Tran, P., Do, M.-T., Yackle, K., Cespedes, A., Hartenstein, V., Call, G. B., & Banerjee, U. (2009). G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nature Methods*, *6*(8), 603–605. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1356>
- Fan, Y., Yin, S., Hao, Y., Yang, J., Zhang, H., Sun, C., Ma, M., Chang, Q., & Xi, J. J. (2014). miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *RNA*, *20*(6), 765–772. <https://doi.org/10.1261/RNA.043026.113>
- Ferreira, A., Boulan, L., Perez, L., & Milán, M. (2014). Mei-P26 Mediates Tissue-Specific Responses to the Brat Tumor Suppressor and the dMyc Proto-Oncogene in *Drosophila*. *Genetics*, *198*(1), 249–258. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.167502>
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* *2008 9:2*, *9*(2), 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
- Foronda, D., Weng, R., Verma, P., Chen, Y. W., & Cohen, S. M. (2014). Coordination of insulin and Notch pathway activities by microRNA miR-305 mediates adaptive homeostasis in the intestinal stem cells of the *Drosophila* gut. *Genes & Development*, *28*(21), 2421–2431. <https://doi.org/10.1101/GAD.241588.114>
- Frenzel, A., Lovén, J., & Henriksson, M. A. (2010). Targeting MYC-Regulated miRNAs to Combat Cancer. *Genes and Cancer*, *1*(6), 660–667. [https://doi.org/10.1177/1947601910377488/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1947601910377488-FIG1.JPEG](https://doi.org/10.1177/1947601910377488/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1947601910377488-FIG1.JPEG)
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, *19*(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Fulga, T. A., McNeill, E. M., Binari, R., Yelick, J., Blanche, A., Booker, M., Steinkraus, B. R., Schnall-Levin, M., Zhao, Y., Deluca, T., Bejarano, F., Han, Z., Lai, E. C., Wall, D. P., Perrimon, N., & van Vactor, D. (2015). A transgenic resource for conditional competitive inhibition of conserved *Drosophila* microRNAs. *Nature Communications* *2015 6:1*, *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8279>
- Gallant, P. (2013). Myc Function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(10), a014324. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A014324>
- Gallant, P., Shio, Y., Cheng, P. F., Parkhurst, S. M., & Eisenman, R. N. (1996). Myc and Max Homologs in *Drosophila*. *Science*, *274*(5292), 1523–1527. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5292.1523>

- Géminard, C., Rulifson, E. J., & Léopold, P. (2009). Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, *10*(3), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.002>
- Germani, F., Bergantinos, C., & Johnston, L. A. (2018). Mosaic Analysis in *Drosophila*. *Genetics*, *208*(2), 473–490. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.117.300256>
- Gibbins, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., & Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nature Cell Biology* *2012 14:12*, *14*(12), 1314–1321. <https://doi.org/10.1038/ncb2611>
- Golic, K. G. , & L. S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, *59*(3), 499–509.
- Gomes, A. Q., Nolasco, S., & Soares, H. (2013). Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell. *International Journal of Molecular Sciences 2013, Vol. 14, Pages 16010-16039*, *14*(8), 16010–16039. <https://doi.org/10.3390/IJMS140816010>
- Gonzalez, C. (2013). *Drosophila melanogaster*: a model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nature Reviews Cancer 2013 13:3*, *13*(3), 172–183. <https://doi.org/10.1038/nrc3461>
- Green, M. M. (2010). 2010: A Century of *Drosophila* Genetics Through the Prism of the white Gene. *Genetics*, *184*(1), 3–7. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.109.110015>
- Greer, C., Lee, M., Westerhof, M., Milholland, B., Spokony, R., Vijg, J., & Secombe, J. (2013). Myc-Dependent Genome Instability and Lifespan in *Drosophila*. *PLOS ONE*, *8*(9), e74641. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0074641>
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature 2004 432:7014*, *432*(7014), 235–240. <https://doi.org/10.1038/nature03120>
- Grewal, S. S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R. N., & Edgar, B. A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nature Cell Biology 2005 7:3*, *7*(3), 295–302. <https://doi.org/10.1038/ncb1223>
- Griffin, R., Binari, R., & Perrimon, N. (2014). Genetic odyssey to generate marked clones in *Drosophila* mosaics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(13), 4756–4763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403218111>
- Grimson, A., Farh, K. K. H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, *27*(1), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>

- Hailstock, T., Terry, D., Wardwell-Ozgo, J., Robinson, B. v., Moberg, K. H., & Lerit, D. A. (2023). Colorimetric Synchronization of *Drosophila* Larvae. *Current Protocols*, 3(10). <https://doi.org/10.1002/cpz1.924>
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creighton, M. P., van Oudenaarden, A., & Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 2009 462:7273, 462(7273), 595–601. <https://doi.org/10.1038/nature08592>
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., & Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005 435:7043, 435(7043), 828–833. <https://doi.org/10.1038/nature03552>
- Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:9, 12(9), 613–626. <https://doi.org/10.1038/nrc3318>
- Hermeking, H. (2007). p53 Enters the MicroRNA World. *Cancer Cell*, 12(5), 414–418. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.10.028>
- Herranz, H., Hong, X., Pérez, L., Ferreira, A., Olivieri, D., Cohen, S. M., & Milán, M. (2010). The miRNA machinery targets Mei-P26 and regulates Myc protein levels in the *Drosophila* wing. *The EMBO Journal*, 29(10), 1688–1698. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.69>
- Herter, E. K., Stauch, M., Gallant, M., Wolf, E., Raabe, T., & Gallant, P. (2015). snoRNAs are a novel class of biologically relevant Myc targets. *BMC Biology*, 13(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0132-6>
- Herzog, G., Joerger, A. C., Shmueli, M. D., Fersht, A. R., Gazit, E., & Segal, D. (2012). Evaluating *Drosophila* p53 as a model system for studying cancer mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44330–44337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417980>
- Ho, J. J. D., Metcalf, J. L., Yan, M. S., Turgeon, P. J., Wang, J. J., Chalsev, M., Petruzzello-Pellegrini, T. N., Tsui, A. K. Y., He, J. Z., Dhamko, H., Man, H. S. J., Robb, G. B., Teh, B. T., Ohh, M., & Marsden, P. A. (2012). Functional importance of dicer protein in the adaptive cellular response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 29003–29020. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.373365/ATTACHMENT/0800FE91-3A03-4501-B6C4-D73D5EB382B3/MMC1.PDF>
- Hock, A. K., & Vousden, K. H. (2014). The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(1), 137–149. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.05.022>

- Hofmann, J. W., Zhao, X., de Cecco, M., Peterson, A. L., Pagliaroli, L., Manivannan, J., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Zhang, Y., Feng, B., Li, X., Serre, T., Qi, W., van Remmen, H., Miller, R. A., Bath, K. G., de Cabo, R., Xu, H., Neretti, N., & Sedivy, J. M. (2015). Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell*, *160*(3), 477–488. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.12.016/ATTACHMENT/C0AD3401-2CFE-4057-9CC0-6DA21DFA60AB/MMC5.PDF>
- Horn, H. F., & Vousden, K. H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* *2007* *26*:9, *26*(9), 1306–1316. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210263>
- Hu, W., Chan, C. S., Wu, R., Zhang, C., Sun, Y., Song, J. S., Tang, L. H., Levine, A. J., & Feng, Z. (2010). Negative Regulation of Tumor Suppressor p53 by MicroRNA miR-504. *Molecular Cell*, *38*(5), 689–699. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.027>
- Hulf, T., Bellosta, P., Furrer, M., Steiger, D., Svensson, D., Barbour, A., & Gallant, P. (2005). Whole-Genome Analysis Reveals a Strong Positional Bias of Conserved dMyc-Dependent E-Boxes. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(9), 3401–3410. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3401-3410.2005>
- Hung, R. J., Li, J. S. S., Liu, Y., & Perrimon, N. (2021). Defining cell types and lineage in the *Drosophila* midgut using single cell transcriptomics. *Current Opinion in Insect Science*, *47*, 12–17. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2021.02.008>
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* *2011* *12*:2, *12*(2), 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Ingaramo, M. C., Sánchez, J. A., Perrimon, N., & Dekanty, A. (2020). Fat Body p53 Regulates Systemic Insulin Signaling and Autophagy under Nutrient Stress via *Drosophila* Upd2 Repression. *Cell Reports*, *33*(4), 108321. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108321/ATTACHMENT/C46B52E5-547D-403D-9B51-EB65C287546B/MMC2.PDF>
- Ingaramo, M. C., Sánchez, J. A., & Dekanty, A. (2018). Regulation and function of p53: A perspective from *Drosophila* studies. In *Mechanisms of Development* (Vol. 154, pp. 82–90). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.007>
- Ishizu, H., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2012). Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & Development*, *26*(21), 2361–2373. <https://doi.org/10.1101/GAD.203786.112>
- Jain, A. K., & Barton, M. C. (2018). P53: Emerging roles in stem cells, development and beyond. *Development (Cambridge)*, *145*(8). <https://doi.org/10.1242/DEV.158360/19342>
- Jaklevic, B., Uyetake, L., Lemstra, W., Chang, J., Leary, W., Edwards, A., Vidwans, S., Sibon, O., & Tin Su, T. (2006). Contribution of Growth and Cell Cycle Checkpoints to Radiation

- Survival in *Drosophila*. *Genetics*, 174(4), 1963–1972.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.106.064477>
- Jaklevic, B. R., & Su, T. T. (2004). Relative Contribution of DNA Repair, Cell Cycle Checkpoints, and Cell Death to Survival after DNA Damage in *Drosophila* Larvae. *Current Biology*, 14(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.032>
- Jang, D., Kim, C. J., Shin, B. H., & Lim, D.-H. (2024). The Biological Roles of microRNAs in *Drosophila* Development. *Insects*, 15(7), 491. <https://doi.org/10.3390/insects15070491>
- Jassim, O. W., Fink, J. L., & Cagan, R. L. (2003). Dmp53 protects the *Drosophila* retina during a developmentally regulated DNA damage response. *The EMBO Journal*, 22(20), 5622–5632. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG543>
- Jaubert, S., Mereau, A., Antoniewski, C., & Tagu, D. (2007). MicroRNAs in *Drosophila*: The magic wand to enter the Chamber of Secrets? *Biochimie*, 89(10), 1211–1220.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2007.05.012>
- Jiang, H., & Edgar, B. A. (2012). Intestinal stem cell function in *Drosophila* and mice. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(4), 354–360.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.04.002>
- Jiang, H., & Edgar, B. A. (2011). Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut. *Experimental Cell Research*, 317(19), 2780–2788.  
<https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2011.07.020>
- Jiang, H., & Edgar, B. A. (2009). EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development*, 136(3), 483–493. <https://doi.org/10.1242/DEV.026955>
- Jin, Y., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Pavlovic, B., Zhang, C., & Edgar, B. A. (2017). Intestinal Stem Cell Pool Regulation in *Drosophila*. *Stem Cell Reports*, 8(6), 1479–1487.  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.002>
- Jin, Z., Kirilly, D., Weng, C., Kawase, E., Song, X., Smith, S., Schwartz, J., & Xie, T. (2008). Differentiation-Defective Stem Cells Outcompete Normal Stem Cells for Niche Occupancy in the *Drosophila* Ovary. *Cell Stem Cell*, 2(1), 39–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.021>
- Jin, S., Martinek, S., Joo, W. S., Wortman, J. R., Mirkovic, N., Sali, A., Yandell, M. D., Pavletich, N. P., Young, M. W., & Levine, A. J. (2000). Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 7301–7306. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.13.7301>
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N., & Gallant, P. (1999). *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. *Cell*, 98(6), 779–790.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81512-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81512-3)

- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Leading Edge Putting p53 in Context. *Cell*, *170*, 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. v., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M., & Belmonte, J. C. I. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* *2009 460:7259*, *460*(7259), 1140–1144. <https://doi.org/10.1038/nature08311>
- Khoury, M. P., & Bourdon, J.-C. (2010). The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(3), a000927–a000927. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000927>
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2009 10:2*, *10*(2), 126–139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, *87*(2), 159–170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81333-1/ASSET/4FCE0D0D-AB96-43A6-8C22-1EFD332B1653/MAIN.ASSETS/GR8.JPG](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81333-1/ASSET/4FCE0D0D-AB96-43A6-8C22-1EFD332B1653/MAIN.ASSETS/GR8.JPG)
- Kobayashi, Y. (2005). A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, *353*(7), 1793–1801. <https://doi.org/10.2169/NAIKA.97.1581>
- Kondoh, H., Leonart, M. E., Gil, J., Wang, J., Degan, P., Peters, G., Martinez, D., Carnero, A., & Beach, D. (2005). Glycolytic Enzymes Can Modulate Cellular Life Span. *Cancer Research*, *65*(1), 177–185. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.177.65.1>
- Krizhanovsky, V., & Lowe, S. W. (2009). The promises and perils of p53. *Nature* *2009 460:7259*, *460*(7259), 1085–1086. <https://doi.org/10.1038/4601085a>
- Krützfeldt, J., & Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metabolism*, *4*(1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.009>
- Kudron, M. M., Victorsen, A., Gevirtzman, L., Hillier, L. W., Fisher, W. W., Vafeados, D., Kirkey, M., Hammonds, A. S., Gersch, J., Ammouri, H., Wall, M. L., Moran, J., Steffen, D., Szykarek, M., Seabrook-Sturgis, S., Jameel, N., Kadaba, M., Patton, J., Terrell, R., ... Waterston, R. H. (2018). The ModERN Resource: Genome-Wide Binding Profiles for Hundreds of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* Transcription Factors. *Genetics*, *208*(3), 937–949. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.117.300657>
- Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A. L., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., Young, K. H., & Li, Y. (2010). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene* *2011 30:7*, *30*(7), 843–853. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.457>

- Lai, E. C., Tomancak, P., Williams, R. W., & Rubin, G. M. (2003). Computational identification of DrosophilamicroRNA genes. *Genome Biology*, *4*(7), 1–20. <https://doi.org/10.1186/GB-2003-4-7-R42/FIGURES/7>
- Landt, S. G., Marinov, G. K., Kundaje, A., Kheradpour, P., Pauli, F., Batzoglou, S., Bernstein, B. E., Bickel, P., Brown, J. B., Cayting, P., Chen, Y., DeSalvo, G., Epstein, C., Fisher-Aylor, K. I., Euskirchen, G., Gerstein, M., Gertz, J., Hartemink, A. J., Hoffman, M. M., ... Snyder, M. (2012). ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Research*, *22*(9), 1813–1831. <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>
- Lawrence, M., Huber, W., Pagès, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., Morgan, M. T., & Carey, V. J. (2013). Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Computational Biology*, *9*(8), e1003118. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003118>
- Le, M. T. N., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H. F., & Lim, B. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes & Development*, *23*(7), 862–876. <https://doi.org/10.1101/GAD.1767609>
- Lee, J., Cranna, N., Chahal, A., & Quinn, L. (2012). Genetic Systems to Investigate Regulation of Oncogenes and Tumour Suppressor Genes in Drosophila. *Cells*, *1*(4), 1182–1196. <https://doi.org/10.3390/cells1041182>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *2003* *425*:6956, *425*(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, *21*(17), 4663–4670. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDF476>
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Li R, Z. H. J. C. J. P. M. F. (2020). . Drosophila Myc Restores Immune Homeostasis of Imd Pathway via Activating MiR-277 to Inhibit imd/Tab2. . . *PLoS Genetic*, *16*.
- Li, S., Yu, X., & Feng, Q. (2019). Fat Body Biology in the Last Decade. Annual review of entomology, *64*, 315–333. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-011118-112007>

- Li, L., Edgar, B. A., & Grewal, S. S. (2010). Nutritional control of gene expression in *Drosophila* larvae via TOR, Myc and a novel cis-regulatory element. *BMC Cell Biology*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-7/FIGURES/5>
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science*, *299*(5612), 1540. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1080372/SUPPL\\_FILE/LIM\\_SOM\\_TABLE\\_S1.ZIP](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1080372/SUPPL_FILE/LIM_SOM_TABLE_S1.ZIP)
- Lin, C. P., Choi, Y. J., Hicks, G. G., & He, L. (2012). The emerging functions of the p53-miRNA network in stem cell biology. *Cell Cycle*, *11*(11), 2063–2072. <https://doi.org/10.4161/CC.20207>
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S. J., Murphy, M. E., Appella, E., & Xu, Y. (2004). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature Cell Biology* *2004* 7:2, *7*(2), 165–171. <https://doi.org/10.1038/ncb1211>
- Liu, Y., Su, Z., Tavana, O., & Gu, W. (2024). Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression. *Cancer Cell*, *42*(6), 946–967. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.04.009>
- Losick, V. P., Morris, L. X., Fox, D. T., & Spradling, A. (2011). *Drosophila* Stem Cell Niches: A Decade of Discovery Suggests a Unified View of Stem Cell Regulation. *Developmental Cell*, *21*(1), 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.018>
- Lozy, F., & Karantza, V. (2012). Autophagy and cancer cell metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(4), 395–401. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2012.01.005>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* *2005* *435*:7043, *435*(7043), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Lucchetta, E. M., & Ohlstein, B. (2012). The *Drosophila* midgut: a model for stem cell driven tissue regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *1*(5), 781–788. <https://doi.org/10.1002/WDEV.51>
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, *303*(5654), 95–98. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1090599/>
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T. T., Valastyan, S., Westermann, F., Speleman, F., Vandesompele, J., & Weinberg, R. A. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature Cell Biology* *2010* *12*:3, *12*(3), 247–256. <https://doi.org/10.1038/ncb2024>

- Malkin, D. (1993). p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 66(2), 83–92. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(93\)90233-C](https://doi.org/10.1016/0165-4608(93)90233-C)
- Malone, C. D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W. R., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2009). Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the Drosophila Ovary. *Cell*, 137(3), 522–535. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.040>
- Mandal, P. K., Blanpain, C., & Rossi, D. J. (2011). DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011 12:3, 12(3), 198–202. <https://doi.org/10.1038/nrm3060>
- Manzanero-Ortiz, S., Franco, M., Laxmeesha, M., & Carmena, A. (2024). Drosophila p53 tumor suppressor directly activates conserved asymmetric stem cell division regulators. *IScience*, 27(11). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2024.111118>
- Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M.-L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P., & Bourdon, J.-C. (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death & Differentiation*, 18(12), 1815–1824. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.120>
- Marión, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 2009 460:7259, 460(7259), 1149–1153. <https://doi.org/10.1038/nature08287>
- Martorell, Ò., Merlos-Suárez, A., Campbell, K., Barriga, F. M., Christov, C. P., Miguel-Aliaga, I., Batlle, E., Casanova, J., & Casali, A. (2014). Conserved Mechanisms of Tumorigenesis in the Drosophila Adult Midgut. *PLOS ONE*, 9(2), e88413. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088413>
- Matsuda, S., Schaefer, J. v., Mii, Y., Hori, Y., Bieli, D., Taira, M., Plückthun, A., & Affolter, M. (2021). Asymmetric requirement of Dpp/BMP morphogen dispersal in the Drosophila wing disc. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26726-6>
- Mauri, F., McNamee, L. M., Lunardi, A., Chiacchiera, F., del Sal, G., Brodsky, M. H., & Collavin, L. (2008). Modification of Drosophila p53 by SUMO modulates its transactivation and pro-apoptotic functions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 20848–20856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710186200>
- McNamee, L. M., & Brodsky, M. H. (2009). p53-Independent Apoptosis Limits DNA Damage-Induced Aneuploidy. *Genetics*, 182(2), 423–435. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.109.102327>

- Mesquita, D., Dekanty, A., & Milán, M. (2010). A dp53-Dependent Mechanism Involved in Coordinating Tissue Growth in *Drosophila*. *PLOS Biology*, *8*(12), e1000566. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000566>
- Metcalf, A. D., & Ferguson, M. W. J. (2008). Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair: Skin stem and progenitor cells: Using regeneration as a tissue-engineering strategy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(1), 24–32. <https://doi.org/10.1007/S00018-007-7427-X/METRICS>
- Micchelli, C. A., & Perrimon, N. (2005). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* *2005 439:7075*, *439*(7075), 475–479. <https://doi.org/10.1038/nature04371>
- Miettinen, H. E., Paunu, N., Rantala, I., Kalimo, H., Paljärvi, L., Helin, H., & Haapasalo, H. (2001). Cell cycle regulators (p21, p53, pRb) in oligodendrocytic tumors: A study by novel tumor microarray technique. *Journal of Neuro-Oncology*, *55*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1023/A:1012961918848/METRICS>
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., & Bellosta, P. (2019). *Drosophila melanogaster*: A model organism to study cancer. *Frontiers in Genetics*, *10*, 425859. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00051/BIBTEX>
- Moreno, E., & Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell*, *117*(1), 117–129. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00262-4)
- Muller, P. A. J., & Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology* *2013 15:1*, *15*(1), 2–8. <https://doi.org/10.1038/ncb2641>
- Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., Chang, K., Dinh, H. H., Drummond, J. A., Fowler, G., Kovar, C. L., Lewis, L. R., Morgan, M. B., Newsham, I. F., Reid, J. G., Santibanez, J., Shinbrot, E., Trevino, L. R., Wu, Y. Q., Wang, M., Gunaratne, P., Donehower, L. A., Creighton, C. J., ... Thomson, E. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, *487*(7407), 330. <https://doi.org/10.1038/NATURE11252>
- Nakamura, M., Ohsawa, S., & Igaki, T. (2014). Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. *Nature Communications* *2014 5:1*, *5*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms6264>
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M., & Prochownik, E. v. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* *1999 18:19*, *18*(19), 3004–3016. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202746>
- Neumüller, R. A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S. M., & Knoblich, J. A. (2008). Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* *2008 454:7201*, *454*(7201), 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature07014>

- Neveu, P., Kye, M. J., Qi, S., Buchholz, D. E., Clegg, D. O., Sahin, M., Park, I. H., Kim, K. S., Daley, G. Q., Kornblum, H. I., Shraiman, B. I., & Kosik, K. S. (2010). MicroRNA profiling reveals two distinct p53-related human pluripotent stem cell states. *Cell Stem Cell*, 7(6), 671–681. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.11.012/ATTACHMENT/34139B63-682E-4C2A-A8FF-28F764AAB8B8/MMC4.XLS>
- Nicholson, L., Singh, G. K., Osterwalder, T., Roman, G. W., Davis, R. L., & Keshishian, H. (2008). Spatial and Temporal Control of Gene Expression in *Drosophila* Using the Inducible GeneSwitch GAL4 System. I. Screen for Larval Nervous System Drivers. *Genetics*, 178(1), 215–234. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.107.081968>
- Nystul, T. G., & Spradling, A. C. (2006). Breaking out of the mold: diversity within adult stem cells and their niches. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(5), 463–468. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2006.08.003>
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. v., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005 435:7043, 435(7043), 839–843. <https://doi.org/10.1038/nature03677>
- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2007). Multipotent *Drosophila* Intestinal Stem Cells Specify Daughter Cell Fates by Differential Notch Signaling. *Science*, 315(5814), 988–992. <https://doi.org/10.1126/science.1136606>
- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2005). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 2005 439:7075, 439(7075), 470–474. <https://doi.org/10.1038/nature04333>
- Ohsawa, S., Sato, Y., Enomoto, M., Nakamura, M., Betsumiya, A., & Igaki, T. (2012). Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature*, 490(7421), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature11452>
- Okamura, K., Liu, N., & Lai, E. C. (2009). Distinct Mechanisms for MicroRNA Strand Selection by *Drosophila* Argonautes. *Molecular Cell*, 36(3), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.027>
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, 18(14), 1655–1666. <https://doi.org/10.1101/GAD.1210204>
- Ollmann, M., Young, L. M., di Como, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W. W., Buchman, A., Duyk, G., Friedman, L., Prives, C., & Kopczynski, C. (2000). *Drosophila* p53 Is a Structural and Functional Homolog of the Tumor Suppressor p53. *Cell*, 101(1), 91–101. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80626-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80626-1)

- Orian, A., van Steensel, B., Delrow, J., Bussemaker, H. J., Li, L., Sawado, T., Williams, E., Loo, L. W., Cowley, S. M., Yost, C., Pierce, S., Edgar, B. A., Parkhurst, S. M., & Eisenman, R. N. (2003). *Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network*. <https://doi.org/10.1101/gad.1066903>
- Otsuka, K., & Ochiya, T. (2014). Genetic Networks Lead and Follow Tumor Development: MicroRNA Regulation of Cell Cycle and Apoptosis in the p53 Pathways. *BioMed Research International*, 2014(1), 749724. <https://doi.org/10.1155/2014/749724>
- Padmanabha, D., & Baker, K. D. (2014). Drosophila gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(10), 518–527. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2014.03.011/ASSET/1803E7D6-C8EB-4C81-BB48-68A1265D9E72/MAIN.ASSETS/GR2.JPG>
- Palanker, L., Tennessen, J. M., Lam, G., & Thummel, C. S. (2009). Drosophila HNF4 Regulates Lipid Mobilization and  $\beta$ -Oxidation. *Cell Metabolism*, 9(3), 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.009>
- Pant, V., Quintás-Cardama, A., & Lozano, G. (2012). The p53 pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans. *Blood*, 120(26), 5118–5127. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-05-356014>
- Parra-Peralbo, E. , T. A. , & B. R. (2021). Origin and Development of the 147 Adipose Tissue, a Key Organ in Physiology and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(3636).
- Pearson, B. J., & Alvarado, A. S. (2010). A planarian p53 homolog regulates proliferation and self-renewal in adult stem cell lineages. *Development*, 137(2), 213–221. <https://doi.org/10.1242/DEV.044297>
- Peters, M., DeLuca, C., Hirao, A., Stambolic, V., Potter, J., Zhou, L., Liepa, J., Snow, B., Arya, S., Wong, J., Bouchard, D., Binari, R., Manoukian, A. S., & Mak, T. W. (2002). Chk2 regulates irradiation-induced, p53-mediated apoptosis in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11305–11310. <https://doi.org/10.1073/PNAS.172382899>
- Pierce, S. B., Yost, C., Britton, J. S., Loo, L. W. M., Flynn, E. M., Edgar, B. A., & Eisenman, R. N. (2004). dMyc is required for larval growth and endoreplication in Drosophila. *Development*, 131(10), 2317–2327. <https://doi.org/10.1242/DEV.01108>
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., & Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, 17(3), 118–126. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2006.12.007/ASSET/DFCB0E34-C1A4-4A53-B894-664C96508A6F/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>

- Prober, D. A., & Edgar, B. A. (2000). Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell*, *100*(4), 435–446. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80679-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80679-0)
- Rajan, A., & Perrimon, N. (2012). *Drosophila* Cytokine Unpaired 2 Regulates Physiological Homeostasis by Remotely Controlling Insulin Secretion. *Cell*, *151*(1), 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.019>
- Rhiner, C., Díaz, B., Portela, M., Poyatos, J. F., Fernández-Ruiz, I., López-Gay, J. M., Gerlitz, O., & Moreno, E. (2009). Persistent competition among stem cells and their daughters in the *Drosophila* ovary germline niche. *Development*, *136*(6), 995–1006. <https://doi.org/10.1242/DEV.033340>
- Riu, E., Bosch, F., & Valera, A. (1996). Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing Myc in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(5), 2198–2202. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.5.2198>
- Rong, Y. S., Titen, S. W., Xie, H. B., Golic, M. M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B. M., Brodsky, M., Rubin, G. M., & Golic, K. G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes & Development*, *16*(12), 1568–1581. <https://doi.org/10.1101/GAD.986602>
- Ruby, J. G., Stark, A., Johnston, W. K., Kellis, M., Bartel, D. P., & Lai, E. C. (2007). Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Research*, *17*(12), 1850–1864. <https://doi.org/10.1101/GR.6597907>
- Rudrapatna, V. A., Cagan, R. L., & Das, T. K. (2012). *Drosophila* cancer models. *Developmental Dynamics*, *241*(1), 107–118. <https://doi.org/10.1002/DVDY.22771>
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2005). Processing of Pre-microRNAs by the Dicer-1–Loquacious Complex in *Drosophila* Cells. *PLOS Biology*, *3*(7), e235. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0030235>
- Sánchez, J. A., Ingaramo, M. C., Gervé, M. P., Thomas, M. G., Boccaccio, G. L., & Dekanty, A. (2023). FOXO-mediated repression of Dicer1 regulates metabolism, stress resistance, and longevity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.2216539120>
- Sanchez, J. A., Mesquita, D., Ingaramo, M. C., Ariel, F., Milan, M., & Dekanty, A. (2019). Eiger/TNF $\alpha$ -mediated Dilp8 and ROS production coordinate intra-organ growth in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, *15*(8), e1008133. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008133>
- Sarig, R., Rivlin, N., Brosh, R., Bornstein, C., Kamer, I., Ezra, O., Molchadsky, A., Goldfinger, N., Brenner, O., & Rotter, V. (2010). Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(10), 2127–2140. <https://doi.org/10.1084/jem.20100797>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S., & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, *44*(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.006>
- Schreiber-Agus, N., Stein, D., Chen, K., Goltz, J. S., Stevens, L., & DePinho, R. A. (1997). Drosophila Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(4), 1235–1240. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.4.1235>
- Shams, R., Aghdaei, H. A., Behmanesh, A., Sadeghi, A., Zali, M., Salari, S., & Padrón, J. M. (2020). Micrnas targeting myc expression: Trace of hope for pancreatic cancer therapy. a systematic review. *Cancer Management and Research*, *12*, 2393–2404. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S245872>
- Shi, D., & Gu, W. (2012). Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes and Cancer*, *3*(3–4), 240–248. [https://doi.org/10.1177/1947601912455199/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1947601912455199-FIG2.JPEG](https://doi.org/10.1177/1947601912455199/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1947601912455199-FIG2.JPEG)
- Shlevkov, E., & Morata, G. (2011). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in Drosophila. *Cell Death & Differentiation* *2012 19:3*, *19*(3), 451–460. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.113>
- Southall, T. D., Elliott, D. A., & Brand, A. H. (2008). The GAL4 System: A Versatile Toolkit for Gene Expression in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2008*(7), pdb.top49. <https://doi.org/10.1101/pdb.top49>
- Sperka, T., Wang, J., & Rudolph, K. L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2012 13:9*, *13*(9), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrm3420>
- Spike, B. T., & Wahl, G. M. (2011). p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. [Http://Dx.Doi.Org/10.1177/1947601911410224](http://Dx.Doi.Org/10.1177/1947601911410224), *2*(4), 404–419. <https://doi.org/10.1177/1947601911410224>
- Spurgers, K. B., Gold, D. L., Coombes, K. R., Bohnenstiehl, N. L., Mullins, B., Meyn, R. E., Logothetis, C. J., & McDonnell, T. J. (2006). Identification of cell cycle regulatory genes as principal targets of p53-mediated transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(35), 25134–25142.

<https://doi.org/10.1074/JBC.M513901200/ATTACHMENT/93B4090A-9251-4F6E-9F48-0A2BEF31D1F6/MMC1.ZIP>

- Stehmeier, P., & Muller, S. (2009). Regulation of p53 family members by the ubiquitin-like SUMO system. *DNA Repair*, 8(4), 491–498. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2009.01.002>
- Suster, M. L., Seugnet, L., Bate, M., & Sokolowski, M. B. (2004). Refining GAL4-driven transgene expression in *Drosophila* with a GAL80 enhancer-trap. *Genesis (United States)*, 39(4), 240–245. <https://doi.org/10.1002/GENE.20051>
- Takwi, A., & Li, Y. (2009). The p53 Pathway Encounters the MicroRNA World. *Current Genomics*, 10(3), 194–197. <https://doi.org/10.2174/138920209788185270>
- Teleman, A. A., Hietakangas, V., Sayadian, A. C., & Cohen, S. M. (2008). Nutritional Control of Protein Biosynthetic Capacity by Insulin via Myc in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 7(1), 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.010>
- ter Huurne, M., Peng, T., Yi, G., van Mierlo, G., Marks, H., & Stunnenberg, H. G. (2020). Critical Role for P53 in Regulating the Cell Cycle of Ground State Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 14(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.01.001>
- Tétreault, N., & de Guire, V. (2013). miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*, 46(10–11), 842–845. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.02.009>
- Thiel, A., & Ristimäki, A. (2013). Toward a molecular classification of colorectal cancer: The role of BRAF. *Frontiers in Oncology*, 3 NOV, 66989. <https://doi.org/10.3389/FONC.2013.00281/BIBTEX>
- Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19(5), 517–529. <https://doi.org/10.1101/GAD.1284105>
- Tong, Z., Cui, Q., Wang, J., & Zhou, Y. (2019). TransmiR v2.0: an updated transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D253–D258. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1023>
- Totary-Jain, H., Sanoudou, D., Ben-Dov, I. Z., Dautriche, C. N., Guarnieri, P., Marx, S. O., Tuschl, T., & Marks, A. R. (2013). Reprogramming of the MicroRNA Transcriptome Mediates Resistance to Rapamycin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6034–6044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416446>
- Ueda, M., Sato, T., Ohkawa, Y., & Inoue, Y. H. (2018). Identification of miR-305, a microRNA that promotes aging, and its target mRNAs in *Drosophila*. *Genes to Cells*, 23(2), 80–93. <https://doi.org/10.1111/GTC.12555>

- Ugur, B., Chen, K., & Bellen, H. J. (2016). Drosophila tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3), 235–244. <https://doi.org/10.1242/DMM.023762>
- Valera, A., Pujol, A., Gregori, X., Riu, E., Visa, J., & Bosch, F. (1995). Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *The FASEB Journal*, 9(11), 1067–1078. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.9.11.7649406>
- van Kouwenhove, M., Kedde, M., & Agami, R. (2011). MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nature Reviews Cancer* 2011 11:9, 11(9), 644–656. <https://doi.org/10.1038/nrc3107>
- Vidal, M., & Cagan, R. L. (2006). Drosophila models for cancer research. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2005.12.004>
- Vousden, K. H., & Ryan, K. M. (2009). p53 and metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:10, 9(10), 691–700. <https://doi.org/10.1038/nrc2715>
- Wang, J., & Dahmann, C. (2020). Establishing compartment boundaries in Drosophila wing imaginal discs: An interplay between selector genes, signaling pathways and cell mechanics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 107, 161–169. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.07.008>
- Wang, X., Zhao, X., Gao, P., & Wu, M. (2013). c-Myc modulates microRNA processing via the transcriptional regulation of Drosha. *Scientific Reports* 2013 3:1, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep01942>
- Wells, B. S., & Johnston, L. A. (2012). Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in Drosophila by p53. *Developmental Biology*, 361(2), 263–276. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.10.012>
- Wells, B. S., Yoshida, E., & Johnston, L. A. (2006). Article Compensatory Proliferation in Drosophila Imaginal Discs Requires Dronc-Dependent p53 Activity. *Current Biology*, 16, 1606–1615. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.046>
- Wylie, A., Jones, A. E., Das, S., Lu, W. J., & Abrams, J. M. (2022). Distinct p53 isoforms code for opposing transcriptional outcomes. *Developmental Cell*, 57(15), 1833–1846.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.06.015>
- Wylie, A., Lu, W. J., D'Brot, A., Buszczak, M., & Abrams, J. M. (2014). p53 activity is selectively licensed in the Drosophila stem cell compartment. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.01530>
- Xu, N., Wang, S. Q., Tan, D., Gao, Y., Lin, G., & Xi, R. (2011). EGFR, Wiggless and JAK/STAT signaling cooperatively maintain Drosophila intestinal stem cells. *Developmental Biology*, 354(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.03.018>

- Xu, D., Woodfield, S. E., Lee, T. v., Fan, Y., Antonio, C., & Bergmann, A. (2009). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly*, *3*(1), 78–90.  
<https://doi.org/10.4161/FLY.3.1.7800>
- Yamamoto, S., Jaiswal, M., Charng, W. L., Gambin, T., Karaca, E., Mirzaa, G., Wiszniewski, W., Sandoval, H., Haelterman, N. A., Xiong, B., Zhang, K., Bayat, V., David, G., Li, T., Chen, K., Gala, U., Harel, T., Pehlivan, D., Penney, S., ... Bellen, H. J. (2014). A *Drosophila* Genetic Resource of Mutants to Study Mechanisms Underlying Human Genetic Diseases. *Cell*, *159*(1), 200–214. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.09.002>
- Yamasaki, S., Yagishita, N., Sasaki, T., Nakazawa, M., Kato, Y., Yamadera, T., Bae, E., Toriyama, S., Ikeda, R., Zhang, L., Fujitani, K., Yoo, E., Tsuchimochi, K., Ohta, T., Araya, N., Fujita, H., Aratani, S., Eguchi, K., Komiya, S., ... Nakajima, T. (2007). Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase “Synoviolin.” *EMBO Journal*, *26*(1), 113–122.  
[https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601490/SUPPL\\_FILE/EMBJ7601490-SUP-0010.PDF](https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601490/SUPPL_FILE/EMBJ7601490-SUP-0010.PDF)
- Yang, J. S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants. *Molecular Cell*, *43*(6), 892–903.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.07.024/ASSET/33B92C79-20E7-472C-AD6F-B8C666E06277/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Ye, P., Liu, Y., Chen, C., Tang, F., Wu, Q., Wang, X., Liu, C. G., Liu, X., Liu, R., Liu, Y., & Zheng, P. (2015). An mTORC1-Mdm2-Drosha axis for miRNA biogenesis in response to glucose- and amino acid-deprivation. *Molecular Cell*, *57*(4), 708–720.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.12.034/ATTACHMENT/BB9778EC-1374-41EA-83E1-08D32DE45ADE/MMC8.PDF>
- Yi, L., Lu, C., Hu, W., Sun, Y., & Levine, A. J. (2012). Multiple roles of p53-related pathways in somatic cell reprogramming and stem cell differentiation. *Cancer Research*, *72*(21), 5635–5645.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1451/650541/AM/MULTIPLE-ROLES-OF-P53-RELATED-PATHWAYS-IN-SOMATIC>
- Yun, M. H., Gates, P. B., & Brockes, J. P. (2013). Regulation of p53 is critical for vertebrate limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(43), 17392–17397.  
[https://doi.org/10.1073/PNAS.1310519110/SUPPL\\_FILE/PNAS.201310519SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1310519110/SUPPL_FILE/PNAS.201310519SI.PDF)
- Zhang, B., Rotelli, M., Dixon, M., & Calvi, B. R. (2015). The function of *Drosophila* p53 isoforms in apoptosis. *Cell Death & Differentiation* *2015 22:12*, *22*(12), 2058–2067.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2015.40>

Zhao, Z., Zuber, J., Diaz-Flores, E., Lintault, L., Kogan, S. C., Shannon, K., & Lowe, S. W. (2010). p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. *Genes & Development*, *24*(13), 1389–1402. <https://doi.org/10.1101/GAD.1940710>

Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A. C., Hiller, D. J., Chen, A. J., Perry, S. R., Tonon, G., Chu, G. C., Ding, Z., Stommel, J. M., Dunn, K. L., Wiedemeyer, R., You, M. J., Brennan, C., Wang, Y. A., Ligon, K. L., Wong, W. H., Chin, L., & DePinho, R. A. (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* *2008* *455*:7216, *455*(7216), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature07443>