



Caracterització dels factors de transcripció E74 i Seven Up en el desenvolupament de l'insecte hemimetàbol *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae)

Ferran Borràs Castells

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**CARACTERITZACIÓ DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ E74 I SEVEN UP EN EL
DESENVOLUPAMENT DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL *BLATTELLA*
GERMANICA (L.) (DICTYOPTERA, BLATTELLIDAE)**

Ferran Borràs Castells



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA
PROGRAMA DE FISIOLOGIA, BIENNI 2006-2008**

Treball realitzat en el Departament d'evolució funcional d'insectes de l'Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), sota la direcció dels Drs. David Martín Casacuberta i Xavier Bellés Ros, amb el títol:

**CARACTERITZACIÓ DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ E74 I SEVEN UP EN EL
DESENVOLUPAMENT DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL *BLATTELLA*
GERMANICA (L.) (DICTYOPTERA, BLATTELLIDAE)**

Ferran Borràs Castells
Doctorand

Dr. David Martín Casacuberta
Científic Titular del CSIC
Director de la tesi

Dr. Xavier Bellés Ros
Professor d'Investigació del CSIC
Director de la tesi

Dra. Isabel Navarro Álvarez
Professora Titular de Fisiologia
Departament de Fisiologia (UB)
Tutora de la tesi

AGRAÏMENTS

Voldria aprofitar aquestes línies per agrair a totes les persones que han contribuït en la realització d'aquesta tesi durant els últims cinc anys, tant a l'època a l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona com a la de l'Institut de Biologia Evolutiva. En primer lloc voldria agrair als meus directors de tesi, els Drs. Xavier Bellés i David Martín, per haver confiat en mi, després de la meva etapa de pràctiques, i donar-me la oportunitat de fer la tesi al departament. Moltes gràcies Xavier, per la beca i per totes les xerrades que hem tingut durant aquests anys. Moltes gràcies David, per guiar-me en l'investigació, per totes les idees que has tingut i per ser no només un bon cap, sinó també un gran amic.

A continuació, voldria agrair a tots els membres del grup de receptors nuclears, tant passats com presents, per compartir molt més que buffers i hores de disseccions, moltes gràcies pels grans moments viscuts durant aquesta època. Moltes gràcies Pepi i Dani, els meus primers companys de pipetes i els que em van acompanyar durant les primeres passes en un laboratori. Gràcies Clàudia per ensenyar-me tots els secrets dels llevats i per aconseguir que tot el que perdia aparegués a la teva taula misteriosament. Gràcies també a l'Enric i la Cristina, els membres actuals del grup amb els que he compartit grans moments de traduccions català - valencià i loops sense fi. Cristina, moltes gràcies per compartir els teus coneixements de mosques, microscopi i photoshop. I moltes gràcies pels teus esmorzars i pastissos variats. Enric, moltes gràcies per compartir tantes hores de laboratori junts, qui ho diria que després de coincidir a algunes classes de facultat acabariem al mateix laboratori fent la tesi. Ah, i moltes gràcies per descobrir-nos les meravelloses patates d'Olot. Una menció especial per la Núria i la Lluïsa, que tot i no ser oficialment del grup, són de la família. Moltes gràcies per la vostra ajuda i moltes gràcies per la vostra alegria i simpatia.

També voldria agrair a tots els companys dels laboratoris veïns, els dels Drs. Jose L. Maestro, Elena Cascuberta i Xavi Franch. Amb tots ells em compartit seminaris, sala de lupes, microscopi, esquiades i molts esmorzars, dinars, berenars i algun que altre sopar també. Vull agrair al Jose per ensenyar-me a treure CA i per ajudar-me en tantes disseccions, moltes gràcies. També vull agrair-li amb ell i la gent del seu laboratori l'ajuda sobre les vies de nutrició i pels primers cèdits amablement. A la Songul, moltes gràcies per les xerrades i històries sobre Turquia i al Marc, gràcies per la teva amistat i per tots els primers que m'has deixat i gràcies per explicar "el secret", jo no sabia com dir-ho. I molts ànims, que ets el següent. Moltes gràcies als meus companys de cafè, la Rute i el Piñeyro. Gràcies per compartir la vaca per escalfar l'aigua, el cafè soluble i les càpsules. Moltes gràcies Piñeyro pel teu sentit de l'humor i bon rotllo. Rute, obligado tant per ensenyar-me tècniques amb parafilm i gels com pels pastissos "de nata" de Portugal. Però per sobre de tot moltes gràcies per la teva amistat durant aquests anys i per les moltes xerrades que hem tingut, científiques i no-científiques. Elisenda, o Mezzi com t'agrada que et diguin, moltes gràcies per mantenir el desordre controlat a la teva taula. I moltes gràcies també a les noves incorporacions, Cristina i Neus, per la vostra simpatia i coneixements del món manga.

També voldria agrair a tota la colla dels laboratoris del Dr. Xavier Bellés i la Dr. M^aDolors Piluachs. A la Dolors moltes gràcies per tenir la porta sempre oberta per resoldre qualsevol dubte o problema. Moltes gràcies a l'Erica, la Mercedes, l'Alba i el Jesús pels bons moments

compartits a la sala de lopes i sopars varis. També moltes gràcies a la Laura, la Paula i l'Eva que van formar part d'aquest laboratori. Vull tenir unes paraules d'agraïment a la resta de membres de l'IBE, tot i que no haguem interactuat tant per qüestions tècniques, la filogenia no és el meu fort, moltes gràcies pels diferents moments que em compartit en retreats, festes i partits de volley. Moltes gràcies a l'equip d'administració per totes les gestions fetes i també per la vostra simpatia. Gràcies de tot cor Blanca, Rita, Anna i Emiliano.

No vull acabar els agraiments sense donar les gràcies a una persona molt especial per mi, la Rocío. Moltes gràcies per estar al meu costat en els bons moments i en els no tant bons i per animar-me quan ho necessitava.

Fora del món científic, vull donar les gràcies als meus amics i a tota la meva família i especialment als meus pares, Anna i Toni, ja que sense ells aquesta tesi no hauria estat possible. Gràcies pel vostre suport incondicional i per compartir pis amb mi. Encara que us sembli mentida, per fi he acabat d'escriure la tesi!!

I. CONTINGUT

I. CONTINGUT	I
I. LLISTA D'ABREVIATURES	VII
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. CONTROL HORMONAL DEL DESENVOLUPAMENT DELS INSECTES.....	4
1.1.1. Les hormones controlen el desenvolupament dels insectes	4
1.2. L'HORMONA DE LA MUDA: LA 20-HIDROXIECDISONA	6
1.2.1. Síntesi de la 20E.....	6
1.2.2. L'hormona protoracicotròpica (PTTH).....	7
1.2.3. Mecanisme d'acció de la 20E. El model d'Ashburner	9
1.3. ELS RECEPTORS NUCLEARS D'INSECTES	11
1.3.1. Mecanisme d'acció dels receptors nuclears.....	15
1.4. L'HORMONA JUVENIL.....	16
1.4.1. La síntesi de l'hormona juvenil als insectes.....	18
1.5.2. Mecanisme d'acció de l'HJ	19
1.5. <i>BLATTELLA GERMANICA</i> COM A MODEL PER L'ANÀLISI DEL CONTROL HORMONAL DEL DESENVOLUPAMENT HEMIMETÀBOL.....	22
1.5.1. Fisiologia de <i>Blattella germanica</i>	23
1.6.2. Anatomia de <i>Blattella germanica</i>	24
1.5.3. Mecanisme d'acció de la 20E a <i>Blattella germanica</i>	26
1.6. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E74	28
1.7. EL RECEPTOR NUCLEAR SEVEN UP (Svp)	29
2. OBJECTIUS	33
3. MATERIAL I MÈTODES	33
3.1. INSECTES.....	39
3.2. TÈCNiques QUIRÚRGiques.....	39
3.2.1. Dissecció dels ovaris, cos gras i epidermis	39
3.2.2. Dissecció de les glàndules col·laterals.....	40
3.2.3. Dissecció dels <i>corpora allata</i> (CA)	40
3.2.4. Dissecció de la glàndula protoràcica (GP)	40
3.2.5. Obtenció d'hemolimfa.....	40
3.3. EXTRACCIÓ D'ÀCIDS RIBONUCLEICS.....	41
3.4. CLONATGE DELS cDNAs DE BgSvp I BgE74	41
3.4.1 PCR.....	41

3.4.2. Amplificació ràpida dels extrems 5' i 3' dels cDNAs	42
3.5. ELECTROFORESI DE DNA	43
3.6. LLIGACIÓ D'INSERTS EN PLÀSMIDS	44
3.7. PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS	44
3.8. SEQÜENCIACIÓ DE DNA	44
3.9. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES SINTÈTIQUES	44
3.10. ASSAIG D'UNIÓ A DNA	44
3.10.1 Síntesi de la sonda de DNA	45
3.10.2 Reacció d'unió	46
3.10.3 Electroforesi, tractament del gel i revelat	47
3.11. RT-PCR SEMIQUANTITATIVA	47
3.11.1. Tractament amb DNAsa	47
3.11.2. Retrotranscripció	48
3.11.3. PCR	48
3.12. PCR EN TEMPS REAL	49
3.13. INTERFERÈNCIA D'RNA <i>IN VIVO</i>	51
3.13.1 Obtenció de l'RNA de doble cadena (dsRNA)	51
3.14.2. Preparació i injecció del dsRNA	54
3.14. TINCIÓ AMB FALOIDINA-TRITC I DAPI	54
3.15. TUNEL de CA	54
3.16. MARCATGE AMB BrdU	55
3.17. OBSERVACIONS MICROSCÒPIQUES	56
4. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DE BgE74	57
4.1. ANTECEDENTS	59
4.2. RESULTATS	60
4.2.1. Clonatge i caracterització estructural del factor de transcripció BgE74	60
4.2.2. Comparació entre les seqüències d'E74	62
4.2.3. Patrons d'expressió de BgE74 durant les dues darreres fases nimfals	62
4.3. DISCUSSIÓ	65
5.1. ANTECEDENTS	73
5.2. RESULTATS	74
5.2.1. El RNAi <i>in vivo</i> redueix els nivells de missatger de BgE74 en nimfes de <i>B. germanica</i>	74
5.2.2. Anàlisi fenotípica de les nimfes de sisena fase tractades amb dsBgE74	76
5.2.3. BgE74 afecta el patró de pigmentació en l'insecte hemimetàbol <i>B. germanica</i>	79

5.3. DISCUSSIÓ.....	88
6. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL RECEPTOR NUCLEAR BgSVP	93
6.1. ANTECEDENTS	95
6.2. RESULTATS.....	96
6.2.1. Clonatge de dos cDNAs corresponents a dues isoformes del receptor nuclear Seven Up a <i>B. germanica</i>	96
6.2.2. Compració de les seqüències de Seven Up d'artròpodes i vertebrats.....	97
6.2.3. Capacitat d'unió a DNA de les dues isoformes de Svp de <i>Blattella germanica</i>	100
6.2.4. Patrons d'expressió de BgSvp durant el desenvolupament de <i>B. germanica</i>	102
6.3. DISCUSSIÓ.....	103
7. ESTUDI FUNCIONAL DE BgSVP DURANT EL DESENVOLUPAMENT POSTEMBRIONARI DE <i>B. GERMANICA</i>	107
7.1. ANTECEDENTS	109
7.2. RESULTATS.....	110
7.2.1. La interferència d'RNA disminueix els nivells d'mRNA de les isoformes de Svp a <i>B. germanica</i>	110
7.2.2. Anàlisi fenotípic del silenciament de BgSvp durant el desenvolupament postembrionari de <i>B. germanica</i>	110
7.2.3. Anàlisi fenotípic de femelles interferides per BgSvp durant l'estadi adult	113
7.2.4. La interferència específica de cadascuna de les isoformes de BgSvp indica que no són redundants	117
7.2.5. BgSvpB controla el desenvolupament i funcionament dels <i>corpora allata</i> de les femelles adultes de <i>B. germanica</i>	118
7.2.6. Efecte del silenciament de BgSvpB durant el desenvolupament dels CA durant els estadis nimfals.....	125
7.2.7. Efecte de la interferència de BgSvp en el segon cicle gonadotròfic de <i>B. germanica</i>	127
7.3. DISCUSSIÓ.....	132
8. CONCLUSIONS.....	137
9. BIBLIOGRAFIA	141

I. LLISTA D'ABREVIATURES

AST: Al·latostatina

AT: Al·latotropina

BR-C: Broad Complex

BrdU: Bromodeoxyuridina

BSA: Albúmina sèrica bovina

CA: *Corpora allata*

CC: *Corpora cardiaca*

CCAP: Pèptid cardioactiu de crustàcis

cDNA: DNA complementari

CG: Cos gras

COUP-TF: Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBD: Domini d'unió a DNA

DDC: Dopa decarboxilasa

dsRNA: RNA de doble cadena

DTT: Ditiotreitòl

20E: 20-hidroxiècdisona

E74: Ecdysone induced protein 74

E75: Ecdysone induced protein 75

E78: Ecdysone induced protein 78

EcR: Receptor d'ècdisona

EH: Hormona d'eclosió

EMSA: Assaig de retard de mobilitat electroforètica

ESM: Error estàndard de la mitjana

ETH: Hormona d'ècdisi

ETS: E twenty-six

FTZ-F1: Fushi Tarazu Factor 1

FPPS: Farnesil difosfat sintasa

GP: Glàndula protoràcica

HJ: Hormona Juvenil

HMG-R: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa

HMG-S: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa

HR3: Hormone nuclear receptor 3

HR38: Hormone nuclear receptor 38

HR4: Hormone nuclear receptor 4

HR78: Hormone nuclear receptor 78

HRE: Element de resposta a l'hormona

InR: Receptor d'insulina

JHE: Esterasa de l'hormona juvenil

LOB: Loongitud oòcit basal

LBD: Domini d'unió a lligand

MET: Tolerant al metopré

NGS: Sèrum normal de cabra

PBS: Tampó fosfat salí

PETH: Hormona de pre-ècdisi

PFA: Paraformaldehid

PTTH: Hormona protoràcticotropa

RACE: Amplificació ràpida d'extremes de cDNA

RNAi: RNA de interferència

Svp: Seven up

TNT: Transcripció-Traducció *in vitro*

TOR: Target og rapamycin

TRITC: Tetrametil rodamina iso-tiocianat

USP: Ultraespiracle

UTR: Regió no traduïda

Vg: Vitel·logenina

II. LLISTES DE TAULES I FIGURES

Figura 1.1. Diversitat de la classe <i>Insecta</i> .	4
Figura 1.2. Estructura química de les dues hormones més importants en la regulació endocrina dels insectes i marc endocrí durant el desenvolupament de <i>Drosophila melanogaster</i> .	5
Figura 1.3. Esquema de la biosíntesi de la 20-hidroxiecdisona (20E).	8
Figura 1.4. Model de senyalització de la PTTH.	10
Figura 1.5. Model d'Ashburner.	11
Figura 1.6. Organització dels receptors nuclears.	13
Figura 1.7. Característiques funcionals dels receptors nuclears.	16
Figura 1.8. Mecanismes d'acció dels receptors nuclears.	17
Figura 1.9. Via de biosíntesi de l'hormona Juvenil.	20
Figura 1.10. Marc endocrí durant les últimes fases del desenvolupament postembronari de <i>B. germanica</i> .	24
Figura 1.11. Anatomia de <i>Blattella germanica</i> .	26
Figura 1.12. Representació esquemàtica dels nivells d'expressió de varis receptors nuclears durant les dues últimes fases nimfals de <i>B. germanica</i> .	28
Figura 4.1. El factor de transcripció E74 a <i>B. germanica</i> .	57
Figura 4.2. Seqüències de nucleòtids i aminoàcids de les dues isoformes del factor de transcripció E74 a <i>B. germanica</i> .	59
Figura 4.3. Comparació dels dominis estructurals de les dues isoformes de BgE74 respecte els E74 d'altres espècies d'insectes.	62
Figura 4.4. Patrons d'expressió de les isoformes del factor de transcripció BgE74 en diferents teixits durant les dues darreres fases nimfals a <i>B. germanica</i> .	63
Figura 5.1. Interferència del factor de transcripció BgE74 mitjançant la tècnica d'RNAi <i>in vivo</i> en femelles de sisena fase nimfal de <i>B. germanica</i> .	70
Figura 5.2. Efecte del silenciament de BgE74 sobre la muda imaginal de <i>B. germanica</i> .	71
Figura 5.3. Alteracions en l'ècdisi degut al silenciament de BgE74.	72

Figura 5.4. Efecte del tractament amb dsE74 sobre les estructures de locomoció i adhesió.	74
Figura 5.5. Procés de pigmentació després de la muda imaginal a <i>B. germanica</i> .	76
Figura 5.6. Alteracions en el patró de pigmentació de les femelles tractades amb dsBgE74.	78
Figura 5.7. Pigmentació en insectes i seqüència parcial de la BgDDC.	79
Figura 5.8. Caracterització de la DDC a <i>B. germanica</i> .	80
Figura 5.9. Silenciament de BgDDC mitjançant la tècnica d'RNAi <i>in vivo</i> en femelles de sisena fase nimfal de <i>B. germanica</i> .	81
Figura 5.10. Efecte del silenciament de BgDDC en el patró de pigmentació de <i>B. germanica</i> .	82
Figura 5.11. Efecte de la interferència de BgE74 sobre l'expressió de la BgDDC i sobre els receptors nuclears BgHR3, BgE75A, BgE75A i BgHR4 durant el final de la sisena fase nimfal a <i>B. germanica</i> .	83
Figura 6.1. Representació esquemàtica de les dues isoformes de Svp a <i>B. germanica</i> .	93
Figura 6.2. Seqüència de nucleòtids i aminoàcids de les dues isoformes del receptor nuclear Svp a <i>B. germanica</i> .	94
Figura 6.3. Comparació dels dominis estructurals de la isoforma BgSvpB de <i>B. germanica</i> amb SvpB d'altres espècies d'insectes i varis COUP-TF de vertebrats.	96
Figura 6.4. Característiques d'unió a DNA de les dues isoformes de Svp de <i>B. germanica</i> .	97
Figura 6.5. Expressió relativa de les dues isoformes de BgSvp en diferents teixits de <i>B. germanica</i> .	98
Figura 6.6. Patrons d'expressió de BgSvp durant les dues últimes fase ninfals de <i>B. germanica</i> .	99
Figura 7.1. Interferència del receptor nuclear BgSvp mitjançant la tècnica d'RNAi <i>in vivo</i> en femelles de sisena fase nimfal de <i>B. germanica</i> .	107

Figura 7.2. Efecte del silenciament de BgSvp sobre la muda imaginal de <i>B. germanica</i> .	108
Figura 7.3. Efecte de la interferència de BgSvp sobre la degeneració de la glàndula protoràtica a <i>B. germanica</i> .	109
Figura 7.4. Esquema de l'acció de l'HJ sobre el cos gras i els oòcits a <i>B. germanica</i> .	110
Figura 7.5. Efecte de la interferència de BgSvp en femelles adultes de <i>B. germanica</i> .	112
Figura 7.6. Efecte del metoprè sobre l'expressió de l'mRNA de BgVg de femelles adultes de <i>B. germanica</i> tractades amb dsBgSvp.	113
Figura 7.7. Efecte del silenciament de BgSvpA i BgSvpB sobre la muda imaginal de <i>B. germanica</i> .	115
Figura 7.8. Efecte de la interferència de BgSvpB en el desenvolupament dels <i>corpora allata</i> de <i>B. germanica</i> durant l'estadi adult.	116
Figura 7.9. Efecte de la interferència de BgSvpB sobre la mort cel·lular programada.	117
Figura 7.10. Efecte de la interferència de dsBgSvpB sobre l'expressió de gens de la via del mevalonat en femelles adultes de <i>B. germanica</i> .	119
Figura 7.11. Esquema de la via de la insulina.	120
Figura 7.12. Efecte de la interferència de BgSvp sobre l'expressió dels mRNA de BgTOR i BgInR.	121
Figura 7.13. Efecte del metoprè sobre l'expressió de l'mRNA de dos gens de la via del mevalonat en els CA de femelles adultes tractades amb dsBgSvpB.	122
Figura 7.14. Efecte de la interferència de BgSvpB en el desenvolupament dels CA durant La última fase nimfal de <i>B. germanica</i> .	124
Figura 7.15. Efecte del silenciament de BgSvp en el desenvolupament dels CA durant la penúltima fase nimfal.	125

Figura 7.16. Efecte de la interferència de BgSvpB durant el segon cicle gonadotròfic. 127

Taula 1.1. La família de receptors nuclears. 14

Taula 4.1. Isoformes del receptor nuclear E74 a insectes. 56

Taula 4.2. Percentatges d'identitat del domini d'unió a DNA de tipus ETS d'E74 de diferents espècies d'insectes i vertebrats en relació a BgE74 de *Blattella germanica*. 61

Taula 5.1. Efecte del silenciament de BgE74 en de femelles de sisena fase nimfal de *B. germanica* sobre la muda imaginal. 73

Taula 6.1. Percentatges d'identitat dels DBD i LDB de SvpB i COUP-TF de diferents espècies d'insectes i vertebrats en relació a BgSvpB de *B. germanica*. 95

1. INTRODUCCIÓ

Els insectes són el grup d'organismes més divers que ha aparegut en els més de 3000 milions d'anys en la història de la vida a la Terra. No només és el més abundant i divers dins del filum dels artròpodes sinó que hi ha més espècies d'insectes que de totes les altres classes d'animals junts. Es caracteritzen per tenir un exosquelet de quitina, tres parells de potes i generalment dos parells d'ales a la regió toràcica, tot i que alguns només tenen un parell o fins hi tot no en tenen.

Hi ha registres fòssils d'insectes de 400 milions d'anys d'antiguitat tot i que la majoria d'insectes moderns van aparèixer fa 250 milions d'anys. Encara que s'han descrit aproximadament un milió d'espècies, el nombre total podria estar entre 2,5 i 10 milions. I això ens porta a preguntar-nos perquè els insectes han tingut tant èxit evolutiu? El disseny de l'exosquelet amb segments repetitius, apèndixs adaptats a la vida terrestre i les ales dissenyades per millorar la mobilitat, dispersió i escapatòria són, indubtablement, part d'aquest èxit, tot i que és una innovació més recent la autèntica responsable: la aparició de la metamorfosi. Coleoptera, Diptera, Hymenoptera i Lepidoptera representen aproximadament el 80% dels insectes, i tots quatre ordres presenten una metamorfosi completa (Figura 1.1) (Grimaldi i Engel, 2005). Aquest tipus d'insectes, anomenats holometàbols, presenten tres estadis de desenvolupament post-embrionari morfològicament diferenciats: larva, pupa i adult. En aquests insectes, el creixement es dona a les fases larvàries, mentre que a la pupa té lloc el procés de metamorfosi, durant el qual es destrueixen els teixits larvaris i es generen els teixits adults a partir del creixement controlat dels discs imaginals. Segons el tipus de metamorfosi hi ha dos tipus més d'insectes, els hemimetàbols, que presenten una metamorfosis incompleta on les formes immadures, anomenades nimfes, són morfològicament semblants a l'adult i presenten uns rudiments alars que esdevindran ales funcionals en les formes adultes i la seva genitalia no és funcional. Per últim els insectes ametàbols, no presenten cap tipus de metamorfosi i no hi ha canvis entre les formes immadures i l'adult tret de la genitalia funcional.

Malgrat aquesta diversitat d'estratègies en el desenvolupament dels insectes, existeix un denominador comú entre els tres tipus de desenvolupament, les hormones que el regulen. En tots els casos, els ecdisteroides i l'hormona juvenil (HJ) són les encarregades de controlar tant el desenvolupament embrionari com post-embrionari dels insectes. Es per això que l'estudi de la funció i el mecanisme d'acció d'aquestes hormones permetrà esbrinar quins canvis en la endocrinologia del desenvolupament han estat clau per a l'aparició de la metamorfosi completa.

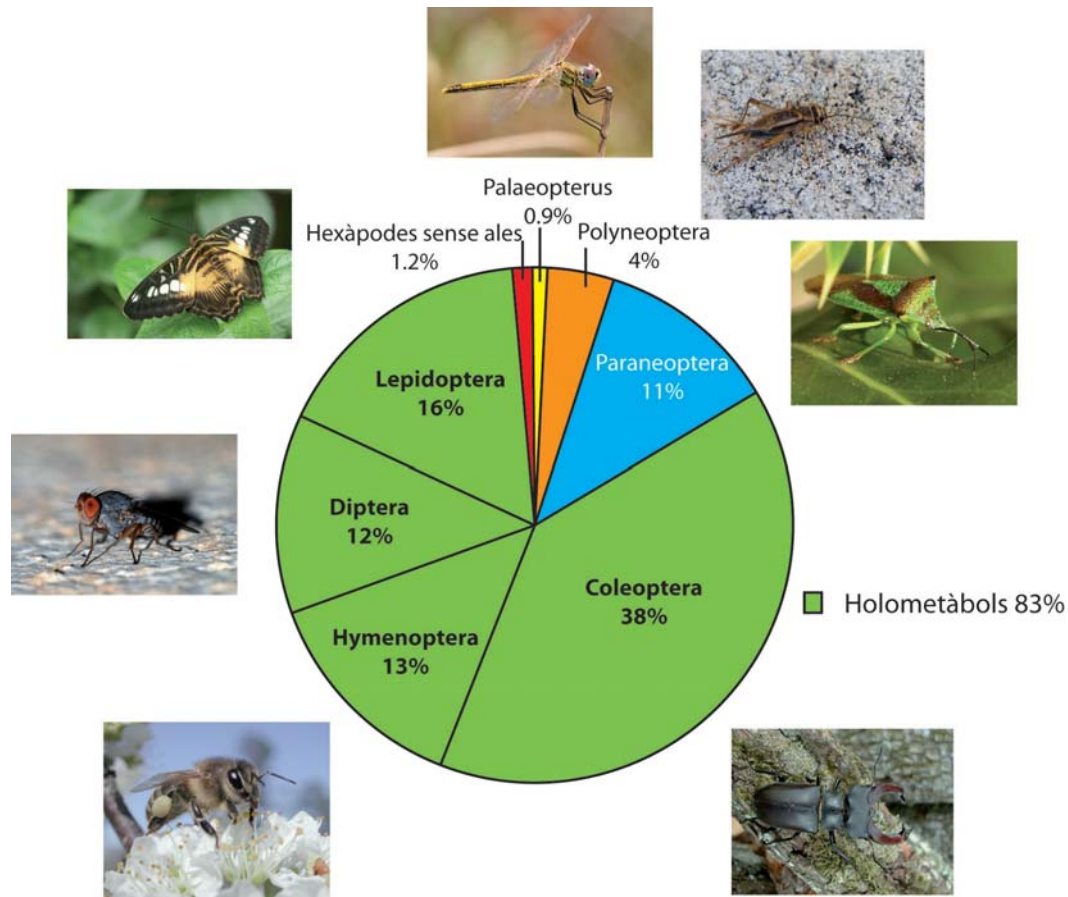


Figura 1.1. Diversitat de la classe *Insecta*. Gràfic on es representen els principals ordres dels insectes en proporció al seu nombre d'espècies. Segons la seva metamorfosi els holometàbols representen aproximadament el 83% dels insectes, els hemimetàbols un 16% i finalment els ametàbols un 1%. Adaptat de Grimaldi i Engel (2005).

1.1. CONTROL HORMONAL DEL DESENVOLUPAMENT DELS INSECTES

1.1.1. Les hormones controlen el desenvolupament dels insectes

Tot i els diferents tipus de desenvolupament post-embrionari descrits anteriorment, el control d'aquest procés està en tots els casos en mans de dos hormones lipofíliques: la 20-hidroxicdisona (20E) i l'hormona juvenil (HJ) (Figura 1.2A i B). La 20E és una hormona esteroïdal derivada del colesterol que indueix i controla el procés de la muda. La naturalesa d'aquesta muda ve determinada per la presència o absència de l'HJ, hormona de naturalesa sesquiterpènica. En presència d'HJ, el pic de 20E produeix una muda entre estadis juvenils, es a dir, de larva a larva o de nimfa a nimfa. En canvi, quan desapareix l'HJ, la 20E indueix una muda a l'estadi adult (Dubrovsky, 2006). Degut a aquest efecte, l'HJ és coneguda com l'hormona "status quo", ja que evita la diferenciació dels teixits sense interferir en el seu creixement (Fig. 1.2C).

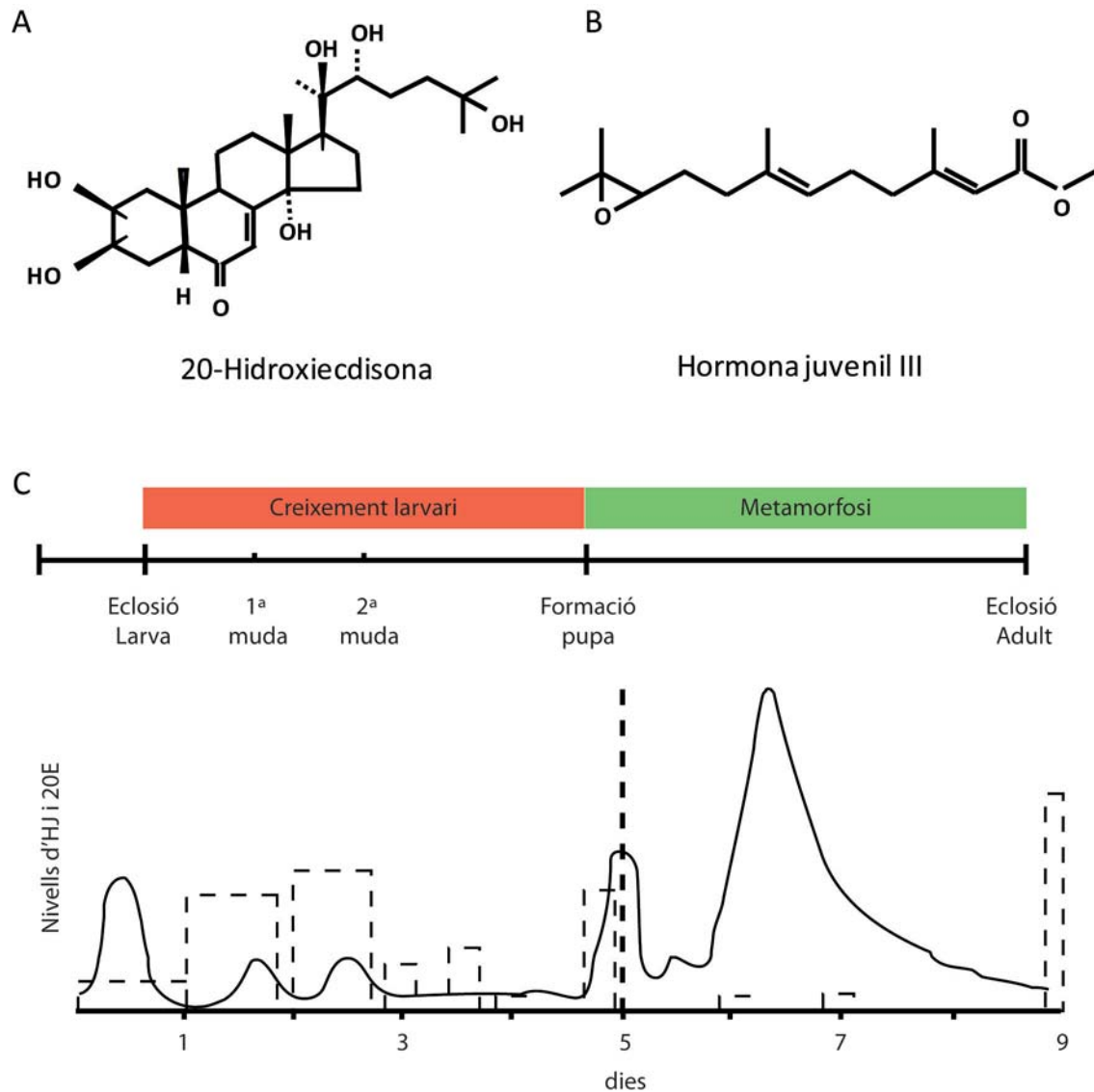


Figura 1.2. Estructura química de les dues hormones més importants en la regulació endocrina dels insectes i marc endocrí durant el desenvolupament de *Drosophila melanogaster*. (A) 20-hidroxiecdisona (20E) i (B) Hormona juvenil (HJ). (C) Nivells de la 20E i l'HJ durant el desenvolupament de *D. melanogaster*. La línia continua indica els nivells de 20E i la puntejada els de l'HJ. Cada muda entre les diferents etapes està iniciada per la 20E i l'HJ determina el tipus de transició. Adaptat de Dubrovsky (2006).

El control hormonal s'ha estudiat en detall a *Drosophila melanogaster* com a insecte model del desenvolupament holometàbol; aquests insectes presenten quatre fases durant el seu cicle de vida: ou, larva, pupa i adult. Els nivells de 20E augmenten durant l'embriogènesi, abans de cada muda entre fases larvals, abans de formar la pupa i durant la metamorfosi (al final de la diferenciació de les estructures adultes), mentre que l'HJ es produeix durant la major part del cicle excepte durant la pupa (Figura 1.2C). La muda és el procés pel qual els insectes es

desprenen de la seva cutícula, exosquelet quitinós que tenen tots els artròpodes, ja que al ser rígida els restringeix el creixement durant les fases juvenils. Per tant, per poder seguir creixent s'han de despendre de la cutícula regularment mitjançant les mudes. Durant aquest procés, la cutícula es separa de l'epidermis (apòlisi), es digereix parcialment i finalment s'allibera (ècdisi). Després de la ècdisi, l'epidermis sintetitza una nova cutícula. D'aquesta manera la larva va creixent en les successives mudes, mantenint la mateixa forma, fins a obtenir la mida adient perquè tingui lloc la metamorfosi. Aquest procés té lloc quan es produeix un pic de 20E en absència d'HJ, moment en que es produeix un canvi complet en la morfologia de l'insecte. Els òrgans larvals són destruïts mitjançant la mort cel·lular programada i substituïts per estructures adultes que creixen a partir de discs imaginals, invaginacions de grups de cèl·lules provinents de l'ectoderm embrional i que han anat creixent sense diferenciar-se durant les fases larvals. Durant la metamorfosi de *D. melanogaster*, el model d'insecte holometàbol, té lloc la històlisi de diferents teixits i òrgans larvals com ara les glàndules salivals i el tub digestiu i el creixement i diferenciació dels discs imaginals. Els discs parells de la pupa donaran lloc a les ales, potes, cap i estructures toràciques de l'adult, mentre que el disc terminal donarà lloc a la genitalia exterior.

1.2. L'HORMONA DE LA MUDA: LA 20-HIDROXIECDISONA

Tal i com hem descrit, el desenvolupament dels insectes està controlat per la 20-hidroxicdisona (20E), una hormona esteroïdal coneguda com l'hormona de la muda. La 20E és la forma activa dels ecdisteroides i es forma per la hidroxilació en diferents teixits de la -ecdisona (E), produïda a la glàndula protoràcica (GP). En els insectes hemimetàbols, la GP consta de dos eixos musculars envoltats de cèl·lules que sintetitzen els ecdisteroides. En els insectes més modificats, com *D. melanogaster*, la GP és una porció de la glàndula anular, que també conté els *corpora allata* (CA), que sintetitza l'hormona juvenil, i els *corpora cardiaca* (CC), òrgans neurohemals i neurosecretors (Dai i Gilbert, 1991).

1.2.1. Síntesi de la 20E

Les hormones esteroïdals són derivats químics del colesterol que regulen el desenvolupament tant en animals com en plantes. Curiosament, els insectes tenen la particularitat de no poder sintetitzar colesterol a partir de precursors com ara l'acetat. Així, han d'obtenir el colesterol directament de la ingesta. Els insectes que s'alimenten de plantes incorporen principalment sitosterol i campesterol, que han de ser metabolitzats a l'intestí.

Tal i com s'ha dit anteriorment, la esteroidogènesi (Figura 1.3.) té lloc a les cèl·lules de la GP. El primer pas és la conversió del colesterol a 7-dehidrocolesterol (7dC) mitjançant una 7,8 deshidrogenasa, codificada pel gen *neverland* (*nvd*) (Huang et al., 2008). A *D. melanogaster*, *Nvd* s'expressa a la GP de l'embrió i de la larva, i en adult només s'expressa a les cèl·lules nodradores de les cambres ovàriques, que actuen com a font d'ecdisteroides. Tal i com és d'esperar, els mutants nuls de *Nvd* paren el seu desenvolupament a l'estadi prepupal. Confirmant el seu paper enzimàtic, aquest mutants poden ser rescatats amb l'aplicació de 7dC (Yoshiyama et al., 2006). A partir del 7dC, les següents reaccions han estat englobades dins del nom genèric de caixa negra degut a que no es coneixen els passos metabòlics intermedis fins a la formació de ⁴-diketol. Recentment s'han identificat diferents gens que formen part de la caixa negra i que són membres de la família anomenada genèricament com a gens "Halloween". Els primers gens en ser identificats van ser *spook* (*spo*) i *spookier* (*spok*), que codifiquen per citocroms P450, tots dos actuen en passos posteriors a la formació del 7dC tot i que no s'ha pogut establir la seva activitat enzimàtica (Ono et al., 2006). *Spok* s'expressa a la GP en tots els estadis, des de l'embrió fins a adult, però no s'expressa als oòcits, on en canvi s'expressa *Spo*. El següent gen identificat que també forma part de la caixa negra és *shroud* (*sro*). Els mutants de *Sro* són letals tant durant l'embriogènesi com durant l'estadi de larva i poden ser rescatats aplicant 20E (Niwa et al., 2010). Finalment, les últimes quatre hidroxilacions de la via també són catalitzades per citocroms p450. *Phantom* (*phm*), *disembodied* (*dib*) i *shadow* (*sad*) catalitzen les tres últimes reaccions fins a la formació de la E (Chavez et al., 2000; Warren et al., 2002; Warren et al., 2004). La última reacció està catalitzada per *shade* (*shd*), enzim que, al contrari dels altres, no està present a la GP i converteix la E a 20E en diferents teixits perifèrics (Petryk et al., 2003).

1.2.2. L'hormona protoracicotrópica (PTTH)

En aquest eix hormonal que regula el desenvolupament dels insectes hi ha un altra factor implicat que regula la producció i alliberament de la ecdisona a la GP. Quan es va començar a estudiar el control endocrí de la muda, es va demostrar l'existència d'un factor difusible en el cervell necessari per induir la metamorfosi de l'arna *Lymantria dispar* (Kopec, 1922). Més tard, el Prof. Wigglesworth (1934) va dur a terme experiments amb la xinxa hematòfaga *Rhodnius prolixus* i va demostrar, un altra cop, que el cervell era important per la muda de les larves durant certs moments crítics del desenvolupament. En aquesta mateixa

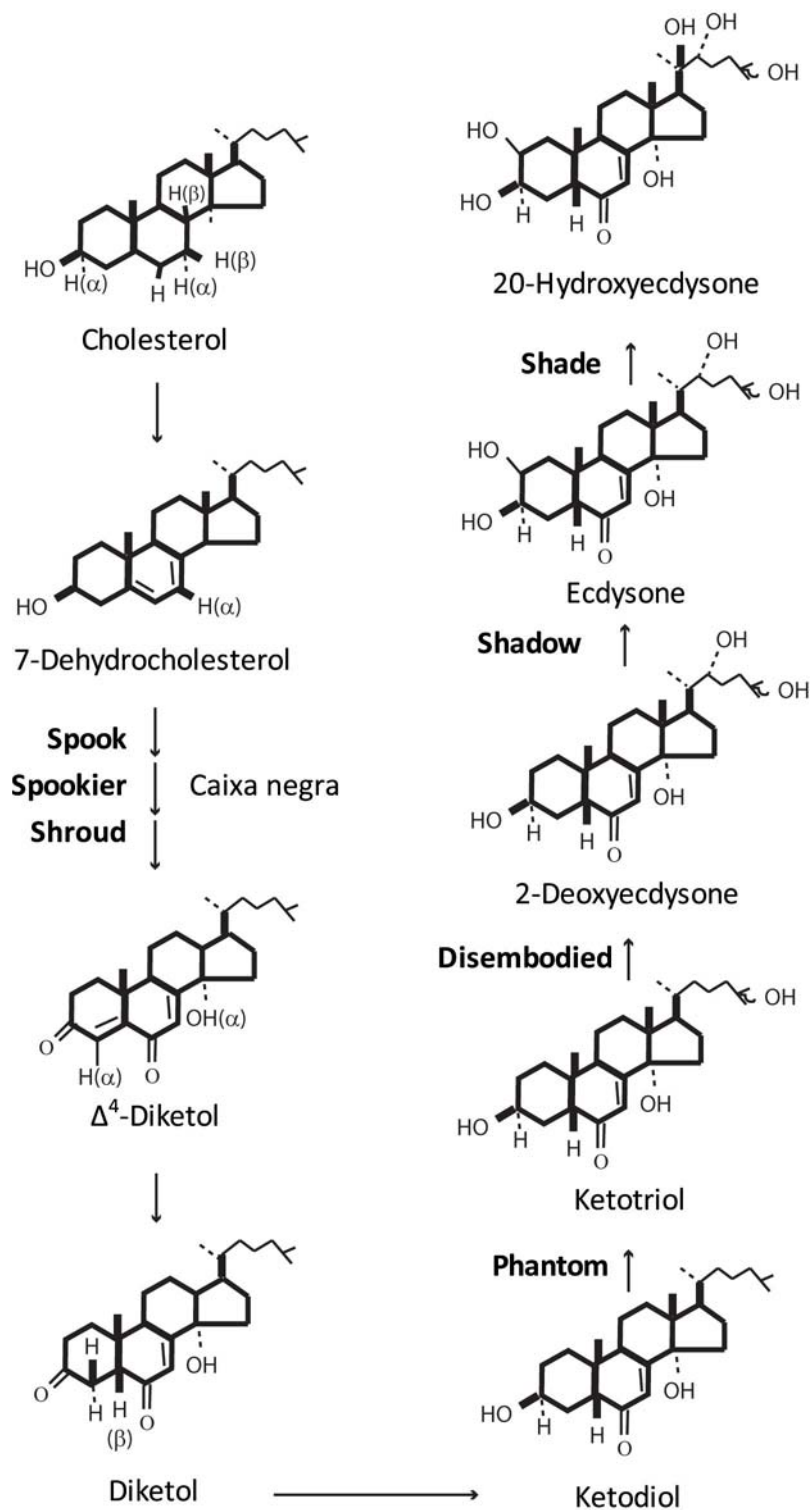


Figura 1.3. Esquema de la biosíntesi de la 20-hidroiecdisona (20E). En aquests procés estan implicats almenys set gens que codifiquen per enzims de tipus citocrom P450. La part corresponent a la caixa negra encara té passos intermedis per caracteritzar i es representa amb múltiples fletxes. Adaptat de Huang et al. (2008).

època també es va demostrar que aquest factor produït al cervell no era suficient per estimular la metamorfosi, i que era necessari un altra factor produït al tòrax dels insectes (Burt, 1938; Fukuda, 1941; Williams, 1947). Després de molts anys de recerca es va identificar el factor cerebral que era necessari per induir la muda. Aquest era l'hormona protoracicotròpica (PTTH), que va ser aïllada i clonada per primera vegada al cuc de seda *Bombyx mori* (Kawakami et al., 1990) i que posteriorment ha estat clonada en varies espècies de lepidòpters (Marchal et al., 2010a). És un pèptid produït per un parell de cèl·lules neurosecretores situades a la regió dorsomedial del cervell dels insectes i que actua a la GP regulant la producció i alliberament de l'E. Es sintetitza com una pro-hormona i finalment s'allibera com un homodímer més curt i glicosilat (Henrich et al., 1999). En els lepidòpters, les cèl·lules neurosecretores que produeixen la PTTH estan connectades als CA, la glàndula que s'encarrega de la síntesi de l'HJ. Tot i això, aquest pèptid no exerceix cap efecte en la síntesi de l'HJ, sinó que és alliberat a l'hemolimfa, on finalment es captada per la GP (Rybczynski et al., 2001; Rybczynski i Gilbert, 2003; Smith i Gilbert, 1989).

Mitjançant purificació per cromatografia, a *D. melanogaster*, es va poder aïllar 1 pèptid amb una activitat semblant a la PTTH, tot i que no presentava una alta similitud amb la seqüència de la PTTH de lepidòpters (Kim et al., 1997). Malgrat això, el pèptid obtingut té una mida similar a la PTTH de lepidòpters i manté una alta conservació en 7 residus de cisteïna necessaris per la seva conformació tridimensional (Noguti et al., 1995). La PTTH de *D. melanogaster* també es produïda per un parell de cèl·lules neurosecretores bilaterals del cervell però, a diferència dels lepidòpters, aquestes neurones innerven directament la GP. És sorprenent veure que en eliminar les neurones que secreten la PTTH a *D. melanogaster* es constata que aquest pèptid no és essencial per la metamorfosi ni per la muda. L'absència de PTTH només provoca un retard en el desenvolupament de la larva i l'aparició, com a conseqüència, de mosques més grans (McBrayer et al., 2007). Recentment, es va descobrir a *D. melanogaster* que el receptor de la PTTH és Torso, un receptor quinasa de tirosina que s'expressa a la GP durant les fases larvals de *D. melanogaster*. Confirmant la seva funció, la pèrdua de Torso per RNA d'interferència produeix el mateix fenotip de retard en el desenvolupament que la absència del seu lligand (Rewitz et al., 2009).

1.2.3. Mecanisme d'acció de la 20E. El model d'Ashburner

Un cop identificada la 20E com l'hormona de la muda es va dedicar molt esforç en caracteritzar el seu mecanisme d'acció. Una de les primeres aproximacions va ser per part del Prof. Ulrich Clever, que va demostrar que els ecdisteroides podien iniciar una cascada d'activació

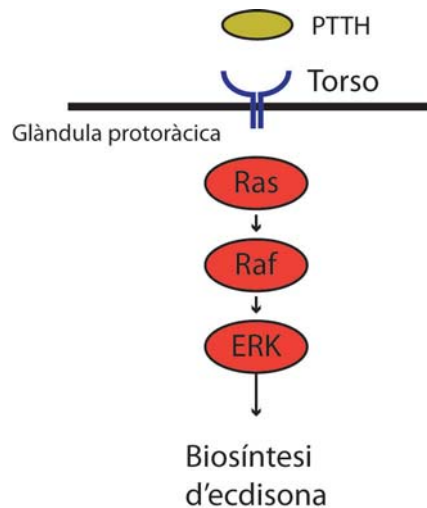


Figura 1.4. Model de senyalització de la PTHH. Model proposat a partir dels components de la via de TORSO en l'embrió de *D. melanogaster* (Rewitz et al., 2009).

de gens, tal com va observar en els cromosomes politènics del dípter *Chironomus tentans* (Thummel, 2002). Els cromosomes de les glàndules salivals de *D. melanogaster* i de *C. tentans* són politènics, ja que han tingut varies fases de replicació de DNA sense divisió cel·lular. D'aquesta manera es poden identificar fàcilment gens de manera individual ja que en la última fase larval poden haver-hi fins a 1000 còpies de cada cromosoma en el nucli de les cèl·lules de les glàndules salivals. És interessant que, els gens que es transcriuen activament en aquests cromosomes politènics es visualitzen sota el microscopi com a bombolles, els anomenats "puffs". Estudis posteriors van confirmar aquesta hipòtesis, incloent els treballs realitzats amb cromosomes politènics de *D. melanogaster* pel Prof. Michel Ashburner. Ell i els seus col·laboradors van elaborar un model de la regulació de l'expressió de gens per la 20E, postulant que l'hormona actuaria directament en el nucli (Ashburner, 1973, 1974). Aquest model, conegut com a model d'Ashburner, proposava que la 20E unida al seu receptor, induiria de manera ràpida i directa l'expressió d'una sèrie de gens que es van anomenar "primerencs". Les proteïnes resultants d'aquest gens reprimarien la seva pròpia expressió i activarien un seguit de gens anomenats "tardans". Aquests gens tardans serien els efectors que de manera directa o indirecta donarien lloc a la resposta biològica produïda per la 20E (Fig. 1.5.). Durant els següents anys, diferents investigadors han confirmat el model d'Ashburner en aïllar i caracteritzar tant el receptor de la 20E com pràcticament la totalitat dels gens primerencs. Així, el receptor de a 20E és un heterodímer format pel receptor d'ecdisona (EcR), homòleg del receptor de farnesoic de vertebrats (FXR), i Ultraespiracle (USP), l'homòleg del receptor X de retinoides en vertebrats (RXR) (Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992; Yao et al., 1993). És important ressenyar que tant EcR

i USP pertanyen a la superfamília dels receptors nuclears, factors de transcripció dependents de lligand. Curiosament, la majoria de gens primerencs també són receptors nuclears, com ara HR3, HR4, HR39, E75, E78 i Fushi Tarazu Transcription Factor 1 (Ftz-F1) encara que també hi ha factors de transcripció d'altres famílies com Broad-Complex (BR-C) i E74.

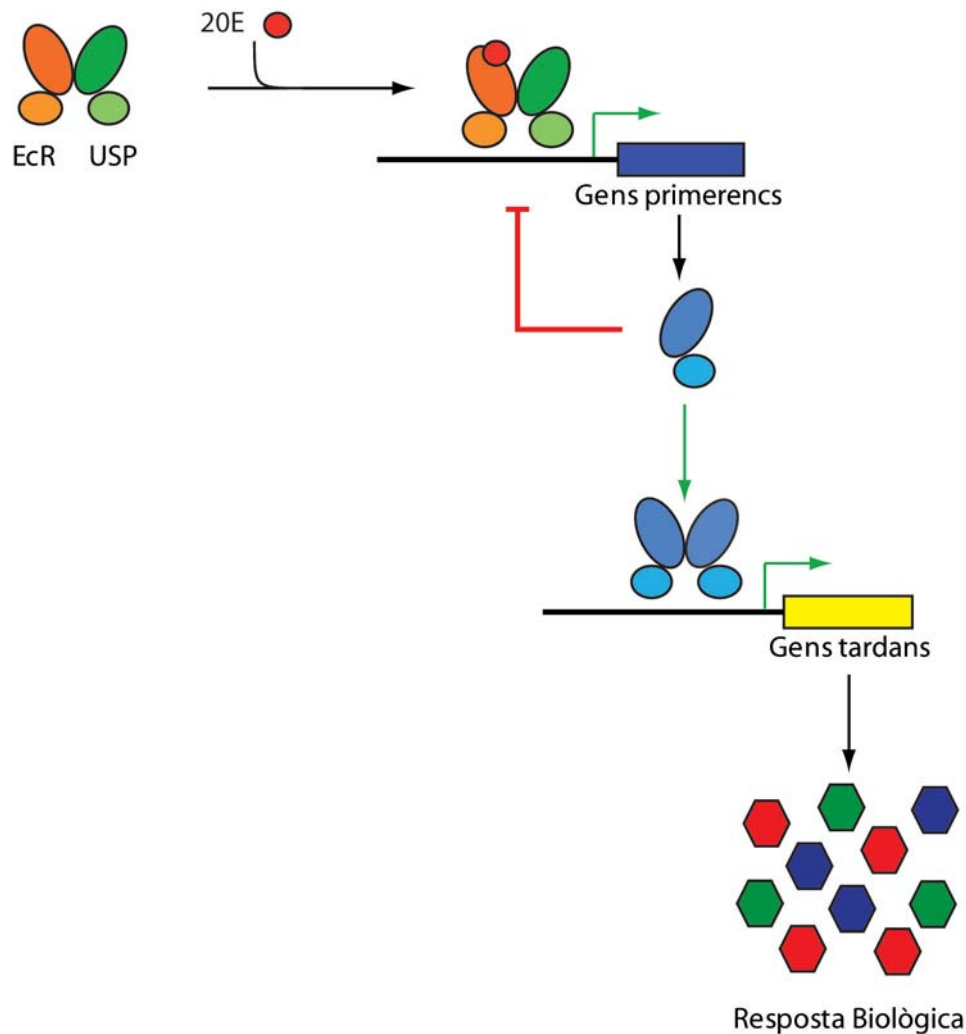


Figura 1.5. Model d'Ashburner. Esquema de la cascada de factors reguladors induïts per la 20-hidroxiciclidona (20E). La unió de la 20E al seu receptor indueix de forma directa l'expressió d'una sèrie de gens primerencs. El producte d'aquests gens indueix l'expressió dels gens tardans, els quals induiran la resposta biològica. A més, les proteïnes generades a partir dels gens primerencs reprimeixen la seva pròpia expressió.

1.3. ELS RECEPTORS NUCLEARS D'INSECTES

Tal i com s'ha descrit, tant el receptor heterodimeric de la 20E com la majoria dels gens primerencs formen part de la superfamília dels receptors nuclears, factors de transcripció activats per lligand que regulen diferents processos del desenvolupament, la reproducció, la

homeòstasis i el metabolisme. Els receptors nuclears són proteïnes amb la capacitat d'unir un lligand i d'aquesta manera unir-se a DNA activant o reprimint la transcripció dels seus gens diana. En aquesta superfamília, però, no hi ha només receptors amb lligand conegut sinó que també hi ha un gran nombre de receptors sense lligand conegut, anomenats per això orfes. Els receptors nuclears s'han trobat en tots els metazous, des de platihelminths i cnidaris fins a artròpodes i vertebrats. No obstant això, no s'han trobat receptors nuclears ni en plantes, ni en fongs, ni en eucariotes unicel·lulars (Laudet i Bonneton, 2005). En els insectes, els receptors nuclears estan implicats en una gran varietat de processos, des de l'embriogènesi fins al control del desenvolupament post-embriònic, com les mudes, la metamorfosi i la reproducció (Kozlova i Thummel, 2000).

Els receptors nuclears tenen una organització modular, amb tres dominis principals (Fig. 1.6A). L'extrem N-terminal és el més variable i és on trobem el domini de transactivació independent de lligand (AF-1), que té una llargada variable i una seqüència diferent entre els membres de la família. A continuació trobem el domini d'unió a DNA (DBD), que és el lloc on es dona la interacció específica amb el DNA. El DBD conté una estructura de dos dits de zinc comú en tots els membres de la família. El primer dit de zinc dona especificitat a la unió a DNA a través de 5 aminoàcids coneguts com la caixa proximal (caixa-P). D'altra banda, el segon dit de zinc facilita al receptor una dimerització dèbil, però només en el cas que el receptor estigui unit a DNA. Aquesta dimerització es dona a través dels aminoàcids que conformen la caixa distal (caixa-D) (Figura 1.6B). A la regió C-terminal trobem el domini d'unió al lligand (LBD), separat del DBD per una regió frontissa molt variable. L'LBD s'organitza en 12 o 13 hèlixs- α que conformen una caixa hidrofòbica on s'uneixen els diferents lligands de naturalesa lipofílica (Figura 1.6C). A l'extrem C-terminal de l'LBD trobem el segon domini d'activació, aquest dependent de lligand (AF-2), que és el responsable del reclutament de coactivadors de la transcripció.

Les anàlisis filogenètiques permeten classificar els receptors nuclears en set subfamílies que comparteixen una alta conservació de les seqüències del DBD i l'LBD (Laudet, 1997; Ruau et al., 2004). Analitzant el repertori complet de receptors nuclears de *D. melanogaster* es pot comprovar que conté 21 receptors nuclears, 18 dels quals es poden classificar dins de les sis subfamílies. Hi ha un grup atípic de 3 receptors nuclears, el grup NO, format per knirps (KN1), knirps-related (KNRL) i eagle (EG), als quals els manca l'LBD i que juguen un paper important durant l'embriogènesi i la neurogènesi de la mosca (Nauber et al., 1988; Oro et al., 1988). Per altra part, quatre receptors nuclears s'han originat per una duplicació gènica que no s'ha donat en vertebrats. Aquestes parelles són E75-E78, HR51-HR83, HR39-FTZ-F1 i dissatisfaction (dsf) –

tailless (tll). Finalment, és interessant remarcar que dos tercers parts dels receptors nuclears de vertebrats no tenen ortòleg a *D. melanogaster* (Taula 1.1.) (Laudet i Bonneton, 2005).

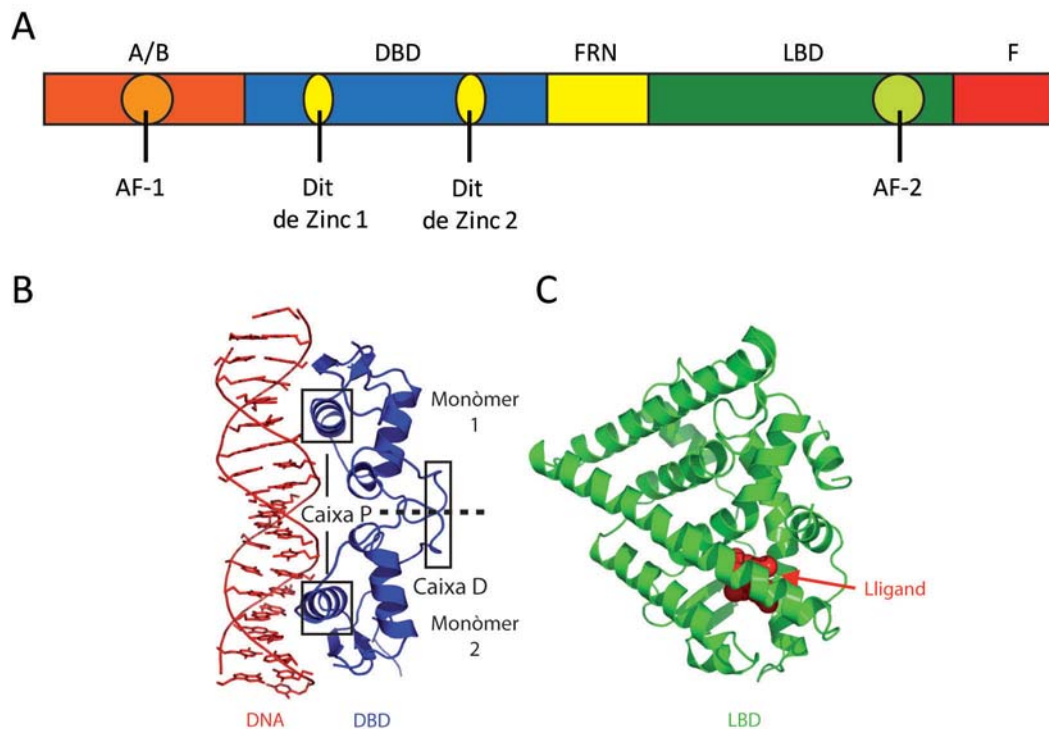


Figura 1.6. Organització dels receptors nuclears. (A) Representació esquemàtica de l'organització d'un receptor nuclear. La regió A/B confereix la capacitat d'activar la transcripció de manera independent de lligand a través del domini AF-1. El següent domini és el d'unió a DNA (DBD), que inclou dos dits de zinc necessaris per la unió a seqüències específiques de DNA. A continuació, trobem la regió frontissa (FRN) i el domini d'unió a lligand (LBD). L'LBD és responsable de la unió a lligand i presenta la regió activadora dependent de lligand AF-2. Finalment, els receptors nuclears presenten la regió F. (B) Esquema tridimensional de la interacció entre els DBDs d'un dímer de receptors nuclears i el DNA. Les caixes P del receptor interaccionen amb seqüències específiques del DNA, mentre que les caixes D faciliten la dimerització dels receptors nuclears mantenint l'estructura del complex (C) Esquema tridimensional de l'LBD d'un receptor unit al lligand.

A més, del genoma complet de *D. Melanogaster*, també s'ha seqüenciat el genoma d'altres espècies com els dípters *Anopheles gambiae* i *Aedes aegypti*, el lepidòpter *B. mori*, el coleòpter *Tribolium castaneum* i l'himenòpter *Apis mellifera*. L'anàlisi d'aquests genomes ha demostrat que tots ells presenten tots els membres de la família de receptors nuclears amb l'excepció d'algun membre de la subfamília N0 (Bonneton et al., 2008; Cheng et al., 2008; Cruz et al., 2009; King-Jones i Thummel, 2005; Velarde et al., 2006).

Taula 1.1. La família de receptors nuclears. En aquesta taula es mostren els 21 receptors nuclears descrits a *D. melanogaster*, així com els seus homòlegs a humans. La nomenclatura utilitzada en la primera columna és la de NURABASE, que els divideix en 7 subfamílies (Ruau et al., 2004). La subfamília O només s'ha trobat a *D. melanogaster* i esta formada per receptors nuclears sense LBD. A la última columna es mostra el número d'accés a NCBI de les seqüències de *D. melanogaster*.

Nomenclatura	Nom General	Ortòleg Humà	D.melanogaster
NR1D3	E75	REV-ERBA	CG8127
NR1E1	E78	REV-ERVBA	CG18023
NR1F4	HR3	RORB	CG33183
NR1H1	ECR	FXR/LXR	CG1765-PA CG1765-PB
NR1J1	HR96	VDR	CG11783
NR2A4	HNF4	HNF4A	CG9310
NR2B4	USP	RXR	CG4380
NR2D1	HR78	TR2	CG7199
NR2E2	TLL	TLX	CG1378
NR2E3	HR51	PNR	CG16801
NR2E4	DSF	TLX	CG9019
NR2E5	HR83	-	CG10296
NR2F3	SVP	COUP-TF	CG11502
NR3B4	ERR	ERRb	CG7404
NR4A4	HR38	NURR1	CG1864
NR5A3	FTZ-F1	LRH-1 / SF-1	CG4059
NR5B1	HR39	LRH-1 / SF-1	CG8676
NR6A1	HR4	GCMF	CG16902
NR0A1	KN1	-	CG4717
NR0A2	KNRL	-	CG4761
NR0A3	EG	-	CG7383

1.3.1. Mecanisme d'acció dels receptors nuclears

El mecanisme molecular a través del qual els receptors nuclears converteixen un senyal hormonal en una resposta transcripcional difereix de la via clàssica de transducció de senyals a través de receptors de membrana. Així, quan els receptors nuclears s'uneixen al lligand, entren al nucli on reconeixen seqüències específiques de DNA, anomenats elements de resposta, que contenen la seqüència consens 5'-AGGTCA-3' o derivada en funció dels aminoàcids que componguin la caixa-P del DBD. Alguns receptors nuclears s'uneixen a DNA com a monòmers (Figura 1.7A), unint-se a elements de resposta senzills, mentre que d'altres ho fan com a homo o heterodímers, unint-se a dos elements de resposta situats un al costat de l'altra (Figura 1.7B i C). En aquest cas, els dos elements de resposta poden ser repeticions directes, invertides o evertides, i poden estar contigües o separades per un nombre variable de nucleòtids. Així, tant la seqüència i la orientació com la separació entre els elements de resposta determina l'especificitat de l'acció hormonal (Mangelsdorf i Evans, 1995).

En les últimes dues dècades s'ha establert el mecanisme d'acció dels receptors nuclears a nivell molecular, podent-se dividir en tres grans grups (Figura 1.8). En el primer grup, representat pel receptor de glucocorticoides (GR), el receptor nuclear es troba inactiu en el citoplasma unit a xaperones. Quan el receptor uneix el seu lligand es transloca al nucli on dimeritza formant un homo o heterodímer, s'uneix al seu element de resposta i activa la transcripció del gen diana (Figura 1.8A). Un segon grup comprendria homo o heterodímers que en absència de lligand actuen com a repressors reclutant corepressors. Una vegada el dímer interacciona amb el seu lligand, s'allibera dels corepressors i s'uneix a coactivadors, activant la transcripció del gen diana (Figura 1.8B). Exemples d'aquest grup són el receptor de l'hormona tiroïdal (TR) i el receptor d'àcid retinoïc (RAR) que formen heterodímers amb el receptor x de retinoids (RXR). En l'últim grup, representat pel receptor esteroïdogènic 1 (SF-1), la regulació de l'activitat transcripcional està basada en la capacitat del receptor nuclear de fosforil·lar-se. Així, el receptor actuant com a monòmer unit a l'element de resposta, és un activador constitutiu que és capaç d'augmentar la seva capacitat transactivadora quan es fosforil·la (Figura 1.8C).

A més, existeixen altres casos en els que els receptors nuclears poden regular negativament la transcripció. Així, per exemple, un receptor que no té activitat transactivadora, degut a la manca del domini AF-2, és capaç d'unir-se a un dels dos components de l'heterodímer activador, evitant que s'activi el gen diana. En un altra cas, un receptor nuclear repressor competeix amb un homodímer activador per la unió a un element de resposta situat al promotor del gen diana.

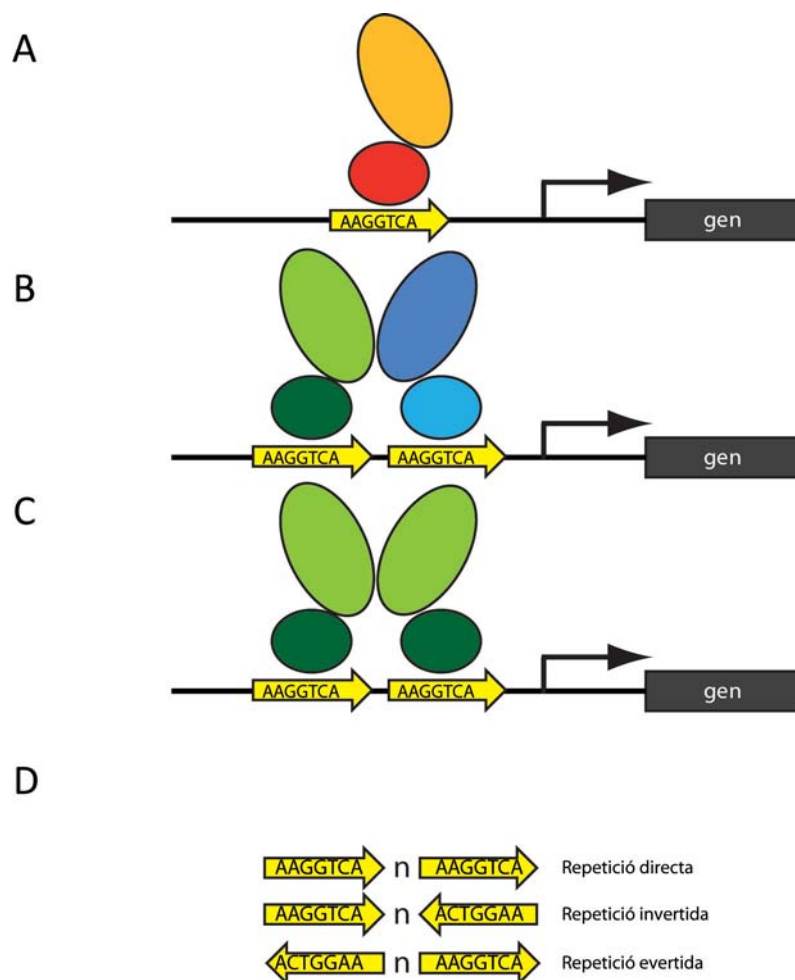


Figura 1.7. Característiques funcionals dels receptors nuclears. Els receptors nuclears poden actuar com a (A) monòmers o com a (B) heterodímers o (C) homodímers, unint-se a seqüències consens en el DNA. (D) Els elements de resposta dels receptors nuclears són elements simples o repeticions directes, invertides o evertides de la seqüència consens AGGTCA separades per 0-6 nucleòtids.

1.4. L'HORMONA JUVENIL

Juntament amb la 20E, l'hormona clau per regular el desenvolupament dels insectes és l'HJ. En presència de l'HJ, la 20E induïx mudes entre fases juvenils, mentre que durant l'últim estadi juvenil l'absència de l'HJ produeix la muda a l'estadi adult. Aquest efecte ha estat comprovat en diferents ordres d'insectes, com ara Coleoptera, Orthoptera i Lepidoptera. En aquests ordres l'aplicació d'HJ o d'un anàleg d'aquesta durant la darrera fase juvenil, produeix una larva supernumerària (Riddiford et al., 2003). Curiosament, *D. melanogaster* és una excepció a aquesta norma, ja que si s'aplica HJ en la última fase larvària les larves poden pupar sense problemes i no s'obté una larva supernumerària. Per contra, si s'aplica l'HJ a la pupa no s'observa cap efecte en la diferenciació del cap i tòrax però sí que es veu efecte en l'epidermis abdominal (Zhou i Riddiford, 2002). Fins fa poc, a *D. melanogaster* només s'havia estudiat la

activitat biològica de l'HJIII, però en estudis recents s'ha vist que a l'hemolimfa de les larves també hi ha metil farnesoat (MF) i biseptoxi HJIII (HJB3) (Richard et al., 1989). Aquests descobriments plantegen noves incògnites sobre quin és el paper en el desenvolupament dels insectes de cada un dels productes alliberats per la glàndula anular. Aquests fets van portar a realitzar un sèrie d'assaigs per comprovar quin és l'efecte de cada una de les hormones juvenils, l'HJIII, el MF i l'HJB3. Així, el MF té activitat d'hormona juvenil en larves però no en pupa, on en canvi, si que en té l'HJIII i l'HJB3 (Harshman et al., 2010).

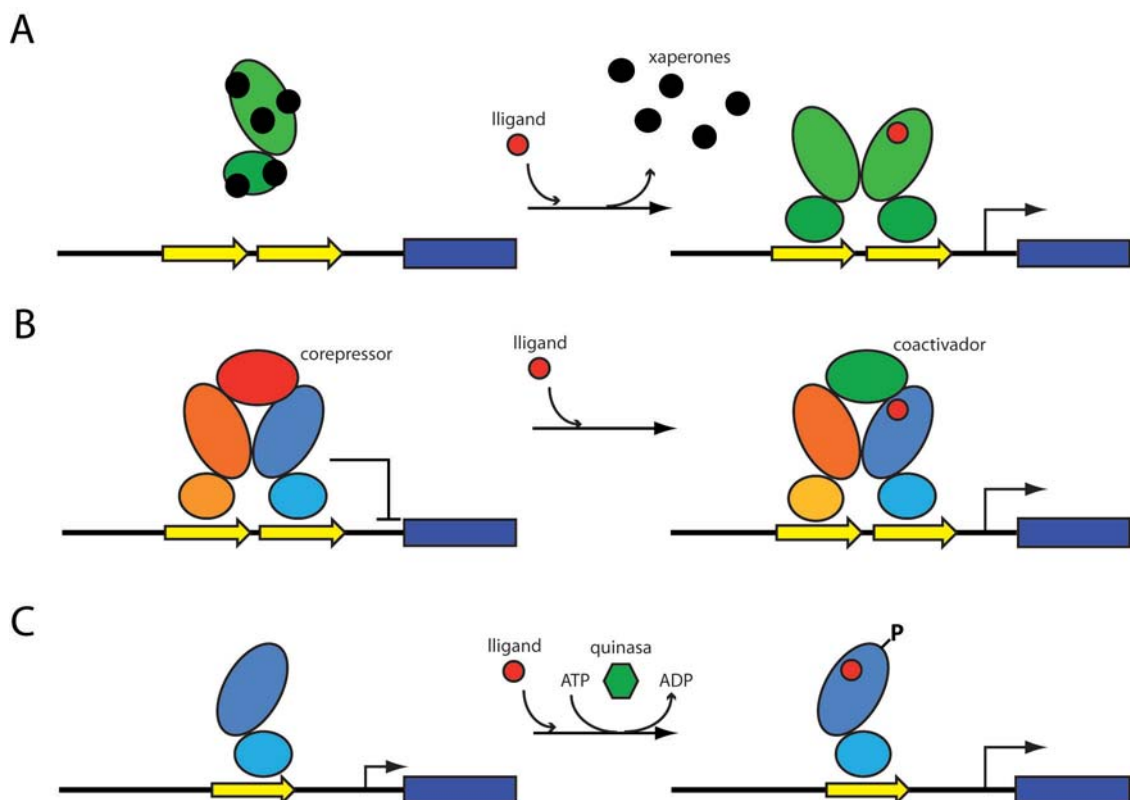


Figura 1.8. Mecanismes d'acció dels receptors nuclears. (A) El receptor es troba al citoplasma unit a xaperones, quan el lligand s'uneix al receptor les xaperones es separen i es desplaça al nucli on activa la transcripció com a homodímer. (B) El receptor actua com a heterodímer amb RXR i en absència de lligand es troba unit a un corepressor que inhibeix l'expressió del gen diana. En el moment que s'uneix al lligand, el receptor passa a unir-se a un coactivador, fent que s'expressi el gen diana. (C) En aquest cas el receptor és un monòmer, que té poca capacitat transactivadora, però en el moment que es fosforil·la la seva capacitat transactivadora augmenta.

A més del seu paper en les mudes dels insectes, l'HJ controla altres processos entre els que s'inclouen el polifenisme, la diferenciació de castes, el comportament sexual i en la majoria d'insectes regula els principals processos associats a la reproducció, com ara la vitel·logènesi i el desenvolupament dels ovaris. La principal funció de l'HJ en la reproducció és regular l'expressió del gen de la vitel·logenina (Vg) en el cos gras, que un cop sintetitzada s'allibera a l'hemolimfa i posteriorment s'incorpora a l'oòcit basal (Raikhel et al., 2005).

1.4.1. La síntesi de l'hormona juvenil als insectes

L'HJ es produeix a les cèl·lules dels CA, unes glàndules neuroendocrines situades en una posició retrocerebral. La via de síntesi de l'HJ (Figura 1.9) es pot dividir en dues parts, la primera part és des de l'acetil-CoA fins al farnesil difosfat, i es coneguda com la via del mevalonat. Aquesta part es dona en tots els teixits, ja que es sintetitzen diferents productes intermedis necessaris pel metabolisme, com ara l'adenina isopentenil o la ubiquinona. La segona part de la via es dona només en els CA i és la branca en que es sintetitza l'HJ a partir del farnesil difosfat. Aquesta part de la via és exclusiva dels insectes, ja que en vertebrats el producte final de la via del mevalonat és el colesterol. Els insectes però, com ja hem dit anteriorment, han perdut la capacitat de sintetitzar colesterol *de novo* (Bellés et al., 2005).

Durant el desenvolupament dels insectes, els nivells d'HJ a l'hemolimfa estan regulats a diferents nivells. En primer lloc, la biosíntesi està regulada per neuropèptids com les al·latotropines i les al·latostatines, alliberades des del cervell als CA a través de connexions neuronals. En segon lloc també depèn de l'activitat dels enzims de la via de biosíntesi i dels encarregats del catabolisme de l'hormona (Gilbert et al., 2000). En aquest sentit, durant els darrers anys s'han clonat i caracteritzat diferents enzims de la via. Concretament, de la part corresponent a la via del mevalonat hi ha tres enzims que han estat especialment estudiats: la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMG-S), la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-R) i la farnesil difosfat sintasa (FPPS).

L'HMG-S és el segon enzim de la via i produeix hidroximetilglutaril-CoA a partir d'acetoacetil-CoA. Ha estat clonat en els coleòpters *Dendroctonus jeffreyi* (Tittiger et al., 2000) i *Ips pini* (Bearfield et al., 2006) i en el lepidòpter *B. mori*, on s'expressa especialment en els CA (Kinjoh et al., 2007). Aquest enzim també ha estat clonat en el dictiòpter *Blattella germanica*, on s'ha vist que hi ha dues isoformes, BgHMG-S1 i BgHMG-S2, que tenen un 78% de identitat. BgHMG-S2 és la isoforma que s'expressa principalment en els CA de l'adult (Buesa et al., 1994; Martinez-Gonzalez et al., 1993a).

El següent enzim, responsable de la tercera reacció de la via és l'HMG-R. Aquest enzim catalitza la formació de mevalonat a partir d'hidroximetilglutaril-CoA. Aquest enzim ha estat clonat a *D. melanogaster* (Gertler et al., 1988), en els coleòpters *D. jeffreyi* (Tittiger et al., 2003) i *Ips paraconfusus* (Tittiger et al., 1999), en el lepidòpter *B. mori* (Kinjoh et al., 2007) i per últim, a *B. germanica* (Martinez-Gonzalez et al., 1993b). A *D. melanogaster*, l'HMG-R és necessària per a la producció de MF en larva, i la seva interferència impedeix la formació de la pupa (Jones et al., 2010).

La última reacció de la via del mevalonat és la formació de farnesil difosfat a partir de geranil difosfat, sent l'enzim responsable la FPPS. Aquest enzim ha estat clonat en varis lepidòpters, com ara *Agrotis ipsilon* (Castillo-Gracia i Couillaud, 1999), *Choristoneura fumiferana* i *Pseudaletia unipuncta* (Cusson et al., 2006). També s'ha clonat a *B. mori*, on s'han descrit tres isoformes tot i que la FPPS2 és la que s'expressa principalment en els CA i es creu que és la que actua en la via de producció de l'HJ (Kinjoh et al., 2007). Per últim, la FPPS també s'ha clonat a *B. germanica* (Martín et al., 2007).

Les reaccions posteriors a la formació del farnesil difosfat pertanyen a la part de la via de formació de l'HJ, exclusiva d'insectes. Entre els enzims d'aquesta part de la via els més estudiats són els dos últims, l'àcid-O-metiltransferasa de l'HJ (JHAMT) i l'epoxidasa de l'HJ. En el cas dels lepidòpters, on el últim enzim de la via és la JHAMT, mentre que a ortòpters i dictiòpters primer és la JHAMT i després l'HJ epoxidasa. La JHAMT ha estat clonada a *B. mori* (Shinoda i Itoyama, 2003), *D. melanogaster* (Niwa et al., 2008) i *T. castaneum*, on s'han clonat tres isoformes diferents tot i que la TcJHAMT3 sembla ser la única responsable de la producció d'HJ (Minakuchi et al., 2008a). Finalment, s'ha clonat una JHAMT a *A. aegypti*, on també és el penúltim enzim de la via (Mayoral et al., 2009). Per últim, la epoxidasa de l'HJ és un citocrom P450, que ha estat clonat al dípter *D. melanogaster* (Chung et al., 2009), l'ortòpter *Schistocerca gregaria* (Marchal et al., 2010b) i als dictiòpters *Diploptera punctata* (Helvig et al., 2004) i *B. germanica* (Maestro et al., 2010).

1.5.2. Mecanisme d'acció de l'HJ

Tot i que ja han passat 70 anys des de que l'acció anti-metamòrfica de l'HJ va ser descoberta, a nivell molecular encara es coneix molt poc del seu mecanisme d'acció. El principal repte en aquest camp, però, és la identificació del receptor de l'HJ. El primer candidat va ser USP, el receptor nuclear que dimeritza amb EcR per formar el receptor d'ecdisona, tal i com s'ha descrit anteriorment. Així, degut a que USP podia unir a l'HJ formant homodímers, es va

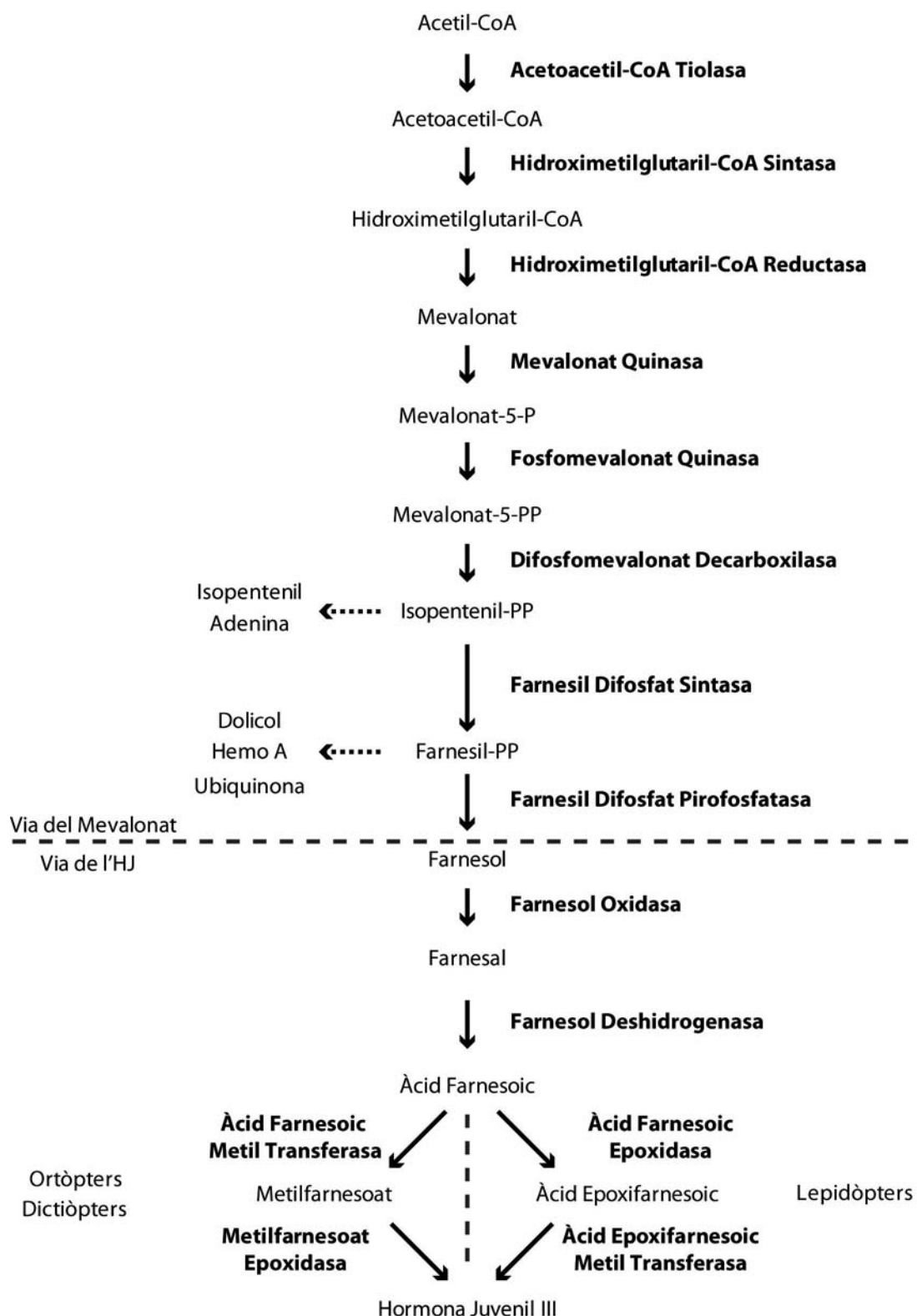


Figura 1.9.- Via de biosíntesi de l'hormona Juvenil. La conversió d'Acetil-CoA fins a Farnesil-PP forma part de la via del mevalonat, comú en diferents organismes, incloent els vertebrats. En els CA dels insectes és on té lloc la segona part de la via, el producte final de la qual és l'HJ. Les dues últimes reaccions, que converteixen l'àcid farnesoic en HJ, varien segons l'ordre d'insectes. Així, a ortòpters i dictiòpters primer hi ha la metilació i després la epoxidació i a lepidòpters a l'inrevés. Figura adaptada de Bellés et al. (2005).

proposar que USP podria ser el receptor de l'HJ (Jones i Sharp, 1997). No obstant, més tard es comprovà que USP unia HJIII amb una afinitat 100 vegades menor del que s'esperaria per un lligand específic d'un receptor nuclear (Jones et al., 2001), descartant d'aquesta manera que fos el receptor funcional de l'HJ. Posteriorment, es va comprovar que USP unia metil farnesoat (MF), l'immediat precursor de l'HJ, i que, en aquest cas, tenia una afinitat de unió 100 vegades més gran que la que tenia per l'HJIII (Jones et al., 2006).

1.5.2.1. Met com a receptor de l'HJ

Un segon candidat a receptor de l'HJ és el gen *methoprene-tolerant (met)*, que es va descobrir a *D. melanogaster* en un estudi per buscar mutants resistents a la acció de l'HJ o als seus anàlegs durant la formació de la pupa (Wilson i Fabian, 1986). *Met* codifica per una proteïna pertanyent a la família basic helix-loop-helix (bHLH) amb un domini PAS. Així, els mutants de *met* de *D. melanogaster* presenten resistència a la acció tòxica de l'HJ durant el període de prepupa. Sorprenentment, els mutants són viables, fet que resta pes a la possibilitat de que sigui el receptor de l'HJ (Ashok et al., 1998). Malgrat això, els mutants adults presenten retard en la producció d'ous i una fertilitat reduïda (Wilson i Ashok, 1998). A *D. melanogaster*, s'ha trobat un paràleg de *met* anomenat *germ cell expressed (gce)*, que presenta entre un 70 i un 86% d'identitat de seqüència en regions conservades. La presència d'aquest gen podria explicar la supervivència dels mutants de *met* (Moore et al., 2000). Estudis posteriors han demostrat que *met* pot formar homodímers i heterodímers amb *gce* (Godlewski et al., 2006). En la resta d'insectes només s'ha trobat un paràleg de *met/gce* i en tots els casos presenta una identitat més gran amb *gce* de *D. melanogaster* (Wang et al., 2007). A *T. castaneum*, on només s'ha trobat un gen *met/gce*, la interferència del mateix mitjançant RNAi a larves produeix una metamorfosi prematura, indicant el seu paper en la transducció de el senyal antimetamòrfica de l'HJ (Konopova i Jindra, 2007).

1.5.2.2. Via de senyalització de Met

A més dels dos possibles receptors de l'HJ, han estat identificats dos gens responsables de la transducció de el senyal hormonal, *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)* i *Broad complex (BR-C)*. *Kr-h1* és un factor de transcripció descobert com un dels gens homòlegs al gen de segmentació *Krüppel*, amb un grau alt de semblança en els motius de dits de zinc i en els aminoàcids que separen aquests dits (Schuh et al., 1986). A *D. melanogaster*, *Kr-h1* juga un paper important en la

metamorfosi ja que la majoria de mutants moren en el moment de la eversió del cap, procés que marca l' inici del desenvolupament pupal (Pecasse et al., 2000). Tant a *D. melanogaster* com a *T. castaneum*, Kr-h1 és un mediador de l'efecte de l'HJ (Minakuchi et al., 2009; Minakuchi et al., 2008b).

Un segon gen de la cascada de l'HJ és *Br-C*, un factor de transcripció que pertany a la família Broad-Tramtrack-Bric-a-brac (BTB) i que es caracteritza per tenir un domini N terminal del tipus BTB i un domini C terminal format per dits de zinc. A *D. melanogaster*, hi ha 4 isoformes que varien en el domini dels dits de zinc (Z1 – Z4). *Br-C* és un dels gens primerencs de la cascada de la 20E i la seva expressió s'activa per aquesta hormona (Bayer et al., 1996; DiBello et al., 1991). *Br-C* és clau en el procés de la metamorfosi i els seus mutants no superen l'estadi de pupa (Karim et al., 1993). Aquest factor, participa en la via de senyalització de l'HJ a *D. melanogaster*, *Manduca sexta* (Zhou i Riddiford, 2002) i *T. castaneum* (Suzuki et al., 2008). En aquest últim insecte, l'HJ activa l'expressió de *Br-C* a través de Met (Konopova i Jindra, 2008). A *Oncopeltus fasciatus*, insecte hemimetàbol, *Br-C* s'expressa durant les fases nimfals i desapareix a l'adult (Erezyilmaz et al., 2006).

1.5. BLATTELLA GERMANICA COM A MODEL PER L'ANÀLISI DEL CONTROL HORMONAL DEL DESENVOLUPAMENT HEMIMETÀBOL

La caracterització dels mecanismes moleculars d'acció de la 20E i l'HJ s'ha dut a terme en insectes holometàbols, principalment a *D. melanogaster*, *A. aegypti*, *M. sexta* i *T. castaneum*. Pel contrari, fins fa poc no es coneixia pràcticament res de com actuen la 20E i l'HJ en insectes filogenèticament més basals, de desenvolupament hemimetàbol. Per tal d'aprofundir en el coneixement del mecanisme d'acció, a nivell molecular, de les hormones que controlen el desenvolupament en insectes hemimetàbols, als laboratoris del Dr. David Martín i del Dr. Xavier Bellés s'han clonat i caracteritzat els diferents gens implicats en el mecanisme d'acció de la 20E a l'insecte hemimetàbol *B. germanica*. En últim terme, el coneixement dels mecanismes implicats en la metamorfosi d'insectes amb un desenvolupament hemimetàbol, pot ajudar a esbrinar quins han estat els canvis evolutius que han donat lloc a formes amb desenvolupament holometàbol.

1.5.1. Fisiologia de *Blattella germanica*

La panerola *Blattella germanica* és un insecte hemimetàbol que pertany al subordre *Blattodea*, que juntament amb *Isoptera* (tèrmits) i *Mantodea* (mantis), formen l'ordre dels dictiòpters, format per unes 6000 espècies.

L'embriogènesi de *B. germanica* dura 17 dies i acaba amb l'eclosió d'una nimfa, el creixement de la qual es produeix a través de sis estadis ninfals separats per les mudes. Els primers estadis ninfals duren 3-4 dies, la 5^a fase ninfal dura 6 dies i la 6^a, i última, fase ninfal dura 8 dies. Durant la última fase ninfal es produeix la maduració de les ales i la capacitat dels òrgans sexuals, i la fase finalitza amb la muda imaginal, que donarà lloc a l'estadi adult. Durant aquesta fase adulta té lloc la maduració dels òrgans necessaris per la reproducció. En les mascles, aquesta maduració dura uns 10 dies durant els quals es produeix el desenvolupament de les glàndules conglobades, les glàndules accessòries i els testicles. En les femelles s'inicia el primer cicle gonadotròfic, que dura entre 7 i 8 dies, durant el qual té lloc la vitel·logènesi, la maduració dels oòcits basals i les glàndules col·laterals i finalment l'ovulació i la formació de l'ooteca. Si la femella ha estat fertilitzada es desenvolupen entre 40 i 50 embrions a l'interior de l'ooteca, que es transportada per la femella durant els 17 dies que dura l'embriogènesi. Un cop la femella ha deixat l'ooteca comença un nou cicle gonadotròfic.

Tots els processos que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari i el post-embrionari de *B. germanica* estan regulats per fluctuacions en els nivells de la 20E i l'HJ, que han estat caracteritzades prèviament a la panerola (Cruz et al., 2003; Treiblmayr et al., 2006). Així, durant els dos últims estadis ninfals es produeix un pic de 20E, durant la 5^a fase aquest pic és en presència d'HJ i durant la 6^a fase en absència d'HJ. Finalment, després de la muda imaginal, la 20E presenta nivells molt baixos que augmenten lleugerament durant el cicle gonadotròfic. En canvi, els nivells d'HJ augmenten durant l'estadi adult, arribant al màxim cinc dies després de mudar; durant aquest pic els nivells d'HJ són 5 vegades superiors als detectats durant la 5^a fase ninfal. Durant la fase adulta és l'HJ la que controla els processos associats a la reproducció, com ara la vitel·logènesi (Comas et al., 2001) (Figura 1.10).

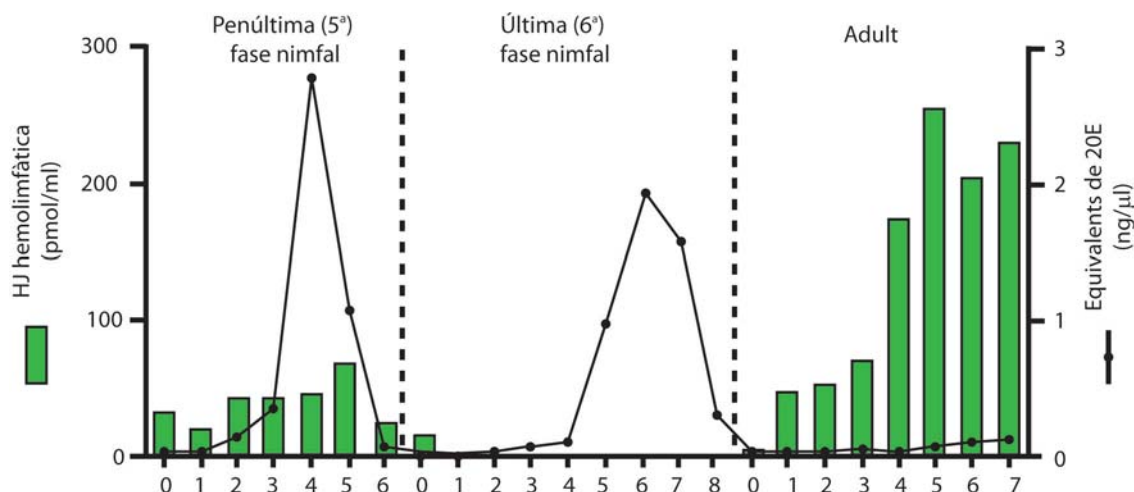


Figura 1.10. Marc endocrí durant les últimes fases del desenvolupament postembronari de *Blattella germanica*. Nivells de 20E i HJ durant els dos últims estadis nimfals i el primer cicle gonadotròfic de femelles. Dades obtingudes de Cruz *et al.* (2003; 2005) i Treiblmayr *et al.* (2006).

1.6.2. Anatomia de *Blattella germanica*

- El cos de *B. germanica* està cobert d'un exosquelet de quitina amb peces dures o esclerites, unides entre sí per membranes. Pot dividir-se en tres regions principals: cap, tòrax i abdomen. El cap conté els òrgans sensorials, dues antenes llargues filiformes, dos ocells, dos ulls compostos i quatre palps (2 maxil·lars i 2 labials), així com un complex aparell bucal mastegador. El tòrax és el centre de la locomoció i consta de 3 segments: el protòrax, el mesotòrax i el metatòrax. Presenta 3 parells de potes, cada parell s'articula en un dels segments i 2 parells d'ales en la zona dorsal de mesotòrax i del metatòrax, respectivament. Les ales mesotoràciques reben el nom de tegmines o elitroides i estan endurides i pigmentades. La seva funció és la de protegir les ales metotoràciques, que són membranoses i amb funció voladora. Per últim, l'abdomen està segmentat i no presenta apèndixs, a excepció de l'últim segment, que té un parell de cercs amb funcions sensorials.
- El sistema nerviós està format per una doble cadena ventral de nervis que connecta una sèrie de ganglis dels quals parteixen nervis secundaris que innerven els òrgans perifèrics. Un complex ganglionar forma el cervell, que està connectat al gangli subesofàgic. Aquest es connecta amb el gangli protoràcic i a continuació hi ha un gangli a cada segment fins l'últim segment abdominal, que innerva els cercs.

- El sistema respiratori és de tipus traqueal. Està format per una xarxa de tràquees i traquèoles d'origen ectodèrmic que connecten directament els teixits amb els espiracles, obertures situades als costats de cada segment.
- El sistema circulatori és obert i presenta un vas dorsal contràctil amb una aorta anterior que serveix per distribuir l'hemolimfa que envolta els òrgans interns. L'hemolimfa de les paneroles és transparent i conté hemòcits de diferents funcions, com ara transport de nutrients, defensa i coagulació entre d'altres. L'hemolimfa no transporta gasos respiratoris.
- El cos gras és el principal teixit metabòlic i és anàleg al fetge i el teixit adipós dels vertebrats. Es troba unit a diferents teixits, epidermis, gònades, tub digestiu, cadenes nervioses, etc. Serveix com a teixit biosintètic i d'emmagatzematge.
- El sistema digestiu consta d'un tub situat entre la cadena nerviosa central i el vas dorsal en el que es poden diferenciar tres regions: estomodeu, mesodeu i proctodeu. A l'estomodeu es tritura l'aliment i es barreja amb saliva. El mesodeu presenta uns cecs gàstrics, on es segreguen enzims digestius, i es on es produeix l'absorció de nutrients, presenta cèl·lules endocrines que alliberen pèptids a l'hemolimfa. Finalment, el proctodeu es la regió que reabsorbeix l'aigua. Estomodeu i proctodeu estan recoberts d'una cutícula que es renova a cada muda.
- L'aparell excretor està format pels tubs de Malpighi, tubs cecs que desemboquen entre el mesodeu i el proctodeu. Les substàncies de rebuig travessen selectivament l'epiteli dels tubs i son dipositades al tub digestiu on se sumen a la composició de les femtes.
- Els principals òrgans endocrins de la panerola són la GP i el complex format pels CA i els CC. El cervell presenta diferents cèl·lules neurosecretores especialitzades que alliberen neuropèptids a l'hemolimfa. La GP consta de dos eixos musculars creuats, units a la part central i recoberts de cèl·lules endocrines especialitzades. Està situada en el protòrax, entre l'estomodeu i el gangli protoràctic. La seva principal funció és la síntesi d'ecdisteroides que s'alliberen a l'hemolimfa (Figura 1.11A). Els CC i els CA estan formats per parelles de glàndules endocrines de tipus ganglionar. Estan associades entre si en un complex retrocerebral situat sobre el tub digestiu. Els CC sintetitzen l'hormona adipocinètica, la qual estimula la mobilització de carbohidrats i lípids. Els CA són les glàndules productores de l'HJ (Figura 1.11B).
- L'aparell reproductor de les femelles consta d'un parell d'ovaris panoístics, només maduren els oòcits basals de cada ovariol durant el cicle gonadotròfic, dels que parteixen oviductes que conflueixen en un de únic. A l'oviducte comú s'obren les

glàndules col·laterals, que sintetitzen substàncies que formen l'ooteca, i les espermateques, que després de la còpula emmagatzemen l'esperma dels mascles per fecundar els ous a mesura que passen per l'oviducte durant l'ovulació (Figura 1.11C).

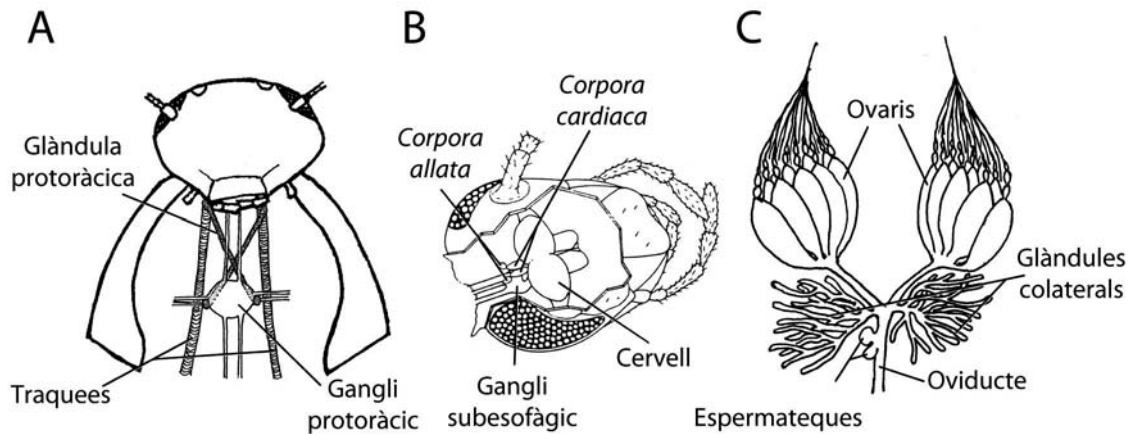


Figura 1.11. Anatomia de *Blattella germanica*. (A) Dissecció ventral del protòrax mostrant la glàndula protoràcica sota el gangli protoràcic i la cadena nerviosa ventral. (B) Complex retrocerebral dels *corpora allata* i els *corpora cardiaca* connectat al cervell. (C) Aparell reproductor femení on es mostren els ovaris, les glàndules col·laterals i les espermateques.

1.5.3. Mecanisme d'acció de la 20E a *Blattella germanica*

A *B. germanica*, el receptor funcional de la 20E està format per l'homòleg del receptor de l'ecdisona (BgEcR) i pel del receptor X dels retinoides (BgRXR). En aquesta espècie s'han clonat dues isoformes d'RXR, BgRXR-L i BgRXR-S, que difereixen en una inserció/deleció de 23 aminoàcids, sent la isoforma BgRXR-S la predominant en tots els teixits durant les fases nimfals (Maestro et al., 2005). Mitjançant experiments d'RNAi *in vivo* durant els diferents estadis nimfals, es demostrà que BgRXR és necessari per que es dugui a terme de manera correcta la muda (Martin et al., 2006). Per altra banda, tot i que s'han descrit tres isoformes d'EcR a *D. melanogaster*, *A. aegypti* i *T. castaneum* (EcR-A, EcR-B1 i EcR-B2), a *B. germanica*, només s'ha clonat una, BgEcR-A. De la mateixa manera que BgUSP, BgEcR-A també és necessari per que es produeixi la muda (Cruz et al., 2006).

Després de la caracterització del receptor heterodimèric de la 20E, es van clonar la majoria de gens primerencs a *B. germanica*: tres isoformes d'*HR3* (*BgHR3-A*, *BgHR3-B1* i *BgHR3-B2*) (Cruz et al., 2007), dos de *Ftz-F1* (*BgFtz-F1A* i *BgFtz-F1B*) (Cruz et al., 2008), cinc d'*E75* (*BgE75A*, *B*, *C*, *D* i *E*) (Mane-Padros et al., 2008) i una d'*HR4* (*BgHR4*). D'aquesta manera s'ha pogut descriure bona part de la cascada gènica de la 20E durant la última fase nimfal de *B.*

germanica. Mentre que BgEcR i BgRXR s'expressen constantment durant tota la sisena fase, la resta de gens implicats tenen un patró d'expressió determinat per la presència/absència de 20E i les interaccions entre ells. Així doncs, l'heterodímer BgEcR/BgUSP activa l'expressió de tots els gens primerencs però el seu patró d'expressió també depèn de les interaccions entre ells. Les primeres en expressar-se són les diferents isoformes de BgE75. La primera d'elles en expressar-se és BgE75D, seguida de BgE75C, BgE75A, BgE75B i finalment BgE75E. Les diferents isoformes de BgE75 inhibeixen l'expressió de BgHR3 i BgHR4. Un cop que els nivells de BgE75 cauen comencen a augmentar els de BgHR3, que activa BgHR4 i aquest a la seva vegada activa a BgFtz-F1 (Figura 1.12).

Mitjançant la tècnica d'RNAi s'ha estudiat la funció de cada un d'aquests receptors nuclears. Així, s'ha demostrat que el receptor de la 20E és necessari pel procés de muda, ja que si s'interfereix BgEcR (Cruz et al., 2006) o BgRXR (Martin et al., 2006) durant la sisena fase nimfal, la majoria de femelles no poden completar l'ècdisi i moren al presentar dobles estructures i no poder desprendre's de l'antiga cutícula. Aquest mateix fenotip també es dona en interferir els gens primerencs BgHR3 (Cruz et al., 2007) o BgFtz-F1 (Cruz et al., 2008), demostrant que participen en el senyalització de la 20E i que són necessaris per la muda. Per últim, si s'interfereix BgE75 durant la sisena fase nimfal es produeix la degeneració prematura de la GP i no té lloc el procés de muda, mantenint-se com a nimfes de sisena fase indefinidament. Aquestes femelles de sisena fase comencen a expressar el programa genètic adult (Mane-Padros et al., 2010; Mane-Padros et al., 2008).

En aquest punt és on est troba actualment la investigació del mecanisme d'acció de la 20E en els insectes hemimetàbols. Continuar amb la caracterització del diferents membres d'aquesta via és l'objectiu d'aquesta tesis. Es per això que l'objectiu principal és clonar i caracteritzar dos gens implicats en el mecanisme d'acció de la 20E. En primer lloc, el factor de transcripció E74, un dels gens primerencs. I en segon lloc el receptor nuclear Seven Up, que es creu que és un modulador del senyal de la 20E interactuant amb el seu receptor. A continuació descriuré de manera resumida les principals característiques d'aquests dos gens.

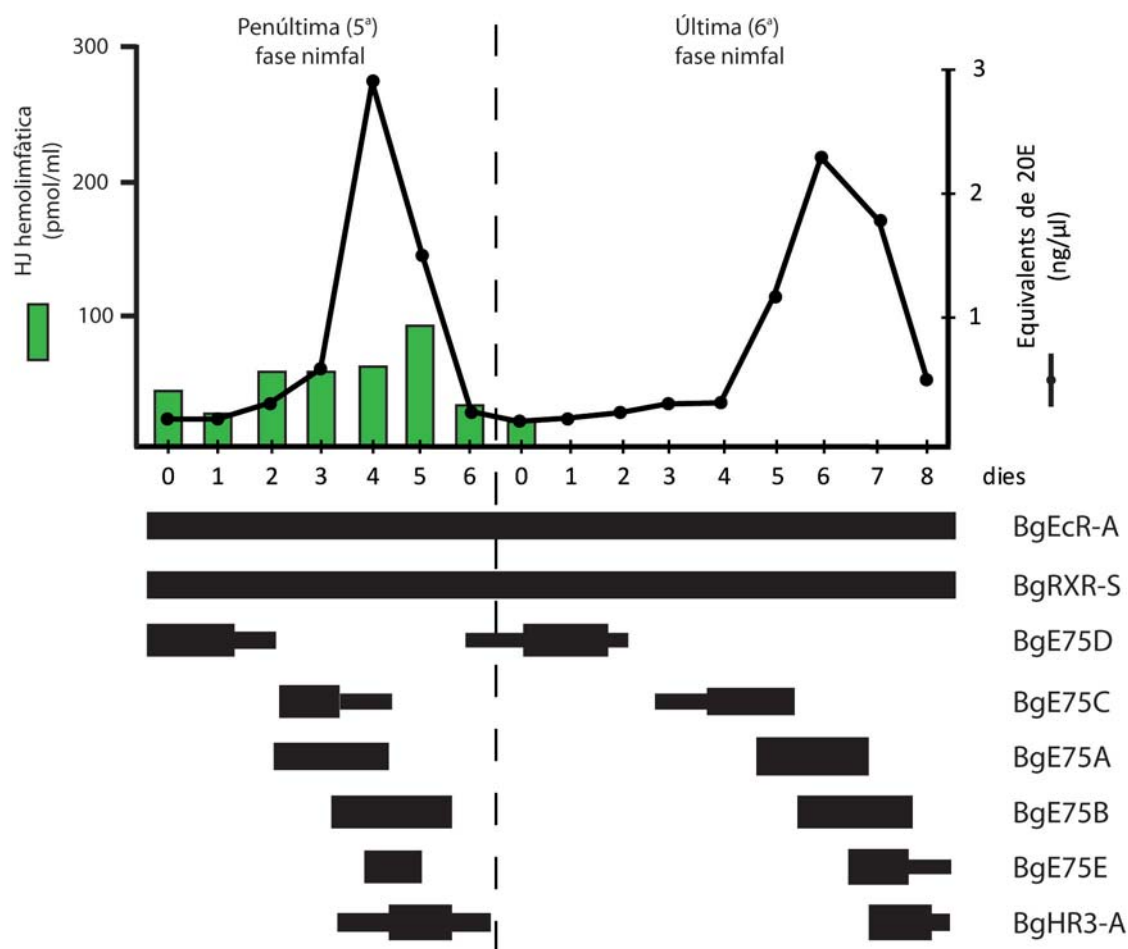


Figura 1.12.- Representació esquemàtica dels nivells d'expressió de varis receptors nuclears durant les dues últimes fases nimfals de *B. germanica*. A la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E i d'HJ segons Cruz *et al.* (2003). L'amplada dels esquemes d'expressió dels mRNA representen el nivell aproximat d'expressió. Adaptat de Cruz *et al.* (2008).

1.6. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E74

Tal i com hem descrit anteriorment, la 20E exerceix el seu paper regulador mitjançant l'activació d'una sèrie de gens primerencs. A més dels ja descrits a *B. germanica*, *BgE75*, *BgHR3*, *BgHR4* i *BgFtz-F1*, el factor de transcripció *E74* també forma part dels gens primerencs. Aquest factor és un membre de la família de factors de transcripció de tipus ETS. En totes les espècies d'insectes on s'ha identificat aquest gen hi ha dues isoformes, *E74A* i *E74B*, amb un domini d'unió a DNA tipus ETS comú i un extrem N-terminal específic de cada isoforma. Aquest gen es va identificar per primera vegada a *D. melanogaster* (Burtis *et al.*, 1990). Mitjançant mutants

nuls es va demostrar que tant DmE74A com DmE74B són necessaris pel desenvolupament de la mosca a partir de la pupa (Fletcher et al., 1995; Fletcher i Thummel, 1995). Posteriorment, E74 ha estat caracteritzat al mosquit *A. aegypti*, on AaE74A i AaE74B regulen la producció de vitel·logenina (vg), procés regulat per la 20E en mosquits (Sun et al., 2002; Sun et al., 2004). Finalment, s'ha clonat a *M. sexta* (Stilwell et al., 2003) i a *B. mori* (Sekimoto et al., 2007), tot i que en cap cas s'han estudiat funcionalment.

La família ETS està formada per un gran nombre de factors de transcripció evolutivament conservats, molts dels quals estan associats a tumors. Hi ha descrits 25 membres de la família ETS en humans i 26 a murins. Els factors de transcripció d'aquesta família regulen l'expressió de gens crítics en diversos processos, que inclouen proliferació cel·lular, desenvolupament de cèl·lules limfoides i angiogènesi (Sementchenko i Watson, 2000). A *D. melanogaster*, s'han identificat 8 gens d'aquesta família, quatre dels quals, *E74*, *pointed (pnt)*, *yan* i *Ets97D (D-elg)*, estan caracteritzats genèticament. De la resta es coneixen els patrons d'expressió però no hi ha informació funcional (Hsu i Schulz, 2000).

1.7. EL RECEPTOR NUCLEAR SEVEN UP (Svp)

Seven up (Svp) és un membre de la família dels receptors nuclears, aïllat per primera vegada a *D. melanogaster*. A vertebrats, l'homòleg de Svp és COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor). Dins dels receptors nuclears d'insectes, Svp és el que té una identitat més gran amb el seu homòleg a vertebrats, arribant a un 90% en l'LBD i el DBD. A *D. melanogaster* s'han trobat dues isoformes, DmSvp1 i DmSvp2. DmSvp2 té l'LBD truncat amb una regió C terminal que no té similitud ni amb COUP-TF ni amb cap altra receptor nuclear. DmSvp està implicat en la diferenciació del tipus cel·lular de l'ommatidi durant el desenvolupament, evitant que els fotoreceptors R1, R3, R4 i R6 es converteixin en R7 (Mlodzik et al., 1990). Així, l'expressió ectòpica de DmSvp després del moment en que el destí cel·lular s'ha establert, indueix el canvi de cèl·lules R7 a un dels altres tipus cel·lulars, R1 a R6 (Hiromi et al., 1993).

En relació amb les hormones esteroïdals, a *D. melanogaster* Svp inhibeix la acció de EcR-USP sobre la inducció transcripcional en cèl·lules S2. Aquesta funció inhibidora de l'acció del receptor de la 20E s'ha confirmat *in vivo* mitjançant la sobreexpressió de DmSvp en mosques transgèniques al final de la tercera fase, induint una alta mortalitat en el període prepupal. La sobreexpressió de Usp durant la prepupa evita la mort associada a Svp (Zelhof et al., 1995).

DmSvp també té un paper en el desenvolupament i diferenciació del sistema nerviós de l'embrió de *D. melanogaster*. Durant la neurogenèsi del sistema nerviós central de l'embrió DmSvp s'expressa amb un patró restringit als neuroblasts i és essencial pel canvi de factors de transcripció que es dona en aquestes cèl·lules per generar la diversitat neuronal necessària (Kanai et al., 2005). DmSvp regula la identitat dels cardioblasts de *D. melanogaster*. Aquesta mosca, com tots els insectes, té un sistema circulatori obert, que consisteix en un tub lineal cardíac anomenat vas dorsal, que actua bombejant l'hemolimfa. Totes les cèl·lules cardíques expressen inicialment *tinman* (*tin*), un factor de transcripció. En el vas dorsal embrionari madur l'expressió de *tin* disminueix en set parells de cèl·lules bilaterals, que expressen DmSvp, necessari per reprimir l'expressió de *tin* (Lo i Frasch, 2001). L'expressió de DmSvp és important ja que aquestes cèl·lules esdevindran els tractes d'entrada del tub cardíac o ostia (Bryantsev i Cripps, 2009). Per últim, durant l'embriogènesi de *D. melanogaster*, DmSvp regula la divisió cel·lular, induïda a través del receptor del factor de creixement (EGFR), de les cèl·lules que esdevindran els tubs de Malpighi. Aquests tubs, formen un epiteli monocapa excretor que actua com els ronyons dels vertebrats. Estan formats per dos parells de tubs tancats formats per una sola capa de cèl·lules. DmSvp regula dos components del cicle cel·lular de manera directa o indirecta aquests són *string* i la ciclina E (Kerber et al., 1998).

A més de *D. melanogaster*, *Svp* s'ha estudiat principalment al mosquit *A. aegypti*, on s'ha clonat una isoforma, *AaSvp*. Aquest factor s'expressa en el cos gras de femelles adultes durant el primer cicle vitel·logènic. De la mateixa manera que a *D. melanogaster*, *AaSvp* reprimeix la transactivació a través de *AaEcR* – *AaUSP*, fet que suggereix que podria actuar com a regulador negatiu de la via de la 20E en el cos gras del mosquit (Miura et al., 2002). Per tal d'establir el mecanisme molecular pel qual *AaSvp* reprimeix la acció de *EcR-USP*, s'han realitzat assaigs de doble híbrid, comprovant que *AaSvp* interactua amb *AaEcR* i *AaUSP*. Mitjançant experiments d'immunoprecipitació de cromatina (Chip) amb extracte de cos gras, s'ha demostrat que *AaSvp* només interactua amb *AaUSP* al final del cicle gonadotròfic. Aquests resultats confirmen que *AaSvp* participa en la regulació de la acció del receptor de la 20E a través de la formació d'heterodímers amb *USP/RXR* (Zhu et al., 2003). A *T. castaneum* també s'ha clonat només una isoforma de *Svp*, i és necessària per la metamorfosi (Tan i Palli, 2008) i per la reproducció (Xu et al., 2010). Finalment, també s'ha clonat *Svp* a *A. mellifera* (Velarde et al., 2006) i *B. mori* (Togawa et al., 2001), tot i que en aquests insectes no s'ha estudiat la seva funció.

COUP-TF és l'homòleg de *Svp* a vertebrats. Hi ha dues isoformes descrites, COUP-TF1 és essencial en neurogenèsi i COUP-TF2 és essencial en la diferenciació de diferents teixits i en el metabolisme (Tsai i Tsai, 1997). COUP-TF actua principalment com a repressor de varies vies de

senyalització, i la seva acció és a través de dos mecanismes. Primer, competint amb altres receptors nuclears per formar heterodímers amb RXR i en segon lloc, competint, com a homodímer, per unir-se als mateixos elements de resposta d'altres receptors nuclears (Park et al., 2003).

2. OBJECTIUS

1. Identificar els homòlegs d'E74 i Seven up a *B. germanica*, clonar i analitzar les seves seqüències.
2. Caracteritzar el patró d'expressió d'E74 i de Seven up de *B. germanica* durant les dues últimes fases nimfals i el primer i segon cicle gonadotròfic.
3. Realitzar l'estudi funcional d' E74 i Seven up de *B.germanica* mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo* durant els estadis mencionats.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. INSECTES

Per realitzar els diferents assajos es van utilitzar femelles de *B germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) provinents d'una colònia mantinguda en condicions constants de temperatura (30 ± 1 °C), d'humitat relativa (70-75 %) i en fosc constant. L'alimentació que se'ls subministrava consistia en pinso especial per gossos PANLAB 125 i aigua *ad libitum* (Piulachs, 1987).

L'edat de les nimfes de cinquena i sisena fase es determinava cronològicament perquè no es disposava de cap paràmetre adequat per fixar l'edat fisiològica. En canvi, per determinar l'edat de les femelles adultes en el primer cicle gonadotròfic es va utilitzar com a paràmetre la longitud dels oòcits basals (Piulachs, 1987).

3.2. TÈCNIQUES QUIRÚRGIQUES

Les disseccions dels insectes es van realitzar sota una lupa binocular Meiji prèvia anestèsia mitjançant CO₂. Per a la manipulació i l'extracció dels diferents teixits s'utilitzaven pinces INOX 5 Super Wit i microtissors Diener. Totes les disseccions es van realitzar en solució salina Ringer.

Solució salina Ringer:

NaCl	9,0 g/l
KCl	0,2 g/l
NaHCO ₃	0,2 g/l
CaCl ₂	0,2 g/l

3.2.1. Dissecció dels ovaris, cos gras i epidermis

Per extreure els ovaris es realitzava una obertura longitudinal a la part ventral de l'abdomen de l'insecte, des del segment genital fins el tòrax. Seguidament, es separaven les esternites abdominals i es retirava el cos gras fins deixar els dos ovaris visibles, un a cada costat del tub digestiu. Per obtenir el cos gras, primer es retirava el tub digestiu, els ovaris i les glàndules col·laterals, i a continuació es recollia amb cura tot el cos gras abdominal amb l'ajuda de les pinces. L'epidermis dorsal lliure de cos gras es va utilitzar per fer cicles d'expressió en aquest teixit. Per dissecar el cos gras unit a l'epidermis i a la cutícula es feien dues obertures longitudinals seguint la línia on s'uneixen les cutícules dorsal i ventral des de l'últim segment

abdominal fins al tòrax. A continuació es descartaven les esternites abdominals i es retirava el tub digestiu, i els ovaris. Finalment es separava el tòrax i l'últim segment abdominal amb les glàndules col·laterals i s'utilitzava la cutícula dorsal on estava adherit el cos gras.

3.2.2. Dissecció de les glàndules col·laterals

Per a la dissecció de les glàndules col·laterals es va obrir l'insecte per la zona ventral de la mateixa manera que en les disseccions d'ovaris i cos gras. A continuació, es va separar la cutícula de la regió caudal i es va retirar el tub digestiu deixant al descobert les glàndules col·laterals unides a l'oviducte.

3.2.3. Dissecció dels *corpora allata* (CA)

Les disseccions de CA es van realitzar practicant una obertura a la coberta quitinosa del cap a nivell de la zona occipital. Un cop realitzada l'obertura, s'inclina el cap endavant i es retira el teixit muscular i el cos gras que es troba just sota l'orifici occipital, quedant exposat el complex retrocerebral, format pels *corpora cardiaca* (CC) i els CA. Aquest complex es troba situat per sobre l'esòfag i el gangli subesofàgic, entre dues tràquees dorsals disposades longitudinalment. Degut a la seva reduïda mida, els CA s'extreuen juntament amb els CC i posteriorment es separen.

3.2.4. Dissecció de la glàndula protoràtica (GP)

Les disseccions de GP es van realitzar retirant la cutícula de la regió ventral del coll de l'insecte. Un cop realitzada l'obertura es van retirar les tràquees ventrals deixant exposat el gangli protoràtic i els seus nervis connectius. A continuació es va tenyir la zona amb blau de metilè durant un minut i es va extreure el gangli, deixant al descobert la glàndula protoràtica sobre el tub digestiu. Finalment, es van tallar les quatre branques de la glàndula per la zona més distal i es va extreure.

3.2.5. Obtenció d'hemolimfa

L'hemolimfa es va obtenir seccionant un metafemur i, sobre el tall, aplicant una micropipeta de vidre aforada de 5 µl que va permetre recollir l'hemolimfa per capil·laritat.

3.3. EXTRACCIÓ D'ÀCIDS RIBONUCLEICS

Les extraccions d'RNA es van realitzar utilitzant el kit de Sigma "GenElute Mammalian Total RNA" d'acord amb les instruccions del fabricant. Per a les extraccions d'RNA total del cos gras amb epidermis i ovari, els teixits prèviament congelats en nitrògen líquid es van triturar amb l'ajuda d'un homogeneïtzador mecànic. En el cas dels CA i les GP, les mostres es van congelar amb el tampó de lisi i se'n va extreure l'RNA directament. L'RNA es va quantificar per obtenir la seva concentració i puresa amb l'espectrofotòmetre ND-1000 UV-Vis (Nanodrop), llegint l'absorbància a 260 i 280 nm.

3.4. CLONATGE DELS cDNAs DE BgSvp I BgE74

El clonatge es va realitzar mitjançant les tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i l'ús d'oligonucleòtids degenerats. Un cop obtingut un primer fragment, es completava amb les tècniques de 5'- i 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

3.4.1 PCR

Per clonar un primer fragment dels diferents factors de transcripció es van dissenyar oligonucleòtids degenerats basats en el DBD, en el cas de Svp, i en el domini d'unió a DNA de tipus ETS, en els cas d'E74. En ambdós casos, la regió escollida per dissenyar els oligonucleòtids és la més conservada entre els diferents homòlegs. Com a motlle per a la PCR es va utilitzar un cDNA obtingut a partir de cos gras d'última fase ninfal de *B. germanica*. Les reaccions de PCR es van realitzar amb GoTaq (Promega) seguint les especificacions del fabricant, excepte en la concentració d'oligonucleòtids a utilitzar: en tractar-se d'oligonucleòtids degenerats, aquests es posaven a una concentració cinc vegades superior a la indicada.

Els oligonucleòtids degenerats utilitzats pel clonatge de BgE74 i de BgSvp van ser:

Molècula	Oligonucleòtid	Seqüència	Grandària del fragment amplificat
BgSvp	SVPFwd1	5'-AUHGARTGYGTNGTNTGY-3'	120 pb
	SVPRvd1	5'-NCCNVMYCANSRYTANGT-3'	
BgE74	E74Fwd1	5'-TTYATHAARTGGACNAAAY-3'	149 pb
	E74Rvd1	5'-YCCYCKYTGRRTARTARTA-3'	

Les condicions de PCR en tots dos casos van ser:

94 °C 2 min

4x (94 °C 30 seg
40 °C 30 seg
74 °C 1 min

34x (94 °C 30 seg
44 °C 1 min
74 °C 30 seg

74 °C 5 min

3.4.2. Amplificació ràpida dels extrems 5' i 3' dels cDNAs

Les seqüències es van completar mitjançant les tècniques de 5'- i 3'-RACE. Aquesta tècnica va ser descrita inicialment per Frohman *et al.* (1988) i la vàrem portar a terme seguint les instruccions del "5'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versió 2.0" (Invitrogen), o bé les instruccions del "3'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versió 2.0" (Invitrogen), a partir d'RNA total obtingut de cos gras d'última fase nimfal de *B. germanica*.

Els oligonucleòtids específics que es van utilitzar en aquestes tècniques es van dissenyar sobre el primer fragment de BgSvp i BgE74 que s'havia obtingut o sobre la seqüència obtinguda en fer el primer RACE.

Els oligonucleòtids utilitzats van ser:

Molècula	Tècnica	Oligonucleòtid	Seqüència
BgSvp	5'RACE	SVPR7	5'-TGAGATTTCTCCTGACACTCCTCT-3'
	3'RACE	FWSPA1	5'-AGAGGAGTGTCAGGAGAAATCTCA-3'
BgE74	5'RACE	E74F1	5'-GACCAATCGGGAGAAAGGAGTCTT-3'
	3'RACE	E74R2	5'-TCCTCTCTGGTAGTAATACCTAAGT-3'

Les reaccions de PCR es van realitzar a partir de 5 µl de dC-Tailed DNA o de 1 µl de 3' cDNA originats mitjançant la tècnica del 5'- o del 3'-RACE, respectivament. En totes les amplificacions s'utilitzava la DNA-polimerasa Go-Taq (Promega), seguint les especificacions del fabricant.

Les condicions de les PCR van ser:

BgSvp

<u>5'RACE</u>	
	94°C 2 min
39x	94°C 30 seg
	55°C 30 seg
	74°C 1 min
	74°C 5 min
<u>3'RACE</u>	
	94°C 2 min
39x	94°C 30 seg
	60°C 30 seg
	74°C 90 seg
	74°C 5 min

BgE74

<u>5'RACE</u>	
	94°C 2 min
44x	94°C 30 seg
	56°C 30 seg
	74°C 90 seg
	74°C 5 min
<u>3'RACE</u>	
	94°C 2 min
39x	94°C 30 seg
	64°C 30 seg
	74°C 90 seg
	74°C 5 min

3.5. ELECTROFORESI DE DNA

Les electroforesi de DNA es van realitzar en gels d'agarosa de l'1 a l'1,5% (p/v), preparats en tampó TBE 0,5X. A cada carril es carregava la quantitat adient de DNA Sambrook *et al.* (1989). Les electroforesi es duien a terme a un voltatge constant (100-130V) i després el gel es tenyia amb una solució de Bromur d'etidi de 0,2 µg/ml en aigua. La visualització del DNA es realitzava amb un transil·luminador de llum ultraviolada.

Tampó d'electroforesi TBE 0,5X:

Tris base	44,5 mM
Àcid bòric	44,5 mM
EDTA (pH 8.0)	1,0 mM

3.6. LLIGACIÓ D'INSERTS EN PLÀSMIDS

Totes les lligacions de fragments de DNA generats per PCR es van fer en el vector pSTBlue-I seguint les instruccions del pAcceptor Vector Kit (Novagen). Les transformacions de DNA plasmídic es feien en cèl·lules competents Novablue d'*E. coli* (Novagen), seguint el procediment descrit per Sambrook *et al.* (1989).

3.7. PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS

L'obtenció del DNA plasmídic es va realitzar seguint les instruccions del GenElute Plasmid Miniprep KIT (Sigma), a partir de cultius líquids incubats tota la nit a 37°C en agitació constant (250 rpm).

3.8. SEQÜENCIACIÓ DE DNA

La seqüenciació del DNA es va realitzar mitjançant el mètode de terminació de la cadena per dideoxinucleòtids. Els diferents clons es seqüenciaven en ambdós sentits utilitzant els oligonucleòtids específics interns del propi insert, en el sistema ABI de seqüenciació automàtica per fluorescència. Les seqüenciacions es realitzaven en el Servei de Seqüenciació de DNA de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona, del CSIC.

3.9. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES SINTÈTIQUES

La síntesi de les proteïnes utilitzades en l'assaig d'unió a DNA es va realitzar mitjançant un sistema de transcripció – traducció *in vitro*. Es va utilitzar el kit TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega), seguint les indicacions del fabricant. Com a motlle es va utilitzar 1 µg de DNA plasmídic que incloïa la seqüència de cDNA a expressar sota el control del promotor T7.

3.10. ASSAIG D'UNIÓ A DNA

Els experiments d'unió de proteïnes a DNA es van realitzar mitjançant el retard de mobilitat electroforètica (EMSA). Aquesta tècnica permet la detecció i l'anàlisi de les interaccions proteïna – DNA, per la qual cosa resulta molt útil en l'estudi de factors de transcripció. L'assaig es va realitzar mitjançant la incubació d'una sonda de DNA marcada radioactivament amb proteïna sintètica, seguida d'una electroforesi en un gel de poliacrilamida no desnaturitzant. Els complexos DNA – proteïna tindran una mobilitat electroforètica retardada respecte el DNA lliure i apareixeran com a bandes discretes en una autoradiografia.

3.10.1 Síntesi de la sonda de DNA

Es van dissenyar oligonucleòtids per tal de sintetitzar les sondes de DNA. Aquests hibridaven parcialment reproduint els elements de resposta i deixaven extrems 5' protuberants necessaris pel seu marcatge. En els assaigs duts a terme es va utilitzar l'element de resposta a ecdisteroides (EcRE):

EcRE:

5'-GAGACAAGGGTTCAATGCACTTGCCAAT-3'

Els oligonucleòtids utilitzats van ser:

Element	Oligonucleòtid	Seqüència
EcRE	EcRE-D	5'-AGAGAAGAGACAAGGGTTCAATGCACTTGCCAAT-3'
	EcRE-R	5'-ATTGGATTGGACAAGTGCATTGAACCTTGCTCT-3'

Les parelles d'oligonucleòtids es van hibridar mitjançant el procediment següent:

1. Barrejar 1 nmol de cada oligonucleòtid en 100 µl de H₂O.
2. Escalfar durant 10 min a 95°C.
3. Deixar refredar lentament fins a temperatura ambient per permetre la hibridació.
4. Guardar a -80°C.

Un cop hibridats els oligonucleòtids, es va procedir al seu marcatge radioactiu mitjançant el mètode "end-filling". Aquest mètode es basa en la capacitat de la polimerasa Klenow de reparar els extrems 5' protuberants. S'aconsegueix el marcatge del DNA afegint un dels nucleòtids marcats radioactivament, en aquest cas la dCTP.

1. En un tub de microcentrifuga afegir:
 - 100 ng d'oligonucleòtids hibridats
 - 2,5 µl de Tampó BIB 10x
 - 2 µl d'una barreja de dATP, dGTP i dTTP (33 mM cada un; Roche)
 - H₂O fins a 25 µl.
 - 1 µl d' Exonuclease Free Klenow (5u/µl; Amersham)
 - 2 µl de α³²P-dCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; Amersham)
2. Centrifugar breument i incubar 30 min a 37°C.

3. Purificar mitjançant l'ús d'una microcolumna Sephadex™ G-50 (GE Healthcare), seguint les instruccions del fabricant.
4. Quantificar el marcatge mitjançant un comptador d'escintil·lació LS 6000 SC (Beckman).

Solucions:

Tampó BIB 10x

Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	500 mM
MgCl ₂	100 mM
Espermidina	15 mM
B-mercaptoetanol	50 mM

3.10.2 Reacció d'unió

Un cop sintetitzades les sondes es van realitzar les reaccions d'unió de les proteïnes al DNA. En les reaccions d'unió a proteïnes sintetitzades *in vitro* es va utilitzar 1 µl de cada reacció de TNT. Les reaccions es van realitzar en tubs de microcentrífuga en un volum de 20 a 75 µl de tampó d'unió 1x. Addicionalment es va afegir:

1 µl de poli-dIdC (oligonucleòtid inespecífic de cadena doble; Sigma).

1 µl d'un oligonucleòtid inespecífic de cadena senzilla (seqüència del promotor SP6).

50 µg d'albumina sèrica bovina (BSA; Sigma).

4000 cpm de sonda.

Les reaccions es van incubar durant 30 min en un bany de gel. Pels assaigs de competició, abans d'incorporar la sonda es va afegir la quantitat senyalada d'oligonucleòtids sense marcar i es va incubar 10 min en un bany de gel. Després es va afegir la sonda i es va continuar amb la incubació de 30 min.

Tampó d'unió 5x:

Tris base	50 mM	EDTA (pH 8,0)	2,5 mM
MgCl ₂	5 mM	Glicerol	20 %
Ditiotreitol (DTT)	2,5 mM	NaCl	0,25 M

3.10.3 Electroforesi, tractament del gel i revelat

L'electroforesi dels assaigs d'unió a DNA es van realitzar en gels de poliacrilamida no desnaturalitzants. D'aquesta manera es manté la estructura secundària de les proteïnes i les possibles interaccions entre elles i les sondes de DNA. El procediment va ser el següent:

1. Preparar el gel de poliacrilamida no desnaturalitzant:
 - 6,7 ml d'acrilamida/bisacrilamida (30:0,8).
 - 2 ml TBE 10x.
 - 300 µl de Persulfat amònic 10%
 - 15 µl de TEMED
 - 32,7 ml H₂O
2. Córrer les mostres en TBE 0,5x a 120V a 4 °C durant 3,5 h.
3. Submergir el gel en àcid acètic 10% durant 10 min.
4. Assecar el gel a 80°C durant 1,5 h.
5. Exposar el gel a una pel·lícula fotogràfica Kodak a -70 °C i revelar-la.

3.11. RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una tècnica que permet l'amplificació exponencial de petites quantitats de DNA *in vitro* utilitzant dos oligonucleòtids flanquejant la regió que es vol amplificar i que hibriden en les cadenes oposades d'aquesta regió de DNA. Per a la reacció d'amplificació s'utilitza una DNA polimerasa termostable que permet realitzar un procés cíclic de desnaturalització, hibridació i extensió dels oligonucleòtids (Saiki et al., 1988). Aquesta tècnica es basa en la retrotranscripció d'una quantitat constant d'RNA que s'utilitzarà posteriorment per realitzar PCRs amb encebadors específics de l'mRNA d'interès. Prèviament a la retrotranscripció es tractava l'RNA amb DNAsa per eliminar el DNA genòmic. La metodologia seguida es descriu a continuació:

3.11.1. Tractament amb DNAsa

Totes les mostres d'RNA es tractaven amb DNAsa, ja que en una extracció d'RNA sempre existeix una petita contaminació amb DNA genòmic que pot interferir en la posterior amplificació dels diferents transcrits.

Procediment:

1. En un volum final de 10 µl afegir els components següents:
 - 300 ng – 1 µg d'RNA

- 1 µl Reaction Buffer (Promega)
- 1 µl RQ1 RNase-Free DNase (Promega)
2. Incubar 30 min a 37 °C
3. Afegir 1 µl de Stop Solution (Promega) i incubar 5 min a 75 °C per aturar la reacció.
4. Posar en gel per evitar hibridacions entre les cadenes d'RNA.

3.11.2. Retrotranscripció

Procediment:

1. Afegir els reactius següents:
 - 4 µl de First Strand Buffer 5 x (Invitrogen)
 - 0,5 µl de Random Primers (0,5 mg/ml) (Promega)
 - 0,5 µl de dNTP Master Mix 100 mM (Ecogen)
 - 2 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen)
 - 1 µl d'RNAsin Ribonuclease Inhibitor 40 u/µl (Promega)
2. Equilibrar la reacció durant 10 min a temperatura ambient.
3. Afegir 1 µl de SuperScript™ II RNase H⁺ Reverse Transcriptase (200 u/µl, Invitrogen) o 1 µl de H₂O en els controls.
4. Equilibrar la reacció 10 min a temperatura ambient.
5. Incubar 50 min a 42 °C per fer la transcripció reversa.
6. Incubar durant 10 min a 75 °C per acabar la reacció.
7. Equilibrar 10 min a temperatura ambient.
8. Afegir 20 µl de TE pH 8.0.

3.11.3. PCR

La determinació de les quantitats relatives dels mRNA d'interès es va realitzar mitjançant la tècnica de RT-PCR semiquantitativa. Les condicions de PCR eren dins la zona d'amplificació lineal per cadascun dels diferents transcrits.

Reacció de PCR:

En un tub Eppendorf de 0,2 ml afegirem els reactius següents fins a una concentració final i un volum final de 25 µl:

GoTaq Buffer (Promega)	1 x
dNTP Master Mix (Ecogen)	800 µM
encebador directe	200 nM
encebador revers	200 nM
cDNA	1 µl
GoTaq DNA polimerasa (Ecogen)	1 unitat

Oligonucleòtids utilitzats:

Molècula	Oligonucleòtid	Seqüència	Grandària fragment amplificat
BgSvpA	FSV3	5'-GTCGAGGTATGGACAATGCATGCA-3'	509 pb
	RSV3	5'-TGCGTTAGAGAACAAGTAGCTCCAGT-3'	
BgSvpB	FSV3	5'-GTCGAGGTATGGACAATGCATGCA-3'	526 pb
	RSVB1	5'-AGATGGTAAACGGAGCAAGAGCTT-3'	
BgE74A	E74AF1	5'-TAATCCTCTACTTGCAGAGAAGCTT-3'	253 pb
	E74R8	5'-ATTGTGGAGCAGCGCTTTGTGCT-3'	
BgE74B	E74BF2	5'-CCTTACACACTTATTTACTTGTGTTA-3'	453 pb
	E74BR2	5'-ATATCGTCGCATGAGGGATTTCTTG-3'	
BgActina5C	ActinaF	5'-TCGTTTCGTGACATCAAGGAGAAGCT-3'	308 pb
	ActinaR	5'-TGTCGGCAATTCAGGGTACATGGT-3'	
BgDDC	DDCF1	5'-TTCCTTCAACTTCAACCCACATAA-3'	205 pb
	DDCR1	5'-TTAGCACGAACCCAGCTTCAGT-3'	

3.12. PCR EN TEMPS REAL

La tècnica de la PCR quantitativa en temps real o Q-PCR permet quantificar l'expressió d'un gen d'interès relativa a un gen control. Aquesta tècnica es basa en la unió a la doble cadena de l'àcid nucleic del fluorocrom SYBRGreen present en la mix de la PCR i la monitorització del seguiment al llarg del temps de la fluorescència emesa per aquest compost. La fluorescència detectada descriu una corba sigmoïdal. En els cicles inicials de la Q-PCR el senyal és molt fluixa i indistingible del soroll de fons. A mesura que el producte s'acumula, la identificació del senyal creix exponencialment fins assolir la fase de saturació. En la part lineal de la fase exponencial (corba representada en eixos logarítmics), la fluorescència és proporcional a la quantitat de DNA amplificat i aquest, al seu torn, es proporcional al número de còpies de cDNA inicial en la mostra. Per tal de quantificar les molècules presents en la mostra inicial del gen d'estudi, cal determinar el número de cicle a partir del qual el senyal és superior al soroll de fons, indicat com a Ct (*Cycle Threshold*). Seguidament s'indica la fórmula de la corba que s'obté de la monitorització de fluorescència:

$$N=N_0(1+E)^{Ct}$$

N=Nombre de còpies

N₀=Nombre de còpies inicials

E=Eficiència de la reacció

Ct= Cycle Treshold

El número de còpies representades com valor del Ct del gen d'interès, es corregeix respecte el gen usat com a referència i s'obté ΔCt .

Les PCRs en temps real es van fer en plaques de 96 pouets. Cada placa conté triplicats de les mostres pel gen d'estudi i pel gen control, un control negatiu sense cDNA per duplicat i un control negatiu de la síntesi de la retrotranscripció sense l'enzim retrotranscriptasa. A cada pouet es van col·locar 2 μ l de la dilució adient del cDNA i es van afegir 18 μ l de la Master mix següent:

Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)	1 x
Oligonucleòtid directe	100 nM
Oligonucleòtid revers	100 nM

La reacció de PCR és la següent:

95°C 10 min
40x (95°C 5 seg
60°C 1 min

Al final de la PCR es va aplicar un gradient creixent de temperatures (de 60 a 95 °C) per monitoritzar la cinètica de dissociació dels fragments amplificats. D'aquesta manera es va comprovar l'especificitat de l'amplicó.

Els resultats es van analitzar mitjançant el hardware i el software de BIORAD.

Oligonucleòtids utilitzats:

Molècula	Oligonucleòtid	Seqüència	Grandària fragment amplificat
BgSvpA	SVPA F1	5'-GTAAGTGTGACAAACAGCAGTCT-3'	120 pb
	RSV3	5'-TGC GTTAGAGAACAAGTAGCTCCAGT-3'	
BgSvpB	SVPB F1	5'-ACATCGAAAGTCTCCAAGAGAAATC-3'	110 pb
	RSVB1	5'-AGATGGTAAACGGAGCAAGAGCTT-3'	
BgHMG-S	HMGS1-RT F1	5'-CTTCGCTTTACGGAGGTTTGGTC-3'	200 pb
	HMGS1-RT R1	5'-GCTGCGGCTTGATGTGCGAGAG-3'	
BgHMG-R	HMGR-RT F1	5'-TTGTAGCTGATGGAATGACTCGT-3'	200 pb
	HMGR-RT R1	5'-AGCAATGAAGCGTATAAACAAATG-3'	
BgFPPS	FPPS F1	5'-CCTGGCTCGACAAGTTCCTACAAG-3'	200 pb
	FPPS R1	5'-AAACAACAGCAAGTCCCCGATTCT-3'	
BgVg	Vg RT F1	5'-CTACATTGGAAGTGAGGACAGC-3'	200 pb
	Vg RT R1	5'-CCAAAGTTTTAGGATCAGTAGGTG-3'	
BgFtz-F1	Ftz-F1 1146 F	5'-TTCGAACTCTTGAGAACCAGAC-3'	120 pb
	Ftz-F1 1246 R	5'-CAGTCGACCTGAGAGAACAAATTC-3'	

3.13. INTERFERÈNCIA D'RNA *IN VIVO*

Una aproximació actual a la determinació de la funció de proteïnes en organismes que no es poden modificar genèticament de forma estable, com és el cas de *B. germanica*, consisteix en el silenciament transitori dels transcrits que les codifiquen. Aquest procediment es basa en el tractament amb una doble cadena d'RNA (dsRNA) idèntica a un fragment del missatger que es pretén silenciar, el qual, en penetrar dins les cèl·lules es processa en fragments de 21-23 nucleòtids que desencadenen la degradació del missatger endogen diana (Plasterk, 2002; Schutze, 2004).

3.13.1 Obtenció de l'RNA de doble cadena (dsRNA)

La metodologia per a l'obtenció del dsRNA es detalla a continuació.

3.13.1.1. Clonatge del fragment diana

En primer lloc s'amplificava i clonava una regió del receptor nuclear per poder sintetitzar el corresponent dsRNA i silenciar-ne l'expressió. En el cas de BgSvp es van sintetitzar dsRNA específics per a cadascuna de les isoformes i un fragment comú a les dues isoformes en l'LBD. En el cas de BgE74 també es va dissenyar un fragment comú en la regió del domini ETS. En aquesta tesi també es va dur a terme la interferència de la dopa decarboxilasa (DDC). Per als controls dels experiments d'interferència es va utilitzar un fragment d'RNA de doble cadena inespecífic d'aproximadament 100 parells de base, que es va obtenir del vector pSTBlue-I.

Les reaccions de PCR es feien a partir de 50 ng del plàsmid que portava insertat el cDNA complet de la molècula d'interès. En totes les amplificacions s'utilitzava la polimerasa Gotaq (Promega), seguint les especificacions del fabricant. Els fragments amplificats es lligaven entre els promotors T7 i SP6 del vector pSTBlue-I.

Els oligonucleòtids utilitzats van ser:

Molècula	Oligonucleòtid	Seqüència	Grandària fragment amplificat
dsBgSvp	FSV3	5'-GTCGAGGTATGGACAATGCATGCA-3'	356 pb
	RSV1	5'-TATACTCCGCAGAGTCTACGTGAAG-3'	
dsBgSvpA	SVPA F1	5'-GTAAGTGTGACAAACAGCAGTCT-3'	247 pb
	SVPA R1	5'-TAGGAGTTTAAAAGTAAAGTGACA-3'	
dsBgSvpB	SVPB F1	5'-ACATCGAAAGTCTCCAAGAGAAATCA-3'	388 pb
	SVPB R2	5'-AGCATTGATGTGCATACAAGCCTT-3'	
dsBgE74	E74 F1	5'-GACCAATCGGGAGAAAGGAGTCTT-3'	578 pb
	E74 R9	5'-TGGAGCATAATTGGACCACAGTTC-3'	
dsBgDDC	DDC F1	5'-TTCCTTCAACTTCAACCCACATAA-3'	205 pb
	DDC R1	5'-TTAGCACGAACCACAGCTTCAGT-3'	

3.13.1.2. Linearització del DNA plasmídic

Per sintetitzar el dsRNA calia partir de dos fragments lineals de DNA. Un que contingés el promotor T7 i un extrem 5' protuberant al costat, i un altra amb el promotor SP6 i un extrem 5' protuberant a l'extrem oposat. Per obtenir aquests cDNAs es preparaven dues digestions amb l'enzim de restricció adequat per cada cas i 15 µg del plàsmid amb l'insert. Les digestions es feien durant tota la nit a 37 °C.

Un cop efectuada la digestió, els fragments es concentraven mitjançant una precipitació amb fenol-cloroform/etanol. El precipitat es resuspensia en 23,5 µl H₂Odepc i s'utilitzava com a motlle per sintetitzar les cadenes senzilles d'RNA (ssRNA), sentit i antisentit.

3.13.1.3. Síntesi del dsRNA

Procediment:

1. Les reaccions de síntesi de ssRNA es realitzaven de forma independent.

23,5 µg	fragment lineal de DNA
10 µl	Promega Buffer 5 x (Promega)
4 µl	DTT (100 mM; Promega)
1 µl	RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 u/µl; Promega)
10 µl	10mM cada rNTP (Amersham)
1,5 µl	SP6 RNA polymerase (17 u/ µl; Promega)
	T7 RNA polymerase (18 u/ µl; Promega)
2. Incubar 2 h a 37 °C
3. Verificar el correcte funcionament d'ambdues reaccions mitjançant electroforesi en gel d'agarosa d'1 µl de cada reacció.
4. Ajuntar les dues reaccions de ssRNA
5. Incubar en un bany a 95 °C durant 10 min.
6. Deixar disminuir la temperatura del bany fins a temperatura ambient durant unes sis hores aproximadament per permetre que les dues cadenes de ssRNA hibridin.
7. Concentrar el dsRNA obtingut mitjançant precipitació amb fenol-cloroform/etanol. Resuspensar el precipitat en 39,5 µl H₂Odepc.
8. Realitzar un tractament amb DNAsa i RNAsa a la vegada per eliminar el DNA plasmídic i el ssRNA que no hagi hibridat correctament:

En un volum final de 50 µl:

5 µl	Tampó de la DNAsa (10x; Promega)
5 µl	DNase/RNase-free (1 u/µl; Promega)
0,5 µl	RNase A Solution (10 µg/µl; Sigma)

Incubar 15 min a 37 °C.
9. Netejar i concentrar el dsRNA mitjançant precipitació amb fenol-cloroform/etanol. Resuspensar el precipitat en 40 µl en H₂Odepc.

3.14.2. Preparació i injecció del dsRNA

La concentració del dsRNA es determinava llegint la densitat òptica en un biofotòmetre (Eppendorf). El dsRNA es diluïa en Ringer filtrat amb filtre millex de 0,22 µm, fins obtenir la concentració desitjada per poder injectar 1 µl de dsRNA a femelles de sisena fase nimfal o adultes. A les femelles de cinquena fase nimfal se'ls injectava un volum de 0,5 µl. El dsRNA s'injectava directament entre els segments abdominals de l'insecte a la part ventral, utilitzant una xeringa Microlitter de 5 µl (Hamilton).

3.14. TINCIÓ AMB FALOIDINA-TRITC I DAPI

La fal·loïdina és la toxina produïda pel fong *Amanita phalloides* i actua unint-se a la actina i impedit la seva despolimerització. Aquesta propietat s'ha fet servir en microscopia unint la fal·loïdina a molècules fluorescents com el tetrametil rodamina iso-tiocianat (TRITC). Aquest colorant emet un color vermell intens. Per la seva banda, el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) és un colorant fluorescent que s'uneix al DNA i que emet fluorescència en color blau.

El protocol realitzat és el següent:

1. Incubar el teixit durant 30 min en paraformaldehyd (PF) 4%, per fixar-lo.
2. Rentar dues vegades durant 10 min amb PBS 0,2 N pH 6,8.
3. Permeabilitzar el teixit incubant-lo durant 10 min, a temperatura ambient, en una solució Tritó-X100 al 0,1% en PBS 0,2N pH 6,8 (PBST).
4. Rentar amb PBS 0,2N pH 6,8.
5. Incubar durant 20 min amb fal·loïdina-TRITC diluïda amb PBS 0,2N pH 6,8 a 300 ng/ml.
6. Rentar dues vegades durant 5 min amb PBS 0,2 N pH 6,8.
7. Incubar durant 10 min amb una solució d'1 µg de DAPI (Sigma)/ml PBST.
8. Eliminar l'excés de marcatge mitjançant dos rentats de 5 min amb PBS 0,2N.
9. Muntar les diferents preparacions en medi de muntatge Mowiol 4-88 (Calbiochem).

En cas de fer una tinció només amb DAPI es va passar del pas 3 al 7.

3.15. TUNEL de CA

Els assajos de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) marquen DNA fragmentat, característic de cèl·lules apoptòtiques. Aquests assajos es van dur a terme amb l'ajuda de la Dra. Lluïsa Vilaplana, utilitzant el kit de detecció de mort cel·lular mitjançant marcatge amb fluoresceïna (Roche). El protocol que vam seguir és essencialment l'indicat pel fabricant:

1. Incubar els CA durant 30 min en PF 4% per, fixar-los.
2. Rentar amb PBT.
3. Permeabilitzar 30 min a temperatura ambient en 0,1% citrat sòdic - 0,1% Tritó-PBS.
4. Rentar dues vegades durant 5 min amb PBS 0,2 N pH 6,8.
5. Aplicar els components de la reacció TUNEL a les mostres i mantenir-les 1h a 37 °C.
6. Muntar les diferents preparacions en medi de muntatge Mowiol 4-88 (Calbiochem).

3.16. MARCATGE AMB BrdU

Per tal de detectar la divisió cel·lular es va fer servir la tècnica de marcatge amb anticossos contra la bromodeoxyuridina (BrdU). La BrdU s'incorpora a les cèl·lules en fase S, en substitució de la timidina, i pot ser detectada utilitzant anticossos específics.

Procediment:

1. Injecció a la cavitat abdominal de l'insecte 1 µl solució BrdU.
2. Dissecció del teixit.
3. Fixar el teixit amb Carnoy's Fixative 30 min.
4. Rentar dos vegades amb PBS 0,2M.
5. Incubar amb 70% metanol (MeOH) en Ringer 10 min.
6. Incubar amb MeOH 30% H₂O₂ 45 min.
7. Incubar amb 70% MeOH en Ringer 10 min.
8. Rentar dues vegades amb PBS 0,2M.
9. Incubar amb PBST-BSA 1 h.
10. Incubar HCl 0,2M 30 min.
11. Rentar tres vegades amb PBS 0,2M 10 min.
12. Rentar dues vegades amb PBST-BSA 10 min.
13. Incubar amb PBST-BSA-NSG 30 min.
14. Incubar amb l'anticòs primari en PBS-BSA-NSG 4 °C tota la nit (dilució 1:1000).
15. Rentar tres vegades amb PBST-BSA 10 min.
16. Incubar amb PBST-BSA-NSG 30 min.
17. Incubar amb l'anticòs secundari en PBS-BSA-NSG 2 h a temperatura ambient o 4 °C tota la nit (dilució 1:100).
18. Rentar tres vegades amb PBS 20 min.
19. Incubar amb la solució de revelat.
20. Rentar tres vegades amb PBS per aturar la reacció.

Solucions:

Tampó fosfat salí (PBS) 0,2M pH6,8:

NaCl	130 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
Ajustar el pH a 6,8	

PBST-BSA:

PBST	1X
BSA	0,2%

PBST-BSA-NGS:

PBST-BSA	1X
NGS	5%

PBST:

PBS 0,2 M pH 6,8	1X
Tween	0,3%

Carnoy's fixative:

Etanol	60%
Àcid acètic	20%
H ₂ O	20%

3.17. OBSERVACIONS MICROSCÒPIQUES

Les diferents preparacions microscòpiques es van examinar utilitzant un microscopi Zeiss Axiophot. Les imatges es van captar mitjançant una càmera Olympus acoblada al microscopi, i es van processar utilitzant el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated).

4. CLONATGE I CHARACTERITZACIÓ DE BgE74

4.1. ANTECEDENTS

Tal i com hem descrit anteriorment, durant el desenvolupament postembrionari dels insectes la 20E regula diferents processos associats a la muda i la diferenciació adulta. La 20E actua unint-se al seu receptor heterodimèric, format per EcR i RXR i activant una sèrie de gens, anomenats gens primerencs. A *B. germanica*, s'han clonat els dos components del receptor de la 20E, BgEcR i BgRXR, i tots els gens primerencs que pertanyen a la família dels receptors nuclears, com ara BgE75, BgHR3, BgHR4 i BgFtz-F1 (Cruz et al., 2006; 2007; 2008; Maestro et al., 2005; Mane-Padros et al., 2008), així com el factor de transcripció Br-C (Piulachs et al., 2010). Així doncs, per tal de completar la llista de gens primerencs a *B. germanica*, encara falta per clonar el factor de transcripció E74.

E74 és un proto-oncogen amb un domini d'unió a DNA de tipus ETS, que fins ara només s'ha clonat i caracteritzat a insectes holometàbols, concretament a *D. melanogaster*, *A. aegypti*, *M. sexta*, *B. mori* i *A. mellifera* (Paul et al., 2005; Sekimoto et al., 2007; Stilwell et al., 2003; Sun et al., 2002; Thummel et al., 1990). Amb l'excepció d' *A. mellifera*, on s'ha descrit només una isoforma, a la resta d'insectes se n'han descrit dues, anomenades E74A i E74B. Cada isoforma presenta un domini N-terminal específic i una part C-terminal comuna, formada per una regió d'enllaç i un domini d'unió a DNA de tipus ETS (Taula 3.1). Gràcies a l'anàlisi del genoma complet d'altres insectes, s'han trobat seqüències homòlogues, completes o parcials, d'alguna de les isoformes d'E74, però no han estat caracteritzades. Aquest és el cas del coleòpter *T. castaneum*, el dípter *A. gambiae* i dels himenòpters *Nasonia vitripennis* i *Camponotus floridanus*. A vertebrats, el factor de transcripció que presenta més similitud amb E74 és E74-like factor (ELF), del qual hi ha descrites, com en el cas dels insectes, dues isoformes, ELF-1 i ELF-2. Els factors de transcripció ELF participen en processos implicats en creixement, diferenciació cel·lular i també en càncer (Oikawa i Yamada, 2003).

En aquest capítol es presenta el clonatge de dos cDNAs que codifiquen per homòlegs del factor de transcripció E74 a *B. germanica* i que s'han anomenat BgE74A i BgE74B. A més, s'ha realitzat una anàlisi de les seqüències obtingudes, comparant-les amb les de diferents insectes i vertebrats. Finalment, s'ha analitzat l'expressió de les dues en diferents teixits durant el desenvolupament nimfal de *B. germanica*.

Taula 4.1. Isoformes del receptor nuclear E74 a insectes. S'indiquen els respectius números d'accés i la referència de l'article on s'ha publicat.

Espècie	Ordre	Isoformes	Número d'accés	Referència
<i>D. melanogaster</i>	Diptera	E74A	NP_730287.1	Thummel <i>et al.</i> (1990)
		E74B	NP_730288.1	
<i>A. aegypti</i>	Diptera	E74A	AAM33363.1	Sun <i>et al.</i> (2002)
		E74B	AAM33362.1	
<i>M. sexta</i>	Lepidoptera	E74A	AAO41696.1	Stilwell <i>et al.</i> (2003)
		E74B	AAO41697.1	
<i>B. mori</i>	Lepidoptera	E74A	ABF14471	Sekimoto <i>et al.</i> (2007)
		E74B	ABF14472	
<i>A. mellifera</i>	Hymenoptera	E74A	NP_001011631.1	Paul <i>et al.</i> (2005)
<i>T. castaneum</i>	Coleoptera	E74B	XP_966617.2	-
<i>A. gambiae</i>	Diptera	E74A	XP_564896.3	-

4.2. RESULTATS

4.2.1. Clonatge i caracterització estructural del factor de transcripció BgE74

El clonatge de BgE74 es va dur a terme mitjançant la tècnica de RT-PCR utilitzant oligonucleòtids degenerats dissenyats en el domini ETS, regió molt conservada en totes les seqüències descrites d'E74 dels insectes, tal i com es pot veure a la Figura 4.1B. En primer lloc, es va clonar un fragment de 149 parells de bases, que un cop analitzat va permetre concloure que es tractava d'un fragment del domini ETS de l'homòleg d'E74 a *B. germanica*. La seqüència es va completar mitjançant les tècniques 5'- i 3'-RACE, tal i com es descriu a l'apartat 3.4. Així, vam aconseguir clonar dos cDNAs sencers que corresponien a dues isoformes del factor de transcripció E74 a *B. germanica*. Aquestes es van anomenar BgE74A i BgE74B per correspondència amb la resta d'isoformes descrites en altres insectes (Figura 4.1A).

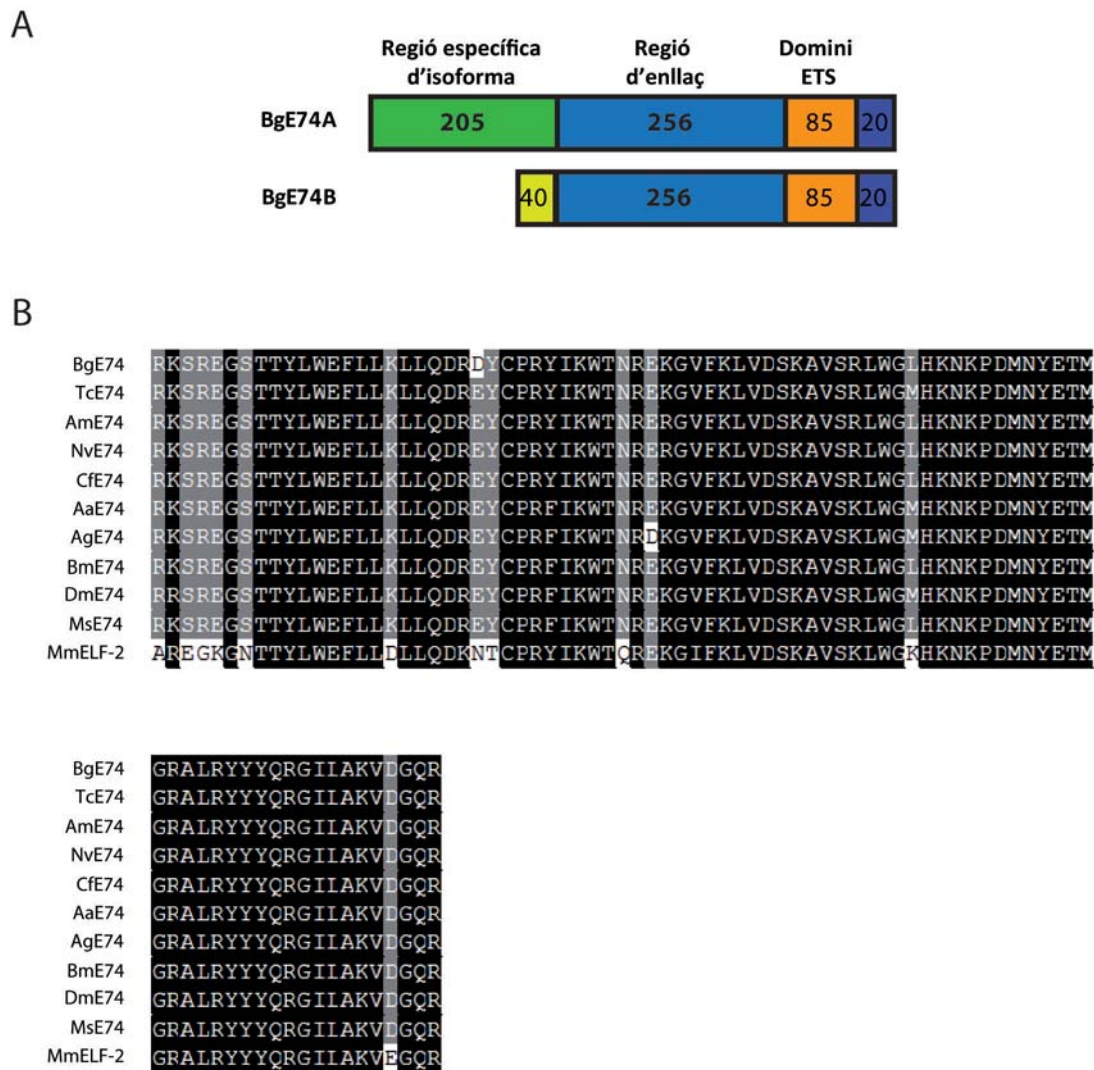


Figura 4.1. El factor de transcripció E74 a *Blattella germanica*. (A) Representació esquemàtica de les dues isoformes d' E74 a *B.germanica*. El nom de cada domini està indicat i els números són els aminoàcids corresponents a cada domini. (B) Alineament de les seqüències aminoacídiques del domini d'unió a DNA de tipus ETS mitjançant el programa Clustal X dels LBD de *B. germanica* (BgE74), *T. castaneum* (TcE74), *A. mellifera* (AmE74), *N. vitripennis* (NvE74), *C. floridanus* (CfE74), *D. melanogaster* (DmE74), *A. aegypti* (AaE74), *A. gambiae* (AgE74), *B. mori* (BmE74), *M. sexta* (MsE74) i *Mus musculus* (MmELF-2).

La grandària d'aquests cDNAs era de 1701 nucleòtids per BgE74A, codificant per una proteïna de 566 aminoàcids, i de 1203 nucleòtids per BgE74B, codificant per una proteïna de 401 aminoàcids. La regió comuna d'ambdues isoformes és de 361 aminoàcids i inclou el domini ETS format per 85 aminoàcids. Aquest domini altament conservat (Figura 4.1B), és el d'unió a DNA i és característic de la família de factors de transcripció ETS. Aquesta família es pot dividir en set

subfamílies segons el nivell d'identitat en el domini ETS i en altres regions conservades, com ara "pointed", domini que intervé en la dimerització i la repressió transcripcional. BgE74 estaria inclòs en la subfamília E74/Elf-2, i una de les característiques d'aquesta subfamília és que no presenten domini "pointed" (Sharrocks et al., 1997). La resta de la regió comuna és coneguda com a regió d'enllaç, i en el cas de *B. germanica* és de 768 nucleòtids, corresponents a 256 aminoàcids. A l'extrem N-terminal hi ha les regions específiques de cada isoforma. En el cas de BgE74A, és de 618 nucleòtids (205 aminoàcids) i en el de BgE74B de 120 nucleòtids (40 aminoàcids) (Figura 4.1A i 4.2).

4.2.2. Comparació entre les seqüències d'E74

Un cop completat el clonatge es va realitzar un estudi comparatiu entre les seqüències de BgE74A i BgE74B i les dels seus homòlegs en insectes. A més, també es va comparar amb el seu homòleg a vertebrats, Elf-2. Tal i com hem descrit anteriorment, el percentatge d'identitat més elevat és al domini ETS, indicant que és el domini més conservat entre els E74 d'insectes. Concretament, el domini ETS de *B. germanica* presenta una identitat del 97,6% tant amb els lepidòpters *M. sexta* i *B. mori* com amb l'himenòpter *A. mellifera*. Si la comparem amb el dípter *D. Melanogaster*, la identitat és del 95,3%. En el cas de Elf-2, el factor de transcripció ETS de *M. musculus* més similar a E74, la identitat entre els seus dominis ETS és del 82,4% (Taula 4.2). La resta de la zona comuna, la regió d'enllaç, presenta una grandària variable i està molt poc conservada entre les diferents espècies d'insectes. La regió específica dels homòlegs d'E74A té una grandària variable, des de 151 a 292 aminoàcids (Figura 4.3A). Tot i la gran variabilitat, els quatre primers aminoàcids (MPFI) són idèntics en totes les espècies analitzades (Figura 4.3B). Si comparem les regions específiques d'E74B, encara observem més diferència de grandària entre els diferents homòlegs, sent entre 40 i 347 aminoàcids (Figura 4.3C). Si analitzem les regions específiques dels E74B d'insectes observem que presenten un motiu conservat al final de la regió específica format per 8 aminoàcids (YKKSLMKR) (Fig.4.3D). Curiosament, a *D. melanogaster* i a *A. aegypti* la seqüència específica de la isoforma d'E74B és més gran que la d'E74A, a l'inrevés que a la resta d'insectes amb dues isoformes descrites.

4.2.3. Patrons d'expressió de BgE74 durant les dues darreres fases nimfals

Un cop clonades les dues isoformes del factor de transcripció E74 a la panerola *B. germanica* i analitzades les seves seqüències, es van estudiar els seus patrons d'expressió

A BgE74A

1 atgcccttcattgacgacgacctgctgtggtgccagataacgacggcaaaaatggtcgac
 1 M P F I D D D L L W C P D N D G K M V D

61 ccttcacaatgcttgcagcaggaggcagccaatggaggccaacagcagcagcaacagcaa
 21 P S Q C L Q Q E A A N G G Q Q Q Q Q Q Q

121 caacagctgcagcaacaacatcaacaacaacaccaacatcatccacaacaacatccgcag
 41 Q Q L Q Q Q H Q Q Q H Q H H P Q Q H P Q

181 catgaagcaagtggaccaggtcttggtgaaactctcccagtcagatctcacaggccttgta
 61 H E A S G P G L G E L S Q S D L T G L V

241 acaagcctggatgaggatgatgaggaagacctattcaaacaacttggggagtcactttt
 81 T S L D E D D E E D L F K Q L G E S T F

301 gagcttgataatcttcttactgattttgaagaaaaggaggagaataacaataatgtagtg
 101 E L D N F F T D F E E K E E N N N N V V

361 tctcctggcagtgaggggggggcgcgctcgatggttgacgagcaccaccgccccaca
 121 S P G S G G G A A S D V V T S T T A P T

421 aaaagtgcaacctcggttacaagacgcgcgcgctaagaagttcaccatcgagctgcta
 141 K S A T S L Q D A R A K K F T I A A A N

481 ccttacttgcagagaagcttggctgctccacctccattgacatcatctgccccaccct
 161 P L L A E K L A A P P P L T S S A P T P

541 gccgccataacaacacaattcattgctggacgtgcaaccatcaagacggagtgcccttgc
 181 A A I T T Q F I A G R A T I K T E C L A

↓

601 ccggacagcagcaaatggacacgactgaattaccaggccccattcgttcttggaaactg
 201 P D S S K V D T T E L P G P H S F L E L

661 ggcgcgcctcaccgtctccacccccgtgaaacgggagccgcccggaccacaaagcgtg
 221 G A A S P S P P P V K R E P P D H K A L

721 ctccacaatatcctgagacagcaccacctcatgagcaccaccagcacatgtggcctcctc
 241 L H N I L R Q H P L M S T P A H V A L L

781 acagcgcacgcagcagccccatacaccacctccaccacaggctctctaccgcccagtcct
 261 T A H R T T P Y T T S T T G S L P P S P

841 gcggattccggtgtctcagacgtggacagcagcagcagtggtcatatcgccaatgacgag
 281 A D S G V S D V D S S S S G H T S N D E

901 ctcaaggcgcgactccagcccacaccagttcccgcggcgagaacccccgacagccccggg
 301 L K A R L Q P T P V P A A R T P D S P G

961 cccggccccatgggtactcgcagctacctcatggagggttcttggccccctattaccac
 321 P G P H G Y S Q L P H G G F L A P Y Y H

1021 caccatcgccaccaccaacagcaacaagcaccgccctcattggaccacgcgtcgactagt
 341 H H R H H Q Q Q Q A P P S L D H A S T S

1081 acggggggggggggggggctatcctggccgaccaccttaccggacggttatggcgggtac
 361 T G G G G G Y P G R P P L P D G Y G G Y

1141 ctacctctcttccacatcaccagcagcagcttccgacacagcaggcgtaccaccaccag
 381 L P P P S H H Q Q Q L P T Q Q A Y H H Q

1201 gcagcgtcccaacggttcgcggcgcctcctgccccctgcccgccagggccgcatcccc
 401 A A S Q R F A A P P A P S P P R P A I P
1261 acgtcggtgattcaggctgcaacgtccagcgtgagcgcgacgaactctacaagctggagctc
 421 T S V I Q A A T S S V S D E L Y K L E L
1321 ggcttccagccccgcaccaagaagaaaatgaagaagcccaagagtggcgaacccggcgcc
 441 G F Q P R T K K K M K K P K S G E P G A
1381 gtcaaaagggaagagccgcgaaggatcaacaacgtacctgtgggagttcctgctgaaacta
 461 V K R K S R E G S T T Y L W E F L L K L
1441 ctccaagatagagattactgccccgatatatcaagtggaccaatcgggagaaaggagtc
 481 L Q D R D Y C P R Y I K W T N R E K G V
1501 ttttaagttggttgactcgaaagctgtatctcgcctctggggattgcacaagaacaaact
 501 F K L V D S K A V S R L W G L H K N K P
1561 gatatgaactatgaaacgatggggcgagcacttaggtattaytaccagagrpgmatTTTTG
 521 D M N Y E T M G R A L R Y Y Y Q R G I L
1621 gcaaaagtagatggccagaggctggatatcagttttagatgtgcccaaggacattgtg
 541 A K V D G Q R L V Y Q F V D V P K D I V
1681 gagatcgactgcacaggagcgtgaccagcagatctgtttgtacatatcgagtcgccggtt
 561 E I D C T G A *
 1741 ggcaccagctaattctcagtggtgacctgtgcatcatgtgcaatt
 1801 atcgttatatttggggacactccaggtaaaacgatgttttcaacgaatgaaaagcaagg
 1861 aatattttgcttcaattctttttttttttgacaagatctcaggaactatgtcgactggtaa
 1921 aaacaaaagaaactaatatagaaaagaaagaactttattttttgtaagcgtttgaaatgg
 1981 tgctgggactaaacttagggttggaaaatccagtgagctgctgctgctgcttacgaaactgtg

B BgE74B

1 atgagcccacttagagattatagcacggattctgatgattccgatggacagtcgggaaga
 1 M S P L R D Y S T D S D D S D G Q S G R
61 atgtcgcggggaggcaaaaattgcaaagcgtacaagaaatccctcatgacgatatttg
 21 M S P G G K N C K A Y K K S L M R R Y L

Figura 4.2. Seqüències de nucleòtids i aminoàcids de les dues isoformes del factor de transcripció E74 a *B. germanica*. (A) cDNA complet de la isoforma BgE74A amb la regió 3'UTR. La fletxa en l'aminoàcid 205 indica el començament de la seqüència comú i la seqüència dins del requadre correspon al domini d'unió a DNA de tipus ETS. (B) Seqüència de nucleòtids i aminoàcids corresponents a l'extrem 5' específic de BgE74B.

durant les dues darreres fases nimfals. Els teixits escollits van ser la GP i l'epidermis amb el cos gras adherit (CG/Epi). La GP és l'òrgan que sintetitza les hormones esteroïdals, el cos gras és el principal teixit metabòlic, equivalent a insectes del fetge i el teixit adipós de vertebrats, i l'epidermis és l'encarregada de sintetitzar la nova cutícula durant les mudes. Tal i com es pot veure a la Figura 4.4, les dues isoformes presenten variacions en la seva expressió en els dos teixits segons els nivells de 20E. Tant a GP com a CG/Epi, BgE74B s'expressa quan els nivells de 20E són baixos, al començament de la cinquena i la sisena fase nimfal. Pel contrari, l'expressió de BgE74A augmenta en el moment en que la 20E ha assolit la màxima concentració en hemolimfa, es a dir a partir de dia quatre a cinquena fase, i a partir de dia sis en la sisena fase nimfal.

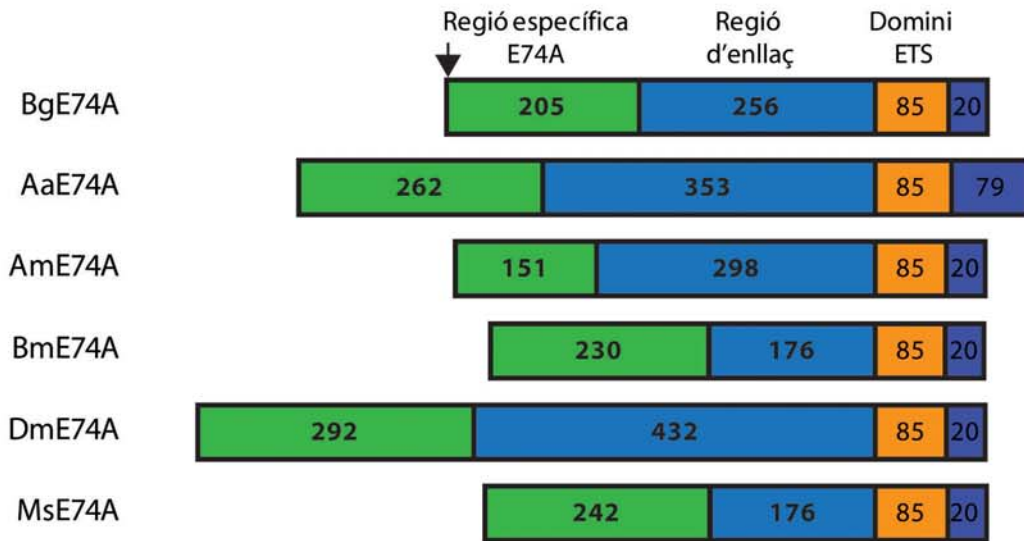
Taula 4.2. Percentatges d'identitat del domini d'unió a DNA de tipus ETS d'E74 de diferents espècies d'insectes i vertebrats en relació a BgE74 de *Blattella germanica*. Les seqüències es van alinear amb el programa Clustal X i els percentatges d'identitat es van obtenir amb el programa Genedoc. Els diferents homòlegs d'E74 es van ordenar segons el percentatge d'identitat del domini ETS.

Espècie	Ordre	Domini ETS
<i>Tribolium castaneum</i>	Coleoptera	97,6
<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera	97,6
<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	97,6
<i>Manduca sexta</i>	Lepidoptera	97,6
<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera	95,3
<i>Aedes aegypti</i>	Diptera	95,3
<i>Anopheles gambiae</i>	Diptera	94,1
<i>Mus musculus</i>	Rodentia	82,4

4.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha descrit el clonatge i l'anàlisi estructural de dues isoformes del factor de transcripció E74 de *B. germanica*, BgE74A i BgE74B. Les dues isoformes presenten una regió C-terminal comuna, que inclou el domini d'unió a DNA de tipus ETS característic dels membres d'aquesta família, i la regió N-terminal específica de cada isoforma. En la resta d'insectes on

A

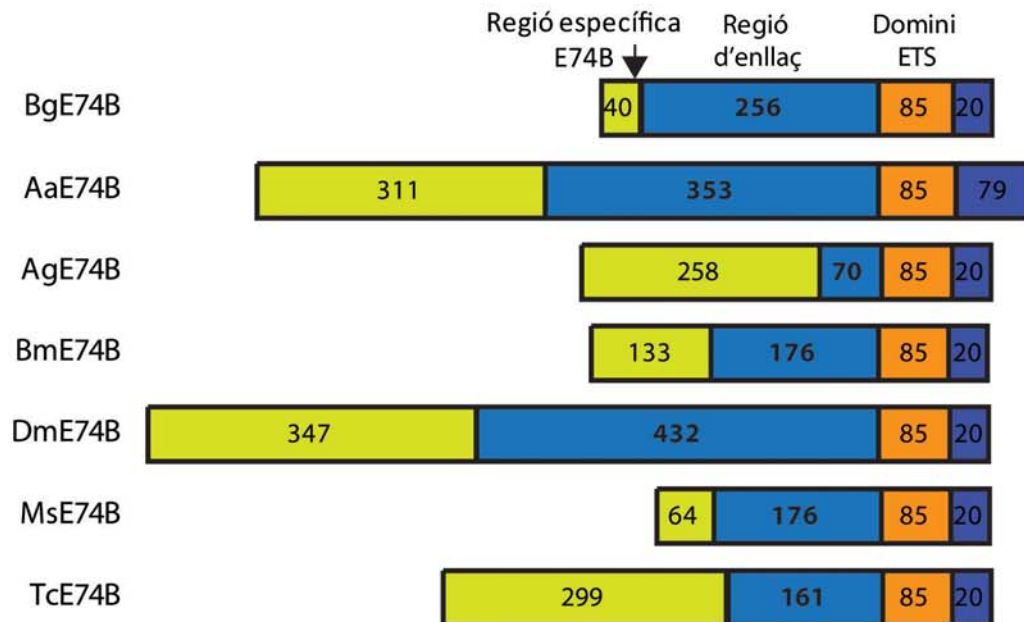


B

```

BgE74A MFFIDLDLWCFINDGKMY--DPSQCLQ---Q
AmE74A MFFIDLDLWCFINDGKMY--DITQCLQ---E
BmE74A MFFIDLEW-WSAENGRMY--DLSNCLQGQFQD
MsE74A MFFIDLEW-WSAENGRMY--DLSNCLQ---FQD
DmE74A MFFIDLALLWCFINDGRINGGLDITGTCIADDSTA
AaE74A MFFIDLDLWCFINDIRMA---DIQACLQEANNP
AgE74A MFFIDLDLWSPINDGRMY--DIQACLQTESNQ
    
```

C



D

```

BgE74B -----KNCKFYKKSIMRRYL
TcE74B GTESDDTEEKIIQEGADCFYKKSILKRC-
BmE74B -----EALTGKLYKKSIMKRYM
MsE74B -----DAISGKLYKKSIMKRYM
DmE74B QCERARMRLKPERKAERSAAYKKSIMKRYY
AaE74B GLDSDGV-----FRDRQGFYKKSIMKRYL
    
```

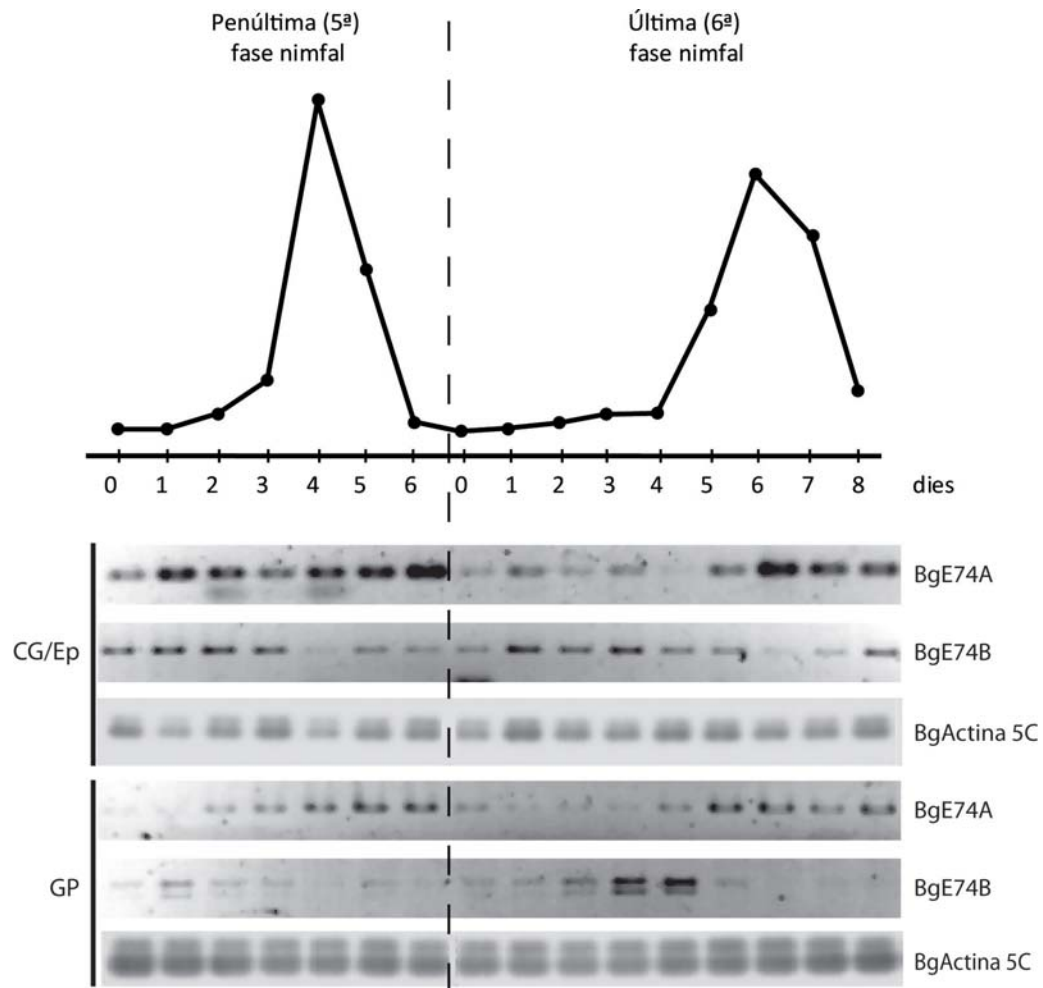


Figura 4.4. Patrons d'expressió de les isoformes del factor de transcripció BgE74 en diferents teixits durant les dues darreres fases nimfals a *B. germanica*. L'amplificació de cada transcrit es va dur a terme mitjançant la tècnica de RT-PCR a partir de la mateixa quantitat d'RNA que es va extreure de glàndules protoràciques (GP) i cos gras amb epidermis (CG/Ep). Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C en cada teixit. En la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E segons Cruz *et al.* (2003). Els nivells presentats són representatius de tres rèpliques.

Figura 4.3. Comparació dels dominis estructurals de les dues isoformes de BgE74 respecte els E74 d'altres espècies d'insectes. (A) Esquema de les diferents isoformes d'E74A d'insectes. (B) Alineament dels aminoàcids conservats de la regió específica de les isoformes d'E74A. (C) Esquema de les isoformes d'E74B d'insectes. (D) Alineament dels aminoàcids conservats de la regió específica de les isoformes d'E74B. Les espècies comparades són *B. germanica* (BgE74), *T. castaneum* (TcE74), *A. mellifera* (AmE74), *D. melanogaster* (DmE74), *A. aegypti* (AaE74), *A. gambiae* (AgE74), *B. mori* (BmE74) i *M. sexta* (MsE74). Els noms dels dominis estructurals es troben indicats sobre de BgE74A i BgE74B. El número dins de cada requadre correspon al número d'aminoàcids que té cada domini en cada espècie. Les fletxes indiquen la posició de les regions conservades en cada regió específica d'isoforma.

s'havia clonat i caracteritzat aquest factor de transcripció (als dípters *D. melanogaster* i *A. aegypti* i als lepidòpters *M. sexta* i *B. mori*) s'han descrit les mateixes isoformes, amb l'excepció de l'himenòpter *A. mellifera* on només s'ha descrit l'isoforma A (Paul et al., 2005; Sekimoto et al., 2007; Stilwell et al., 2003; Sun et al., 2002; Thummel et al., 1990). L'estudi comparatiu de les seqüències de les isoformes de *B. germanica* amb els seus homòlegs en insectes ens confirma que el domini d'unió a DNA de tipus ETS és la regió més conservada, arribant fins a un 97,6 % d'identitat amb coleòpters, himenòpters i lepidòpters. En varis estudis de l'estructura del domini ETS, s'ha demostrat que hi ha una alta conservació estructural, formada per 3 helix- α i 4 lamines- β . El domini ETS s'uneix a una seqüència consens que té com a motiu central GGA, la resta de la seqüència està formada per 11 nucleòtids i varien entre cada membre de la família, en el cas de *DmE74* la seqüència que reconeix és 5'-AACCGGAAGTA-3'. El domini ETS també és una diana d'interacció amb altres proteïnes, de manera que aquestes poden regular la capacitat d'unió a DNA dels factors (Sharrocks, 2001; Sharrocks et al., 1997). Els membres de la família de factors de transcripció ETS es troben presents en tots els eucariotes amb l'excepció de llevats, fongs i plantes. El primer factor de transcripció descrit d'aquesta família es va descobrir per homologia amb un oncogen present en el virus aviar E26 (E Twenty-Six). Els diferents factors poden actuar tant com a activadors o com a repressors de l'expressió dels gens que regulen i s'han descrit una gran varietat de processos que regulen, entre ells hematopoesi, amniogènesi i càncer (Sharrocks, 2001). Mitjançant l'homologia de la seqüència del domini EST s'han identificat fins a vuit factors de transcripció ETS a *D. melanogaster*. Entre aquests, *E74*, *pointed* (*pnt*), *yan* i *Ets9D* (*D-elg*) han estat caracteritzats funcionalment i participen en diferents processos com la metamorfosi, oogènesi, neurogènesi, miogènesi i el desenvolupament de l'ull. Els altres quatre (*D-ets-3*, *D-ets-4*, *D-ets-6* i *Ets96B*) encara no han estat caracteritzats funcionalment (Hsu i Schulz, 2000).

A continuació, s'ha estudiat el patró d'expressió de les dues isoformes del factor de transcripció BgE74 durant les dues últimes fases nimfals de *B. germanica*. En primer lloc, al començament de les dues últimes fases nimfal s'expressa *BgE74B*, quan els nivells de 20E són baixos. A continuació, quan la concentració de 20E comença a augmentar, vers la meitat de cada fase nimfal, *BgE74B* deixa d'expressar-se i es comença a activar *BgE74A*. Aquests són els primers patrons d'expressió d'E74 descrits en un insecte hemimetàbol, ja que fins al moment només s'havien descrit en insectes holometàbols. El primer insecte on es va clonar va ser la mosca *D. melanogaster*, es van estudiar els patrons d'expressió d'E74 en larves i juntament amb els posteriors estudis d'incubació d'òrgans es va demostrar que a concentracions baixes de 20E s'indueix l'expressió de *DmE74B* i a concentracions altes s'activa *DmE74A* i s'inhibeix *DmE74B* (Karim i Thummel, 1991). Durant La última fase larval s'expressa *DmE74B* i al final, quan hi ha

l'augment de concentració de 20E, que indueix la formació de la pupa, es comença a expressar *DmE74A* (Fletcher et al., 1997). A continuació, es va estudiar en un altra dípter, el mosquit *A. aegypti*. Les dues isoformes d'*AaE74* s'expressen al cos gras i els ovaris del mosquit adult i l'expressió de les isoformes és diferent durant el cicle. Primer s'expressa *AaE74B*, amb nivells baixos d'ecdisteroides circulants i al final del cicle, quan augmenten els nivells d'ecdisteroides a l'hemolimfa s'expressa *AaE74A* (Sun et al., 2002). En cultius *in vitro* s'ha vist que les dues isoformes s'activen per la 20E, però que *AaE74B* ho fa a concentracions més baixes de 20E que les que necessita *AaE74A* (Sun et al., 2004). Més endavant es van caracteritzar els patrons d'expressió en el lepidòpter *M. sexta*, obtenint uns resultats semblants. Així, *MsE74B* s'expressa a l'epidermis durant els primers dies de larva i pupa, quan els nivells de 20E estan pujant i *MsE74A* s'expressa al final del cicle quan els nivells de 20E han arribat al màxim i comencen a caure (Stilwell et al., 2003). Per últim, s'ha estudiat l'expressió de les dues isoformes en la glàndula productora de seda d'una altra lepidòpter, *B. mori*, i s'ha demostrat que la 20E activa l'expressió de *BmE74A in vitro*, però no activa l'expressió de *BmE74B* si no és en presència de cicloheximida (Sekimoto et al., 2007).

Un cop clonat el factor de transcripció *BgE74* ja s'han caracteritzat tots els gens primerencs a l'insecte hemimetàbol *B. germanica*. D'aquesta manera, s'ha pogut comprovar que la presència de 20E durant l'última fase nimfal activa una cascada de transcripció de diferents factors que regulen l'expressió de gens tardans i processos com ara la muda. D'aquesta manera es produeix l'activació seqüencial dels següents receptors nuclears *BgE75A*, *BgHR3*, *BgHR4* i *BgFtz-F1*. *BgE75A* s'expressa a partir del quart dia de la última fase nimfal, quan comencen a augmentar els nivells de 20E, i inhibeix l'expressió de *BgHR3*. Quan els nivells de *BgE75A* comencen a caure, a partir del sisè dia, es comença a expressar *BgHR3*, que activa l'expressió de *BgHR4* i *BgFtz-F1*. *BgHR4* inhibeix l'expressió de *BgE75A* i també activa la de *BgFtz-F1*, que és necessari perquè es produeixi la muda (Cruz et al., 2007; 2008; Mane-Padros, 2007; Mane-Padros et al., 2008; 2010). Els patrons d'expressió de *BgE74A* i *BgE74B*, juntament amb els resultats obtinguts en altres insectes, suggereixen que *BgE74B* actuaria com a repressor de gens tardans durant els primers dies de cada fase nimfal i que *BgE74A* actuaria com a activador al final de la fase. En aquest punt s'ha d'establir el paper que exerceixen els dos factors de transcripció en l'eix transcripcional activat per 20E.

5. ANÀLISI FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E74
A B. germanica

5.1. ANTECEDENTS

Durant la sisena i última fase nimfal de *B. germanica*, tenen lloc diferents processos controlats per la 20E, que donaran lloc a la formació de l'adult i que inclouen l'aparició d'ales, genitalia funcional i una pigmentació específica de la cutícula. La regulació d'aquests processos té lloc a través de la cascada de senyalització de la 20E, que s'uneix al seu receptor, format per EcR i USP, i que activa una sèrie de gens primerencs, entre els quals es troba el factor de transcripció E74. En el capítol anterior hem descrit el clonatge de dues isoformes d'E74 a *B. germanica*, anomenades BgE74A i BgE74B, i hem demostrat que ambdues isoformes s'expressen a diferents teixits durant la penúltima i la última fase nimfal. L'objectiu d'aquest capítol és estudiar la funció de BgE74 durant el desenvolupament postembrionari de *B. germanica* mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*.

Fins al moment només s'ha descrit el mutant d'E74 a *D. melanogaster*. Així, en aquesta mosca s'ha vist que DmE74 és essencial durant la metamorfosi, ja que tant els mutants de DmE74A com els de DmE74B no superen l'estat de pupa (Fletcher et al., 1995). També s'ha demostrat que DmE74B actua com a repressor i que DmE74A actua com activador, i que el canvi en la seva expressió, durant la última fase larval, és indispensable perquè s'expressin els gens tardans en la pupa (Fletcher et al., 1997). També s'ha demostrat que DmE74A està implicat en processos d'apoptosi, ja que és necessari per a l'expressió d'un gen activador de la mort cel·lular programada, *head involution defective (hid)*, en les glàndules salivals de la mosca (Jiang et al., 2000). Per altra part, E74 també ha estat estudiat al mosquit *A. aegypti*, on AaE74B és necessari per l'expressió del gen de la *vitel·logenina* en les femelles adultes del mosquit. Pel contrari, AaE74A no regula l'expressió d'aquest gen (Sun et al., 2005).

En el present capítol es descriu l'estudi funcional del factor de transcripció BgE74, demostrant que la interferència de les dues isoformes alhora produeix alteracions en l'ècdisi i alteracions en el patró de pigmentació de l'adult. En aquest sentit, per tal d'estudiar el paper que juga BgE74 sobre la pigmentació de la panerola es va realitzar el clonatge i caracterització del cDNA de la *dopa decarboxilasa (DDC)*, un dels enzims implicats en la via de pigmentació en els insectes i que s'ha demostrat que la seva activació transcripcional està sota l'efecte de la 20E. Finalment, es va estudiar la funció de BgDDC en la pigmentació de la panerola mitjançant la tècnica del RNAi *in vivo* i es demostrà que el factor de transcripció BgE74 regula l'expressió de l'mRNA de la BgDDC.

5.2. RESULTATS

5.2.1. El RNAi *in vivo* redueix els nivells de missatger de BgE74 en nimfes de *B. germanica*

L'estudi funcional del factor de transcripció BgE74 es va dur a terme mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*. Aquesta tècnica va ser posada a punt i utilitzada anteriorment en el laboratori per l'estudi funcional dels components del receptor heterodimèric de la 20E, BgEcR-A i BgRXR (Cruz et al., 2006; Martin et al., 2006) així com dels receptors nuclears BgHR3, BgE75, BgHR4 i BgFtz-F1 (Cruz et al., 2007; 2008; Mane-Padros, 2007; Mane-Padros et al., 2008). Per silenciar les dues isoformes de BgE74 alhora es va utilitzar un fragment de dsRNA sintetitzat a la part comuna de BgE74 de 578 parells de bases (dsBgE74, Figura 5.1A). En primer lloc, per comprovar l'eficàcia de l'RNAi, es van injectar 3 µg de dsBgE74 a nimfes de sisena fase recentment emergides. Degut a la diferent expressió de les isoformes de BgE74 (vegeu fig 4.4) es va analitzar en l'epidermis amb cos gras de femelles de sisena fase nimfal la caiguda dels nivells d'expressió de BgE74A set dies després de la injecció (Figura 5.1C) i de BgE74B, tres dies després (Figura 5.1B). Tal i com es pot veure a les figures 5.1B i C, el tractament amb dsBgE74 va ser efectiu i va disminuir significativament els nivells d'mRNA de les dues isoformes.

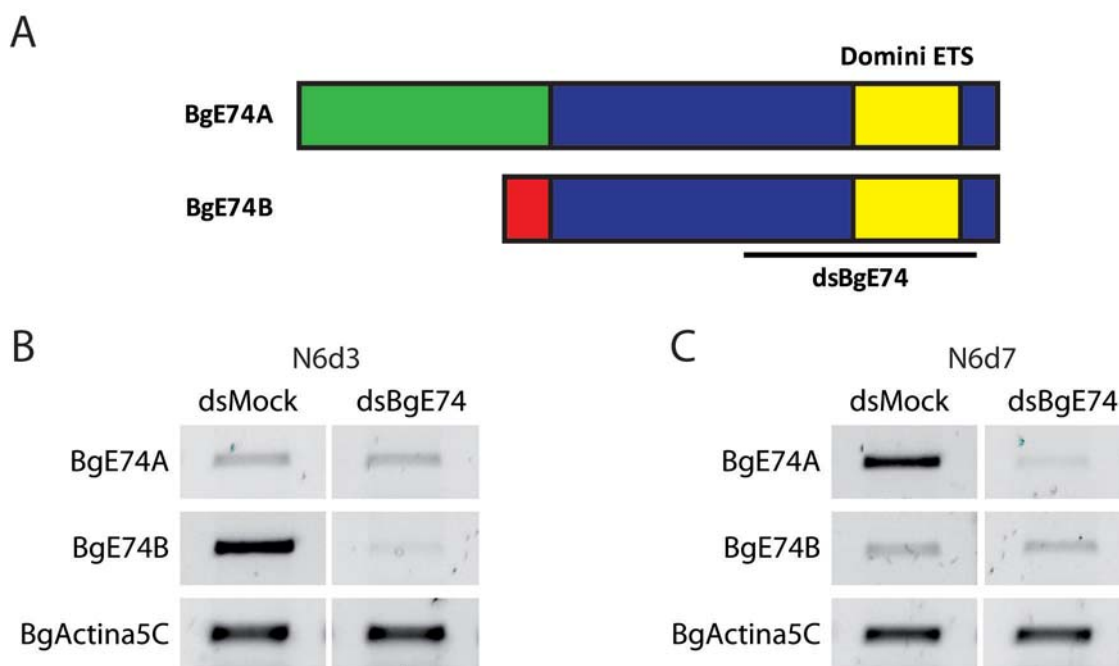


Figura 5.1. Interferència del factor de transcripció BgE74 mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo* en femelles de sisena fase nimfal de *B. germanica*. (A) Esquema de BgE74 on es mostra la regió utilitzada per preparar el dsRNA (dsBgE74). (B) Efecte del tractament amb dsBgE74 sobre els nivells de BgE74A, BgE74B i BgActina5C. S'injectava 3 µg de dsBgE74 o dsMock com a control negatiu en femelles de sisena fase nimfal recentment emergides i es mesuraven els nivells d'mRNA tres i sis dies després mitjançant RT-PCR en l'epidermis amb el cos gras adherit. Els nivells de BgActina5C es van mesurar com a referència.

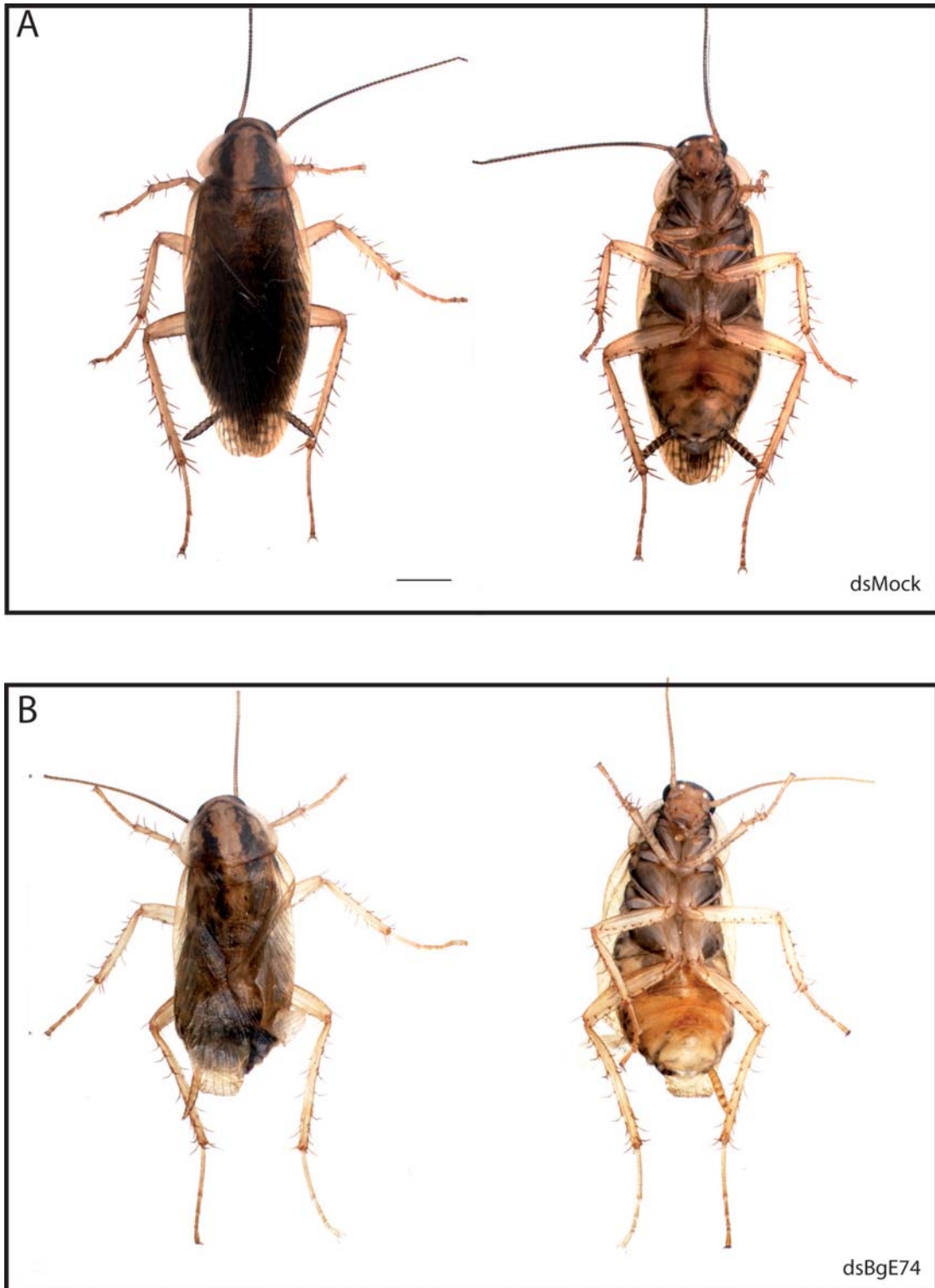


Figura 5.2. Efecte del silenciament de BgE74 sobre la muda imagnal de *B. germanica*. Es van tractar femelles de sisena fase nimfal amb 3 μ g de dsBgE74 o dsMock i es van analitzar després de la muda imagnal. (A) Visió dorsal (esquerra) i visió ventral (dreta) d'una femella tractada amb dsMock, representant l'aspecte normal d'un adult. (B) Visió dorsal (esquerra) i visió ventral (dreta) d'una femella tractada amb dsBgE74 on es poden observar les alteracions en el desplegament de les ales i de les quetes de les potes. Escala: 2 mm.

5.2.2. Anàlisi fenotípica de les nimfes de sisena fase tractades amb dsBgE74

Un cop demostrada l'eficiència de la interferència de BgE74 mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*, vam estudiar la funció d'aquest factor de transcripció durant la sisena fase nimfal de *B. germanica*. Així, el 95% de les nimfes de sisena fase tractades amb 3 µg de dsBgE74 (n=147) i totes les tractades amb dsMock (n=50) van mudar a adult vuit dies després de l'aplicació. Un 5% de les femelles tractades amb dsBgE74 no van poder completar l'ècdisi correctament, sent incapaces de desprendre's totalment de l'exúvia nimfal i morint 9-10 dies després de l'administració del dsRNA (Taula 4.1 i Figura 5.2). Remarcablement, el 64% de les femelles tractades amb dsBgE74 que mudaven a adult presentaven clares alteracions morfològiques associades a problemes durant l'ècdisi, que incloïen un desplegament incorrecte, tant morfològicament com en relació a l'orientació, de les ales (Figura 5.3A). A més, els adults interferits presentaven deformacions de les quetes dels tres parells de potes. Així, les quetes de les femelles interferides per BgE74 en comptes de ser rectes i turgents estaven torçades i presentaven menys turgència (Figura 5.3B).

Taula 5.1. Efecte del silenciament de BgE74 en de femelles de sisena fase nimfal de *B. germanica* sobre la muda imaginal.

Tractament	n	muda completa	problemes ècdisi	muda incompleta
dsMock	50	100%	0%	0%
dsBgE74	147	95%	64%	5%

Remarcablement, també es va observar una alteració en la locomoció en totes les femelles adultes tractades amb dsBgE74. Així, cap d'elles era capaç de pujar superfícies llises, com ara vidre, en canvi sí que podien pujar superfícies poroses com el paper. Per tal d'analitzar en detall aquest fenotip es va dissenyar un assaig d'escalada utilitzant la geotaxi negativa que presenten els insectes. L'assaig va consistir en anestesiar femelles adultes de *B. germanica* mitjançant un flux continu de CO₂ i a continuació es van dipositar en el fons d'un recipient de vidre tubular de 30 cm. Passats dos minuts es van contar el nombre de femelles que es trobaven per sobre d'una marca situada a 10 cm del fons del recipient. El 96% de les femelles tractades amb dsMock es trobaven per sobre de la marca dos minuts després de ser col·locades al fons del recipient. En canvi, només un 6% de les femelles tractades amb dsBgE74

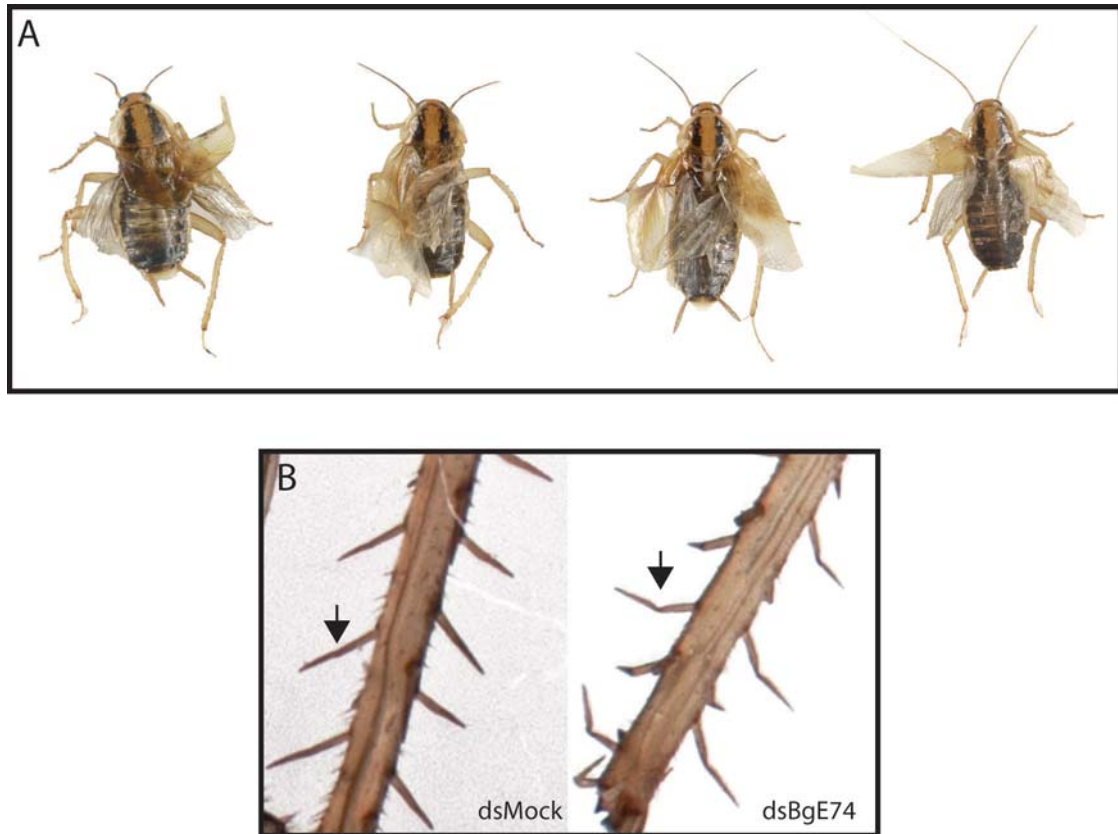
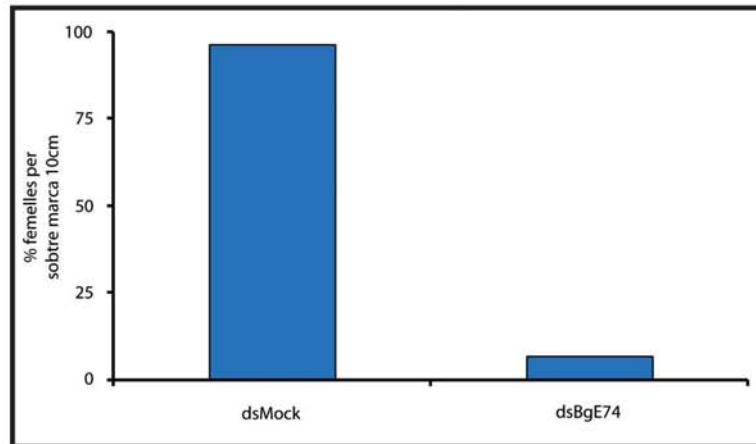


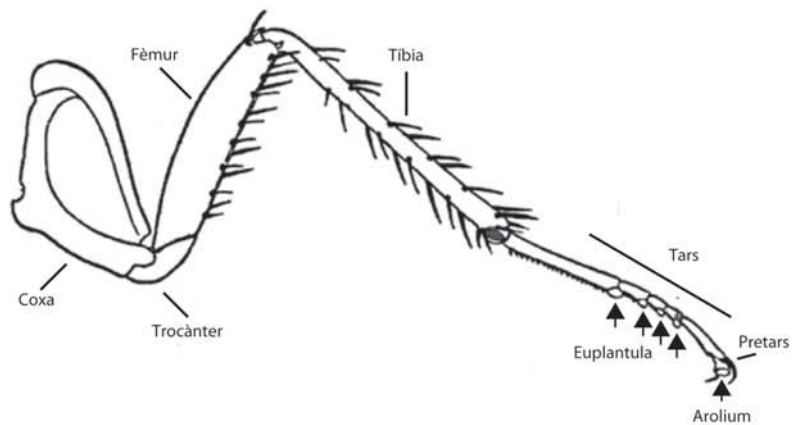
Figura 5.3. Alteracions en l'ècdisi degut al silenciament de BgE74. Les femelles de sisena fase tractades amb 3 μg de dsBgE74 presenten alteracions morfològiques associades a l'ècdisi. (A) Problemes en el desplegament correcte de les ales. (B) Detall d'unes quetes d'una femella tractada amb dsMock (dreta) i quetes d'una femella tractada amb dsBgE74 (esquerra). Les fletxes indiquen la posició de les quetes.

es trobava per sobre la marca (Figura 5.4A). Per tal d'entendre el motiu d'aquesta afectació es va realitzar una observació més detallada de les potes de les femelles adultes tractades amb dsBgE74, demostrant que les estructures encarregades de l'adhesió a superfícies durant la locomoció estaven clarament afectades. Aquestes estructures consisteixen en uns coixinets que es troben a la part més distal de la pota. Concretament, al tars n'hi ha quatre anomenats euplantules i al pretars un més, anomenat aròlium, sent aquest el més distal de tots (Clemente i Federle, 2008) (Figura 5.4B). L'adhesió a superfícies rugoses, pel contrari, no requereix d'aquestes estructures ja que la majoria d'insectes utilitzen uns ganxos situats al pretars que els permeten agafar-se en aquests tipus de superfícies. Una observació en detall de les euplantules i els aròliums de les femelles tractades amb dsBgE74 respecte les tractades amb dsMock ens va indicar clarament una afectació en les característiques morfològiques

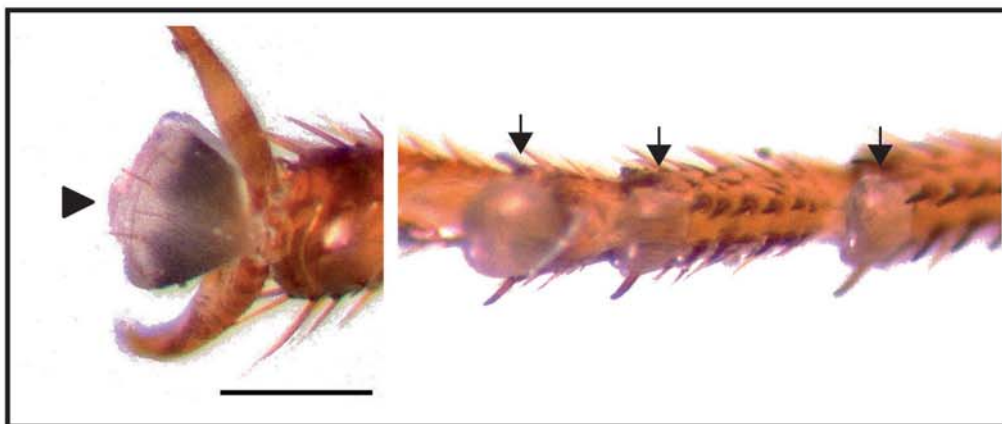
A



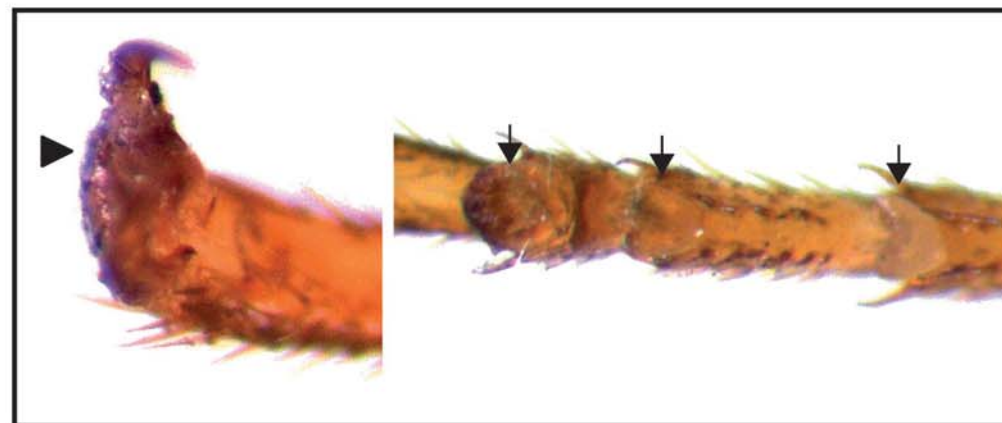
B



C



D



d'aquestes estructures en els tres parells de potes de la panerola, sent les de les femelles interferides per BgE74 menys turgents que les tractades amb dsMock (Figura 5.4C-D).

Aquests resultats indiquen que BgE74 està implicat en processos concrets associats a la muda, com el desenvolupament de les estructures d'adhesió en les potes de l'adult i el desplegament de les ales i les tegmines així com la correcta formació de les quetes de les potes. Per tal de comprovar si aquests efectes eren específics de la muda imaginal o pel contrari també afectava aquests mateixos processos en les diferents mudes entre fases nimfals, es van tractar femelles recentment emergides de quarta i cinquena fase amb dsBgE74 i dsMock. Remarcablement, totes les femelles de quarta fase nimfal (n=20) van mudar a cinquena fase després de sis dies i les femelles de cinquena fase nimfal (n=25) van mudar a sisena després de sis dies, sense observar diferències ni morfològiques ni entre la durada de les fases nimfals de les femelles tractades amb dsBgE74 i dsMock. Les femelles tractades amb dsBgE74 no van presentar problemes d'ècdisi, ni problemes en les estructures d'adhesió ni durant la cinquena ni durant la sisena fase nimfal. Aquest resultat indica que BgE74 regula el desenvolupament morfològic de les estructures d'adhesió de *B. germanica* exclusivament en la formació de l'adult, fet que suggereix que durant la muda imaginal tenen lloc una sèrie de processos específics de la morfogènesi adulta.

5.2.3. BgE74 afecta el patró de pigmentació en l'insecte hemimetàbol *B. germanica*

En els insectes, just després de la muda es produeix la esclerotització de la nova cutícula. Durant aquest procés químic, la cutícula recentment sintetitzada passa de ser un material flexible a un de més dur i rígid. Paral·lelament, també es produeix la pigmentació de la nova cutícula, la qual varia de ser incolora a tenir una varietat de marrons i negres en funció de la fase del desenvolupament (Yersen, 2005) (Figura 5.5). En el cas de *B. germanica*, un cop

Figura 5.4. Efecte del tractament amb dsBgE74 sobre les estructures de locomoció i adhesió. (A) Percentatge de femelles que superen la marca de 10 cm en l'experiment d'escalada realitzat en un pot tubular de vidre amb femelles adultes tractades amb dsMock (n=10) o amb dsBgE74 (n=25). (B) Esquema d'una pota d'insecte on s'indica el nom de cada part. Les fletxes indiquen la posició de les euplantules i dels aròliums. (C) Detall d'un aròlium (esquerra) i detall de les euplantules (dreta) d'una femella adulta tractada amb dsMock que corresponen a l'aspecte normal de les estructures de locomoció de *B. germanica*. (D) Detall d'un aròlium (esquerra) i detall de les euplantules (dreta) d'una femella adulta tractada amb dsBgE74. Les fletxes indiquen la posició de les euplantules i el cap de fletxa la de l'aròlium a C i D. Escala: 0,2mm.

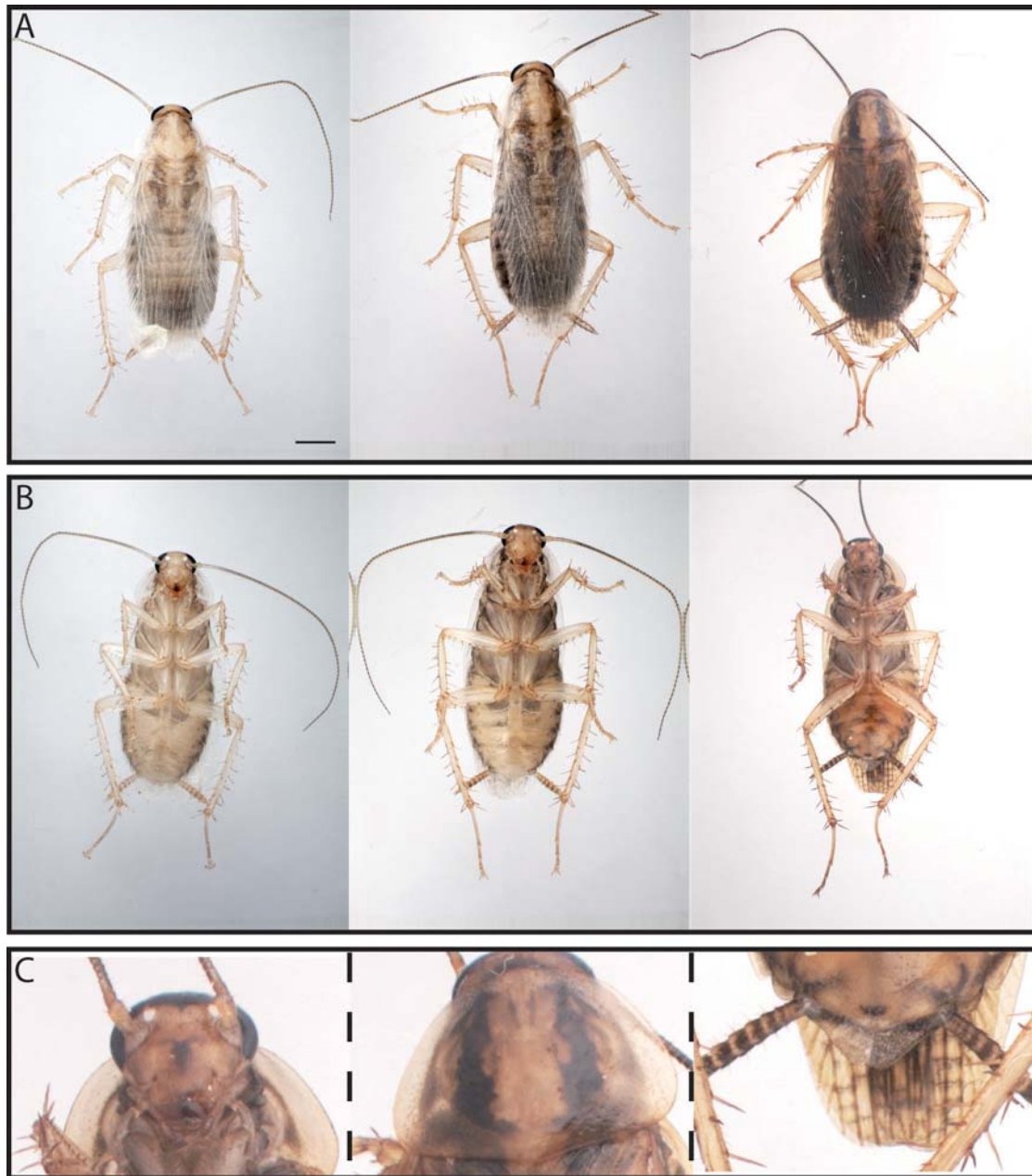


Figura 5.5. Procés de pigmentació després de la muda imaginal a *B. germanica*. (A) Visió dorsal d'una femella, acabada de mudar (esquerra), una hora després de la muda imaginal (centre) i tres hores després de la muda imaginal (dreta). (B) Visió ventral, una hora després de mudar (centre) i color final (dreta). (C) Detall de la pigmentació de la panerola. Taca del cap entre els ocells (esquerra), bandes negres en el pronot (centre) i bandes dels cercs (esquerra).

es produeix la muda imaginal les femelles presenten una cutícula de color marró amb un patró d'acumulacions de pigment negra en algunes zones, en contraposició a la cutícula negra que caracteritza les nimfes. Les zones més destacables de l'adult amb pigment negre són, en primer lloc una taca situada en el cap, entre els ocells i en segon lloc, dues línees de pigment negres situades en el pronot i per últim, unes bandes negres presents als cercs (Figura 5.5C).

Remarcablement, es va observar que, a part dels problemes associats a l'ècdisi i l'adhesió, les femelles tractades amb dsBgE74 no presentaven la mateixa pigmentació que les tractades amb dsMock. La seva cutícula era molt més pàl·lida, variant dels tons marrons als groguencs, les antenes i els èlitres també eren més clars que els de les femelles tractades amb dsMock (Figura 5.2). A més, les zones de pigmentació negra eren molt reduïdes, com en el cas del pronot o gairebé inexistents com la de la taca entre els ocells (Figura 5.6A) o la pigmentació característica de les antenes (Figura 5.6B) i els cercs (Figura 5.6C).

5.2.3.1. Clonatge i patrons d'expressió de l'enzim dopa decarboxilasa a *B. germanica*.

Degut a l'alteració en el patró de pigmentació de la cutícula, vam decidir estudiar en més detall el mecanisme molecular d'acció de BgE74 sobre aquest procés. En els insectes, els mecanismes moleculars de la pigmentació han estat estudiats especialment en el dípter *D. melanogaster* i en els lepidòpters *Papilio xuthus* i *M. sexta* (Futahashi i Fujiwara, 2005; Hiruma i Riddiford, 2009; Hodgetts i O'Keefe, 2006). Així doncs, el patró de pigmentació en els insectes depèn de l'acció de diferents enzims que sintetitzaran la melanina i els diferents pigments derivats de la tirosina. A *D. melanogaster*, aquesta via té tres bifurcacions que produeixen tres pigments diferents: negre, marró i groc (Wittkopp et al., 2002) (Figura 5.7A). La pigmentació de la cutícula està controlada principalment pels enzims tirosina hidroxilasa (TH) i dopa decarboxilasa (DDC) que successivament converteixen la tirosina en dopa i aquesta en melanina dopamina, el pigment predominant en la cutícula dels insectes (Hiruma et al., 1985; Wright, 1987). A continuació, Ebony, una N- β -alanil dopamina sintasa, converteix la dopamina en el precursor del pigment groc. Així, els mutants d'Ebony augmenten la quantitat de pigment negre (Koch et al., 2000). Per altra part, també es pot trobar l'enzim Yellow, que metabolitza derivats de la dopa, per tant els seus mutants no presenten pigments negres (Han et al., 2002).

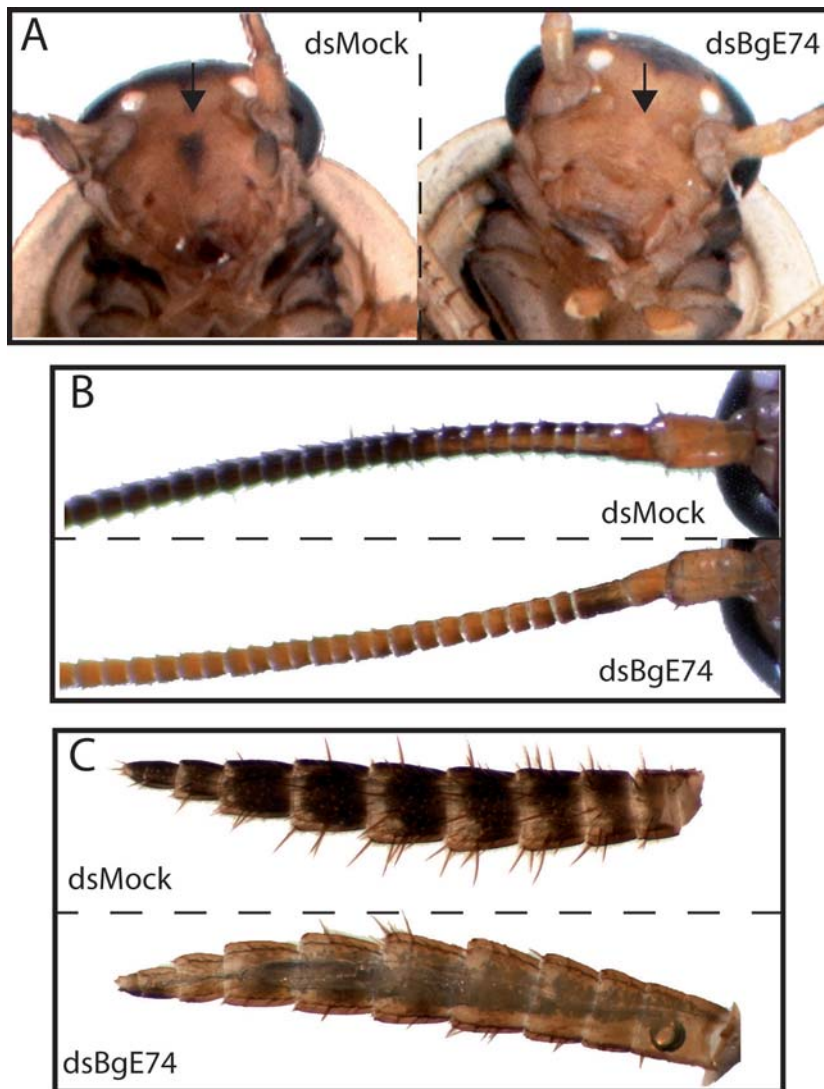


Figura 5.6. Alteracions en el patró de pigmentació de les femelles tractades amb dsBge74. (A) Detall del cap d'una femella adulta tractada amb dsMock (esquerra) i d'una femella adulta tractada amb dsBge74 (dreta). La fletxa indica la taca de pigmentació negra situada entre les antenes. (B) Detall de les antenes d'una femella adulta tractada amb dsMock (imatge superior) i d'una femella adulta tractada amb dsBge74 (imatge inferior). (C) Detall d'un cerc d'una femella adulta tractada amb dsMock (imatge superior) i d'una femella adulta tractada amb dsBge74 (imatge inferior).

En la via de pigmentació dels insectes que acabem de descriure, s'ha demostrat que la *DDC* és un dels gens tardans induïts per la 20E. Així, a *D. melanogaster*, s'ha comprovat que la *DDC* s'activa a través del receptor de la 20E (Chen et al., 2002b) i que un dels factors implicats en la seva regulació és Br-C (Chen et al., 2002a). A *M. sexta*, també s'ha estudiat la cascada de factors de la 20E que regulen l'expressió de *DDC*. MsHR4 i MsE75B inhibeixen la *DDC*, tot i que encara no es coneixen amb detall tots els factors implicats (Hiruma i Riddiford, 2007). Donada la dependència de la *DDC* a l'acció de la 20E vam decidir caracteritzar-la per tal d'estudiar la relació

entre BgE74 i la via de pigmentació. És per això, que en primer lloc es va clonar un fragment de la seqüència de la DDC en el nostre insecte model, *B. germanica*. Per aconseguir-ho es van dissenyar uns oligonucleòtids degenerats en zones conservades de les seqüències de DDC disponibles a insectes i es va clonar un fragment de 290 parells de bases (96 aminoàcids), que un cop analitzats es va confirmar que eren de la DDC de *B. germanica* (BgDDC) (Figura 5.7B).

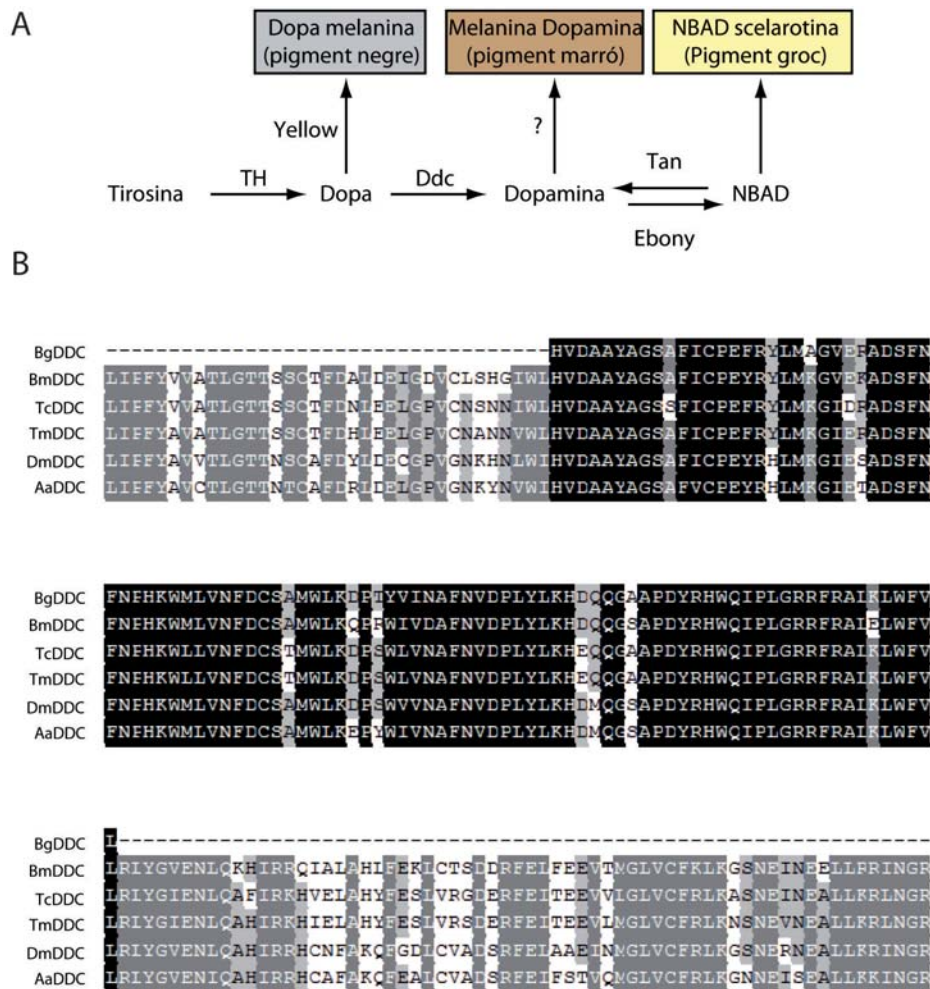


Figura 5.7. Pigmentació en insectes i seqüència parcial de la BgDDC. (A) Esquema del mecanisme molecular de pigmentació en insectes. Adaptat de (Wittkopp et al., 2002) (B) Alineament de la seqüència obtinguda de la DDC de *Blattella germanica* (BgDDC) amb la dels insectes on ha estat clonada, *B. mori* (BmDDC), *T. castaneum* (TcDDC), *Tenebrio molitor* (TmDDC), *D. melanogaster* (DmDDC) i *A. aegypti* (AaDDC).

A continuació, es van caracteritzar els nivells d'expressió de l'mRNA de BgDDC a l'epidermis de *B. germanica* durant la última fase nimfal i un dia després de mudar a adult. Els nivells d'mRNA de BgDDC oscil·len segons els nivells de 20E, la concentració de l'mRNA de

BgDDC disminueix quan augmenta la concentració de 20E. Així, els nivells més alts es donen al començament i al final de la última fase nimfal, mentre que quan es dona el pic de 20E els nivells d'expressió disminueix (Figura 5.8). Aquest patró d'expressió suggereix una regulació de la BgDDC per part de la 20E.

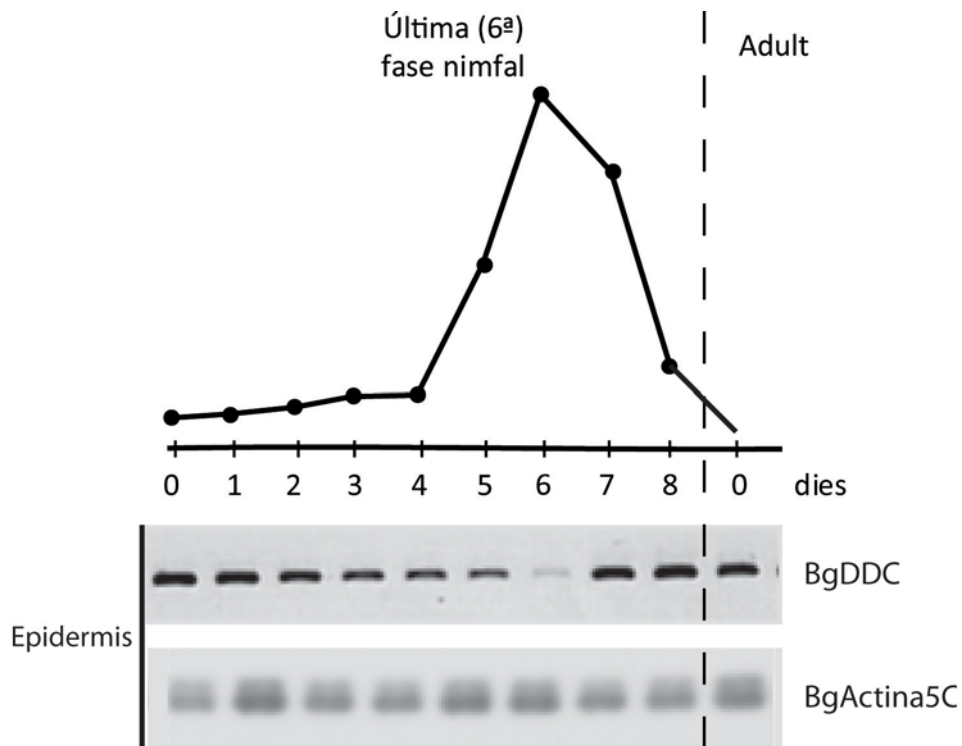


Figura 5.8. Patró d'expressió de la BgDDC durant la darrera fase nimfal de *B. germanica*. Patró d'expressió de la BgDDC durant la última fase nimfal de la panerola. L'amplificació de cada transcrit es va realitzar mitjançant RT-PCR a partir de la mateixa quantitat d'RNA que es va extreure d'epidermis. Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C. En la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E segons Cruz *et al.* (2003). Cada mostra és representativa de dos rèpliques.

En primer lloc, per tal de comprovar si la BgDDC a *B. germanica* està involucrada en la pigmentació de l'estadi adult, es van reduir els nivells d'mRNA de BgDDC mitjançant RNAi *in vivo*. Així doncs, es va dissenyar un dsRNA de 205 pb que vam anomenar dsBgDDC. Es van tractar femelles de *B. germanica* de sisena fase nimfal recentment emergides amb 2 µg de dsBgDDC i cinc dies després es va comprovar l'eficiència de la interferència analitzant els nivells d'mRNA de BgDDC en l'epidermis. Tal i com es pot veure a la Figura 5.9, la interferència és efectiva i els nivells d'mRNA de BgDDC són significativament més baixos en les femelles tractades amb dsBgE74 que en les tractades amb dsMock.

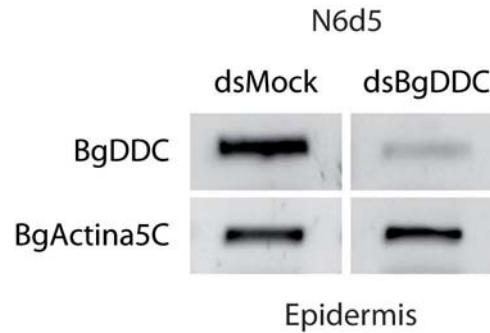


Figura 5.9. Silenciament de BgDDC mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo* en femelles de sisena fase nimfal de *B. germanica*. Efecte del tractament amb dsBgDDC sobre els nivells de BgDDC i BgActina5C. Es van injectar 2 µg de dsBgDDC o bé dsMock a femelles de sisena fase recentment emergides i es van analitzar els nivells d'mRNA cinc dies després en l'epidermis. Els nivells de BgActina5C es van mesurar com a referència. Cada mostra és representativa de cinc rèpliques.

Un cop confirmada l'efectivitat del dsBgDDC, es va estudiar el seu efecte durant el procés de pigmentació que té lloc en la muda imagnal. Es van tractar femelles d'última fase nimfal amb 2 µg de dsBgDDC o amb dsMock i es va observar el desenvolupament durant la sisena fase nimfal. Vuit dies després, tots les femelles tractades amb dsBgDDC (n=45) i amb dsMock (n=10) van mudar a adult. No obstant, les femelles adultes que havien estat tractades amb dsBgDDC no pigmentaven correctament la cutícula, presentant una cutícula molt més pàl·lida que les femelles dsMock, i les zones amb taques de pigmentació negra estaven reduïdes. Concretament, no presentaven la taca entre les antenes, les línees del pronot estaven reduïdes, i tan les dels cercs com les de les antenes eren més clares (Figura 5.9). Així doncs, el fenotip obtingut en interferir BgDDC és semblant al fenotip de la pigmentació de la interferència de BgE74, el que suggereix que els problemes de pigmentació que presenten les paneroles amb els nivells d'E74 reduïts es poden deure a una caiguda dels nivells de la BgDDC.

5.2.4.2. BgE74 regula l'expressió de la BgDDC a *B. germanica*

Un cop clonat un fragment de la BgDDC i comprovat tant el seu patró d'expressió com la seva funció en la pigmentació de *B. germanica* mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*, es va procedir a estudiar si el factor de transcripció BgE74 regulava l'expressió de la BgDDC tal i com

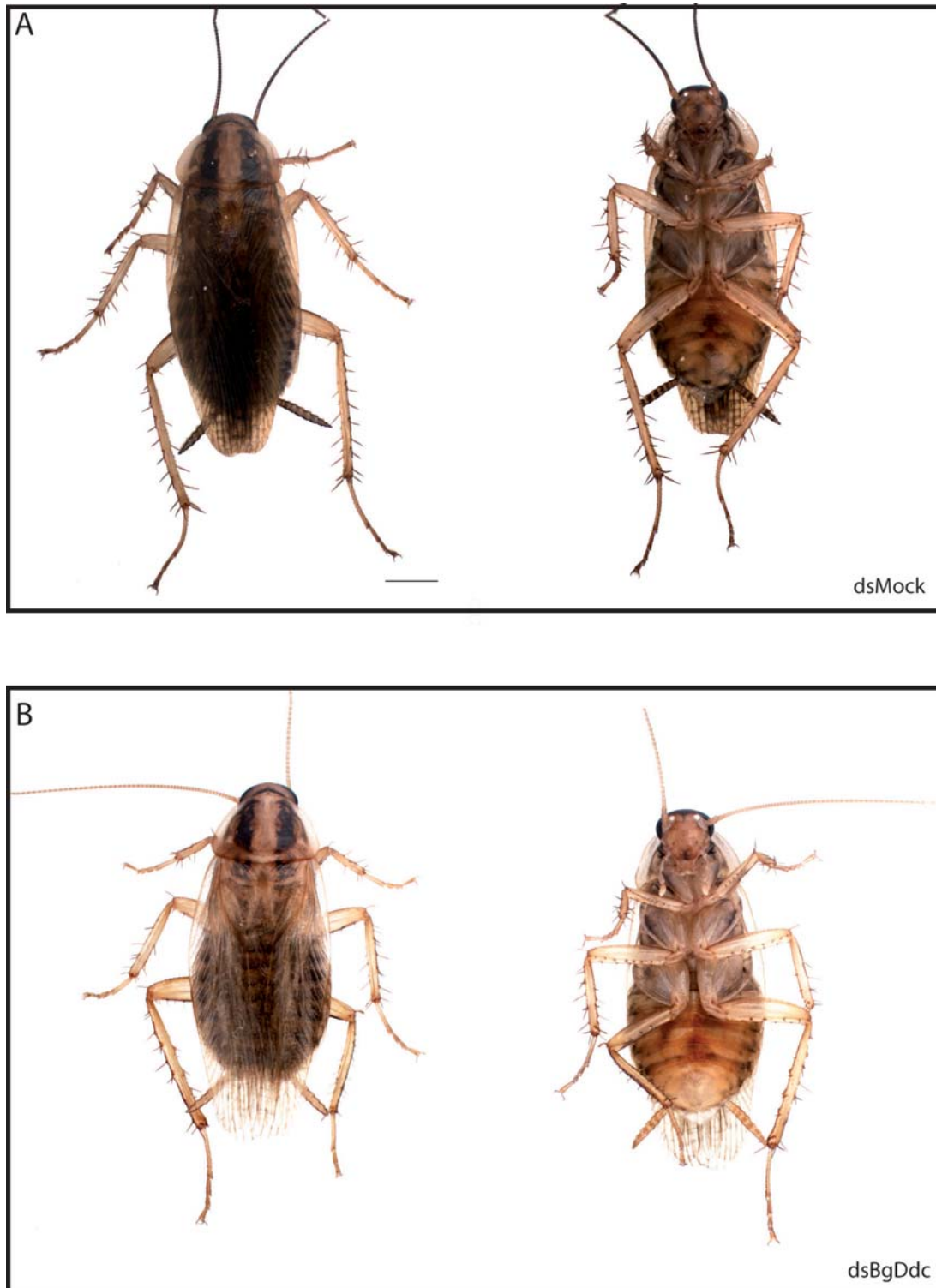


Figura 5.10. Efecte del silenciament de BgDDC en el patró de pigmentació de *B. germanica*. Es van tractar femelles de sisena fase nimfal amb 2 μg de dsBgDDC o dsMock i es van analitzar després de la muda imagnal. (A) Femella tractada amb dsMock, representant l'aspecte normal d'un adult. Visió dorsal (esquerra) i ventral (dreta). (B) Femella tractada amb dsBgDDC on es poden observar les alteracions en la pigmentació. Visió dorsal (esquerra) i ventral (dreta). Escala: 2 mm.

suggereixen els resultats anteriors. Per això, es van mesurar els nivells d'mRNA de BgDDC en l'epidermis de femelles tractades amb dsBgE74. Així, es van tractar femelles de sisena fase amb 3 µg de dsBgE74 o amb dsMock i es van analitzar els nivells d'mRNA de BgDDC mitjançant RT-PCR durant l'últim dia de sisena fase nimfal i els dos primers dies de la fase d'adult. L'expressió de l'mRNA de BgDDC de les femelles tractades amb dsBgE74 està reduïda en els tres dies analitzats respecte als nivells de les femelles tractades amb dsMock. Aquest resultat ens demostra que la interferència de BgE74 afecta els nivells d'expressió de la BgDDC.

A continuació, es van mesurar els nivells d'mRNA d'altres receptors nuclears implicats en la resposta de la 20E per tal de determinar l'eix regulador de l'expressió de la BgDDC. Els receptors nuclears que es van analitzar van ser BgE75A, BgE75B, BgHR3 i BgHR4, ja que formen l'eix regulador implicat en la regulació de la DDC a *M. sexta* (Hiruma i Riddiford, 2009). Així, l'últim dia de la sisena fase nimfal, els mRNA de BgE75A, BgE75B i BgHR4 s'expressen més en les femelles tractades amb dsBgE74 que en les tractades amb dsMock. En mudar a adult, l'expressió de BgHR3 i BgE75 és més baixa en les femelles tractades amb dsBgE74 respecte a les tractades amb dsMock.

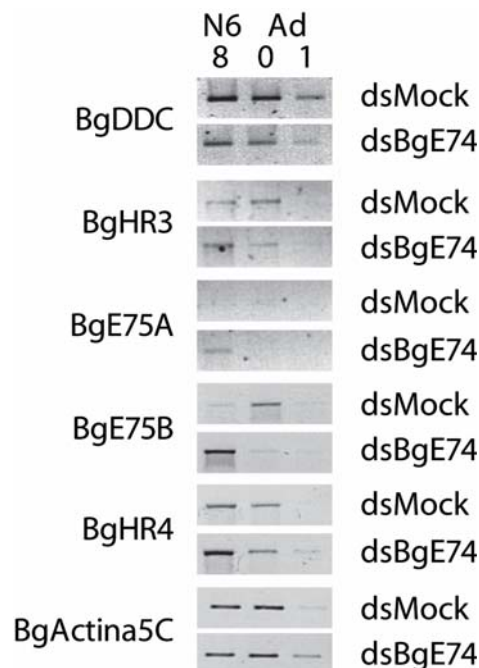


Figura 5.11. Efecte de la interferència de BgE74 sobre l'expressió de la BgDDC i sobre els receptors nuclears BgHR3, BgE75A, BgE75A i BgHR4 durant el final de la sisena fase nimfal a *B. germanica*. Les femelles de sisena fase nimfal recentment emergides van ser tractades amb 2 µg de dsBgE74 i es van mesurar els nivells d'mRNA dels diferents transcrits mitjançant RT-PCR vuit, nou i deu dies després. Els nivells de BgActina5C es van mesurar com a referència. Cada mostra és representativa de quatre rèpliques.

D'aquesta manera, es va demostrar que la interferència del factor de transcripció BgE74 produeix una lleugera alteració en alguns dels factors implicats en el senyalització de la 20E i com ha resultat d'aquesta desregulació, els nivells d'mRNA de la BgDDC es troben disminuïts en l'epidermis de *B. germanica*.

5.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha estudiat la funció del factor de transcripció BgE74 durant el desenvolupament nimfal de *B. germanica*, mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*. Així, el tractament amb dsBgE74 afecta de manera significativa l'ècdisi. Un 5% de les femelles interferides per BgE74 no es poden desprendre de la cutícula antiga i moren 9-10 dies després del tractament. A més, la resta de femelles interferides per BgE74 que muden a adult presenten problemes relacionats amb l'ècdisi, que consisteixen en un mal desplegament de les ales, malformació de les quetes i una alteració del procés de pigmentació de la nova cutícula.

L'ècdisi és el procés mitjançant el qual els insectes sintetitzen una cutícula nova i es desprenen de l'antiga. Degut a l'exosquelet quitinós, aquest procés és clau per continuar creixent i ha d'estar regulat de manera precisa. Així, l'ècdisi es pot dividir en tres fases anomenades pre-ècdisi, ècdisi i post-ècdisi, cada una d'aquestes fases està regulada per diferents hormones peptídiques i neuropèptids. Les dos principals hormones que activen aquest procés són la PETH (Pre-Ecdysis Triggering Hormone) i l'ETH (Ecdysis Triggering Hormone), que són produïdes per les cèl·lules Inka i alliberades a l'hemolimfa. A més d'aquestes dues hormones hi ha altres neuropèptids que també regulen les diferents fases de l'ècdisi. Aquest factors són alliberats pel sistema nerviós central i destaquen l'EH (Ecdysis Hormone), CCAP (Crustacean CardioActive Peptide) i la corazonina, que es sintetitza a les cèl·lules neurosecretores laterals del cervell i produeix l'alliberació de l'ETH de les cèl·lules Inka de *B. mori* i *M. sexta* (Zitnan i Adams, 2005). L'EH s'ha aïllat a varis insectes entre els que destaquen *M. sexta*, *B. mori* i *D. melanogaster*, no obstant això, la seva funció només ha estat estudiada a *M. sexta*, on també produeix l'alliberació de l'ETH en les cèl·lules Inka. En la resta d'insectes on s'ha clonat es desconeix la seva funció (Zitnan et al., 2007). Per altra banda, la PETH i l'ETH s'han identificat als lepidòpters *M. sexta* (Zitnan et al., 1996) i *B. mori* (Zitnan et al., 2002), a l'himenòpter *A. mellifera* (Hummon et al., 2006), als coleòpters *T. castaneum* (Amare i Sweedler, 2007; Arakane et al., 2008) i *Tenebrio molitor* (Roller et al., 2010), als dípters *D. melanogaster* (McNabb et al., 1997), *A. gambiae* (Zitnan et al., 2003) i *A. aegypti* (Dai i Adams, 2009), i als ortòpters *Periplaneta americana*, *Schistocerca americana* i el grill *Gryllus sp.* (Roller et al., 2010). A dípters i lepidòpters

s'ha demostrat que l'expressió de la PETH i de l'ETH s'activa a les cèl·lules Inka quan hi ha nivells elevats d'ecdisteroides a l'hemolimfa, un o dos dies abans de l'ècdisi. L'alliberament de les dues hormones a l'hemolimfa es produeix una hora abans de l'ècdisi, quan hi ha un descens en els nivells d'ecdisteroides i s'expressa β Ftz-F1 (Zitnan i Adams, 2005; Zitnan et al., 2007). La funció de les dues hormones ha estat estudiada en els dos lepidòpters, a *D. melanogaster*, a *T. castaneum* i a *A. aegypti*, i en tots els casos s'ha demostrat que són necessàries per al procés d'ècdisi (Arakane et al., 2008; Dai i Adams, 2009; Park et al., 2002; Zitnan i Adams, 2005). Finalment, la post-ècdisi està controlada per bursicon, un neuropèptid que regula l'expansió de les ales i l'esclerotització i la pigmentació de la nova cutícula i que està secretat per dos grups diferents de neurones (Dewey et al., 2004; Peabody et al., 2008). El seu receptor és *rickets* i s'ha demostrat que ni els mutants per l'hormona ni pel seu receptor poden realitzar correctament l'expansió de les ales ni esclerotitzar ni pigmentar la nova cutícula (Baker i Truman, 2002; Dewey et al., 2004). Curiosament, la interferència de *bursicon* en el coleòpter *T. castaneum* produeix defectes en el desplegament dels èlitres però no afecta la pigmentació de la cutícula (Arakane et al., 2008).

En aquest punt, faltaria respondre al mecanisme a través del qual una disminució dels nivells d'mRNA de BgE74 afecta el procés d'ècdisi. Per un costat els nivells hemolímatics de 20E regulen l'alliberació de PETH i ETH, per tant la interferència dels factors implicats en la seva senyalització poden afectar la síntesi i alliberament d'aquestes hormones. A *B. germanica*, s'han descrit defectes semblants en l'ècdisi de femelles de sisena fase nimfal interferides per BgEcR, BgUSP, BgHR3, o BgFtz-F1. En la majoria dels casos les nimfes tractades sintetitzen la nova cutícula però no poden trencar l'antiga i moren 9-10 dies després del tractament. Un percentatge menor aconsegueix mudar i presenta desplegament incorrecte de les ales i les tegmines i malformació de les quetes de les potes (Cruz, 2006; Maestro, 2008; Mane-Padros, 2007). Curiosament, tot i els defectes descrits, en cap dels casos anteriors s'han observat alteracions en la pigmentació, fet que suggereix que només la interferència de BgE74 afectaria aquest procés. Així doncs, el tractament amb dsBgE74 podria afectar tant els nivells de PETH i ETH com els nivells de bursicon, l'hormona de pigmentació dels insectes. Malgrat desconèixer amb exactitud quin és el mecanisme a través del qual BgE74 regula el procés de post-ècdisi sí que hem identificat un dels gens diana d'aquesta senyalització. Es tracta de la *BgDDC*, que codifica per un enzim que converteix la Dopa en Dopamina i participa en els processos de pigmentació, esclerotització, cicatrització, defensa contra paràsits i el comportament dels insectes (Hodgetts i O'Keefe, 2006). El gen de la *DDC* ha estat clonat en diferents insectes holometàbols: els dípters *D. melanogaster* (Morgan et al., 1986), *A. gambiae* (Paskewitz i Yreev,

2008) i *A. aegypti* (Ferdig et al., 1996), els coleòpters *T. molitor* (Kim et al., 2000) i *T. castaneum* (Arakane et al., 2009) i els lepidòpters *B. mori* (Noguchi i Hayakawa, 2001), *M. sexta* (Hiruma i Riddiford, 1985) i *Papilio xuthus* (Futahashi i Fujiwara, 2005). La funció de l'enzim de la DDC en la pigmentació ha estat estudiada a *D. melanogaster*, on la majoria de larves mutants de *DmDDC* són letals però les poques que sobreviuen presenten problemes de pigmentació en l'adult (Wright et al., 1976). En el cas del coleòpter *T. castaneum*, la interferència de *TcDDC* durant la pupa produeix un retard d'unes hores en la pigmentació de l'adult recentment emergit i acaba assolint un color lleugerament més fosc que un individu control (Arakane et al., 2009). En la papallona *P.xuthus*, s'ha demostrat que la inhibició de l'enzim evita l'aparició de pigmentació en cultius *in vitro* d'epidermis (Futahashi i Fujiwara, 2005). Els nostres resultats a *B. germanica* indiquen que la interferència de *BgDDC* afecta la pigmentació de l'adult, produint una disminució del pigment marró en tota la cutícula i una menor quantitat de pigment negra en les taques característiques d'aquesta fase.

La regulació de l'expressió de *DDC* també ha estat motiu d'estudi. Així, *MsDDC* s'expressa a l'epidermis de *M. sexta* al final de cada fase del cicle, coincidint amb la caiguda dels nivells de 20E (Hiruma et al., 1995; Hiruma i Riddiford, 1985, 1990; Hiruma et al., 1985). S'ha demostrat que a l'epidermis de *M. sexta* s'expressen de manera seqüencial diferents factors de la cascada de senyalització de la 20E: *MsE75B*, *MsHR3*, *MsHR4* i *MsβFtz-F1*. L'expressió d'aquests factors forma un eix transcripcional que regularia l'expressió de *MsDDC*. Tot i que encara no es sap quin és l'efecte que exerceixen la majoria de factors implicats si que es sap que, *MsE75B* i *MsHR4* inhibeixen l'expressió de la *MsDDC in vitro* (Hiruma i Riddiford, 2007, 2009). A *D. melanogaster*, també s'ha demostrat que l'expressió de la *DmDDC* està regulada per la 20E i que un dels factors implicats en la seva regulació és el factor de transcripció *DmBr-C* (Chen et al., 2002a). A més, també s'ha identificat un altra dels factors implicats en la regulació de *DmDDC*, el receptor nuclear *DmHR38*. Aquest activaria l'expressió de la *DmDDC* en l'epidermis de la mosca mitjançant la interacció amb *DmEcR* (Davis et al., 2007). Remarcablement, els mutants de *DmE74A* a *D. melanogaster* produeixen un pupari més clar que els salvatges, indicant una possible relació amb l'expressió de la *DmDDC* (Fletcher et al., 1995). Els nostres resultats indiquen que la regulació de la *DDC* per part de la 20E també es dona a *B. germanica*. Així, hem demostrat que la *BgDDC* s'expressa a l'epidermis de la panerola durant les dues últimes fase ninfals i que la seva expressió disminueix coincidint amb la màxima concentració de 20E a l'hemolimfa. Pel que fa a la seva regulació per part dels factors de la via de senyalització de la 20E, hem comprovat que la interferència de *BgE74* afecta l'expressió de *BgDDC* durant els últims

dies de la darrera fase nimfal i que una sèrie de gens implicats en la via de senyalització de la 20E també veuen afectada la seva expressió.

A més, les femelles adultes tractades amb dsBgE74 presenten alteracions en les estructures de locomoció i adhesió a superfícies llises. Aquestes alteracions en l'adhesió no s'havien observat en les femelles de *B. germanica* interferides per altres factors de la via de senyalització de la 20E i que presentaven problemes associats a l'ècdisi en mudar a adult. Aquests resultats ens indiquen que l'afectació en l'adhesió no està produïda per problemes associats a l'ècdisi sinó que seria un procés independent. El fet que en interferir *BgE74* en la quarta i cinquena fase nimfal no es produeixi cap efecte en l'adhesió, en suggereix que durant la muda imaginal tenen lloc una sèrie de processos exclusius en les estructures de locomoció i adhesió que estarien regulats per *BgE74*. L'observació microscòpica d'aquestes estructures suggereix que l'afectació estaria a nivell de síntesi o secreció de la substància que es troba a l'interior de l'aròlium i de les euplantules, i que confereix la capacitat d'adhesió a aquestes estructures. Fins al moment, les investigacions al voltant de les estructures de locomoció i adhesió dels insectes s'han centrat en la mecànica (Clemente i Federle, 2008; Drechsler i Federle, 2006; Federle i Endlein, 2004), però no s'ha estudiat el mecanisme de síntesi i alliberament d'aquestes substàncies. Només trobem l'estudi de la composició de la substància a l'ortòpter *Locusta migratoria*, sent una emulsió de gotes lipídiques en un medi aquós d'alta viscositat, fet que li conferiria les seves propietats adherents (Votsch et al., 2002).

Així doncs, les funcions de *BgE74* descrites a *B. germanica* difereixen de les descrites fins ara en insectes holometàbols. A *D. melanogaster*, la mutació de qualsevol de les dues isoformes és letal i cap de les pupes arriba a l'estadi adult. Les larves que presenten mutada la isoforma *DmE74A* moren al final de la metamorfosi i les que presenten mutada la isoforma *DmE74B* moren al principi de la metamorfosi, quan es produeix la eversió del cap (Fletcher et al., 1995). A més de ser necessari per la metamorfosi, *DmE74A* està implicat en la mort cel·lular programada de les glàndules salivals de la mosca, regulant l'expressió de head involution effective (*hid*), inductor de la mort cel·lular (Jiang et al., 1997). Pel contrari, durant la mort cel·lular programada de l'intestí de la mosca durant la metamorfosi, *DmE74A* no exerceix cap paper regulador de l'apoptosi (Lee et al., 2002). En els lepidòpters on s'ha clonat *E74*, tot i que no s'ha demostrat la seva funció s'ha estudiat la seva expressió en diferents teixits. A *B. mori*, les dues isoformes de *BmE74* s'expressen a les glàndules anteriors secretores de la seda i els seus patrons d'expressió indiquen que també podrien estar relacionades amb la mort cel·lular programada d'aquestes

glàndules (Sekimoto et al., 2007). A *M. sexta*, s'ha clonat i caracteritzat el patró d'expressió de *MsE74*, i els autors suggereixen que *MsE74B* podria tenir un paper similar durant la metamorfosi al de *DmE74B*, ja que els patrons d'expressió són semblants (Stilwell et al., 2003). Per últim, al mosquit *A. aegypti* s'ha demostrat que *AaE74B* regula l'expressió del gen de la *vitel·logenina* tan *in vivo* com *in vitro*, mentre que, per contra, *AaE74A* no afecta l'expressió d'aquest gen. La regulació de la *vitel·logenina* per part d'*AaE74B* sembla que es produeix mitjançant l'interacció proteïna – proteïna amb el receptor heterodimeric de la 20E, format per EcR-USP (Sun et al., 2005).

6. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL RECEPTOR NUCLEAR BgSVP

6.1. ANTECEDENTS

Un cop clonat el factor de transcripció BgE74, s'han clonat i caracteritzat la totalitat dels gens primerencs de la cascada de senyalització de la 20E així com el seu receptor heterodimèric. A part dels factors que formen part del model d'Ashburner també hi ha altres receptors nuclears que regulen l'acció d'EcR/USP inhibint-ne el senyal, aquests són: HR38, HR78 i Svp. El següent pas és clonar aquests inhibidors de la via de senyalització de la 20E a *B. germanica*. Així, l'objectiu experimental d'aquest capítol és el clonatge de Seven Up (Svp), receptor nuclear que només ha estat clonat en insectes holometàbols. Svp va ser identificat per primera vegada a *D. melanogaster* com un gen implicat en la diferenciació dels tipus cel·lulars en l'ommatidi (Mlodzik et al., 1990). En aquesta mosca, hi ha dues isoformes descrites, DmSvpA i DmSvpB. DmSvpB presenta tots els dominis característics dels receptors nuclears, mentre que DmSvpA té el domini LBD truncat, de manera que la seva regió C-terminal té una seqüència de 293 aminoàcids sense cap similitud amb altres receptors nuclears. Curiosament, a la resta d'insectes on s'ha clonat, els coleòpters *T. castaneum* i *T. molitor*, l'himenòpter *A. mellifera*, el lepidòpter *B. mori*, el dípter *A. aegypti* i l'ortòpter *S. gregaria* només s'ha descrit una isoforma (Broadus i Doe, 1995; Miura et al., 2002; Mlodzik et al., 1990; Mouillet et al., 1999; Tan i Palli, 2008; Togawa et al., 2001; Velarde et al., 2006). L'homòleg de Svp a vertebrats és COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor), que principalment modula el senyal hormonal de diferents receptors nuclears, ja sigui competint per llocs d'unió a ADN o la heterodímerització a RXR o altres receptors (Pereira et al., 2000; Tsai i Tsai, 1997). Anàlisis detallats han demostrat que COUP-TF pot unir-se a diferents elements d'unió formats per repeticions directes de tipus DR3, DR4 i DR5, del motiu simple 5'-AGGTCA-3'. A més, també pot unir-se als elements de resposta on s'uneixen el receptor de la vitamina D (VDR), el receptor del hormona tiroïdal (TR) i el receptor d'àcid retinoic (RAR). Mitjançant aquesta competició directa pels llocs d'unió, COUP-TF reprimeix la inducció dels gens diana de VDR, TR i RAR (Cooney et al., 1993; Cooney et al., 1992). Per altra part, COUP-TF també pot formar heterodímers amb RXR, disminuint d'aquesta manera la concentració d'RXR disponible per formar heterodímers amb altres receptors i inhibint les vies de senyalització en les que estan implicats aquests (Kliwer et al., 1992).

En els insectes, mitjançant experiments *in vitro*, s'ha demostrat que Svp pot modular la resposta de la 20E a *D. melanogaster* interactuant amb USP (Zelhof et al., 1995). A més, a *A. aegypti* s'ha demostrat que AaSvp reprimeix la via de senyalització d'ecdisteroides durant la vitel·logènesi. En aquest mosquit, mitjançant experiments de coimmunoprecipitació fent servir

extractes nuclears a partir de cos gras de femelles, s'ha demostrat que AaSvp interactua amb AaUSP. En assaigs de transfecció cel·lular, AaSvp reprimeix l'activació de gens a través de l'heterodímer EcR-USP (Zhu et al., 2003). Per últim, a *T. castaneum* s'ha demostrat, mitjançant experiments d'RNAi *in vivo*, que Svp és necessari per que es produïxi correctament el procés de la metamorfosi, tot i que no s'ha demostrat que interactuï amb cap dels components del receptor de la 20E (Tan i Palli, 2008).

Així doncs, en aquest capítol es descriu el clonatge de dos cDNAs que codifiquen pels homòlegs de Svp a la panerola *B. germanica* i que s'han anomenat BgSvpA i BgSvpB. Posteriorment, s'ha realitzat una anàlisi de les seqüències i s'han comparat amb les de diferents insectes i vertebrats. A més, s'ha comprovat la capacitat d'unió d'ambdues isoformes a diferents elements de resposta i finalment, s'ha analitzat l'expressió relativa en diferents teixits i la seva expressió en dos teixits concrets durant les dues últimes fases ninfals.

6.2. RESULTATS

6.2.1. Clonatge de dos cDNAs corresponents a dues isoformes del receptor nuclear Seven Up a *B. germanica*

El clonatge de l'homòleg de Svp a *B. germanica* es va dur a terme mitjançant la tècnica d'RT-PCR utilitzant oligonucleòtids degenerats dissenyats en la regió que presentava la major identitat entre les diferents seqüències de Svp descrites a insectes. Així, es va amplificar un primer fragment de 120 parells de bases, que un cop analitzat es va confirmar que corresponia a l'homòleg de Svp a *B. germanica*. La seqüència es va completar combinant les tècniques de 5'- i 3'-RACE, tal com es descriu en l'apartat 3.4. Finalment, es van obtenir dos cDNAs diferents que corresponien a dues isoformes de Svp a *B. germanica* i que es van anomenar BgSvpA i BgSvpB, d'acord amb la nomenclatura utilitzada a *D. melanogaster*. Tot i així, no s'ha pogut clonar la seqüència completa, ja que falta una part del domini A/B, l'extrem 5' de la molècula, comú en les dues isoformes. La grandària de BgSvpA és de 954 nucleòtids (que codifica per una proteïna de 318 aminoàcids) i la de BgSvpB és de 1182 nucleòtids (394 aminoàcids). Les dues isoformes presenten els dominis característics dels receptors nuclears, tot i que difereixen en el domini LBD (Figura 6.1.). Les dues isoformes presenten un domini A/B de 50 aminoàcids, un domini DBD de 66 aminoàcids i una regió frontissa de 49 aminoàcids, exactament iguals. BgSvpB presenta un domini LBD de 217 aminoàcids i una regió F de 14 aminoàcids. Pel contrari, l'LBD de la isoforma A només té 139 aminoàcids, dels quals els últims 21 no es troben a cap altra seqüència de

receptors nuclears. El DBD conté les vuit cisteïnes necessàries per formar l'estructura típica de dos dits de zinc que dóna la capacitat per reconèixer i unir-se a seqüències de DNA específiques. El primer dit de zinc conté la caixa P i és necessari pel reconeixement de la seqüència a la que s'ha d'unir el receptor. El segon dit de zinc conté la caixa D, implicada en la dimerització. Per altra part, l'LBD és el domini encarregat del reconeixement del lligand i la transactivació dependent de lligand, presenta una estructura formada per dotze helix- α , necessàries per la conformació tridimensional del receptor que permet la unió al lligand. En aquesta regió es troba el domini de transactivació AF-2, que es localitza dins de l'helix-12. En el cas de BgSvpA, en estar l'LBD incomplet, li manquen les 4 últimes helix- α , i per tant, el domini AF-2 (Figura 6.2.A i B).

	A/B	DBD	FRN	LBD
BgSvpA	50	66	49	139
BgSvpB	50	66	49	229

Figura 6.1.- Representació esquemàtica de les dues isoformes de Svp a *B. germanica*. Els dominis funcionals s'indiquen amb negreta i els números dins dels requadres representen el nombre total d'aminoàcids de cada domini.

6.2.2. Comparació de les seqüències de Seven Up d'artròpodes i vertebrats

Una vegada obtingudes les seqüències d'aminoàcids de BgSvp, es va realitzar un estudi comparatiu amb les seqüències dels seus homòlegs a artròpodes, incloent a més els homòlegs de quatre espècies de vertebrats. Concretament, es van fer servir les seqüències dels COUP-TF de *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Mus musculus* i *Homo sapiens*. En les espècies de vertebrats on s'han descrit homòlegs de COUP-TF s'han trobat dues isoformes que presenten diferències tant en el DBD com en l'LBD. Per fer aquest estudi es van seleccionar dos dominis, l'LBD i el DBD. Tal i com es mostra a la taula 6.1, la identitat entre el DBD de *B. germanica* i la resta d'isoformes és molt elevada, per sobre del 94,4%, en totes les seqüències estudiades. El percentatge d'identitat de l'LBD encara és més elevat dins dels insectes, arribant fins al 99,5%. Els alts valors d'identitat entre els diferents dominis confirmen que Svp/COUP-TF és el receptor nuclear més conservat. A més, hem comparat la grandària dels diferents dominis de SvpB de les mateixes espècies que l'apartat anterior. Tal i com es pot veure a la Figura 6.3, el domini amb una grandària més variable és el A/B. Tant els dos dominis més conservats, el DBD i l'LBD, com la regió frontissa tenen una grandària pràcticament idèntica entre les diferents espècies comparades.

A

```

1 atcgagtggtgtagtttgtggcgacaagtccagcgggaaactacggccagttcacgtgc
1 I E C V V C G D K S S G K H Y G Q F T C

61 gaaggatgcaaaagtcttcaagaggagtgtcaggagaaatctcacatactcatgtcga
21 E G C K S F F K R S V R R N L T Y S C R

121 gggaaatcgaaattgccccatcgaccaacatcatcggaatcagtgccagtactgtcggctc
41 G N R N C P I D Q H H R N Q C Q Y C R L

181 aagaagtgtctcaagatgggcatgaggagagaagccgtccaacgagggcgggtacctccg
61 K K C L K M G M R R E A V Q R G R V P P

241 tgcagcctcctgggtcttccgggtcagtttgactcaccaacggcgacgccgctctgca
81 S Q P P G L P G Q F A L T N G D A A S A

301 gctgctgccgcccagttctgaacggccactcgtaacctttcaagttacatttctctgttgctg
101 A A A A S L N G H S Y L S S Y I S L L L

361 cgggcagaaccctacccgacgtcgaggatggacaatgcatgcagcccaacaacatcatg
121 R A E P Y P T S R Y G Q C M Q P N N I M

421 ggaatcgacaacatttgcgaacttgcggcaaggttgttgttctctgcccgtggaatggcg
141 G I D N I C E L A A R L L F S A V E W A

481 cgaaacatccctttcttccccgacctacaggtcacggaccaagtggcgctgttgagactt
161 R N I P F F P D L Q V T D Q V A L L R L

541 gtgtggagcgaactgtttgcgctgaacgcgtcccagtgctccatgcctcttcatgtggct
181 V W S E L F A L N A S Q C S M P L H V A

601 ccgcttcttgcggcagcaggacttcacgcacatgcccattggcggcgatagggtagtagcc
201 P L L A A A G L H A S P M A A D R V V A

661 tttatggatcacatcaggatattccaggaacaagtggagaagctcaaggckcttcacgta
221 F M D H I R I F Q E Q V E K L K A L H V

721 gactctgoggagtatagctgtctcaaggccatcgctgctcttactacagacgcatgctggg
241 D S A E Y S C L K A I V L F T T D A C G

781 ctgtcggacgtggcgcacatcgaaagtctccaagagaaatcacagtgcgcgctagaggaa
261 L S D V A H I E S L Q E K S Q C A L E E

841 tactgccggaccatataatccgaatcagcctacccgcttcggcaagctcttgcctccgttta
281 Y C R T Q Y P N Q P T R F G K L L L R L

901 ccatctctcaggactgtcagttcgcaagttatcgagcagcttttctttgttcgtctgggtg
301 P S L R T V S S Q V I E Q L F F V R L V

961 gggaaagacgcccatcgagacgctgataagggacatgctgttgagcgggaagcagcttcagt
321 G K T P I E T L I R D M L L S G S S F S

1021 tggcettacatgagctcgatgtga 1044
341 W P Y M S S M * 347
    
```

B

```

1 ggtaagtgtgacaaacagcagtcctcctgccgctactgaagggcgtaactccaagcatgac
1 G K C D K Q Q S P A A T E G R N S K H D

61 aagtaggttgcatTTTTAATATGCGCGAGGTGTTAAACTGGAGCTACTTGTCTCTAACGC
21 K *

121 acctctgtttatTTTCTCCACTACTAATTTAATGACACGGATGCCTACAAATCAACATCTT
181 agaatgggtgcaattCGTTTTGtagtacagtgTGGAGAGCTGGCTGTCACTTTACTTTTA
241 aactcctagggcgTcggT 258
    
```

Figura 6.2.- Seqüència de nucleòtids i aminoàcids de les dues isoformes del receptor nuclear Svp a *B. germanica*. (A) Seqüència de nucleòtids i aminoàcids de BgSvpB; els requadres indiquen les regions DBD i LBD, entre aquests dos dominis es troba la regió frontissa i després de l’LBD hi ha la regió F. En negreta i subratllat, dins del DBD, s’indiquen la caixa P i la caixa D respectivament, corresponents als dos dits de zinc, i que confereixen la capacitat d’unió a DNA. En doble subratllat, dins de l’LBD, es marquen les 12 helix- α necessàries per la conformació tridimensional. La fletxa en l’aminoàcid 256 indica el començament de la regió específica de cada isoforma (B) Seqüència de nucleòtids i aminoàcids de la part específica de BgSvpA corresponent a l’extrem 3’ de la seqüència.

Taula 6.1. Percentatges d’identitat dels DBD i LBD de SvpB i COUP-TF de diferents espècies d’insectes i vertebrats en relació a BgSvpB de *B. germanica*. Les seqüències es van alinear amb el programa ClustalX i els percentatges d’identitat es van obtenir mitjançant el programa Genedoc. Els diferents homòlegs de BgSvpB es van ordenar segons el percentatge d’identitat del DBD.

Nom	Espècie	Ordre	DBD	LBD
AmSvpB	<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera	98,6	99,5
ApSvpB	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Homoptera	98,6	98,6
DmSvpB	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera	98,6	98,1
AaSvpB	<i>Aedes aegypti</i>	Diptera	97,2	98,1
TcSvpB	<i>Tribolium castaneum</i>	Coleoptera	97,2	95,8
BmSvpB	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	95,8	95,8
HsCOUP-TF1	<i>Homo sapiens</i>	Primats	95,8	94,0
MmCOUP-TF1	<i>Mus musculus</i>	Rodentis	95,8	94,0
XICOUP-TF1	<i>Xenopus laevis</i>	Anura	95,8	94,0
DrCOUP-TF1	<i>Danio rerio</i>	Cypriniformes	95,8	93,5
HsCOUP-TF2	<i>Homo sapiens</i>	Primats	94,4	94,0
MmCOUP-TF2	<i>Mus musculus</i>	Anura	94,4	94,0

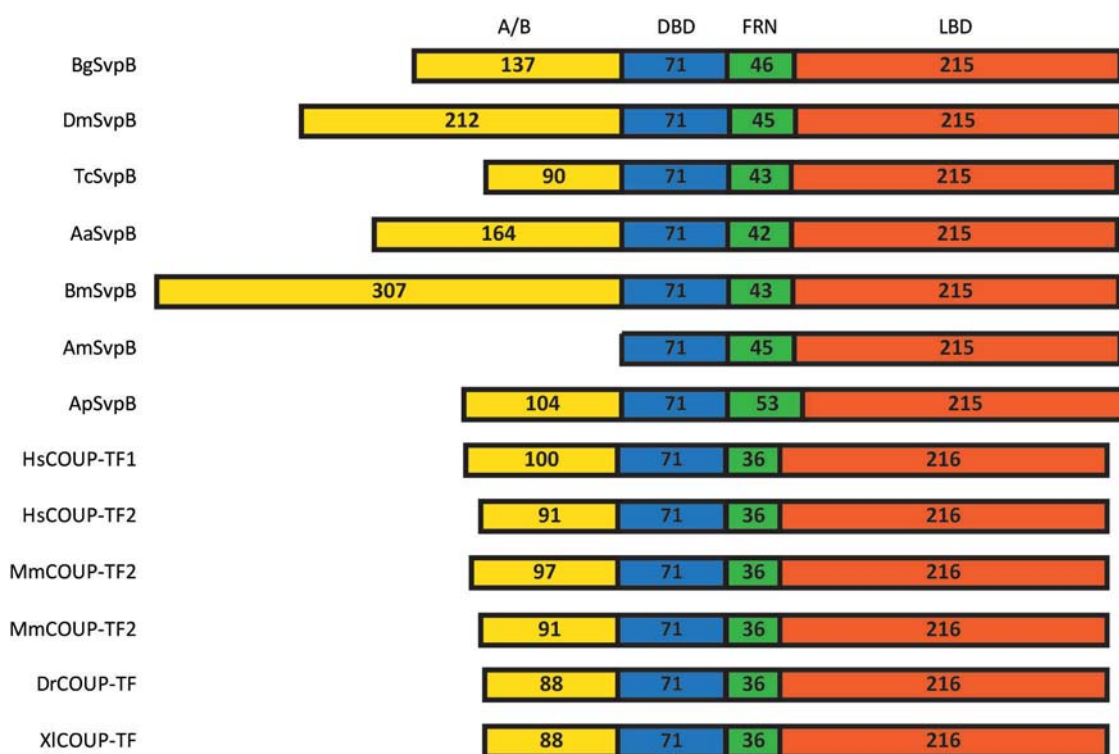


Figura 6.3. Comparació dels dominis estructurals de la isoforma BgSvpB de *B. germanica* amb SvpB d'altres espècies d'insectes i variis COUP-TF de vertebrats. Representació esquemàtica de la isoforma SvpB; els dominis estructurals es troben indicats sobre BgSvpB. Els números dins de cada requadre representen el nombre d'aminoàcids del domini. Les espècies analitzades són *D. melanogaster* (DmSvpB), *T. castaneum* (TcSvpB), *A. aegypti* (AaSvpB), *B. mori* (BmSvpB), *A. mellifera* (AmSvpB), *Acyrtosiphon pisum* (ApSvpB), *Homo sapiens* (HsCOUP-TF), *Mus musculus* (MmCOUP-TF), *Danio rerio* (DrCOUP-TF) i *Xenopus laevis* (XICOUP-TF).

6.2.3. Capacitat d'unió a DNA de les dues isoformes de Svp de *Blattella germanica*

Tal i com hem descrit a la introducció, els receptors nuclears s'uneixen a elements de resposta de l'DNA, que consisteixen en repeticions, directes o invertides, de la seqüència consens 5'-AGGTCA-3'. Aquestes repeticions poden estar separades per un nombre variable de nucleòtids, generalment d'un a cinc. Tot i que molts receptors nuclears formen heterodímers amb RXR/USP alguns poden unir-se als elements de resposta com a homodímers. En aquest sentit, COUP-TF es va caracteritzar com un homodímer capaç d'unir-se a repeticions directes separades per un nucleòtid DR1. Posteriorment també es va veure que es podia unir a DR3, DR4 i DR5 (Tsai i Tsai, 1997). L'especificitat d'unió també s'ha estudiat en els homòlegs de Svp a *D. melanogaster* i a *A. aegypti* mitjançant assaigs EMSA. Així, les dues isoformes de DmSvp i AaSvp s'uneixen a elements de resposta de tipus DR1. Amb aquests precedents es va

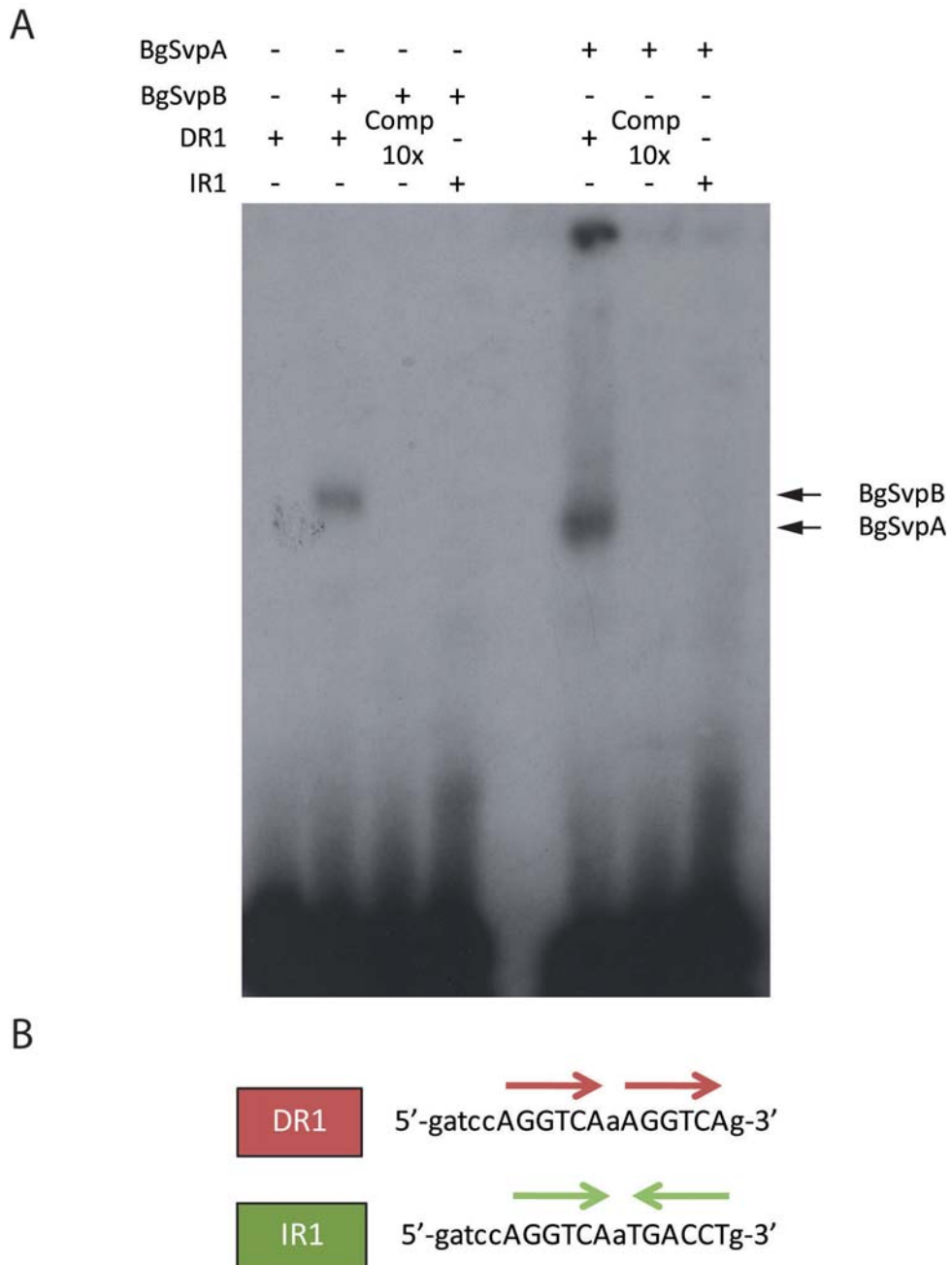


Figura 6.4.- Característiques d'unió a DNA de les dues isoformes de Svp de *B. germanica*. (A) Assaig EMSA per comprovar la capacitat d'unió a DNA de BgSvpA i de BgSvpB. En cada experiment d'unió es va utilitzar 1 µl de reacció TNT de cada proteïna. Com a sonda es va utilitzar un oligonucleòtid que contenia l'element de resposta a ecdisteroides present en el promotor de hsp27 marcat radioactivament amb P³². Com a competidor específic es va utilitzar un excés del mateix element de resposta sense marcar. (B) Seqüències consens d'unió de Svp. Element de repetició directa (DR1) i de repetició inversa (IR).

realitzar un assaig d'unió a DNA per EMSA utilitzant les proteïnes BgSvpA i BgSvpB, sintetitzades mitjançant una transcripció i traducció *in vitro* (TNT) (Apartat 3.10). Com a sonda de DNA es va fer servir un element de tipus DR1 marcat radioactivament. Tal i com mostra la Figura 6.4, tant BgSvpA com BgSvpB s'uneixen com a homodímers a aquest element. L'especificitat d'unió a DR1 es va confirmar competint la unió amb un excés de DR1 sense marcar. Pel contrari, cap de les dues isoformes es van unir a elements de resposta de tipus IR.

6.2.4. Patrons d'expressió de BgSvp durant el desenvolupament de *B. germanica*

Un cop clonades les dues isoformes de BgSvp es va estudiar la seva expressió en diferents teixits de *B. germanica* mitjançant Q-PCR. Per això, es van fer servir oligonucleòtids específics per tal d'amplificar les dues isoformes per separat, tal i com es descriu a l'apartat 3.12. Els teixits que es van fer servir van ser els corpora allata (CA), ovari, cos gras, glàndules colaterals, intestí, cervell i glàndula protoràtica (GP) de nimfes de sisena fase. Com es pot veure a la figura 6.5, les dues isoformes de BgSvp s'expressen principalment en els CA i minoritàriament al cos gras. En la resta de teixits ambdòs transcrits són pràcticament indetectables.

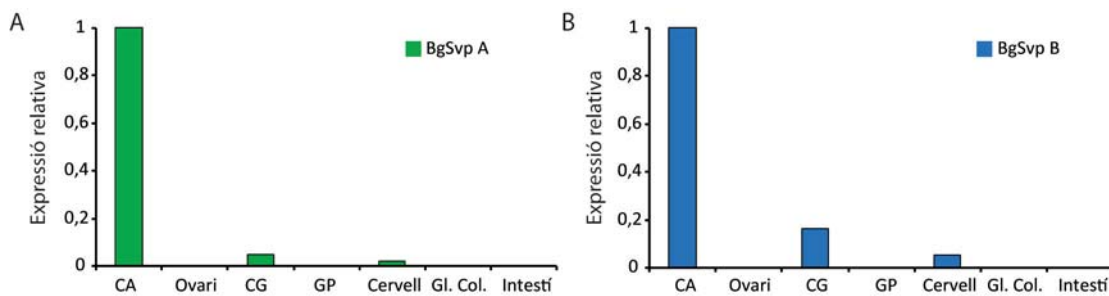


Figura 6.5.- Expressió relativa de les dues isoformes de BgSvp en diferents teixits de *B. germanica*. L'estudi de l'expressió dels mRNA de BgSvpA i BgSvpB es va realitzar mitjançant RT-PCR de temps real (Q-PCR). Els teixits analitzats són *corpora allata* (CA), ovaris, cos gras (CG), glàndula protoràtica (GP), cervell, glàndules colaterals i intestí. Els resultats es mostren com a quantitat relativa d'expressió respecte a l'expressió dels CA. Els valors representats són el promig de quatre rèpliques.

A continuació, es va caracteritzar el patró d'expressió de BgSvpA i BgSvpB mitjançant RT-PCR fent servir oligonucleòtids específics de cada isoforma en els dos teixits on més s'expressen, els CA i el cos gras. Els CA són els òrgans encarregats de la producció de l'HJ i el cos gras és el principal teixit metabòlic i és l'anàleg al fetge i el teixit adipós de vertebrats. Com es pot veure a la figura 6.6, en els dos teixits estudiats, l'expressió de BgSvpA i BgSvpB és constant durant les dues últimes fases nimfals. Aquests patrons suggereixen que les isoformes de BgSvp no

responen a la 20E, ja que l'expressió de l'hormona és cíclica durant les dues últimes fases nimfals, augmentant la concentració a la meitat de cada fase.

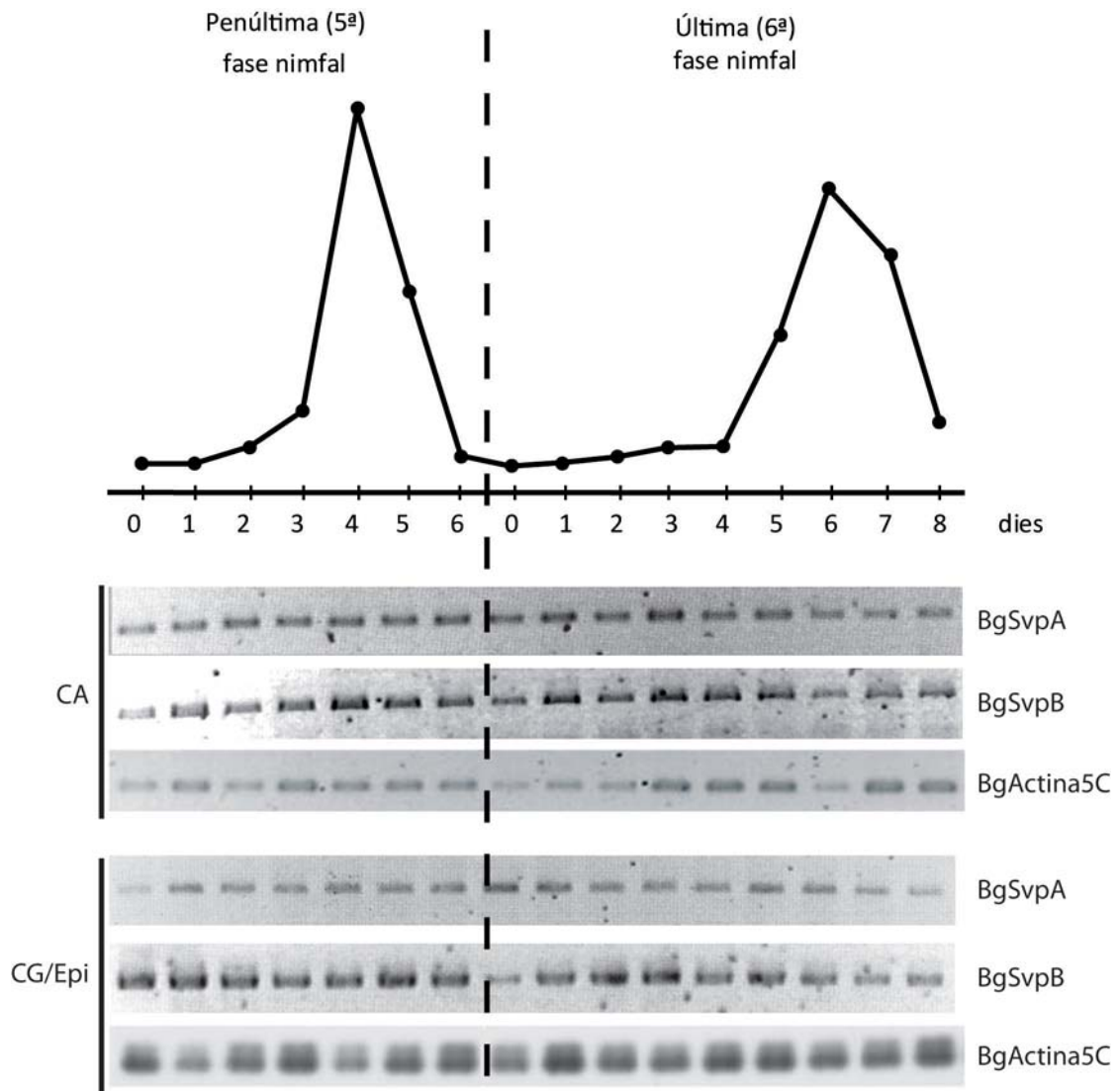


Figura 6.6.- Patrons d'expressió de BgSvp durant les dues últimes fase nimfals de *B. germanica*. Es van mesurar els nivells d'mRNA de BgSvpA i BgSvpB mitjançant RT-PCR als *corpora allata* (CA) i al cos gras (FB) de femelles de cinquèna i sisèna fase nimfal. Els nivells de BgActina5C es van usar com a referència. A la part superior es mostren els nivells hemolimfàtics de la 20E segons Cruz et al (2003). Cada mostra és representativa de tres rèpliques.

6.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha descrit el clonatge i l'anàlisi estructural de dues isoformes del receptor nuclear Seven Up a *B. germanica*, anomenades BgSvpA i BgSvpB. Les dues isoformes presenten l'organització modular característica de la família dels receptors nuclears. La similitud amb les seqüències de *D. melanogaster* ens ha permès classificar les isoformes segons la nomenclatura en la mosca (Mlodzik et al., 1990). A més de *D. melanogaster*, *Svp* s'ha clonat a *A.*

aegypti (Miura et al., 2002), *T. castaneum* (Tan i Palli, 2008), *A. mellifera* (Velarde et al., 2006), *T. molitor* (Mouillet et al., 1999), i *B. mori* (Togawa et al., 2001), i parcialment a l'insecte hemimetàbol *Schistocerca gregaria* (Broadus i Doe, 1995). Curiosament, en tots aquests insectes només s'ha clonat una isoforma d'Svp, homòloga de *BgSvpB*. Una anàlisi en detall de la seqüència de *BgSvpB* de *B. germanica* respecte a les dels diferents homòlegs d'insectes i vertebrats, ens indica que tant el DBD com l'LBD són les regions més conservades, presentant una identitat per sobre del 95%. Aquests resultats ens confirmen que la subfamília de COUP-TF/Svp és la més conservada de tots els receptors nuclears (King-Jones i Thummel, 2005; Tsai i Tsai, 1997). El DBD de les dues isoformes de *BgSvp* presenta la caixa P, essencial pel reconeixement específic dels llocs d'unió, i la caixa D, necessària per la dimerització. En el cas de l'LBD és aquí on es troben les diferències significatives entre les dues isoformes. *BgSvpA* no té la seqüència completa de l'LBD i li manquen varies de les hèlix- α que presenten els receptors nuclears i que permeten conformar la totalitat de l'estructura tridimensional del domini, necessària per unir-se al lligand. En canvi, *BgSvpB* sí que té l'LBD complet, i amb totes les hèlix- α necessàries. En el cas de *COUP-TF* s'ha estudiat l'estructura tridimensional de l'LBD i s'ha comprovat que quan no està unit a lligand es troba en un estat d'autorepressió, ja que el domini AF-2 es troba inaccessible per a corepressors i coactivadors. Fins al moment, la família Svp/COUP-TF forma part del receptors nuclears orfes, sense lligand conegut: tot i això, s'ha demostrat que COUP-TF pot unir-se a àcids retinoics però a una concentració molt més elevada que la fisiològica, descartant-lo com a lligand. No obstant això, amb aquest resultat es demostra que l'LBD de COUP-TF té capacitat d'unió a lligand i que aquesta unió permet que el receptor s'activi i canviï la conformació d'autorepressió (Kruse et al., 2008).

Mitjançant un assaig EMSA hem demostrat que les dues isoformes de *BgSvp* a *B. germanica* es poden unir a elements de resposta d'DNA de tipus DR1. Aquest resultat coincideix amb els obtinguts a *D. melanogaster*, on tant *DmSvpA* com *DmSvpB* poden unir-se com a homodímers a diferents elements de resposta (Zelhof et al., 1995) i a *A. aegypti*, on també s'ha estudiat la capacitat d'unió al DNA de *AaSvp*. En el mosquit només s'ha descrit una isoforma, que forma homodímers que s'uneixen als elements de resposta de repeticions directes DR1. Per tal de comprovar l'afinitat a altres combinacions es va realitzar competició amb DR separades per diferent nombre de nucleòtids i amb repeticions invertides (IR). El complex d'unió a DR1 es veu desplaçat per DR2 i DR4 però no es desplaça en el cas de IR tant en *DmSvpA* i *B* com a *AaSvp* DR1, DR2 i DR4 (Miura et al., 2002; Zelhof et al., 1995). En el cas dels COUP-TFs,

homòlegs de Svp a vertebrats, aquets es poden unir amb gran afinitat a DR1, tot i que també es poden unir a varies repeticions directes (Cooney et al., 1992).

Un cop finalitzat l'anàlisi de la seva estructura i capacitat d'unió a DNA, s'ha estudiat l'expressió de les dues isoformes en diferents teixits de la panerola *B. germanica*. Sorprenentment, l'expressió de les dues isoformes de *BgSvp* és especialment alta en els CA, les glàndules encarregades de sintetitzar l'HJ. En la resta de teixits la seva expressió és pràcticament indetectable amb l'excepció del cos gras i el cervell. El fet que l'expressió de *BgSvp* sigui tant alta en els CA suggereix que el receptor nuclear tindria un paper important en relació a l'HJ. La principal funció de l'HJ és determinar el tipus de muda que es dona al final de cada fase en insectes, així, si l'HJ està present en el moment que es produeix el pic de 20E la muda és entre fases juvenils, en canvi, si no hi ha HJ l'insecte inicia la metamorfosi en insectes holometàbols o muda a la forma adulta en insectes hemimetàbols (Riddiford, 1996). A més, a *B. germanica* l'HJ també regula altres processos com ara la vitel·logènesi i el desenvolupament dels ovaris. Una manera de regular l'acció de l'HJ és regulant-ne la producció, de manera que regulant l'expressió del enzims de la via biosintètica de l'HJ es regula l'acció de l'hormona. Això fa que aquests enzims siguin possibles dianes de la regulació per part del receptor nuclear *BgSvp*.

Tot i que la producció de l'HJ és exclusiva dels CA, hi ha altres teixits que expressen els gens que codifiquen pels enzims de la primera part de la via de biosíntesi de l'HJ, coneguda com a via del mevalonat. Entre aquests teixits destaca el cos gras, teixit metabòlic equivalent al fetge i el teixit adipós de vertebrats. Curiosament, en aquest teixit també es detecta expressió de *BgSvp*. Anteriorment, s'ha demostrat la importància dels receptor nuclears Svp/COUP-TF en els desenvolupament del cos gras, tant en embrions de la mosca *D. melanogaster* (Hoshizaki et al., 1994) com en el teixit adipós de vertebrats, regulant l'adipogènesi (Li et al., 2009; Okamura et al., 2009). Finalment, Svp s'expressa en el cos gras de les femelles adultes del mosquit *A. Aegypti* i exerceix de regulador negatiu del senyal del receptor de la 20E durant la vitel·logenèsi (Miura et al., 2002; Zhu et al., 2003). Per últim, el tercer teixit on s'ha detectat expressió de *BgSvp* és el cervell. Tant a insectes com a vertebrats, Svp/COUP-TF s'expressa en el sistema nerviós on és necessari pel correcte desenvolupament embrionari d'aquest teixit, el correcte desenvolupament dels axons i del nervi espinal (Kanai et al., 2005; Maurange et al., 2008; Pereira et al., 2000; Qiu et al., 1997). A *A. mellifera*, Svp s'expressa al cervell durant l'estadi adult amb l'excepció dels "mushroom bodies", on la seva expressió està reduïda (Velarde et al., 2006). A més dels teixits anteriorment comentats, DmSvp també s'expressa en els ommatidis (Mlodzik et al., 1990), els tubs de Malpighi (Kerber et al., 1998) i el vas dorsal (Lo i Frasch, 2001) de *D. melanogaster*. A *B. mori*, s'ha detectat la seva expressió en l'epidermis (Togawa et al., 2001).

COUP-TF, també s'expressa en diferents teixits durant el desenvolupament embrionari, com ara glàndules salivals, cor, pulmons, estòmac, pancrees i ronyons (Pereira et al., 2000).

A continuació, hem estudiat els nivells d'expressió de les dues isoformes de *BgSvp* en els CA i el cos gras durant les dues últimes fases nimfals de *B. germanica*. El fet que la seva expressió sigui constant durant tots els dies de les dos fases nimfals i la presència d'HJ durant la penúltima fase nimfal ens suggereix que cap de les dues isoformes de *BgSvp* està regulada per la 20E ni per l'HJ. Aquest patró difereix dels que presenten el gens induïts per 20E i que formen part dels gens primerencs segons el model d'Ashburner *BgE75*, *BgE74*, *BgHR3*, *BgHR4* i *BgFtz-F1*. Tots aquests factors s'expressen de manera seqüencial en el moment que augmenta la concentració de 20E formant una cascada de transducció del senyal de l'hormona (Cruz et al., 2005; Mane-Padros et al., 2005; 2008; 2010). El seu patró és semblant al dels dos components del receptor de la 20E, *BgEcR* i *BgRXR*, que no responen a la concentració de la 20E. Els patrons d'expressió de *Svp* s'han estudiat en alguns dels insectes on s'ha clonat tot i que en d'altres com és el cas de *D. melanogaster*, només s'ha detectat la seva expressió en alguns teixits en concret sense estudiar la seva expressió durant les diferents fases del desenvolupament. En d'altres, com el mosquit *A. aegypti*, s'ha determinat que *AaSvp* s'expressa de manera constant en el cos gras i ovaris de l'adult, indicant que la seva expressió no es veu afectada pels nivells de 20E (Cruz et al., 2009). En el cas del lepidòpter *B. mori*, *Svp* es va clonar com a regulador d'una proteïna de cutícula i se n'ha estudiat l'expressió en aquest teixit. Així, s'ha demostrat que *BmSvp* s'expressa constantment a l'epidermis del lepidòpter durant les dues últimes fase larvals (Togawa et al., 2001). Al coleòpter *T. castaneum*, s'ha estudiat l'expressió en el cos gras, l'ovari i en l'adult sencer. En els dos teixits l'expressió es manté constant, en canvi, si tenim en compte l'expressió en tot l'organisme la seva expressió augmenta lleugerament al llarg de la fase adulta. Remarcablement, si es compara l'expressió de *TcSvp* a ovari i cos gras amb la d'altres receptors com ara *TcEcR*, *TcUSP* i *TcFtz-F1*, es comprova que l'expressió de *TcSvp* és molt menys abundant. Per últim, el patró d'expressió de *Svp* en l'epidermis del coleòpter *T. molitor*, suggereix que altes concentracions de 20E inhibeixen l'expressió de *Svp*. Durant la última fase nimfal l'expressió de *TmSvp* augmenta quan es comença a detectar la 20E però després disminueix l'expressió en assolir la màxima concentració de 20E. Durant la pupa, quan els nivells de 20E encara són més elevats no es detecta expressió de *TmSvp* (Mouillet et al., 1999).

**7. ESTUDI FUNCIONAL DE BgSVP DURANT EL DESENVOLUPAMENT
POSTEMBRIONARI DE *B. GERMANICA***

7.1. ANTECEDENTS

Un cop clonats i caracteritzats els patrons d'expressió dels receptors nuclears BgSvpA i BgSvpB a *B. germanica*, el següent objectiu va consistir en esbrinar les seves funcions durant el desenvolupament post-embrionari de la panerola *B. germanica* fent servir per això la tècnica d'RNAi *in vivo*.

Fins ara, la caracterització funcional d'Svp s'ha dut a terme en insectes holometàbols, especialment a *D. melanogaster*. L'únic mutant nul de DmSvp descrit a la mosca és letal embrionari, el que ha impedit poder analitzar la funció que aquest receptor nuclear exerceix en etapes posteriors del desenvolupament (Gausz et al., 1981; Hoshizaki et al., 1994). Per tal de solucionar aquest problema, diferents investigadors han generat mosques transgèniques en les que l'absència de DmSvp es donava en teixits específics. D'aquesta manera s'ha pogut comprovar que durant les etapes postembrionaries, DmSvp controla la divisió i diferenciació cel·lular de diferents teixits com ara els ommatidis, on és necessari per la correcta diferenciació dels fotoreceptors (Mlodzik et al., 1990), als neuroblasts, on regula l'expressió de factors de transcripció implicats en la diversificació neuronal (Kanai et al., 2005), i als cardioblasts, on és indispensable per la formació de les osties (tractes d'entrada al tub cardíac) (Lo i Frasch, 2001). A més, durant l'embriogènesi DmSvp s'expressa en les cèl·lules precursors del cos gras (Hoshizaki et al., 1994) i també als tubs de Malpighi, regulant components del cicle cel·lular (Kerber et al., 1998). A més de les funcions descrites en òrgans concrets, també s'ha estudiat el paper regulador de DmSvp durant el període pupal de *D. melanogaster* en relació a l'acció que exerceix la 20E sobre aquest període del desenvolupament. Així, s'ha demostrat que DmSvp pot regular el senyal transcripcional activat per la 20E mitjançant la seva interacció amb DmUSP, l'heterodímer amb DmEcR, trencant d'aquesta manera la funcionalitat del receptor de la 20E. En aquest sentit, la sobreexpressió de DmSvp produeix la mort durant la metamorfosi de la mosca. Aquesta mortalitat no es produeix si també es sobreexpressa DmUSP, ja que en augmentar la quantitat d'aquest receptor nuclear es torna a afavorir la formació de l'heterodímer EcR-USP (Zelhof et al., 1995). A més de *D. melanogaster*, recentment s'ha estudiat la funció de Svp en el coleòpter *T. castaneum*, en aquesta cas utilitzant la tècnica d'RNAi *in vivo*. En aquest insecte, en interferir TcSvp en larves d'última fase s'impedeix que cap d'elles arribi a adult, amb un 38% d'insectes que no poden pupar i un 62% que moren durant l'estadi pupal (Tan i Palli, 2008). Agafant aquests resultats en el seu conjunt, es pot considerar que Svp té un paper vital en el desenvolupament post-embrionari dels insectes holometàbols, ja sigui tant en les transicions de larva a pupa com en les de pupa a adult.

En aquest capítol s'inicia la caracterització funcional de BgSvp durant el desenvolupament postembrionari de *B. germanica*. Mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo* s'estudia la funció de BgSvp durant la última fase nimfal i l'estadi adult, tant durant el primer cicle com el segon cicle gonadotròfic.

7.2. RESULTATS

7.2.1. La interferència d'RNA disminueix els nivells d'mRNA de les isoformes de Svp a *B. germanica*.

Per estudiar la funció de BgSvp durant el desenvolupament post-embrionari de *B. germanica* es van reduir els nivells de missatger de les dues isoformes mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*. En primer lloc, es va sintetitzar un dsRNA de 356 parells de bases que corresponia a la regió comuna de l'LBD de les dues isoformes (denominat dsBgSvp; veure Figura 7.1A). Aquest fragment, en ser comú a les dues isoformes, hauria de ser capaç de silenciar-les alhora.

En primer lloc es van injectar 3 µg de dsBgSvp a femelles d'última fase nimfal recentment emergides i es van analitzar, mitjançant Q-PCR, els nivells de BgSvpA i BgSvpB set dies més tard. Donat que l'expressió de BgSvp és gairebé exclusiva dels CA, tal i com hem vist en el capítol anterior (veure Figura 6.5), es va analitzar la caiguda de l'mRNA en aquest teixit. Com a control negatiu es van injectar 3 µg d'RNA de doble cadena inespecífic (dsMock). Tal i com s'observa a la Figura 7.1B, els nivells de BgSvpA i BgSvpB en les nimfes tractades amb dsBgSvp es van reduir significativament en comparació amb les tractades amb dsMock.

7.2.2. Anàlisi fenotípic del silenciament de BgSvp durant el desenvolupament postembrionari de *B. germanica*

Un cop demostrada l'efectivitat de la interferència amb dsBgSvp es van estudiar les funcions d'aquest receptor nuclear mitjançant la injecció de 3 µg de dsBgSvp o 3 µg de dsMock a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides. Així, les nimfes tractades amb dsBgSvp no van mostrar cap alteració durant els 8 dies que dura la sisena fase nimfal, i passat aquest temps no es van donar cap diferència estadística en la durada de la fase nimfal entre les femelles tractades amb dsBgSvp (n=124) i les dsMock (n=50) i totes van mudar correctament a adult (Figura 7.2). Per tal d'assegurar que la transició adulta es donava correctament no només a nivell morfològic sino també a nivell fisiològic, es va comprovar l'integritat de la GP després de la muda imaginal. A *B. germanica*, s'ha demostrat que la degeneració de la GP es dona just després

de la muda imaginal i està regulada per una jerarquia de receptors nuclears controlats per la 20E (Mane-Padros et al., 2010). Per comprovar si aquest procés es donava en absència de BgSvpA i BgSvpB, es van analitzar morfològicament les GP de femelles adultes acabades de mudar tractades amb dsBgSvp o dsMock, sense observar cap diferència significativa (Figura 7.3).

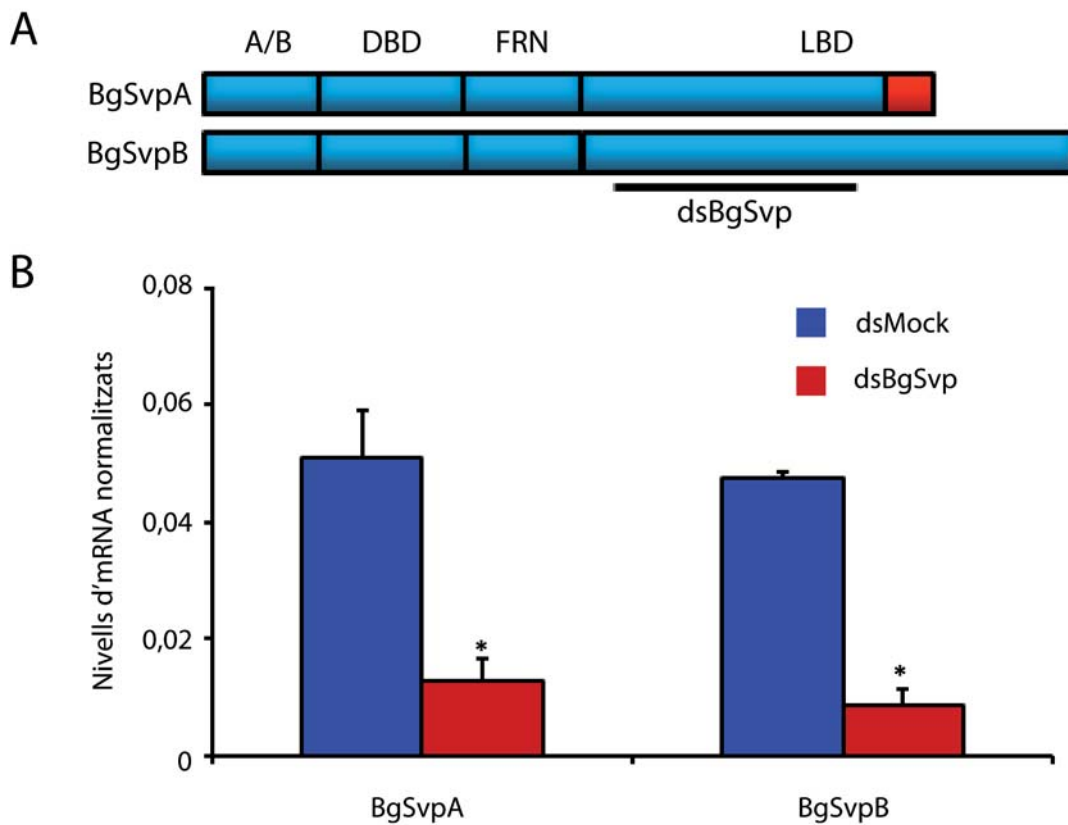


Figura 7.1.- Interferència del receptor nuclear BgSvp mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo* en femelles de sisena fase ninfal de *B. germanica*. (A) Esquema de les dues isoformes, BgSvpA i BgSvpB, on s'indica la zona on es va dissenyar el dsRNA (dsBgSvp). (B) Efecte del tractament amb dsBgSvp sobre els nivells d'mRNA de BgSvpA i BgSvpB. Es van injectar 3 µg de dsBgSvp o bé dsMock a femelles de sisena fase ninfal recentment emergides i es van mesurar els nivells d'mRNA sis dies després per Q-PCR als CA. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4). L'asterisc indica diferències estadísticament significatives $p \leq 0.05$ (*).

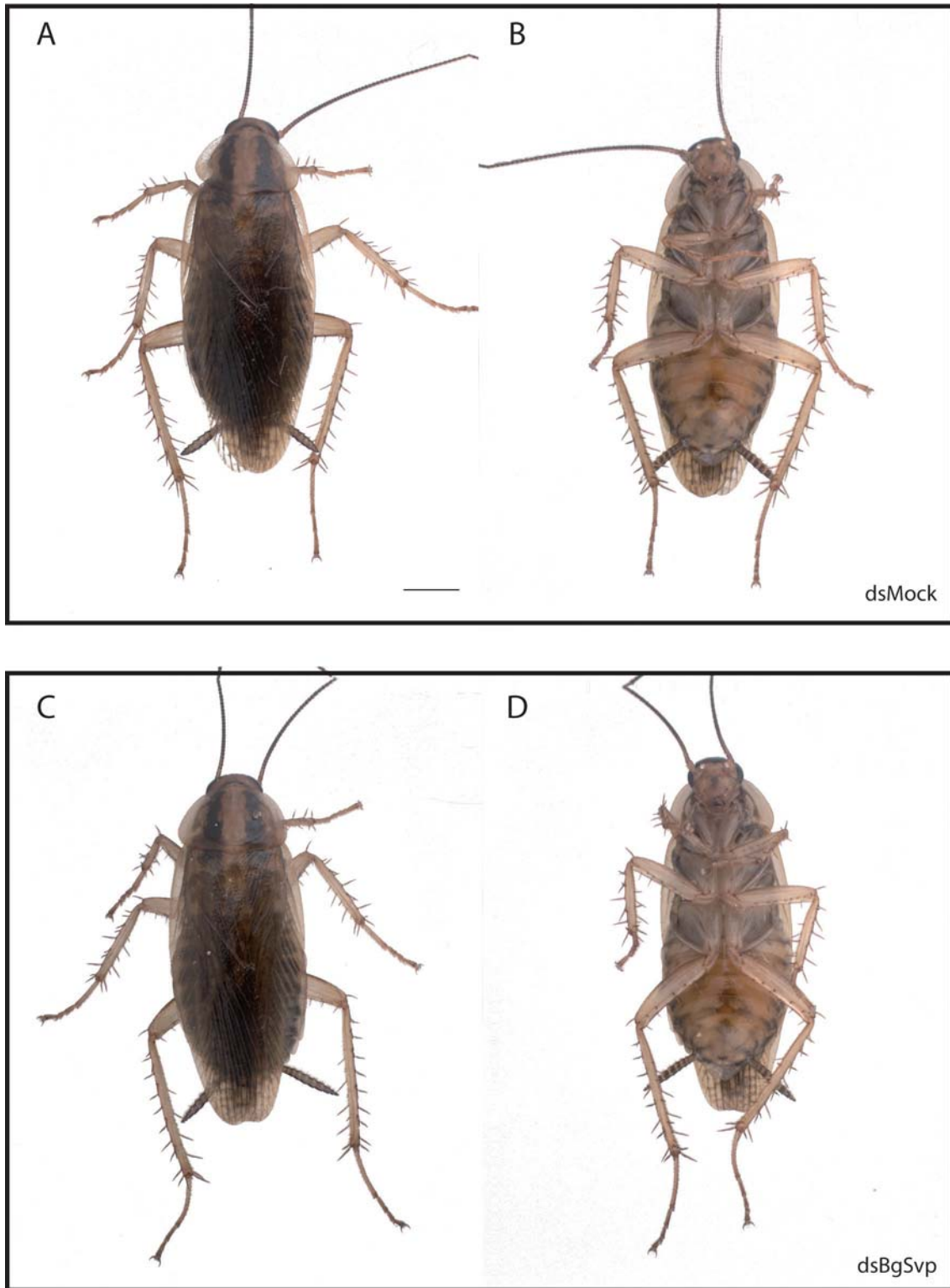


Figura 7.2.- Efecte del silenciament de BgSvp sobre la muda imagnal de *B. germanica*. Es van tractar femelles de sisena fase nimfal amb 3 μ g de dsBgSvp o dsMock i es van analitzar després de la muda imagnal. (A i B) Femella tractada amb dsMock, representant l'aspecte normal d'un adult. (C i D) Femella tractada amb dsBgSvp on no s'observen diferències significatives respecte les tractades amb dsMock. Escala: 1 mm.



Figura 7.3. Efecte de la interferència de BgSvp sobre la degeneració de la glàndula protoràcica a *B. germanica*. Es van injectar 3 μ g de dsBgSvp o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal acabades de mudar. Un dia després de mudar a adult es va extreure la GP i es va tenyir amb DAPI. (A) GP de femella adulta tractada amb dsMock. (B) GP de femella adulta tractada amb dsBgSvp. (C) GP de femella d'última fase nimfal tractada amb dsMock. Escala: 200 μ m

Un cop demostrat que la interferència de BgSvp no afecta la muda imagnal, es va estudiar si aquests receptors nuclears exercien algun paper regulador en les mudes entre diferents fases nimfals. Tal i com s'ha explicat a la introducció, la darrera fase nimfal presenta un marc endocrí molt característic que és diferent a les anteriors fases nimfals degut a l'absència d'HJ, fet que provoca que la muda sigui de nimfa a adult. Així, es van injectar 3 μ g de dsBgSvp o dsMock a nimfes de cinquena (penúltima) fase nimfal recentment emergides. Les nimfes interferides per BgSvp (n=30) no van mostrar cap alteració durant els 6 dies que dura la fase nimfal i totes van mudar correctament a la sisena i última fase nimfal, sense diferències significatives amb les femelles tractades amb dsMock. Posteriorment, tant les nimfes tractades amb dsBgSvp com les tractades amb dsMock van acabar mudant a adult vuit dies després d'haver mudat a la sisena fase. Així doncs, podem concloure que el silenciament conjunt de tots dos receptors nuclears no afecta el desenvolupament nimfal.

7.2.3. Anàlisi fenotípic de femelles interferides per BgSvp durant l'estadi adult

El fet que les femelles de sisena fase nimfal tractades amb dsBgSvp completin la muda imagnal sense cap anomalia ens va permetre analitzar la possible funció que aquests receptors exerceixen durant l'estadi adult. A *B. germanica*, durant el període adult tenen lloc els processos relacionats amb la reproducció (Figura 7.4). En primer lloc, després de la muda imagnal i una vegada la panerola menja, es produeix l'activació biosintètica dels CA amb la conseqüent producció de grans quantitats d'HJ (Osorio et al., 1997). L'HJ és alliberada a l'hemolimfa i actua en teixits perifèrics, com ara el cos gras, activant el gen de la vitel·logenina, principal proteïna de reserva (Comas et al., 1999, 2001). Un cop sintetitzada, la vitel·logenina també és alliberada a

l'hemolimfa i posteriorment incorporada als oòcits basals. Durant els set dies que dura el primer cycle gonadotròfic de *B. germanica*, només l'oòcit basal de cada ovariol experimenta un creixement considerable degut a la incorporació massiva de proteïnes vitel·logèniques i lípids que formaran el vitel (Pascual et al., 1992). Un altra teixit perifèric que respon a l'HJ són les glàndules col·laterals, encarregades de sintetitzar ootecina, oxalat càlcic i diferents enzims que s'alliberen durant la oviposició per formar l'ooteca, dipòsit on es troben els ous i que carrega la femella durant el cycle gonadotròfic (Raikhel et al., 2005) (Figura 7.4).

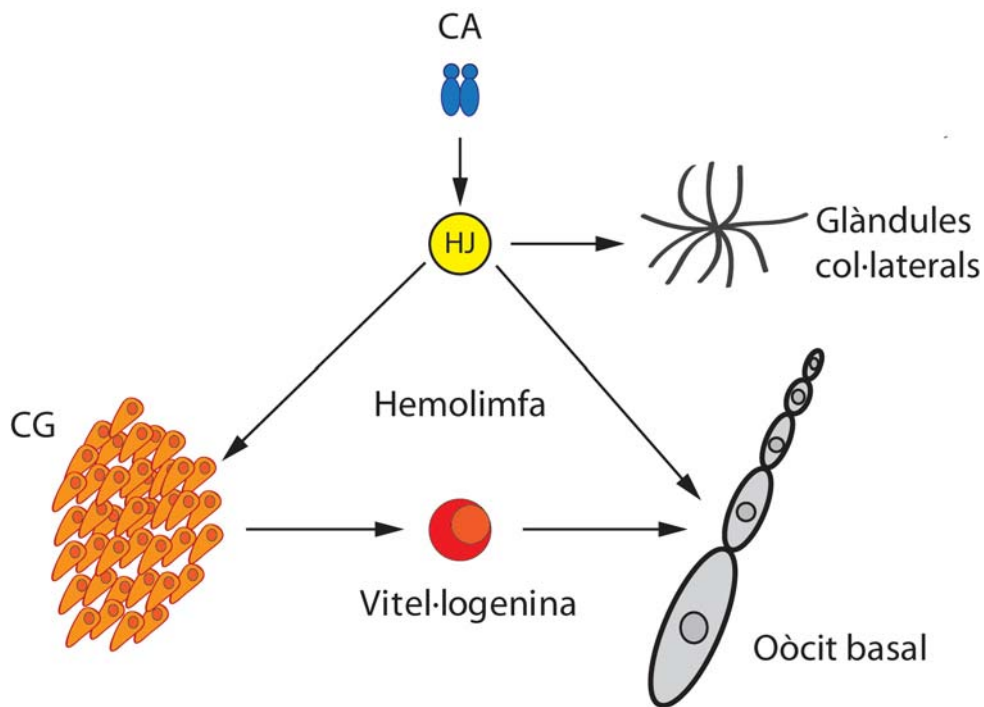


Figura 7.4.- Esquema de l'acció de l'HJ sobre diferents teixits de *B. germanica*. L'HJ és sintetitzada en els CA i alliberada a l'hemolimfa, on arriba als diferents teixits on exerceix una funció. En primer lloc, al cos gras activa la producció de vitel·logenina, aquesta s'allibera a l'hemolimfa i s'incorpora a l'oòcit basal. L'HJ actua sobre l'oòcit basal capacitant-lo per incorporar la vitel·logenina. Per últim, l'HJ també actua sobre les glàndules col·laterals, activant la producció de diferents substàncies que formaran l'ooteca.

Per tal d'analitzar l'efecte de l'absència de BgSvpA i BgSvpB sobre els processos descrits, vam analitzar fenotípicament les femelles adultes tractades amb dsBgSvp i dsMock durant la darrera fase nimfal cinc dies després de la muda imaginal. Remarcablement, mentre que en les femelles tractades amb dsMock la longitud de l'oòcit basal era de 1,50 mm (n=20), en les tractades amb dsBgSvp era de 0,48 mm (n=45), longitud equivalent a un oòcit d'una femella adulta just després de mudar (Figura 7.5A). A més, les glàndules col·laterals dels interferits per BgSvp presentaven un aspecte buit en comparació als controls (Figura 7.5B). Aquests defectes

també es donen en femelles adultes de la panerola que han estat sotmeses a dejuni just després de la muda imaginal (Osorio et al., 1997). Per això, en primer lloc vam comprovar la presència d'aliment en els intestins de les femelles adultes interferides amb dsMock i amb dsBgSvp. Remarcablement, no es van detectar diferències entre el contingut alimentari dels intestins de les femelles tractades amb dsBgSvp i les tractades amb dsMock, descartant així que l'absència de creixement i maduració dels oòcits i de les GC fos degut a l'absència d'alimentació.

Donat que el creixement dels oòcits basals és degut a la incorporació massiva de proteïnes vitel·logèniques, l'absència de creixement dels oòcits en les femelles interferides per BgSvp suggereix un problema amb el procés de la vitel·logenesis. Per tal de comprovar si aquest procés estava afectat, es van mesurar mitjançant Q-PCR els nivells d'mRNA de vitel·logenina (BgVg), principal proteïna vitel·logènica a *B. germanica*, en el cos gras de femelles de sis dies d'edat adulta tractades amb dsBgSvp. Tal i com es mostra a la Figura 7.5C, en el cos gras de les femelles interferides amb dsBgSvp hi ha una dràstica reducció en l'expressió del gen de BgVg respecte a aquelles tractades amb dsMock. A continuació, es va comprovar si la reducció en l'expressió de l'mRNA de BgVg també implicava una disminució en la proteïna. Per això, es van analitzar les proteïnes hemolimfàtiques de femelles de cinc dies d'edat adulta mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS i es van visualitzar mitjançant una tinció amb Blau de Comassie (Figura 7.5D). En les femelles tractades amb dsBgSvp es va observar l'absència de les dos subunitats que formen la BgVg (160 i 102 kDa), mentre que la resta de proteïnes hemolimfàtiques no es veien afectades. Com que la BgVg alliberada a l'hemolimfa és captada pels oòcits també es va comprovar el contingut d'aquesta proteïna en aquest òrgan. Com en el cas de l'hemolimfa, es van obtenir oòcits de femelles tractades amb dsMock i dsBgSvp adultes de sis dies d'edat i es va realitzar una electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS i es va visualitzar amb Blau de Comassie. Els resultats, confirmen l'absència de BgVg en els oòcits de les femelles tractades amb dsBgSvp (Figura 7.5E).

Cal destacar que degut a la inhibició en la síntesi de BgVg i conseqüentment, del creixement dels oòcits basals, totes les femelles adultes tractades amb dsBgSvp van ser estèrils i cap d'elles va formar l'ooteca al final del cicle gonadotròfic (n=45).

La manca de vitel·logenesis en les femelles adultes de *B. germanica* tractades amb dsBgSvp suggereix o bé una absència de producció de l'hormona encarregada de l'activació de gens vitel·logènics, es a dir l'HJ, o bé una afectació del cos gras de manera que aquest teixit no respondria correctament a l'hormona. Per tal de discriminar el motiu es va aplicar metoprè, un anàleg de l'HJ just després de la muda imaginal a les femelles tractades amb dsBgSvp i es van

mesurar els nivells d'mRNA de BgVg en el cos gras dos i cinc dies més tard. Tal i com es pot veure a la Figura 7.6, el metoprè va activar correctament l'expressió de l'mRNA de BgVg en les femelles tractades amb dsBgSvp tant a dia dos com a dia cinc d'edat adulta. El fet de que el cos gras de les

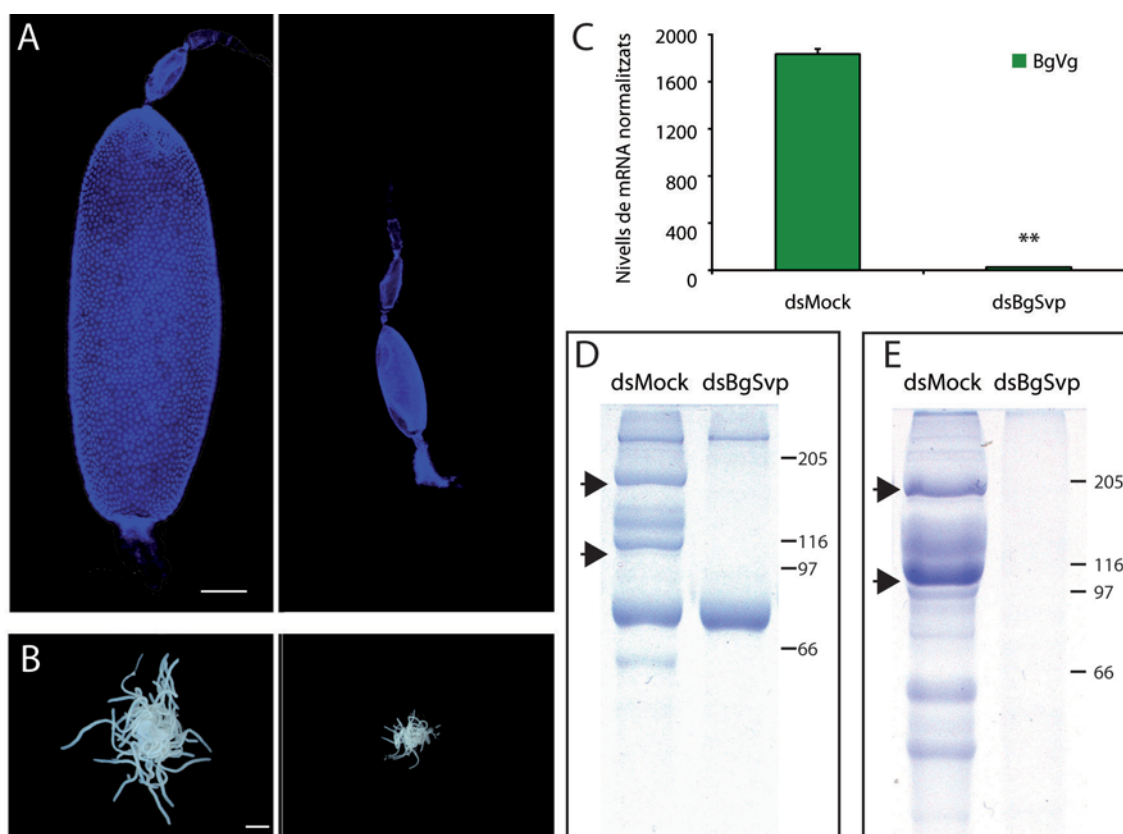


Figura 7.5. Efecte de la interferència de BgSvp en femelles adultes de *B. germanica*. Es van injectar 3 µg de dsBgSvp o dsMock a femelles de sisena fase recentment emergides i es va analitzar el fenotip sis dies després de mudar a adult. (A) Tinció DAPI d'ovarioles. Esquerra, ovariola d'una femella adulta de sis dies tractada amb dsMock, representant el creixement normal de l'oòcit basal. Dreta, ovariola de femella adulta de sis dies tractada amb dsBgSvp. (B) Glàndules col·laterals de femelles adultes de sis dies tractades amb dsMock (dreta), on s'observa que estan plenes de les substàncies que formaran la ooteca o tractades amb dsBgSvp (esquerra), on s'observen les deficiències en l'ompliment dels túbuls de la glàndula. (C) Efecte de la interferència de BgSvp sobre els nivells d'mRNA de BgVg en el cos gras de femelles adultes de sis dies d'edat. Es van injectar 3 µg de dsBgSvp o bé dsMock a femelles de sisena fase ninfal recentment emergides i es van mesurar els nivells d'mRNA sis dies després de mudar a adult per Q-PCR en el CG. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4) L'asterisc indica diferències estadísticament significatives $p \leq 0.005$ (**). (D) Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS d'hemolimfa de femelles adultes tractades amb dsMock o dsBgSvp. (E) Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS d'extracte d'ovari de femelles adultes tractades amb dsMock o dsBgSvp. Les fletxes a (D) i (E) indiquen les diferents subunitats de la BgVg. A la dreta s'indiquen les masses moleculars (kDa). Escala (A): 200 µm. Escala (B): 1 mm.

femelles adultes interferides per BgSvp responguin perfectament al metoprè, activant l'expressió de BgVg fins a uns nivells semblants a una femella control, ens indica clarament que el resultat d'uns nivells baixos de BgSvp durant l'estadi adult és molt probablement la inhibició de la síntesi de l'HJ.

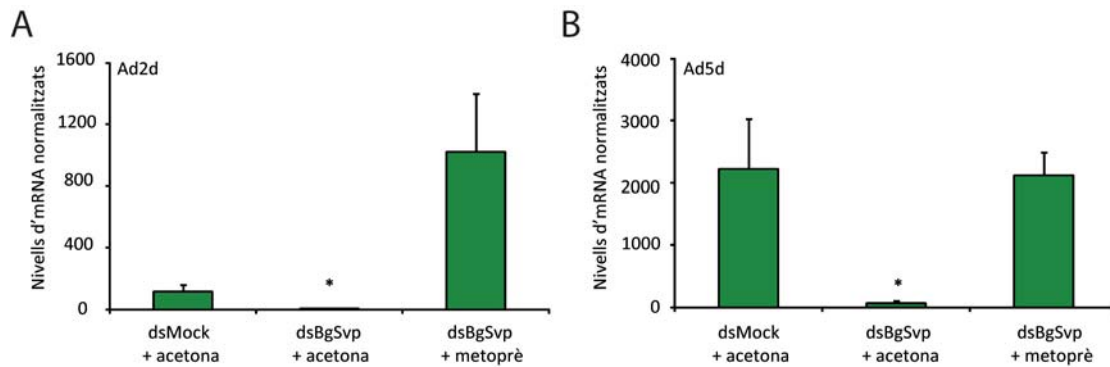


Figura 7.6.- Efecte del metoprè sobre l'expressió de l'mRNA de BgVg de femelles adultes de *B. germanica* tractades amb dsBgSvp. Es van injectar 3 µg de dsBgSvp o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides. Unes hores després de mudar a adult es va aplicar metoprè o acetona (com a control negatiu) i es van mesurar els nivells d'mRNA 2 i 5 dies després per Q-PCR en el CG. (A) Nivells d'mRNA de BgVg en el cos gras de femelles adultes dos dies després de mudar. (B) Nivells d'mRNA de BgVg en el cos gras de femelles adultes cinc dies després de mudar. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). L'asterisc indica diferències estadísticament significatives p≤0.05 (*)

7.2.4. La interferència específica de cadascuna de les isoformes de BgSvp indica que no són redundants

Tal i com hem descrit, *B. germanica* presenta dues isoformes del receptor nuclear Svp, BgSvpA i BgSvpB. Per tal d'esbrinar quina isoforma és responsable del fenotip descrit anteriorment, es van dissenyar dsRNAs específics per interferir cada isoforma individualment. El dsRNA de BgSvpA era de 247 parells de bases i correspon a la part específica de l'LBD de BgSvpA i una part de la regió 3'-UTR. Per la seva part, el dsRNA de BgSvpB era de 356 parells de bases, dissenyat en la regió específica de l'LBD i part 3'-UTR (Figura 7.7A). Tal com havíem fet anteriorment, primer es va mesurar l'eficiència de la interferència amb aquests dsRNAs durant la darrera fase nimfal. Per això, es van injectar 3 µg de dsBgSvpA o 3 µg de dsBgSvpB a nimfes de sisena fase recentment emergides i es van analitzar els nivells d'expressió de BgSvpA i de BgSvpB per Q-PCR en els CA sis dies després. Tal i com es veu a la Figura 7.7B, la interferència no només fou clarament efectiva, sinó que es va mostrar específica de la isoforma. A continuació, es van analitzar fenotípicament les nimfes interferides per cada isoforma. Així, cap de les femelles

tractades amb els dsRNA específics va presentar problemes durant la sisena fase nimfal i tant les tractades amb dsBgSvpA (n=30), com les tractades amb dsBgSvpB (n=40) van mudar a adult en el temps esperat. Seguint el mateix procediment que amb el dsRNA comú es va analitzar el desenvolupament de femelles adultes de cinc dies d'edat. Remarcablement, mentre que cap de les femelles tractades amb dsBgSvpA presentaven diferències en el creixement de l'oòcit basal amb les tractades amb dsMock, totes les tractades amb dsBgSvpB van presentar la mateixa inhibició del creixement de l'oòcit basal que les tractades amb dsBgSvp (Figura 7.7D-F). Seguint el raonament descrit en l'apartat anterior, es van mesurar els nivells d'mRNA de BgVg mitjançant Q-PCR en el cos gras de femelles de sis dies d'edat adulta tractades amb dsBgSvpA, dsBgSvpB, o dsMock. Tal i com es mostra a la Figura 7.7C, en el cos gras de les femelles interferides amb dsBgSvpB hi ha una reducció molt significativa en l'expressió del gen de BgVg respecte a aquelles tractades amb dsMock i amb dsBgSvpA. Tots aquests resultats clarament indiquen que BgSvpB és el responsable del fenotip descrit en interferir les dues isoformes alhora (Figura 7.5).

7.2.5. BgSvpB controla el desenvolupament i funcionament dels *corpora allata* de les femelles adultes de *B. germanica*

Els resultats obtinguts fins ara demostren clarament que BgSvpB regula la síntesi de l'HJ durant l'estadi adult, hormona que és responsable de l'activació de gens codificants per proteïnes vitel·logèniques i, com a conseqüència, del creixement dels oòcits durant el cicle gonadotròfic. Per tal de veure a quin nivell BgSvpB afectava la producció d'HJ es van analitzar a nivell morfològic els CA d'adults recentment emergits i de cinc dies d'edat adulta tractats amb dsBgSvpB o dsMock tenyint-los amb DAPI, que marca el DNA present a les cèl·lules, i amb rodamina fal·loïdina, que marca l'actina filamentosa. A *B. germanica*, durant el desenvolupament adult, el volum de les cèl·lules dels CA augmenta en paral·lel a l'augment de producció d'HJ (Osorio et al., 1997). Com es pot apreciar a la Figura 7.8, després de la muda imaginal no s'aprecien diferències estructurals significatives tant a nivell de volum com de la organització del teixit. Remarcablement, en analitzar els CA cinc dies més tard es va comprovar

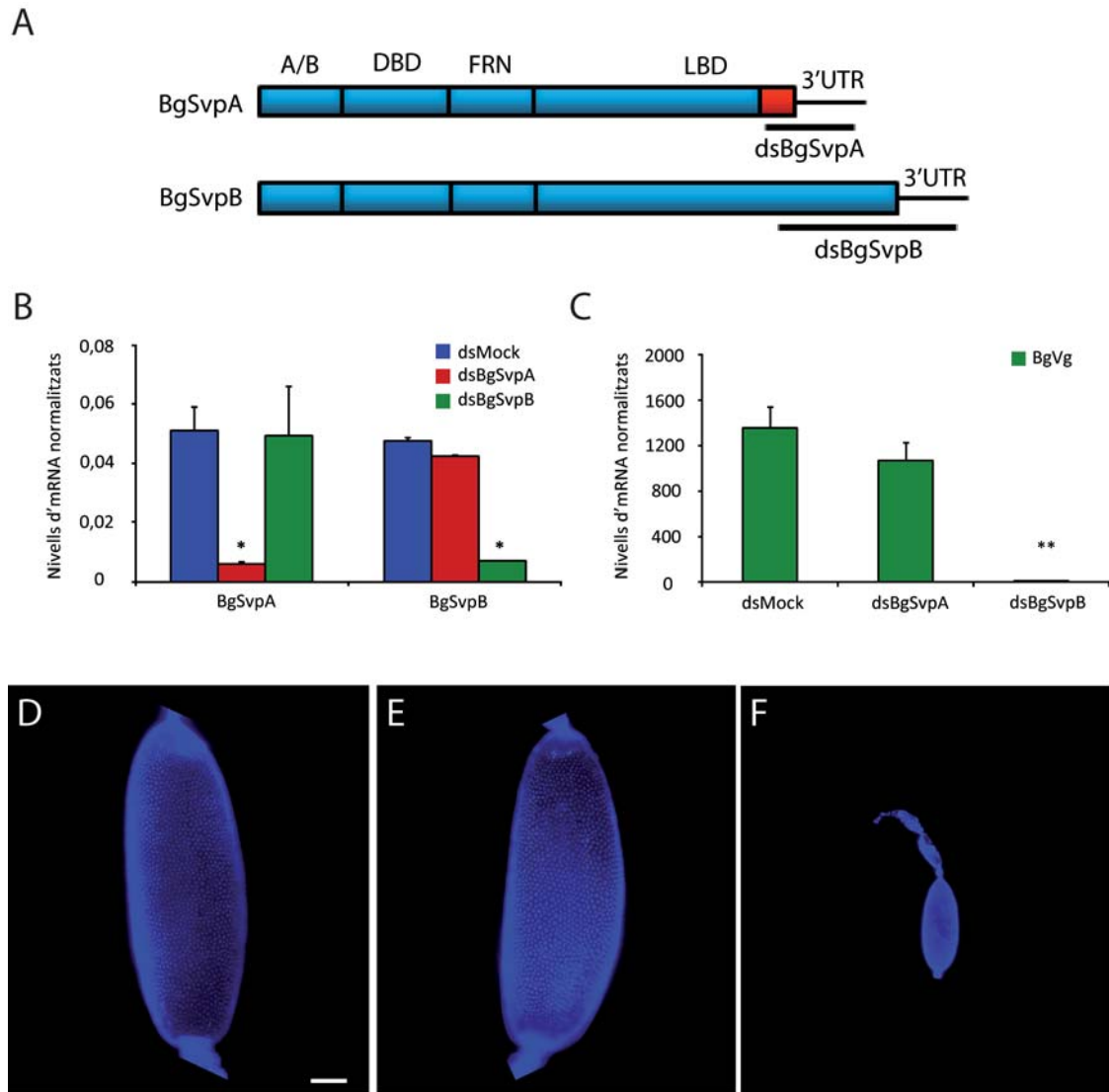


Figura 7.7.- Efecte del silenciament de BgSvpA i BgSvpB sobre la muda imaginal de *B. germanica*. (A) Representació esquemàtica de BgSvpA i BgSvpB on s'indiquen les regions utilitzades per dissenyar RNA de doble cadena específic de cada isoforma (dsBgSvpA i dsBgSvpB). (B) Efecte del tractament amb dsBgSvpA i dsBgSvpB sobre els nivells d'mRNA de BgSvpA i BgSvpB. Es van injectar 3 µg de dsBgSvpA, 3 µg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides i es van mesurar els nivells d'mRNA sis dies després per Q-PCR en els CA. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. (C) Efecte de la interferència de BgSvpA i BgSvpB sobre els nivells d'mRNA de BgVg en el cos gras de femelles adultes de sis dies d'edat. Es van injectar 3 µg de dsBgSvpA, 3 µg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides i es van mesurar els nivells d'mRNA sis dies després de mudar a adult per Q-PCR en el CG. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4-5). L'asterisc indica diferències estadísticament significatives, $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.005$ (**). (D-F) Es van injectar 3 µg de dsBgSvpA, 3 µg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de sisena fase recentment emergides i es va analitzar el fenotip de les ovarioles sis dies després de mudar a adult mitjançant una tinció DAPI. (D) Ovariola d'una femella adulta de sis dies tractada amb dsMock, representant el creixement normal de l'oòcit basal. (E) Ovariola de femella adulta de sis dies tractada amb dsBgSvpA. (F) Ovariola de femella adulta de sis dies tractada amb dsBgSvpB. Escala: 200 µm.

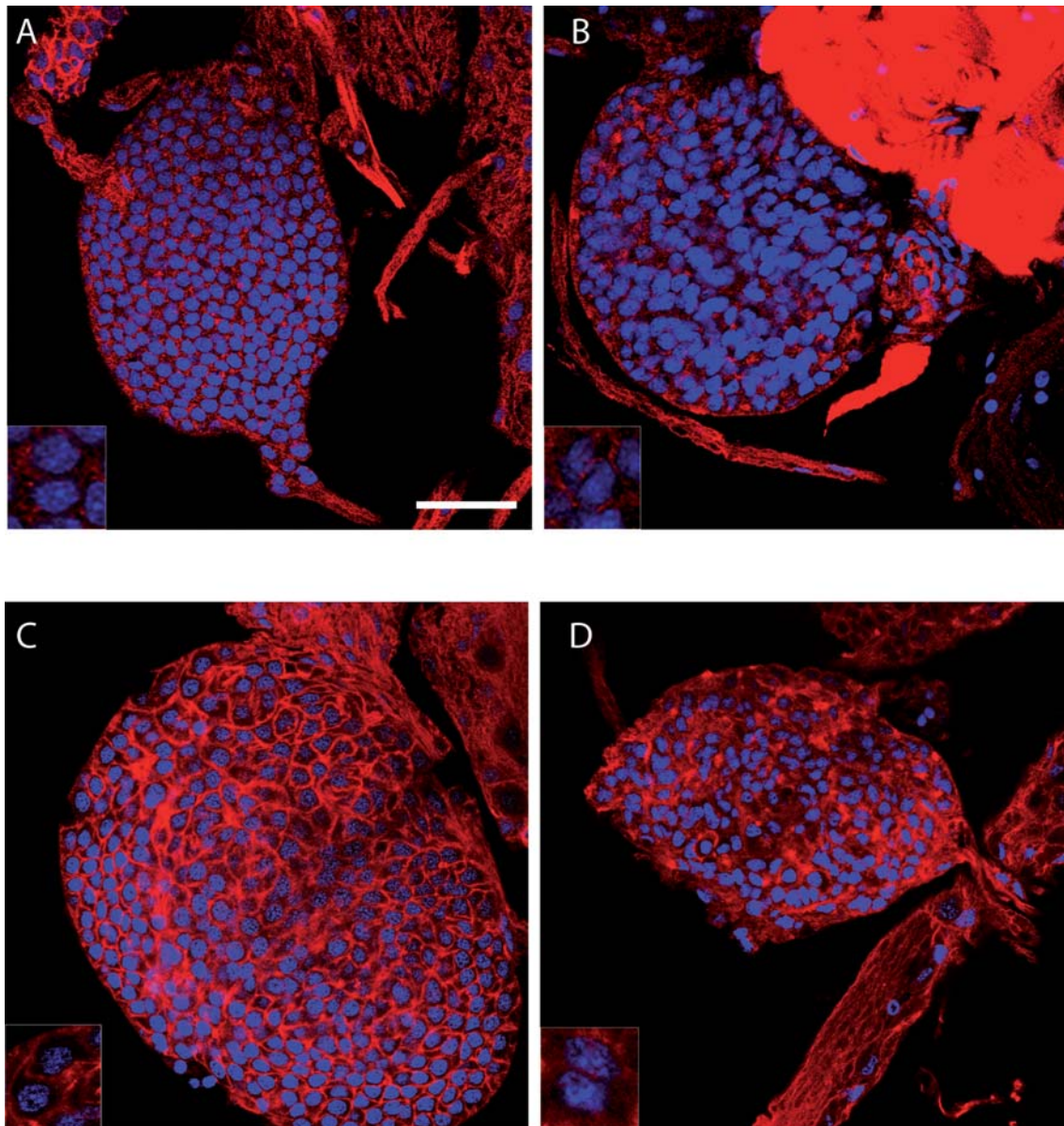


Figura 7.8.- Efecte de la interferència de BgSvpB en el desenvolupament dels *corpora allata* de *B. germanica* durant l'estadi adult. Es van injectar 3 µg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal acabades de mudar. Unes hores després de mudar i cinc dies després es van extreure els CA i es va teyir amb DAPI i fal-loïdina - TRITC. (A) CA de femella adulta tractada amb dsMock just després de mudar, representant l'aspecte d'uns CA normals abans de produir HJ. (B) CA de femella adulta tractada amb dsBgSvpB just després de mudar. (C) CA de femella adulta tractada amb dsMock cinc dies després de mudar, representant el creixement normal dels CA un cop comencen a produir HJ. (D) CA de femella adulta tractada amb dsBgSvpB cinc dies després de mudar. Les zones enquadrades mostren en detall la morfologia cel·lular. Escala: 200 µm.

que mentre que els CA dels tractats amb dsMock han augmentat el seu volum significativament, més espai entre el nucli i la membrana cel·lular, en els interferits amb dsBgSvpB no s'ha produït aquest augment, i inclús en alguns casos la glàndula és més petita que a l'inici del cicle gonadotròfic.

Per tal de comprovar si en l'afectació del desenvolupament dels CA estava implicat un procés de mort cel·lular, es va realitzar una tinció TUNEL (que marca la fragmentació del DNA característica de la mort cel·lular) de CA d'adults de 5 dies. En cap de les mostres es va observar marcatge per TUNEL del CA, indicant que no hi ha mort cel·lular en els CA interferits ni amb dsMock ni amb dsBgSvpB (Figura 7.9).

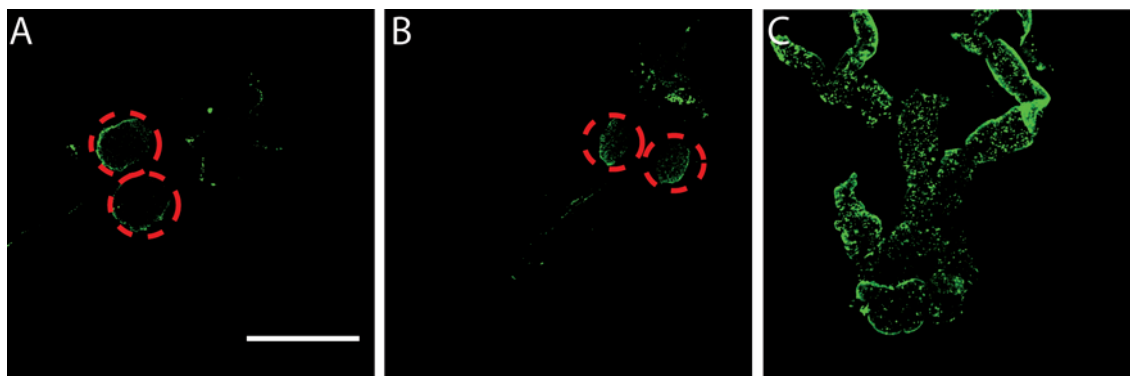


Figura 7.9.- Efecte de la interferència de BgSvpB sobre la mort cel·lular programada. Es van injectar 3 µg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal acabades de mudar. Cinc dies després de mudar a adult es van extreure els CA i es va realitzar la tinció TUNEL per determinar el grau de mort cel·lular associada a fragmentació del DNA nuclear. (A) CA de femella adulta tractada amb dsMock. (B) CA de femella adulta tractada amb dsBgSvp. (C) GP d'una femella recentment emergida amb tinció TUNEL, com a control positiu del marcatge amb TUNEL d'un teixit que es mor just després de la muda imaginal. Les ratlles discontinues indiquen la posició dels CA. Escala: 200 µm.

A continuació, es va realitzar una anàlisi a nivell molecular dels CA de femelles adultes. Per això, es van mesurar els nivells d'mRNA mitjançant Q-PCR dels tres enzims de la via de biosíntesi de l'HJ que havien estat prèviament clonats a *B. germanica*. Els tres gens analitzats van ser l'HMG-CoA Sintasa (BgHMG-S) (Martinez-Gonzalez et al., 1993a), l'HMG-CoA Reductasa (BgHMG-R) (Martinez-Gonzalez et al., 1993b) i la Farnesil Difosfat Sintasa (BgFPPS) (Martín et al., 2007). Els dos primers enzims actuen de manera seqüencial durant els primers passos de la via de biosíntesi de l'HJ i per últim, la BgFPPS és l'últim enzim de la via del mevalonat abans de la bifurcació cap a la via de síntesi de l'HJ, exclusiva d'insectes (Bellés et al., 2005). Les reaccions que catalitzen han estat prèviament descrites al capítol 1.4.1. Per tal de comprovar si les

femelles tractades amb dsBgSvp, dsBgSvpA, dsBgSvpB o dsMock presentaven diferències en l'expressió d'aquests enzims es van analitzar els nivells d'expressió en CA de femelles adultes de cinc dies. Tal i com es mostra a la Figura 7.10(A-C), els nivells d'expressió dels tres gens analitzats no presenten alteracions significatives entre els CA de les femelles tractades amb dsMock i les tractades amb dsBgSvpA. En canvi, en els CA de les femelles tractades amb dsBgSvp i dsBgSvpB els nivells d'expressió de BgHMG-S i de BgHMG-R són significativament més baixos que en les tractades amb dsMock i dsBgSvpA. Pel contrari, els nivells d'expressió de BgFPPS no presenten una variació significativa entre els diferents grups de tractats.

Aquests resultats confirmen que BgSvpB no només es necessari per al desenvolupament morfològic sinó que també controla l'expressió de l'mRNA dels enzims BgHMG-S i BgHMG-R en els CA. Per tal d'esbrinar si aquesta regulació era específica dels CA o també es produïa en altres teixits, es van mesurar els nivells d'aquests dos enzims en el cos gras de femelles adultes de cinc dies d'edat. En aquest teixit també s'expressen aquests gens de la via del mevalonat. A diferència de la branca de biosíntesi de l'HJ, que és específica dels CA, la via del mevalonat en altres teixits produeix diferents productes intermediaris del metabolisme com ara la ubiquinona, el dolicol i la isopentenil adenina (Bellés et al., 2005). Així doncs, es van mesurar els nivells d'expressió dels dos enzims en el cos gras de femelles adultes de cinc dies d'edat tractades amb dsBgSvp, dsBgSvpA, dsBgSvpB o amb dsMock. Tal i com es pot veure en la Figura 7.10(D-E), l'absència de BgSvp o BgSvpB no va produir diferències significatives en els nivells d'expressió de BgHMG-S ni de BgHMG-R entre els cossos grassos de les femelles tractades amb dsBgSvpA, dsBgSvpB, dsBgSvp ni dsMock. En resum, aquest resultat juntament amb els elevats nivells d'expressió de BgSvpB als CA, confirma que l'efecte d'aquest receptor nuclear és específic d'aquest teixit durant l'estadi adult.

Un fet a destacar és que els nivells d'expressió en les femelles adultes de *B. germanica* de la BgHMG-S i de la BgHMG-R en els CA són molt més elevats que en el cos gras. Concretament, la BgHMG-S s'expressa unes 17 vegades més en els CA i la BgHMG-R ho fa 50 vegades més. Els nostres resultats suggereixen que aquesta major expressió als CA es deu a BgSvpB, donat que en els CA de femelles interferides per BgSvpB els nivells d'expressió als CA i al cos gras són molt similars.

Tal i com hem descrit anteriorment, la via nutricional és necessària per l'activació de la producció de l'HJ en els CA de *B. germanica*. Així, fins que la panerola adulta no menja, els CA no s'activen i comencen a produir HJ (Osorio et al., 1997). El senyal nutricional es tradueix en creixement cel·lular mitjançant la via d'insulina (IGF) i la de la quinasa TOR (Target of Rapamycin)

(Edgar, 2006) (Figura 7.11). En els darrers anys, el grup del Dr. Josep L. Maestro ha estudiat variats elements d'aquesta via a *B. germanica*, entre els que destaquen el receptor de

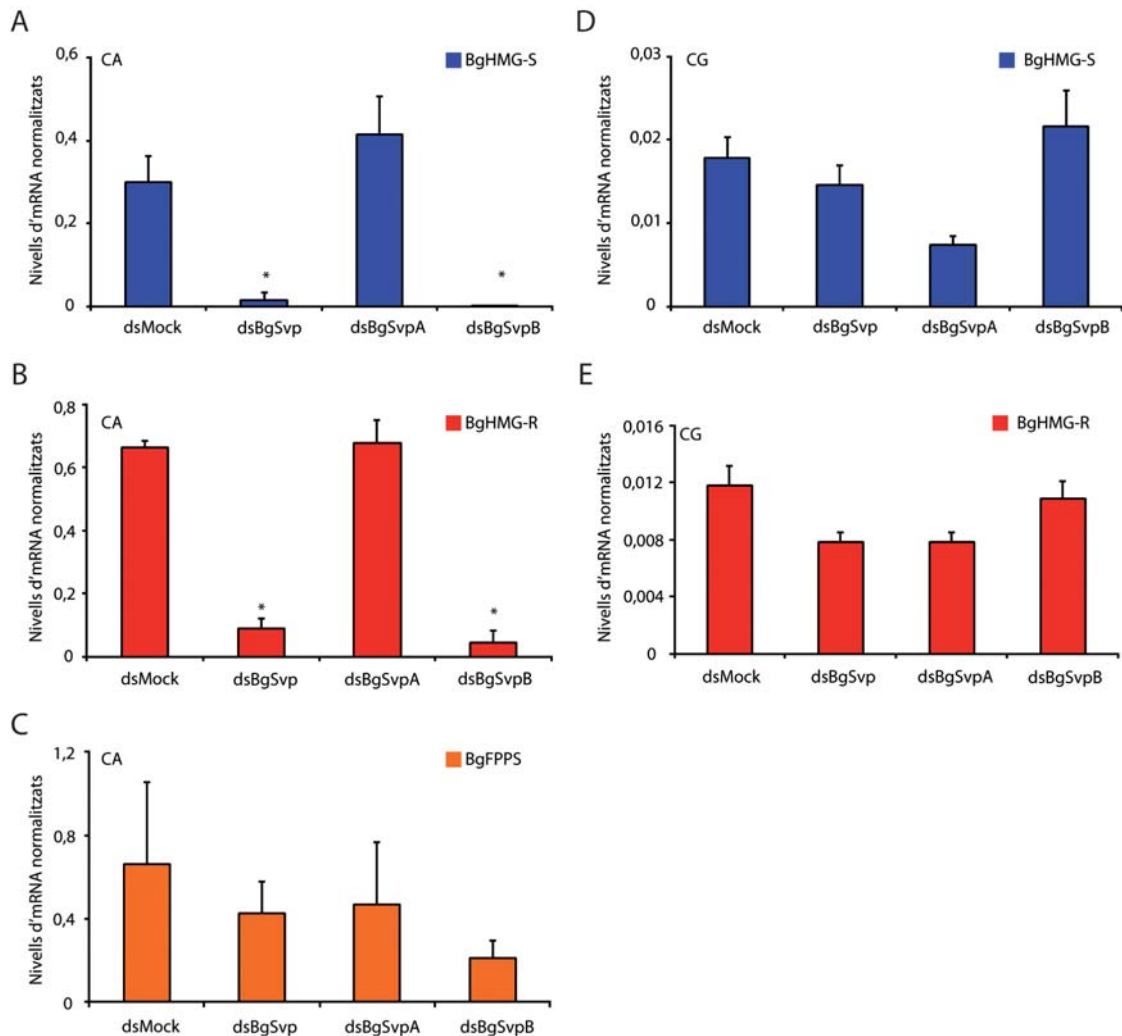


Figura 7.10.- Efecte de la interferència de dsBgSvpB sobre l'expressió de gens de la via del mevalonat en femelles adultes de *B. germanica*. Es van injectar 3 µg de dsBgSvpA, dsBgSvpB, dsBgSvp o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides i es va analitzar l'expressió de l'mRNA de HMG-CoA Sintasa (BgHMG-S), HMG-CoA Reductasa (BgHMG-R) i Farnesil Difosfat Sintasa (BgFPPS) en els CA (A-C) i en el CG (D-E) cinc dies després de mudar mitjançant Q-PCR. (A - C) Efecte del tractament amb dsBgSvpA, dsBgSvpB i dsBgSvp sobre els nivells d'mRNA de BgHMG-S, BgHMG-R i BgFPPS en els CA de femelles cinc dies després de mudar. (D - E) Efecte del tractament amb dsBgSvpA, dsBgSvpB i dsBgSvp sobre els nivells d'mRNA de BgHMG-S i BgHMG-R en el CG de femelles cinc dies després de mudar. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4-6). L'asterisc indica diferències estadísticament significatives $p \leq 0.05$ (*).

l'insulina (InR), FOXO, S6K i target of rapamycin (TOR). Remarcablement, la reducció dels nivells de BgTOR (Maestro et al., 2008) o InR (J.L.Maestro, comunicació personal) mitjançant RNAi *in vivo* produeix el mateix fenotip que la interferència de BgSvpB, es a dir, disminució de l'expressió de BgHMG-S i BgHMG-R en els CA. Es per això que es va voler comprovar si els CA de les femelles tractades amb dsBgSvpB tenien alterat el senyal nutricional analitzant els nivells d'expressió de BgTOR i BgInR en adults de cinc dies d'edat. Com es pot veure a la Figura 7.12, els nivells d'expressió d'aquest dos gens no varien entre les femelles tractades amb dsMock i les tractades amb dsBgSvpB. Aquest resultat juntament amb el fet previamente descrit de que les femelles interferides per BgSvpB menjaven normalment, ens suggereix que dos dels components clau de la via de transducció de la senyal nutricional no estan afectats per la interferència de BgSvpB i que el fenotip obtingut no es degut a una afectació de l'expressió de BgTOR ni de BgInR (Figura 7.12). Així doncs, BgSvpB regula l'expressió de BgHMG-S i BgHMG-R mitjançant altres mecanismes independents del senyal nutricional.

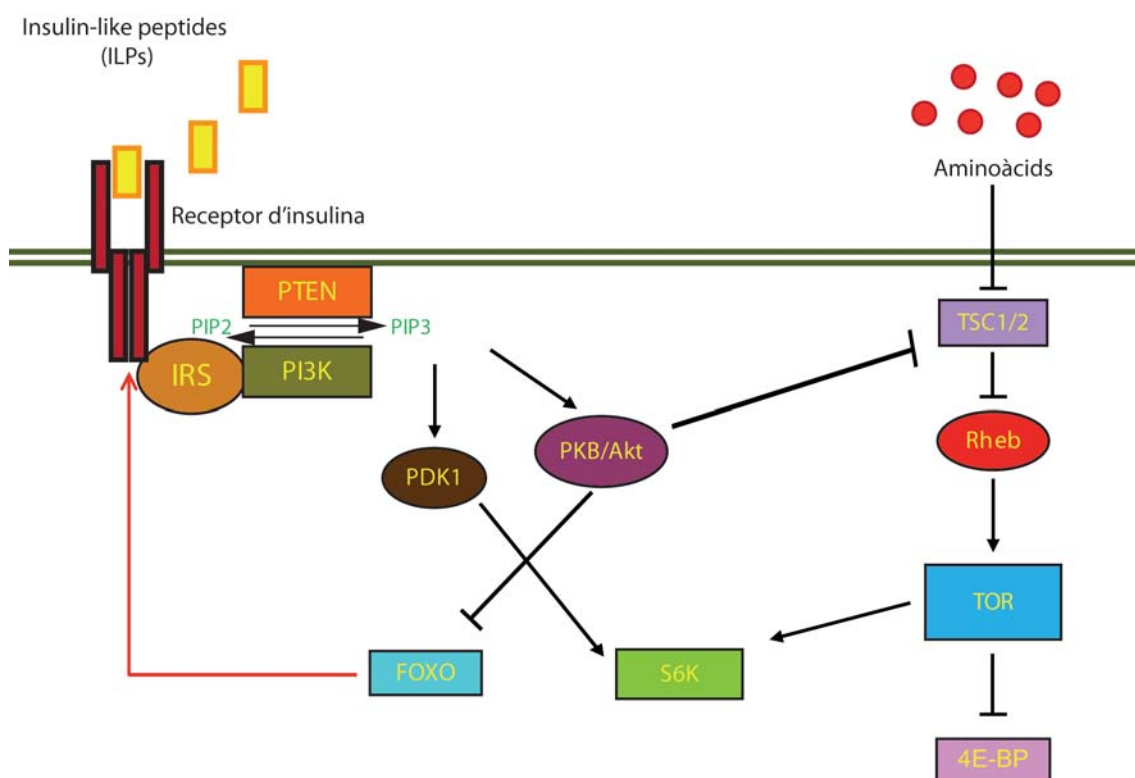


Figura 7.11. Esquema de les principals vies de transducció de la senyal nutricional. Les dos vies principals representades en aquest esquema són la via de l'insulina i la via de TOR. El receptor d'insulina s'uneix als "insulin-like peptides", activant la via i produint creixement cel·lular. La presència d' aminoàcids activa la quinasa TOR, que té un paper essencial en la regulació del creixement cel·lular.

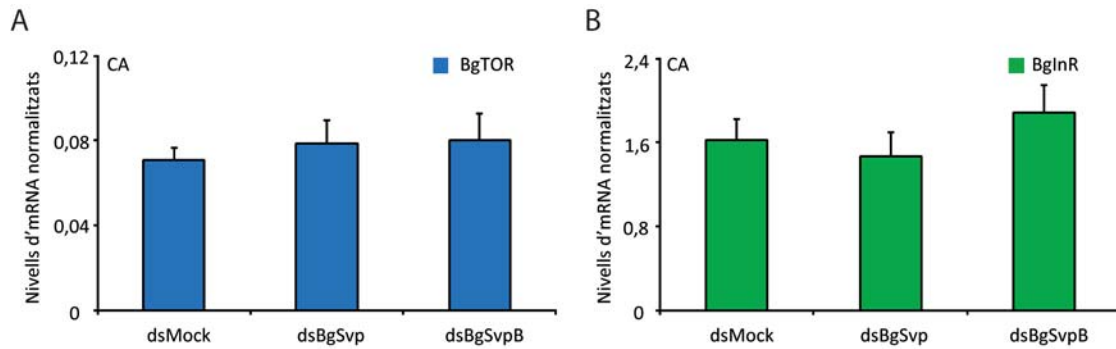


Figura 7.12. Efecte de la interferència de BgSvp sobre l'expressió dels mRNA de BgTOR i BgInR. Es van injectar 3 µg de dsBgSvp, dsBgSvp o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides i cinc dies després de mudar es van mesurar els nivells d'mRNA de BgTOR i BgInR en els CA. (A) Efecte de la interferència de BgSvp sobre els nivells d'mRNA de BgTOR en els CA. (B) Efecte de la interferència de BgSvp sobre els nivells d'mRNA de BgInR en els CA. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4-5).

Donat que en molts casos, l'activació de determinats gens que codifiquen per enzims involucrats en la síntesi d'hormones està regulada per la concentració de la mateixa hormona que produeix la glàndula, ens vam preguntar si en el nostre cas els nivells baixos d'expressió dels mRNA de BgHMG-S i BgHMG-R fossin una conseqüència de l'absència d'HJ i no de la interferència de BgSvpB. Per tal d'aclarir aquest punt, es van tractar femelles de sisena fase recentment emergides amb dsBgSvpB o dsMock i un cop mudades a adult es va aplicar acetona i metoprè a les tractades amb dsBgSvpB i només acetona a les tractades amb dsMock. A continuació, es van analitzar els nivells d'expressió d'mRNA de BgHMG-S i BgHMG-R en els CA de femelles adultes de dos i cinc dies d'edat. Tal i com es pot veure a la Figura 7.13, l'aplicació de metoprè no activa l'expressió de cap dels dos gens analitzats en els CA de les femelles tractades amb dsBgSvpB, confirmant que és la interferència de BgSvpB la que produeix que els nivells d'expressió dels dos enzims de la via del mevalonat siguin baixos.

7.2.6. Efecte del silenciament de BgSvpB durant el desenvolupament dels CA durant els estadis ninfals

Els experiments que hem dut a terme fins ara ens han permès demostrar que BgSvpB regula el desenvolupament i l'activitat biosintètica dels CA durant l'estadi adult mitjançant l'activació d'almenys dos gens de la via biosintètica d'aquest òrgan, la BgHMG-S i la BgHMG-R. Tal i com hem descrit, aquest efecte l'observem en l'estadi adult, un cop les femelles han estat tractades a l'inici de la sisena i última fase nimfal. Donat que a l'últim estadi nimfal les cèl·lules

dels CA presenten una alta tasa de divisió (Chiang et al., 1991; Chiang et al., 1992), ens vam preguntar si l'absència de BgSvpB afectaria a la proliferació d'aquestes cèl·lules durant els diferents estadis nimfals.

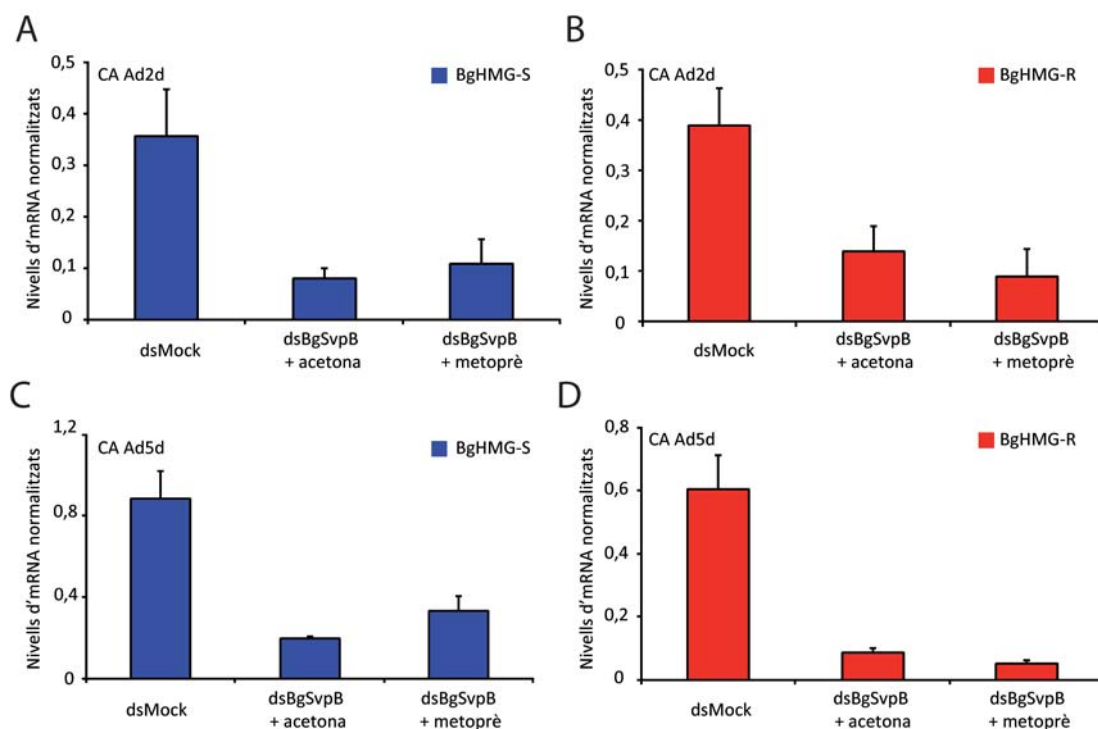


Figura 7.13.- Efecte del metoprè sobre l'expressió de l'mRNA de dos gens de la via del mevalonat en els CA de femelles adultes tractades amb dsBgSvpB. Es van injectar 3 µg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de sisena fase recentment emergides i un cop mudades a adult van ser tractades amb metoprè, un anàleg de l'HJ o amb acetona. Es va analitzar l'expressió de l'mRNA de HMG-CoA Sintasa (BgHMG-S) i HMG-CoA Reductasa (BgHMG-R) en els CA dos i cinc dies després de mudar, mitjançant Q-PCR. Nivells d'mRNA de BgHMG-S (A) i de BgHMG-R (B) en CA de femelles adultes de dos dies d'edat. Nivells d'mRNA de BgHMG-S (C) i de BgHMG-R (D) en CA de femelles adultes de cinc dies d'edat. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4-5)

Per això, es va estudiar la divisió cel·lular dels CA durant la sisena fase nimfal mitjançant el marcatge amb BrdU, tal i com es descriu a l'apartat 3.16. Per tal d'estudiar si BgSvpB regula el procés de divisió cel·lular en els CA durant l'estadi nimfal, es van tractar femelles de sisena fase recentment emergides amb dsMock i dsBgSvp, i es van injectar BrdU 24 hores abans de realitzar l'anàlisi en CA de femelles de sisena fase nimfal de quatre i sis dies d'edat. Tal i com havíem observat en l'apartat anterior, en els CA de femelles tractades amb dsMock es va observar marcatge de divisió cel·lular tant a quatre com a sis dies d'edat de sisena fase (Figura 7.14A i C).

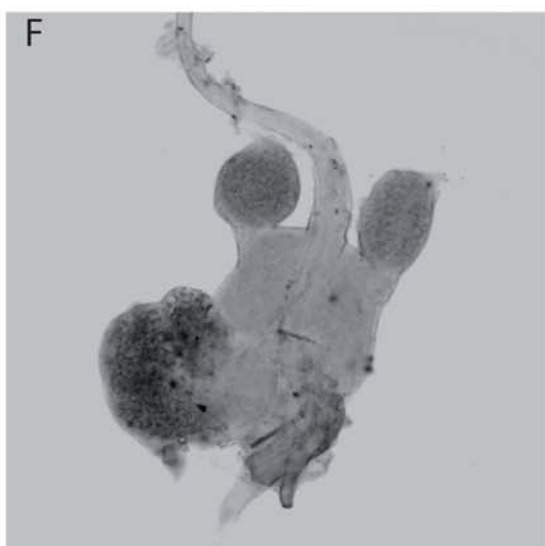
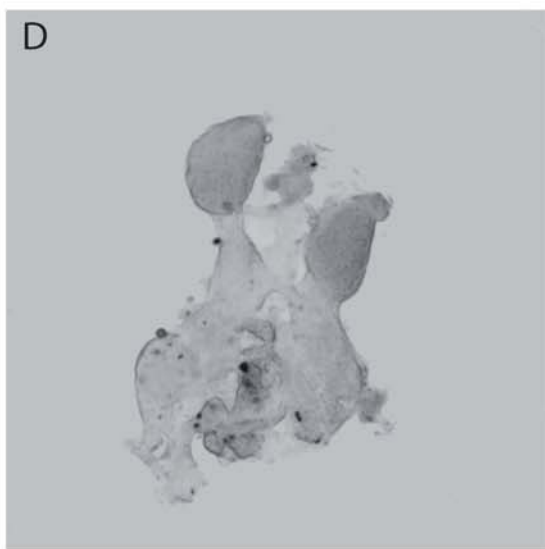
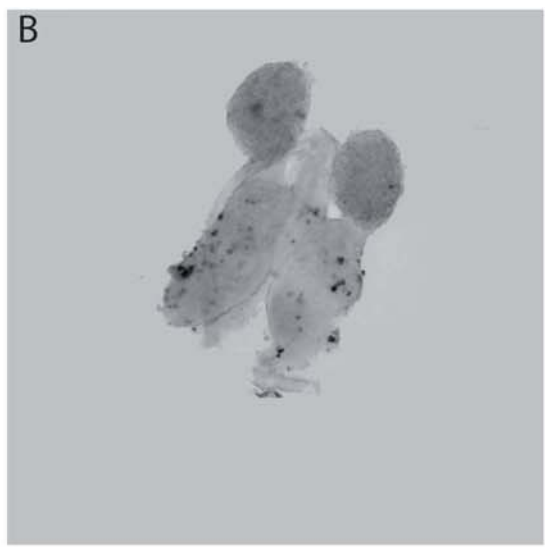
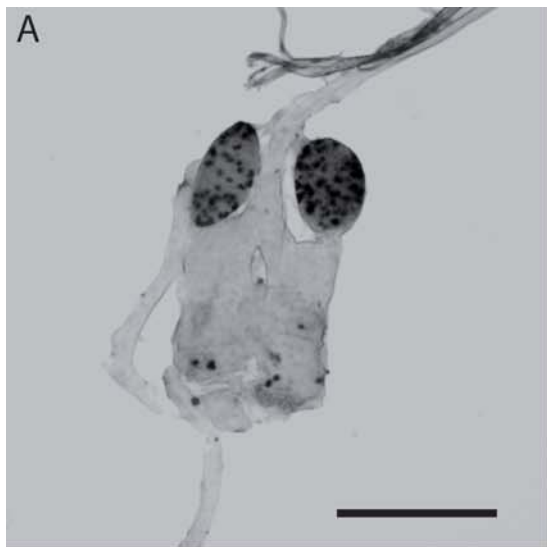
Pel contrari, tal i com es pot veure a la Figura 7.14B i D, en els CA de les femelles tractades amb dsBgSvpB no es va detectar marcatge, ni a quatre ni a sis dies d'edat de sisena fase. Degut a que en la fase adulta de *B. germanica* no hi ha divisió cel·lular en els CA també es va realitzar el marcatge amb BrdU dels CA de tres dies d'edat adulta per comprovar que no hi havia senyal. Així, no es va observar marcatge ni en les femelles tractades amb dsMock ni en les tractades amb dsBgSvp (Figura 7.14E i F). En resum, aquests resultats demostren que BgSvpB regula la divisió cel·lular dels CA durant la sisena fase nimfal de *B. germanica*, donant com a resultat que el nombre de cèl·lules al mudar a adult sigui menor que en les femelles control.

Per tal de comprovar si el control de BgSvpB sobre la proliferació cel·lular era exclusiu de la darrera fase nimfal o bé es produïa durant els diferents estadis juvenils, vam repetir l'experiment interferint nimfes recentment emergides de cinquena (penúltima) fase nimfal. Així, es van interferir nimfes de cinquena fase recentment emergides amb dsMock i dsBgSvpB i es van injectar BrdU 24 hores abans de realitzar l'anàlisi. Tal com veiem a la Figura 7.15, la divisió cel·lular també està afectada en les cèl·lules dels CA de les femelles de cinquena fase de quatre dies d'edat tractades amb dsBgSvpB. Tot i que BgSvpB regula la divisió cel·lular dels CA de cinquena fase no afecta la producció d'HJ ja que com havíem vist a l'apartat 7.2.2. les femelles tractades muden correctament a sisena fase.

7.2.7. Efecte de la interferència de BgSvp en el segon cicle gonadotròfic de *B.*

germanica

Els resultats anteriors ens demostren que el tractament amb dsBgSvpB afecta el desenvolupament dels CA durant la sisena fase nimfal i que després de la muda imaginal les femelles interferides presenten alteracions en l'expressió d'almenys dos enzims clau de la via de biosíntesi de l'HJ en els CA i que no produeixen HJ, amb les conseqüents alteracions en els processos associats a la reproducció que regula aquesta hormona. Per altra banda, també hem demostrat que BgSvpB és necessari per que les cèl·lules dels CA proliferin durant els estadis ninfals. Per tal d'esbrinar si la inhibició en la proliferació cel·lular era responsable dels defectes biosintètics observats en els CA de les femelles adultes o si BgSvpB regula l'expressió d'aquests gens de manera independent a la proliferació cel·lular es van injectar dsBgSvpB a femelles adultes recentment emergides que presenten un nombre fix de cèl·lules. Així, cinc dies després del tractament les femelles adultes interferides per BgSvpB no presentaven



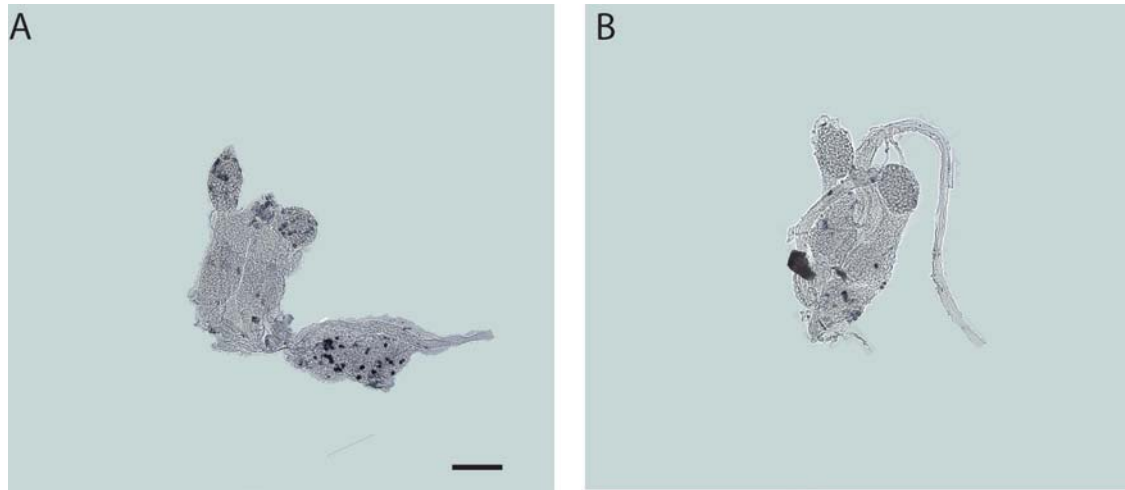


Figura 7.15.- Efecte del silenciament de BgSvp en el desenvolupament dels CA durant la penúltima fase nimfal. Es van injectar 3 μg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de cinquena fase nimfal acabades de mudar. La proliferació cel·lular va ser analitzada mitjançant el marcatge amb 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), que va ser injectada 24 hores abans d'extreure els CA. CA de femelles de cinquena fase de quatre dies d'edat, tractades amb dsMock (A) i amb dsBgSvpB (B). Escala: 200 μm .

diferències en la longitud de l'oòcit basal respecte a les dsMock, al contrari del que passava en interferir BgSvpB en femelles de sisena fase nimfal recentment emergides. Aquest resultat podria ser degut a que la proteïna de BgSvp present en les femelles en el moment de la injecció es suficient per emascarar l'efecte de la interferència, tal i com ja havia passat en l'estudi de BgRXR (Maestro, 2008).

Així doncs, es va optar per utilitzar el segon cicle gonadotròfic per tal d'esbrinar si realment l'activació dels CA mediada per l'activació de BgSvpB és independent de l'efecte regulador de la proliferació cel·lular. Aquesta estratègia d'interferència es va dissenyar aprofitant que a *B. germanica*, durant els 17 dies que es transporta la ooteca entre el primer i el segon cicle gonadotròfic, els nous oòcits basals estan quiescents i quan la femella allibera la ooteca comença un segon cicle gonadotròfic. Així doncs, el que es fa es injectar el dsRNA

Figura 7.14.- Efecte de la interferència de BgSvpB en el desenvolupament dels CA durant la última fase nimfal de *B. germanica*. Es van injectar 3 μg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles de sisena fase nimfal acabades de mudar. La proliferació cel·lular va ser analitzada mitjançant el marcatge amb 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), que va ser injectada 24 hores abans d'extreure els CA. (A - B) CA de femelles de sisena fase de quatre dies d'edat, tractades amb dsMock (A) i amb dsBgSvpB (B). (C - D) CA de femelles de sisena fase de sis dies d'edat, tractades amb dsMock (C) i amb dsBgSvpB (D). (E - F) CA de femelles adultes acabades de mudar, tractades amb dsMock (E) i amb dsBgSvpB (F). Escala: 200 μm .

durant el primer dia de transport de ooteca (tenint en compte que el nombre de cèl·lules que conformen els CA és constant) i deixar que la transportin durant 11 dies, moment en que es retira la ooteca i comença el segon cicle. Es va establir que 11 dies eren els necessaris per aconseguir el major efecte de la interferència i d'aquesta manera hi hagués temps suficient per degradar la proteïna que estigues present (Maestro, 2008). Així, es van injectar 3 µg de dsBgSvpB o dsMock a femelles adultes un dia després d'haver tret la ooteca. Passats 11 dies, es va retirar manualment l'ooteca per tal d'induir l'inici del segon cicle gonadotròfic (Figura 7.16A). Primer de tot, es va mesurar la longitud dels oòcits basals cinc dies després de l'inici del segon cicle gonadotròfic. La longitud dels oòcits basals de les femelles tractades amb dsMock era de 1,49 mm, mentre que les tractades amb dsBgSvp presentaven una longitud de 0,51 mm. Indicant que la interferència de BgSvp durant el segon cicle gonadotròfic també afecta el creixement de l'oòcit basal. A continuació, es van mesurar els nivells d'mRNA de BgVg mitjançant Q-PCR en el cos gras de femelles adultes cinc dies després de començar el segon cicle gonadotròfic i es va comprovar que els nivells de BgVg eren significativament més baixos en les femelles tractades amb dsBgSvpB respecte les tractades amb dsMock (Figura 7.16B). Tot seguit, es van mesurar els nivells d'mRNA de BgHMG-S, BgHMG-R i BgFPPS en els CA cinc dies després de l'inici del segon cicle gonadotròfic mitjançant Q-PCR. Vam comprovar que els nivells de BgHMG-S i BgHMG-R eren significativament més baixos en les femelles tractades amb dsBgSvpB que en les tractades amb dsMock (Figura 7.16C i D), mentre que els nivells de BgFPPS no eren significativament més baixos (Figura 7.16E). Com es va fer durant l'estudi del primer cicle gonadotròfic, també es van mesurar els nivells d'expressió de BgHMG-S i BgHMG-R en el cos gras. Els nivells d'expressió de l'mRNA d'ambdós enzims no variaven entre les femelles tractades amb dsMock i les tractades amb dsBgSvp. (Figura 7.16F i G).

En resum, aquest resultat ens confirma que BgSvpB regula l'expressió d'almenys dos enzims clau en la via de síntesi de l'HJ durant els diferents cicles gonadotròfics de la panerola adulta i que l'efecte regulador de la proliferació cel·lular que té el receptor nuclear durant el desenvolupament nimfal és independent a l'efecte regulador sobre la síntesi de l'HJ durant l'estadi adult.

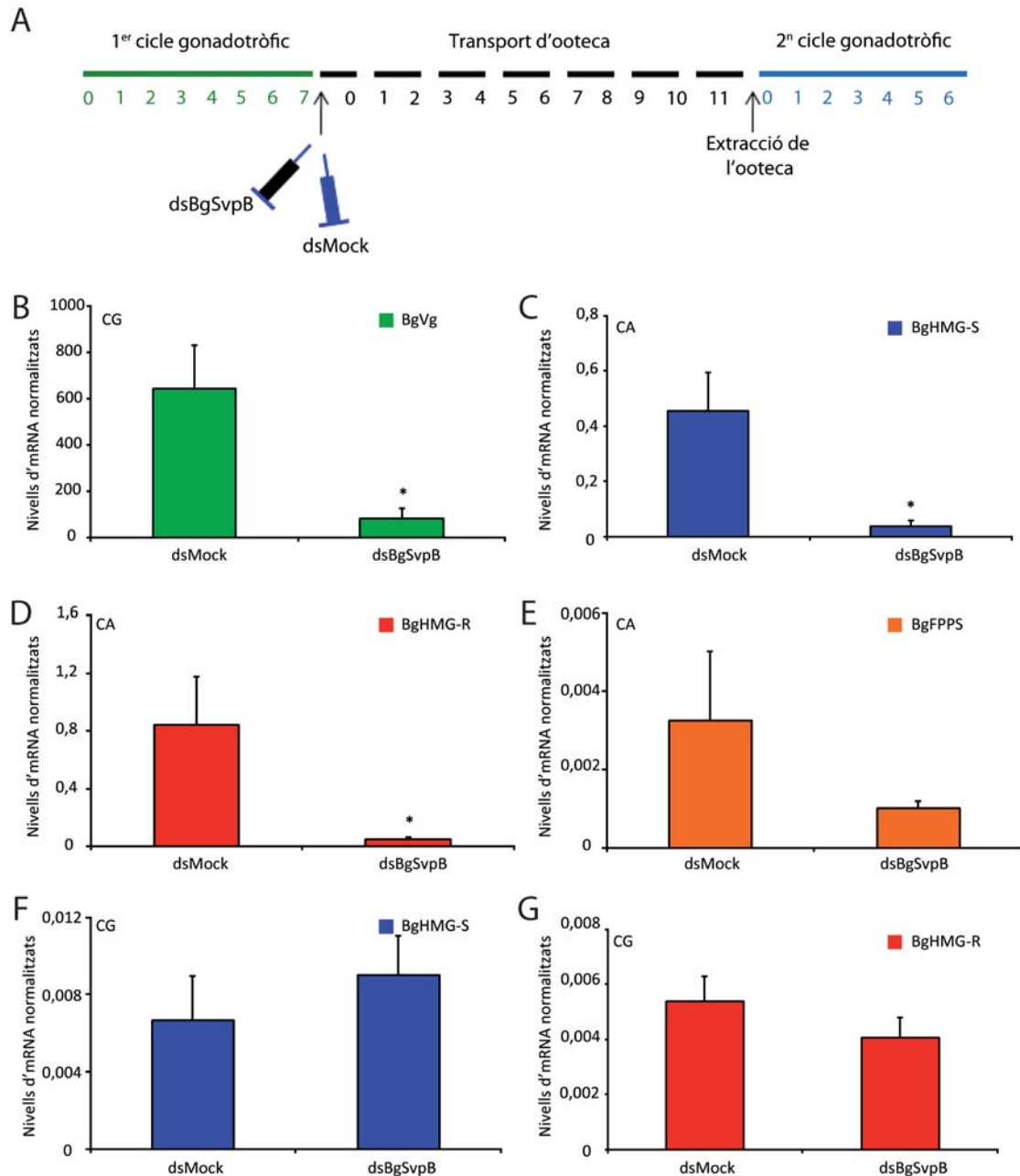


Figura 7.16.- Efecte de la interferència de BgSvpB durant el segon cicle gonadotròfic. (A) Estratègia experimental de silenciament gènic amb RNAi *in vivo* durant el segon cicle gonadotròfic de *B. germanica*. Es van injectar 3 µg de dsBgSvpB o bé dsMock a femelles que acabaven d'extreure l'ooteca i onze dies després es va retirar l'ooteca per tal d'iniciar el segon cicle gonadotròfic i es van mesurar els diferents mRNA cinc dies després. Nivells d'mRNA de BgVg (B), BgHMG-S (F) i BgHMG-R (G) en el CG de femelles adultes cinc dies després de començar el segon cicle gonadotròfic. Nivells d'mRNA de BgHMG-S (C), BgHMG-R (D) i BgFPPS(E) en els CA de femelles adultes cinc dies després de començar el segon cicle gonadotròfic. Els valors estan normalitzats per l'expressió de BgActina5C. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). L'asterisc indica diferències estadísticament significatives, $p \leq 0.05$ (*).

7.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha estudiat la funció del receptor nuclear BgSvp en el desenvolupament post-embrionari de *B. germanica*, mitjançant la utilització d'RNAi *in vivo*, sent aquest el primer estudi funcional d'aquest receptor nuclear en un insecte hemimetàbol. El fet que totes les nimfes de sisena fase interferides per BgSvp mudin correctament a l'estadi adult indica que BgSvp no intervé en la regulació de la via de senyalització de la 20E, a diferència del que succeeix en els insectes holometàbols *D. melanogaster*, *A. aegypti* i *T. castaneum*. A la mosca *D. melanogaster*, DmSvp pot modular la resposta de la 20E tant *in vivo* com *in vitro*. En assaigs de transfecció cel·lular en cèl·lules S2, DmSvp inhibeix la resposta de la 20E interactuant amb DmUSP i impeding l'heterodímerització amb DmEcR. *In vivo*, la sobreexpressió de DmSvp durant la tercera fase larvaria produeix la mort de totes les larves al començament de la metamorfosi. Aquesta mortalitat pot ser rescatada mitjançant la sobreexpressió de DmUSP (Zelhof et al., 1995), fet que suggereix que DmUSP interactua amb DmSvp. En el cas d'*A. aegypti* també s'ha demostrat mitjançant assaigs de co-immunoprecipitació, que AaSvp interactua amb AaUSP i també que en assaigs de transfecció cel·lular inhibeix l'activació de gens dependents de la 20E a través de l'heterodímer EcR-USP (Zhu et al., 2003). Finalment, a *T. castaneum* s'ha demostrat que TcSvp és indispensable per a la metamorfosi ja que cap de les larves interferides per TcSvp mitjançant RNAi *in vivo* arriba a mudar a adult; la majoria poden pupar però no superen aquesta fase (Tan i Palli, 2008). En resum, aquests resultats, juntament amb els que presentem en aquest capítol suggereixen que la capacitat de Svp d'interactuar amb el receptor de la 20E i regular la seva senyalització és exclusiva dels insectes holometàbols.

Sorprenentment, els nostres resultats demostren que BgSvp està implicat en la regulació de l'altra hormona clau en el desenvolupament dels insectes, l'HJ, regulant l'expressió d'almenys dos dels gens de la via de biosíntesi a *B. germanica*. Així, la interferència de BgSvp reduïx l'expressió de BgHMG-S i BgHMG-R, i com a conseqüència no es produïx HJ i els processos dependents d'aquesta hormona en la panerola adulta es veuen afectats. Anteriorment, ja s'havia demostrat que el receptor nuclear BgE75 controla la síntesi d'HJ regulant l'expressió de BgHMG-S en els CA de *B. germanica* (Mane-Padros et al., 2008). Aquests resultats, juntament amb els presentats en aquesta tesi, relacionen dos receptors nuclears amb la regulació de l'expressió de dos enzims de la via del mevalonat a insectes. En el cas de BgE75, es demostra que un factor de la via de senyalització de la 20E regula la síntesi de l'HJ. Malgrat aquests resultats, en insectes holometàbols encara es coneix poc sobre la regulació a nivell molecular de la via de biosíntesi de l'HJ. S'ha demostrat que la síntesi de l'HJ està controlada per neuropèptids, com ara les al·latotropines (AT) i les al·latostatines (AST), activadors i inhibidors respectivament de la síntesi

de l'HJ (Goodman i Granger, 2005) però encara es desconeix el mecanisme molecular. A *B. germanica* s'han aïllat quatre pèptids amb activitat al·lostàtica *in vitro* a partir d'extractes de cervell (Belles et al., 1994), que provenen d'un sol gen precursor que inclou 13 possibles AST (Belles et al., 1999). El silenciament d'aquest gen per RNAi però, no afecta la producció d'HJ (Maestro i Belles, 2006). A més dels neuropèptids, també s'ha demostrat que els nivells de 20E regulen l'activitat dels CA (Goodman i Granger, 2005; Kaneko et al., 2011).

Pel que fa a l'expressió i regulació dels enzims de la via de biosíntesi de l'HJ no es disposa de molta informació. Els dos enzims més estudiats són l'HMG-S i l'HMG-R ja que en vertebrats s'ha demostrat que són els enzims limitants de la via (Goldstein i Brown, 1990). La regulació d'aquests dos enzims ha estat especialment estudiada en els coleòpters, *Dendoctonus jeffreyi*, *Ips pini* i *Ips paraconfusus*. Aquests escarabats són greus plagues forestals tant a Nord-Amèrica com a Europa, i per tal de controlar-les s'estudia la regulació de la via del mevalonat ja que les feromones que produeixen són derivades de productes intermedis de la via. Així, s'ha demostrat que l'aplicació d'HJ augmenta l'expressió de l'mRNA de HMG-R a *I. paraconfusus* (Tittiger et al., 1999), *I. pini* (Tillman et al., 2004) i *D. jeffreyi* (Tittiger et al., 2003) i que també regula l'expressió de l'HMG-S en els mascles de *D. jeffreyi* (Tittiger et al., 2000). Tot i que no s'ha estudiat la seva regulació també s'ha clonat HMG-R en el dípter *D. melanogaster* (Gertler et al., 1988) i el lepidòpter *A. ipsilon* (Duportets et al., 2000). En el nostre insecte model, *B. germanica*, s'ha clonat tant l'HMG-R (Martinez-Gonzalez et al., 1993b) com l'HMG-S (Martinez-Gonzalez et al., 1993a). Posteriorment, s'ha demostrat que a la panerola l'aplicació d'HJ al cos gras no activa l'expressió de l'mRNA de BgHMG-R (Cruz et al., 2003), i segons els nostres resultats l'HJ tampoc augmenta directament l'expressió dels dos enzims en els CA (vegeu Figura 7.13). Tot i això, gràcies a la seqüenciació del genoma del lepidòpter *B. mori*, en els últims anys s'han clonat tots els enzims de la via del mevalonat, fins a la formació de farnesil difosfat (figura 1.8), i s'ha demostrat que durant la penúltima fase larval hi ha una relació entre els nivells d'expressió dels enzims de la via del mevalonat i els nivells de producció de l'HJ (Kinjoh et al., 2007). Aquests resultats, juntament amb els patrons d'expressió d'aquests gens en els CA de *B. mori* (Ueda et al., 2009) permetran estudiar en detall els mecanismes moleculars a través dels quals es regula l'expressió dels diferents enzims de la via del mevalonat.

A diferència dels insectes, la regulació de la via del mevalonat ha estat més estudiada en vertebrats degut a que en aquests organismes el producte final és el colesterol, i els seus nivells en sang estan relacionats amb malalties cardiovasculars. La síntesi de colesterol està regulada

per la concentració intracel·lular del colesterol i per dos hormones, el glucagó i la insulina. El pas limitant de la via i el principal punt de regulació és la conversió d'HMG-CoA a mevalonat, realitzada per l'HMG-R, així en presència d'alts nivells de colesterol els nivells d'expressió de l'HMG-R es redueixen (Goldstein i Brown, 1990). El principal sistema de regulació de l'expressió de l'HMG-R i la d'altres enzims de la via de síntesi i transport del colesterol és mitjançant les SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins). Les SREBP són factors de transcripció units a la membrana del reticle endoplasmàtic, i quan els nivells de colesterol disminueixen es produeix una proteolisi que allibera el domini actiu, que es desplaça al nucli i regula la transcripció de varis dels enzims, entre ells alguns de la via del mevalonat com l'HMG-R, l'HMG-S i la FPPS. A més, també regula enzims implicats en el transport del colesterol (Brown i Goldstein, 1997, 1999; Gimpl et al., 2002). A més de les SREBPS, hi ha altres factors que regulen l'expressió dels enzims de la via. Interessantment, entre els receptors nuclears que regulen l'expressió d'HMG-S hi ha COUP-TFI, l'homòleg de Svp a mamífers. Aquest receptor regula l'expressió de l'HMG-S de manera diferent segons el context cel·lular en que es troba el gen, podent-lo activar o reprimir (Rodríguez et al., 1997). PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) és un altra receptor nuclear implicat en la regulació de l'HMG-S (Rodríguez et al., 1994). Aquests receptors controlen l'hemostasi de lípids i glucosa i se'ls relaciona directament amb resistència a la insulina i amb altres malalties metabòliques (Chawla et al., 2001; Lee et al., 2006; Tan et al., 2005). Curiosament, l'homòleg de PPAR a insectes és el receptor nuclear E75, que també s'ha demostrat que controla l'expressió de BgHMG-S als CA de *B. germanica* (Mane-Padros et al., 2008).

Una altra de les vies implicades en la regulació de la síntesi de l'HJ és la via nutricional; les femelles de *B. germanica* dejunades produeixen molt poca HJ i no se'ls desenvolupen els oòcits basals (Comas et al., 1999; Osorio et al., 1997). La panerola *B. germanica* és un insecte anautogènic, no es reproduïx fins que menja, i una de les vies de senyalització encarregada d'indicar a les cèl·lules si l'insecte s'alimenta és la via de TOR, una quinasa que s'activa en presència d'aminoàcids i que regula processos com el creixement i proliferació cel·lular (Baker i Thummel, 2007; Oldham i Hafen, 2003). En el cas de *B. germanica*, la interferència de BgTOR inhibeix la producció d'HJ en femelles adultes i els nivells d'expressió de BgHMG-S i BgHMG-R en els CA són baixos (Maestro et al., 2008). Una altra de les vies relacionades amb la nutrició i l'activació dels CA és la via del receptor d'insulina (InR). El mutant d'InR a *D. melanogaster* produeix menys HJ (Tatar et al., 2001; Tu et al., 2005), A més, en els CA d'aquestes mosques mutants no s'expressa l'HMG-R (Belgacem i Martin, 2007). En el cas de *B. germanica*, els resultats obtinguts són semblants, les femelles interferides per BgInR presenten nivells

d'expressió reduïts de BgHMG-S i BgHMG-R en els CA i no se'ls desenvolupen els ovaris (J.L.Maestro, resultats no publicats). Els nostres resultats però demostren que en els interferits per BgSvp els nivells d'expressió de BgTOR i BgInR no estan afectats, fet que suggereix que hi ha dos processos reguladors independents de l'activació biosintètica dels CA: la via nutricional a través de BgTOR i BgInR, i la via dependent de BgSvp. La relació entre Svp/COUP-TF i les vies de senyalització nutricional ha estat descrita en mamífers, on la mutació de COUP-TFII en el cervell de ratolins provoca una reducció en el creixement del cervellet degut a una reducció en la tasa de proliferació i un augment de l'apoptosi en un tipus cel·lular determinat, les GPC (granule cell precursors). Aquest efecte és a través de la via de l'insulin like growth factor 1 (IGF-1), ja que en els mutants de COUP-TFII l'expressió d'IGF1 i la fosforilació d'Akt1, dos dels components de la via, es troben reduïdes (Kim et al., 2009).

Un altre dels resultats obtinguts en interferir BgSvp és la inhibició de la divisió cel·lular dels CA durant les dues últimes fase nimfals. A *B. germanica*, s'ha demostrat que el nombre de cèl·lules dels CA augmenta durant els últims dies de la cinquena fase nimfal, quan els nivells de 20E són més elevats; en canvi, durant la última fase nimfal el nombre de cèl·lules augmenta durant tots els dies (Chiang et al., 1992). Aquest resultat ens indica que BgSvp regula el cycle cel·lular dels CA; anteriorment ja s'ha demostrat una relació entre el receptor nuclear i el cycle cel·lular a la mosca *D. melanogaster*. DmSvp regula la proliferació cel·lular en els tubs de Malpighi de l'embrió del dípter. Concretament, la via de senyalització d'EGFR activa DmSvp en les cèl·lules precursors dels tubs de Malpighi i posteriorment, DmSvp activa directa o indirectament la transcripció de components clau del cycle cel·lular. Així doncs, DmSvp almenys regula la transcripció de String (stg), una cdc25 fosfatasa que regula la transició entre les fases G₂ i M del cycle cel·lular i de la ciclina E (cycE), que regula la transició entre les fases G₁ i S (Kerber et al., 1998). El control del cycle cel·lular depèn de dos famílies de proteïnes, les ciclines i les proteïnes quinases dependents de ciclines (cdk). Les ciclines s'uneixen a les cdk activant-les i el complex fosforila altres proteïnes. Dos dels complexos més estudiats són la ciclina E/Cdk 2, que regula la progressió de la fase G₁ a S del cycle cel·lular i la ciclina B/Cdk 1, que regula el pas entre G₂ i M (Swanhart et al., 2005). Així doncs, BgSvp és possible que reguli els nivells d'mRNA d'alguna de les proteïnes implicades en el control del cycle cel·lular, tal i com passa a *D. melanogaster*. D'altra banda, també s'ha demostrat que DmSvp regula la diferenciació de varis teixits durant l'embriogènesi de *D. melanogaster*. Aquest receptor nuclear està implicat en la diferenciació dels ommatidis, el tub cardíac i els neuroblasts i ho fa a través de diferents vies de senyalització. Per exemple, en la diferenciació dels fotoreceptors de l'ull de *D. melanogaster* DmSvp actúa a través de la via de Ras (Begemann et al., 1995). Durant el desenvolupament del

tub cardíac, la senyalització de hedgehog (hh) regula l'expressió de Svp en dos dels sis cardioblasts (Ponzielli et al., 2002). Finalment, DmSvp està implicat en el correcte desenvolupament i diferenciació dels neuroblasts, regulant l'expressió de diferents factors com ara Hunchback (Hb) o Kruppel (Kr) (Kanai et al., 2005; Maurange et al., 2008).

Tot i el seu efecte en la proliferació cel·lular hem demostrat que mitjançant la interferència de BgSvp durant el segon cicle gonadotròfic que també redueix els nivells d'expressió de BgHMG-S i BgHMG-R en els CA i la vitel·logenina en el cos gras en femelles que presenten un CA amb el mateix nombre de cèl·lules que una femella control. En resum, els resultats obtinguts en la caracterització funcional del receptor nuclear BgSvp en aquesta tesi demostren que BgSvp exerceix dues funcions independents en els CA de *B. germanica*, regula la proliferació cel·lular de la glàndula durant la última fase nimfal i que alhora és necessari per l'activació biosintètica dels CA, controlant l'expressió d'almenys dos dels enzims de la via del mevalonat. A més, també hem demostrat que l'acció de BgSvp en l'activació dels CA és independent a la de les vies de senyalització nutricional de BgTOR i BgInR.

8. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts durant la realització d'aquesta tesi, es poden deduir les conclusions següents:

1. L'insecte hemimetàbol *B. germanica* presenta dues isoformes del factor de transcripció E74: BgE74A i BgE74B, i dues isoformes del receptor nuclear Seven up: BgSvpA i BgSvpB.
2. BgE74 és necessari per tal que es produeixi l'ècdisi correctament. La interferència d'aquest factor de transcripció durant la darrera fase nimfal provoca problemes greus en el desplegament de les ales, en la integritat de les quetes, en les estructures d'adhesió i en el procés de pigmentació.
3. L'enzim dopa decarboxilasa de *B. germanica* (BgDDC) està implicat en la pigmentació i la seva interferència durant la última fase nimfal fa que emergeixin adults amb una pigmentació més clara. BgE74 és necessari per a què BgDDC s'expressi correctament.
4. BgSvp controla l'activitat biosintètica dels corpora allata durant l'estadi adult de *B. germanica*. BgSvpB és necessari perquè s'expressin dos gens clau, *BgHMG-R* i *BgHMG-S*, de la via de síntesi de l'hormona juvenil en les femelles adultes.
5. BgSvp és necessari per al desenvolupament dels *corpora allata* durant la darrera fase nimfal. La interferència del receptor nuclear produeix una clara disminució en la divisió cel·lular dels *corpora allata* durant la darrera fase nimfal.
6. BgSvp controla de forma independent l'activitat biosintètica i la divisió cel·lular dels *corpora allata*.
7. Les funcions de les dues isoformes de BgSvp no són redundants.

9. BIBLIOGRAFIA

- Amare, A., i Sweedler, J.V. (2007). Neuropeptide precursors in *Tribolium castaneum*. *Peptides* 28, 1282-1291.
- Arakane, Y., Li, B., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kramer, K.J., i Park, Y. (2008). Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.* 125, 984-995.
- Arakane, Y., Lomakin, J., Beeman, R.W., Muthukrishnan, S., Gehrke, S.H., Kanost, M.R., i Kramer, K.J. (2009). Molecular and functional analyses of amino acid decarboxylases involved in cuticle tanning in *Tribolium castaneum*. *J. of Biol. Chem.* 284, 16584-16594.
- Ashburner, M. (1973). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. 1.- Dependence upon ecdysone concentration. *Dev. Biol.* 35, 47-61.
- Ashburner, M. (1974). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *drosophila-melanogaster*. 2.- Effects of inhibitors of protein-synthesis. *Dev. Biol.* 39, 141-157.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. i Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 38, 655-662.
- Ashok, M., Turner, C. i Wilson, T.G. (1998). Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 2761-2766.
- Baker, J.D. i Truman, J.W. (2002). Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program. *J. of Exp. Biol.* 205, 2555-2565.
- Baker, K.D., i Thummel, C.S. (2007). Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell. Metab.* 6, 257-266.
- Bayer, C.A., Holley, B., i Fristrom, J.W. (1996). A switch in broad-complex zinc-finger isoform expression is regulated posttranscriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Dev. Biol.* 177, 1-14.
- Bearfield, J.C., Keeling, C.I., Young, S., Blomquist, G.J., i Tittiger, C. (2006). Isolation, endocrine regulation and mRNA distribution of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase (HMG-S) gene from the pine engraver, *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae). *Insect. Mol. Biol.* 15, 187-195.
- Begemann, G., Michon, A.M., vd Voorn, L., Wepf, R., i Mlodzik, M. (1995). The *Drosophila* orphan nuclear receptor seven-up requires the Ras pathway for its function in photoreceptor determination. *Development* 121, 225-235.
- Belgacem, Y.H., i Martin, J.R. (2007). *Hmgcr* in the *Corpus Allatum* Controls Sexual Dimorphism of Locomotor Activity and Body Size via the Insulin Pathway in *Drosophila*. *PLoS ONE* 2, e187.

- Belles, X., Graham, L.A., Bendena, W.G., Ding, Q.I., Edwards, J.P., Weaver, R.J., i Tobe, S.S. (1999). The molecular evolution of the allatostatin precursor in cockroaches. *Peptides* 20, 11-22.
- Belles, X., Maestro, J.L., Piulachs, M.D., Johnsen, A.H., Duve, H., i Thorpe, A. (1994). Allatostatic neuropeptides from the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Identification, immunolocalization and activity. *Regul. Pept.* 53, 237-247.
- Bellés, X., Martin, D., i Piulachs, M.D. (2005). The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 181-199.
- Bonneton, F., Chaumot, A., i Laudet, V. (2008). Annotation of *Tribolium* nuclear receptors reveals an increase in evolutionary rate of a network controlling the ecdysone cascade. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 416-429.
- Broadus, J., i Doe, C.Q. (1995). Evolution of neuroblast identity: seven-up and prospero expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and *Schistocerca*. *Development (Cambridge, England)* 121, 3989-3996.
- Brown, M.S., i Goldstein, J.L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell.* 89, 331-340.
- Brown, M.S., i Goldstein, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci*96, 11041-11048.
- Bryantsev, A.L., i Cripps, R.M. (2009). Cardiac gene regulatory networks in *Drosophila*. *Biochim. Biophys. acta* 1789, 343-353.
- Buesa, C., Martinez-Gonzalez, J., Casals, N., Haro, D., Piulachs, M.D., Belles, X., i Hegardt, F.G. (1994). *Blattella germanica* has two HMG-CoA synthase genes. Both are regulated in the ovary during the gonadotrophic cycle. *The J. of Biol. Chem.* 269, 11707-11713.
- Burtis, K.C., Thummel, C.S., Jones, C.W., Karim, F.D., i Hogness, D.S. (1990). The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell* 61, 85-99.
- Castillo-Gracia, M., i Couillaud, F. (1999). Molecular cloning and tissue expression of an insect farnesyl diphosphate synthase. *Eur. J. Biochem.* 262, 365-370.
- Chavez, V.M., Marques, G., Delbecque, J.P., Kobayashi, K., Hollingsworth, M., Burr, J., Natzle, J.E., i O'Connor, M.B. (2000). The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* 127, 4115-4126.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., i Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866-1870.
- Chen, L., O'Keefe, S.L., i Hodgetts, R.B. (2002a). Control of Dopa decarboxylase gene expression by the Broad-Complex during metamorphosis in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 119, 145-156.
- Chen, L., Reece, C., O'Keefe, S.L., Hawryluk, G.W.L., Engstrom, M.M., i Hodgetts, R.B. (2002b). Induction of the early-late DDC gene during *Drosophila* metamorphosis by the ecdysone receptor. *Mech. Dev.* 114, 95-107.

- Cheng, D., Xia, Q., Duan, J., Wei, L., Huang, C., Li, Z., Wang, G., i Xiang, Z. (2008). Nuclear receptors in *Bombyx mori*: Insights into genomic structure and developmental expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38(12):1130-7.
- Chiang, A.S., Gadot, M., Burns, E.L., i Schal, C. (1991). Sexual differentiation of nymphal corpora allata and the effects of ovariectomy on adult gland morphometrics in *Blattella germanica*. *Experientia* 47, 81-83.
- Chiang, A.S., Holbrook, G.L., i Schal, C. (1992). Postembryonic development of *corpora allata* in relation to juvenile hormone biosynthesis in cockroaches. In *Insect juvenile hormone research: fundamental and applied approaches*, B. Mauchamp, F. Couillaud, i J.C. Baehr, eds. (INRA Press).
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P., i Daborn, P.J. (2009). Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5731-5736.
- Clemente, C.J., i Federle, W. (2008). Pushing versus pulling: division of labour between tarsal attachment pads in cockroaches. *Proc. Biol. Sci.* 275, 1329-1336.
- Comas, D., Piulachs, M.D., i Belles, X. (1999). Fast induction of vitellogenin gene expression by juvenile hormone III in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 29, 821-827.
- Comas, D., Piulachs, M.D., i Belles, X. (2001). Induction of vitellogenin gene transcription in vitro by juvenile hormone in *Blattella germanica*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183, 93-100.
- Cooney, A.J., Leng, X., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., i Tsai, M.J. (1993). Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *J. of Biol. Chem.* 268, 4152-4160.
- Cooney, A.J., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., i Tsai, M.J. (1992). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4153-4163.
- Cruz, J., Martin, D., Pascual, N., Maestro, J.L., Piulachs, M.D., i Belles, X. (2003). Quantity does matter. Juvenile hormone and the onset of vitellogenesis in the German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1219-1225.
- Cruz, J., Martin, D., i Belles, X. (2005). To molt or not to molt: use of RNAi to demonstrate a conserved role of HR-3 i FTZ-F1 in insect molting. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integ. Phys.* 141, S110-S110.
- Cruz, J. (2006). Receptores nucleares implicados en la regulación endocrina en *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Caracterización de los genes BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona.

- Cruz, J., Mane-Padros, D., Belles, X., i Martin, D. (2006). Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Dev. Biol.* 297, 158-171.
- Cruz, J., Martin, D., i Belles, X. (2007). Redundant ecdysis regulatory functions of three nuclear receptor HR3 isoforms in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Mech. Dev.* 124, 180-189.
- Cruz, J., Nieva, C., Mané-Padrós, D., Martín, D., i Bellés, X. (2008). Nuclear receptor BgFTZ-F1 regulates molting and the timing of ecdysteroid production during nymphal development in the hemimetabolous insect *Blattella germanica*. *Dev. Dynamics* 237, 3179-3191.
- Cruz, J., Sieglaff, D.H., Arensburger, P., Atkinson, P.W., i Raikhel, A.S. (2009). Nuclear receptors in the mosquito *Aedes aegypti*: annotation, hormonal regulation and expression profiling. *FEBS J* 276, 1233-1254.
- Cusson, M., Beliveau, C., Sen, S.E., Vyeremoten, S., Rutledge, R.G., Stewart, D., Francis, F., Haubruge, E., Rehse, P., Huggins, D.J., Dowling, A., i Grant, G. (2006). Characterization and tissue-specific expression of two lepidopteran farnesyl diphosphate synthase homologs: implications for the biosynthesis of ethyl-substituted juvenile hormones. *Proteins* 65, 742-758.
- Dai, J.D., i Gilbert, L.I. (1991). Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval pupal adult transformation of *Drosophila melanogaster* - a cytophysiological analysis of the ring gland. *Dev. Biol.* 144, 309-326.
- Dai, L., i Adams, M.E. (2009). Ecdysis triggering hormone signaling in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 43-51.
- Davis, M.M., Yang, P., Chen, L., O'Keefe, S.L., i Hodgetts, R.B. (2007). The orphan nuclear receptor DHR38 influences transcription of the DOPA decarboxylase gene in epidermal and neural tissues of *Drosophila melanogaster*. *Genome* 50, 1049-1060.
- Dewey, E.M., McNabb, S.L., Ewer, J., Kuo, G.R., Takanishi, C.L., Truman, J.W., i Honegger, H.-W. (2004). Identification of the Gene Encoding Bursicon, an Insect Neuropeptide Responsible for Cuticle Sclerotization and Wing Spreading. *Curr. Biol.* 14, 1208-1213.
- DiBello, P.R., Withers, D.A., Bayer, C.A., Fristrom, J.W., i Guild, G.M. (1991). The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics* 129, 385-397.
- Drechsler, P., i Federle, W. (2006). Biomechanics of smooth adhesive pads in insects: influence of tarsal secretion on attachment performance. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol Sens Neural Behav. Physiol.* 192, 1213-1222.
- Dubrovsky, E.B. (2006). Hormonal cross talk in insect development. *T. Endo. Metab.* 16, 6-11.
- Duportets, L., Belles, X., Rossignol, F., i Couillaud, F. (2000). Molecular cloning and structural analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Mol. Biol.* 9, 385-392.

- Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nature Gen.* 7, 907-916.
- Erezyilmaz, D.F., Riddiford, L.M., i Truman, J.W. (2006). The pupal specifier broad directs progressive morphogenesis in a direct-developing insect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6925-6930.
- Federle, W., i Endlein, T. (2004). Locomotion and adhesion: dynamic control of adhesive surface contact in ants. *Arthro. Struct. Dev.* 33, 67-75.
- Ferdig, M.T., Li, J., Severson, D.W., i Christensen, B.M. (1996). Mosquito dopa decarboxylase cDNA characterization and blood-meal-induced ovarian expression. *Insect Mol. Biol.* 5, 119-126.
- Fletcher, J.C., Burtis, K.C., Hogness, D.S., i Thummel, C.S. (1995). The *Drosophila* E74 gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development.* 121, 1455-1465.
- Fletcher, J.C., Davino, P.P., i Thummel, C.S. (1997). A steroid-triggered switch in E74 transcription factor isoforms regulates the timing of secondary-response gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4582-4586.
- Fletcher, J.C., i Thummel, C.S. (1995). The *Drosophila* E74 gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development.* 121, 1411-1421.
- Futahashi, R., i Fujiwara, H. (2005). Melanin-synthesis enzymes coregulate stage-specific larval cuticular markings in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Dev. Genes Evo.* 215, 519-529.
- Gausz, J., Gyurkovics, H., Bencze, G., Awad, A.A., Holden, J.J., i Ish-Horowicz, D. (1981). Genetic characterization of the region between 86F1,2 and 87B15 on chromosome 3 of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 98, 775-789.
- Gertler, F.B., Chiu, C.Y., Richter-Mann, L., i Chin, D.J. (1988). Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2713-2721.
- Gilbert, L.I., A. Granger, N., i Roe, R.M. (2000). The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 617-644.
- Gimpl, G., Burger, K., i Fahrenholz, F. (2002). A closer look at the cholesterol sensor. *T. Biochem. Sci.* 27, 596-599.
- Godlewski, J., Wang, S., i Wilson, T.G. (2006). Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1305-1311.
- Goldstein, J.L., i Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-430.

- Goodman, W.G., i Granger, N.A. (2005). The Juvenile Hormones. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, I.G. Lawrence, I. Kostas, and S.G. Sarjeet, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 319-408.
- Grimaldi, D., i Engel, M. (2005). *Evolution of the Insects* (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- Han, D., Fang, J.M., Ding, H.Z., Johnson, J.K., Christensen, B.M., i Li, J.Y. (2002). Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochem. J.* 368, 333-340.
- Harshman, L.G., Song, K.D., Casas, J., Schuurmans, A., Kuwano, E., Kachman, S.D., Riddiford, L.M., i Hammock, B.D. (2010). Bioassays of compounds with potential juvenoid activity on *Drosophila melanogaster*: juvenile hormone III, bisepoxide juvenile hormone III and methyl farnesoates. *J. Insect Physiol.* 56, 1465-1470.
- Helvig, C., Koener, J.F., Unnithan, G.C., i Feyereisen, R. (2004). CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4024-4029.
- Henrich, V.C., Rybczynski, R., i Gilbert, L.I. (1999). Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development. *Vitam. Horm.* 55, 73-125.
- Hirumi, Y., Mlodzik, M., West, S.R., Rubin, G.M., i Goodman, C.S. (1993). Ectopic expression of seven-up causes cell fate changes during ommatidial assembly. *Development* (Cambridge, Engly) 118, 1123-1135.
- Hiruma, K., Carter, M.S., i Riddiford, L.M. (1995). Characterization of the dopa decarboxylase gene of *Manduca sexta* and its suppression by 20-hydroxyecdysone. *Dev. Biol.* 169, 195-209.
- Hiruma, K., i Riddiford, L.M. (1985). Hormonal regulation of dopa decarboxylase during a larval molt. *Dev. Biol.* 110, 509-513.
- Hiruma, K., i Riddiford, L.M. (1990). Regulation of dopa decarboxylase gene expression in the larval epidermis of the tobacco hornworm by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone. *Dev. Biol.* 138, 214-224.
- Hiruma, K., i Riddiford, L.M. (2007). The coordination of the sequential appearance of MHR4 and dopa decarboxylase during the decline of the ecdysteroid titer at the end of the molt. *Mol. Cell. Endo.* 276, 71-79.
- Hiruma, K., i Riddiford, L.M. (2009). The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 39, 245-253.
- Hiruma, K., Riddiford, L.M., Hopkins, T.L., i Morgan, T.D. (1985). Roles of dopa decarboxylase and phenoloxidase in the melanization of the tobacco hornworm and their control by 20-hydroxyecdysone. *J. Comp. Phys. Biochem. Systemic and Enviro. Physio.* 155, 659-669.

- Hodgetts, R.B., i O'Keefe, S.L. (2006). Dopa decarboxylase: A model gene-enzyme system for studying development, behavior, and systematics. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 259-284.
- Hoshizaki, D.K., Blackburn, T., Price, C., Ghosh, M., Miles, K., Ragucci, M., i Sweis, R. (1994). Embryonic fat-cell lineage in *Drosophila melanogaster*. *Development* 120, 2489-2499.
- Hsu, T., i Schulz, R.A. (2000). Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism *Drosophila*. *Oncogene* 19, 6409-6416.
- Huang, X., Warren, J.T., i Gilbert, L.I. (2008). New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J. Genet. Genom.* 35, 1-10.
- Hummon, A.B., Richmond, T.A., Verleyen, P., Baggerman, G., Huybrechts, J., Ewing, M.A., Vierstraete, E., Rodriguez-Zas, S.L., Schoofs, L., Robinson, G.E. i Sweedler, J.V.(2006). From the Genome to the Proteome: Uncovering Peptides in the Apis Brain. *Science* 314, 647-649.
- Jiang, C., Baehrecke, E.H., i Thummel, C.S. (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 4673-4683.
- Jiang, C.A., Lamblin, A.F.J., Steller, H., i Thummel, C.S. (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol. Cell* 5, 445-455.
- Jones, D., Jones, G., Teal, P., Hammac, C., Messmer, L., Osborne, K., Belgacem, Y.H., i Martin, J.-R. (2010). Suppressed production of methyl farnesoid hormones yields developmental defects and lethality in *Drosophila* larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 244-254.
- Jones, G., Jones, D., Teal, P., Sapa, A., i Wozniak, M. (2006). The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand. *FEBS J* 273, 4983-4996.
- Jones, G., i Sharp, P.A. (1997). Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 13499-13503.
- Jones, G., Wozniak, M., Chu, Y., Dhar, S., i Jones, D. (2001). Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 33-49.
- Kanai, M.I., Okabe, M., i Hiromi, Y. (2005). Seven-up controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. *Developmental Cell* 8, 203-213.
- Kaneko, Y., Kinjoh, T., Kiuchi, M., i Hiruma, K. (2011). Stage-specific regulation of juvenile hormone biosynthesis by ecdysteroid in *Bombyx mori*. *Mol. Cell Endocrinol.* 19, 19.
- Karim, F.D., Guild, G.M., i Thummel, C.S. (1993). The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development* 118, 977-988.

- Karim, F.D., i Thummel, C.S. (1991). Ecdysone coordinates the timing and amounts of E74A and E74B transcription in *Drosophila*. *Genes Dev.* *5*, 1067-1079.
- Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T., Mizoguchi, A., Kimura-Kawakami, M., Adachi, T., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A., i Ishizaki, H. (1990). Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science* *247*, 1333-1335.
- Kerber, B., Fellert, S., i Hoch, M. (1998). Seven-up, the *Drosophila* homolog of the COUP-TF orphan receptors controls cell proliferation in the insect kidney. *Genes & Dev.* *12*, 1781-1786.
- Kim, A.-J., Cha, G.-H., Kim, K., Gilbert, L.I., i Lee, C.C. (1997). Purification and characterization of the prothoracicotropic hormone of *Drosophilamelanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 1130-1135.
- Kim, B.J., Takamoto, N., Yan, J., Tsai, S.Y., i Tsai, M.-J. (2009). Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II (COUP-TFII) regulates growth and patterning of the postnatal mouse cerebellum. *Dev. Biol.* *326*, 378-391.
- Kim, M.H., Joo, C.H., Cho, M.Y., Kwon, T.H., Lee, K.M., Natori, S., Lee, T.H., i Lee, B.L. (2000). Bacterial-injection-induced syntheses of N- β -alanyldopamine and Dopa decarboxylase in the hemolymph of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *Europ. J. of Biochem.* *267*, 2599-2608.
- King-Jones, K., i Thummel, C.S. (2005). Nuclear receptors - A perspective from *Drosophila*. *Nature Rev. Genetics* *6*, 311-323.
- Kinjoh, T., Kaneko, Y., Itoyama, K., Mita, K., Hiruma, K., i Shinoda, T. (2007). Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* *37*, 808-818.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., i Evans, R.M. (1992). Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 1448-1452.
- Koch, P.B., Behnecke, B., i French-Constant, R.H. (2000). The molecular basis of melanism and mimicry in a swallowtail butterfly. *Curr. Biol.* *10*, 591-594.
- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segraves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P., i Hogness, D.S. (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* *67*, 59-77.
- Konopova, B., i Jindra, M. (2007). Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 10488-10493.
- Konopova, B., i Jindra, M. (2008). Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolite metamorphosis. *Development* *135*, 559-568.

- Kozlova, T., i Thummel, C.S. (2000). Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *T. Endocrinol. Metab.* *11*, 276-280.
- Kruse, S.W., Suino-Powell, K., Zhou, X.E., Kretschman, J.E., Reynolds, R., Vornrhein, C., Xu, Y., Wang, L., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., i Eric, X. (2008). Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. *PLoS biology* *6*, e227.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endo.* *19*, 207-226.
- Laudet, V., i Bonneton, F. (2005). Evolution of Nuclear Hormone Receptors in Insects. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, I.G. Lawrence, I. Kostas, and S.G. Sarjeet, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 287-318.
- Lee, C.-H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.-W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., i Evans R.M. (2006). PPAR δ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 3444-3449.
- Lee, C.-Y., Cooksey, B.A.K., i Baehrecke, E.H. (2002). Steroid Regulation of Midgut Cell Death during *Drosophila* Development. *Dev. Biol.* *250*, 101-111.
- Li, L., Xie, X., Qin, J., Jeha, G.S., Saha, P.K., Yan, J., Haueter, C.M., Chan, L., Tsai, S.Y., i Tsai, M.J. (2009). The Nuclear Orphan Receptor COUP-TFII Plays an Essential Role in Adipogenesis, Glucose Homeostasis and Energy Metabolism. *Cell metabolism.* *9*, 77-87.
- Lo, P.C.H., i Frasch, M. (2001). A role for the COUP-TF-related gene seven-up in the diversification of cardioblast identities in the dorsal vessel of *Drosophila*. *Mech. Dev.* *104*, 49-60.
- Maestro, J.L., i Belles, X. (2006). Silencing allatostatin expression using double-stranded RNA targeted to preproallatostatin mRNA in the German cockroach. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *62*, 73-79.
- Maestro, J.L., Cobo, J., i Belles, X. (2008). Tor mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production. *J. of Biol. Chem.* *284*. *9*, 5506 – 5513.
- Maestro, J.L., Pascual, N., Treiblmayr, K., Lozano, J., i Bellés, X. (2010). Juvenile hormone and allatostatins in the German cockroach embryo. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *40*. *9*, 660 – 665.
- Maestro, O. (2008). Estudio del receptor de la 20-hidroxicdisona en el insecto hemimetábolo *Blattella Germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Caracterización del receptor nuclear BgRXR. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona - Departamento de Fisiología, Barcelona.
- Maestro, O., Cruz, J., Pascual, N., Martin, D., i Belles, X. (2005). Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the hemimetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Mol. Cell. Endo.* *238*, 27-37.
- Mane-Padros, D. (2007). Mecanismes moleculars d'acció dels ecdisteroides en l'insecte hemimetàbol "*Blattella germanica*" (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Caracterització dels

receptors nuclears BgE75 i BgHR4. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona - Departamento de Fisiología, Barcelona.

Mane-Padros, D., Cruz, J., Belles, X., i Martin, D. (2005). RNAi-mediated knock-down of the nuclear receptor E75 abolishes steroidogenesis in the hemimetabolous insect *Blattella germanica*. *Comp. Bioch. Phys. Mol. Integrative Phys.* **141**, S110-S111.

Mane-Padros, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Nieva, C., Urena, E., Belles, X., i Martin, D. (2010). The hormonal pathway controlling cell death during metamorphosis in a hemimetabolous insect. *Dev. Biol.* **346**, 150-160.

Mane-Padros, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Pascual, N., Belles, X., i Martin, D. (2008). The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Dev. Biol.* **315**, 147-160.

Mangelsdorf, D.J., i Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.

Marchal, E., Vandersmissen, H.P., Badisco, L., Van de Velde, S., Verlinden, H., Iga, M., Van Wielendaele, P., Huybrechts, R., Simonet, G., Smagghe, G., Broeck J.V. (2010a). Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review. *Peptides* **31**, 506-519.

Marchal, E., Zhang, J., Badisco, L., Verlinden, H., Hult, E.F., Van Wielendaele, P., Yagi, K.J., Tobe, S.S., i Broeck, J.V. (2010b). Final steps in juvenile hormone biosynthesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 30.

Martin, D., Maestro, O., Cruz, J., Mane-Padros, D., i Belles, X. (2006). RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *J Insect Physiol.* **52**, 410-416.

Martinez-Gonzalez, J., Buesa, C., Piulachs, M.D., Belles, X., i Hegardt, F.G. (1993a). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A synthase from *Blattella germanica*. Cloning, expression, developmental pattern and tissue expression. *FEBS* **217**, 691-699.

Martinez-Gonzalez, J., Buesa, C., Piulachs, M.D., Belles, X., i Hegardt, F.G. (1993b). Molecular cloning, developmental pattern and tissue expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the cockroach *Blattella germanica*. *FEBS* **213**, 233-241.

Martín, D., Piulachs, M.-D., Cunillera, N., Ferrer, A., i Bellés, X. (2007). Mitochondrial targeting of farnesyl diphosphate synthase is a widespread phenomenon in eukaryotes. *Biochim. et Biophys. Acta – Mol. Cell Research.* **1773**, 419-426.

Maurange, C., Cheng, L., i Gould, A.P. (2008). Temporal transcription factors and their targets schedule the end of neural proliferation in *Drosophila*. *Cell* **133**, 891-902.

Mayoral, J.G., Nouzova, M., Yoshiyama, M., Shinoda, T., Hernandez-Martinez, S., Dolgih, E., Turjanski, A.G., Roitberg, A.E., Priestap, H., Perez, M., *et al.* (2009). Molecular and functional characterization of a juvenile hormone acid methyltransferase expressed in the corpora allata of mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 31-37.

- McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J.P., Beckstead, R.B., Warren, J.T., Thummel, C.S., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I., i O'Connor, M.B. (2007). Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev. Cell* *13*, 857-871.
- McNabb, S.L., Baker, J.D., Agapite, J., Steller, H., Riddiford, L.M., and Truman, J.W. (1997). Disruption of a Behavioral Sequence by Targeted Death of Peptidergic Neurons in *Drosophila*. *Neuron* *19*, 813-823.
- Minakuchi, C., Namiki, T., i Shinoda, T. (2009). Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.* *325*, 341-350.
- Minakuchi, C., Namiki, T., Yoshiyama, M., i Shinoda, T. (2008a). RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase gene causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *FEBS J* *275*, 2919-2931.
- Minakuchi, C., Zhou, X., i Riddiford, L.M. (2008b). Kruppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* *125*, 91-105.
- Miura, K., Zhu, J., Dittmer, N.T., Chen, L., i Raikhel, A.S. (2002). A COUP-TF/Svp homolog is highly expressed during vitellogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Mol. Endo.* *29*, 223-238.
- Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C.S., i Rubin, G.M. (1990). The *Drosophila* seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* *60*, 211-224.
- Moore, A.W., Barbel, S., Jan, L.Y., i Jan, Y.N. (2000). A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 10436-10441.
- Morgan, B.A., Johnson, W.A., i Hirsh, J. (1986). Regulated splicing produces different forms of dopa decarboxylase in the central nervous system and hypoderm of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* *5*, 3335-3342.
- Mouillet, J.F., Bousquet, F., Sedano, N., Alabouvette, J., Nicolai, M., Zelus, D., Laudet, V., i Delachambre, J. (1999). Cloning and characterization of new orphan nuclear receptors and their developmental profiles during *Tenebrio* metamorphosis. *FEBS* *265*, 972-981.
- Nauber, U., Pankratz, M.J., Kienlin, A., Seifert, E., Klemm, U., i Jackle, H. (1988). Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene *knirps*. *Nature* *336*, 489-492.
- Niwa, R., Namiki, T., Ito, K., Shimada-Niwa, Y., Kiuchi, M., Kawaoka, S., Kayukawa, T., Banno, Y., Fujimoto, Y., Shigenobu, S., Kobayashi S., Shimada T., Katsuma S. I Shinoda T. (2010). Non-molting glossy/shroud encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the 'Black Box' of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Development* *137*, 1991-1999.

- Niwa, R., Niimi, T., Honda, N., Yoshiyama, M., Itoyama, K., Kataoka, H., i Shinoda, T. (2008). Juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 714-720.
- Noguchi, H., i Hayakawa, Y. (2001). Dopamine is a key factor for the induction of egg diapause of the silkworm, *Bombyx mori*. *Euro. J. of Biochem.* 268, 774-780.
- Noguti, T., Adachi-Yamada, T., Katagiri, T., Kawakami, A., Iwami, M., Ishibashi, J., Kataoka, H., Suzuki, A., G, M., i Ishizaki, H. (1995). Insect prothoracicotropic hormone: a new member of the vertebrate growth factor superfamily. *FEBS letters* 376, 251-256.
- Oikawa, T., i Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303, 11-34.
- Okamura, M., Kudo, H., Wakabayashi, K.I., Tanaka, T., Nonaka, A., Uchida, A., Tsutsumi, S., Sakakibara, I., Naito, M., Osborne, T.F., Hamakubo T., Ito S., Aburatani H., Yanagisawa M., Kodama T. i Sakai J. (2009). COUP-TFII acts downstream of Wnt/ β -catenin signal to silence PPAR γ gene expression and repress adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106. 14, 5819 – 5824.
- Oldham, S., i Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *T. in Cell Bio.* 13, 79-85.
- Ono, H., Rewitz, K.F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J.T., Marques, G., Shimell, M.J., Gilbert L.I. i O'Connor M.B. (2006). Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Biol.* 298, 555-570.
- Oro, A.E., Ong, E.S., Margolis, J.S., Posakony, J.W., McKeown, M., i Evans, R.M. (1988). The *Drosophila* gene *knirps*-related is a member of the steroid-receptor gene superfamily. *Nature* 336, 493-496.
- Osorio, S., Piulachs, M.-D., i Bellés, X. (1997). Feeding and activation of corpora allata in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *J. Insect Physiol.* 44, 31-38.
- Park, J.I., Tsai, S.Y., i Tsai, M.J. (2003). Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J of Med.* 52, 174-181.
- Park, Y., Filippov, V., Gill, S.S., i Adams, M.E. (2002). Deletion of the ecdysis-triggering hormone gene leads to lethal ecdysis deficiency. *Development* 129, 493-503.
- Pascual, N., Cerdá, X., Benito, B., Tomás, J., Piulachs, M.D., i Bellés, X. (1992). Ovarian ecdysteroid levels y basal oocyte development during maturation in the cockroach *Blattella germanica* (L.). *J. Insect Physiol.* 38, 339-343, 345-348.
- Paskewitz, S.M., i Yreev, O. (2008). Silencing the genes for dopa decarboxylase or dopachrome conversion enzyme reduces melanization of foreign targets in *Anopheles gambiae*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 150, 403-408.
- Paul, R.K., Takeuchi, H., Matsuo, Y., i Kubo, T. (2005). Gene expression of ecdysteroid-regulated gene E74 of the honeybee in ovary and brain. *Insect Mol. Biol.* 14, 9-15.

- Peabody, N.C., Diao, F., Luan, H., Wang, H., Dewey, E.M., Honegger, H.-W., i White, B.H. (2008). Bursicon Functions within the *Drosophila* CNS to Modulate Wing Expansion Behavior, Hormone Secretion, and Cell Death. *J. of Neurosci.* **28**, 14379-14391.
- Pecasse, F., Beck, Y., Ruiz, C., i Richards, G. (2000). Kruppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* **221**, 53-67.
- Pereira, F.A., Tsai, M.J., i Tsai, S.Y. (2000). COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *CMLS* **57**, 1388-1398.
- Petryk, A., Warren, J.T., Marques, G., Jarcho, M.P., Gilbert, L.I., Kahler, J., Parvy, J.P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C., i O'Connor, M.B. (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13773-13778.
- Piulachs, M. (1987). Estudi morfològic i funcional dels corpora allata de *Blattella germanica* (Ditcyoptera, Blattellidae) (Universitat de Barcelona).
- Piulachs, M.D., Pagone, V., i Belles, X. (2010). Key roles of the Broad-Complex gene in insect embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 468-475.
- Plasterk, R.H.A. (2002). RNA silencing: The genome's immune system. *Science* **296**, 1263-1265.
- Ponzielli, R., Astier, M., Chartier, A., Gallet, A., Therond, P., i Semeriva, M. (2002). Heart tube patterning in *Drosophila* requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling. *Development* **129**, 4509-4521.
- Qiu, Y.H., Pereira, F.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Tsai, S.Y., i Tsai, M.J. (1997). Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Gen. & Develop.* **11**, 1925-1937.
- Raikhel, A.S., Brown, M.R., i Belles, X. (2005). Hormonal Control of Reproductive Processes. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, I.G. Lawrence, I. Kostas, and S.G. Sarjeet, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 433-491.
- Rewitz, K.F., Yamanaka, N., Gilbert, L.I., i O'Connor, M.B. (2009). The Insect Neuropeptide PTTH Activates Receptor Tyrosine Kinase Torso to Initiate Metamorphosis. *Science* **326**, 1403-1405.
- Richard, D.S., Applebaum, S.W., i Gilbert, L.I. (1989). Developmental regulation of juvenile hormone biosynthesis by the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. B* **159**, 383-387.
- Riddiford, L.M. (1996). Juvenile hormone: The status of its "status quo" action. *Arch. of Insect Bioch. and Physiol.* **32**, 271-286.

- Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X., i Nelson, C.A. (2003). Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 1327-1338.
- Rodriguez, J.C., Ortiz, J.A., Hegardt, F.G., i Haro, D. (1997). Chicken ovalbumin upstream-promoter transcription factor (COUP-TF) could act as a transcriptional activator or repressor of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. *Biochem. J.* **326** (Pt 2), 587-592.
- Rodríguez, J.C., Gil-Gómez, G., Hegardt, F.G., i Haro, D. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J. Biol. Chem.* **269**, 18767-18772.
- Roller, L., Zitnanová, I., Dai, L., Simo, L., Park, Y., Satake, H., Tanaka, Y., Adams, M.E., i Zitnan, D. (2010). Ecdysis triggering hormone signaling in arthropods. *Peptides* **31**, 429-441.
- Ruau, D., Duarte, J., Ourjald, T., Perrière, G., Laudet, V., i Robinson-Rechavi, M. (2004). Update of NUREBASE: nuclear hormone receptor functional genomics. *Nucleic Acids Res.* **32**, D165-D167.
- Rybczynski, R., Bell, S.C., i Gilbert, L.I. (2001). Activation of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) by the insect prothoracicotropic hormone. *Mol. Cell Endocrinol.* **184**, 1-11.
- Rybczynski, R., i Gilbert, L.I. (2003). Prothoracicotropic hormone stimulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity: the changing roles of Ca²⁺ and cAMP-dependent mechanisms in the insect prothoracic glands during metamorphosis. *Mol. Cell Endocrinol.* **205**, 159-168.
- Saiki, R.K., Gelfy, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., i Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna-polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Côte, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schröder, C., Kemler, R., i Jackle H. (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell* **47**, 1025-1032.
- Schutze, N. (2004). siRNA technology. *Mol. Cell. Endo.* **213**, 115-119.
- Sekimoto, T., Iwami, M., i Sakurai, S. (2007). 20-hydroxyecdysone regulation of two isoforms of the Ets transcription factor E74 gene in programmed cell death in the silkworm anterior silk gland. *Insect Mol. Biol.* **16**, 581-590.
- Sementchenko, V.I., i Watson, D.K. (2000). Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* **19**, 6533-6548.
- Sharrocks, A.D. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 827-837.
- Sharrocks, A.D., Brown, A.L., Ling, Y., i Yates, P.R. (1997). The ETS-domain transcription factor family. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29**, 1371-1387.

- Shinoda, T., i Itoyama, K. (2003). Juvenile hormone acid methyltransferase: a key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 11986-11991.
- Smith, W.A., i Gilbert, L.I. (1989). Early events in peptide-stimulated ecdysteroid secretion by the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *J. Exp. Zool.* *252*, 264-270.
- Stilwell, G.E., Nelson, C.A., Weller, J., Cui, H.Y., Hiruma, K., Truman, J.W., i Riddiford, L.M. (2003). E74 exhibits stage-specific hormonal regulation in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* *258*, 76-90.
- Sun, G.Q., Zhu, J.S., Chen, L., i Raikhel, A.S. (2005). Synergistic action of E74B and ecdysteroid receptor in activating a 20-hydroxyecdysone effector gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 15506-15511.
- Sun, G.Q., Zhu, J.S., Li, C., Tu, Z.J., i Raikhel, A.S. (2002). Two isoforms of the early E74 gene, an Ets transcription factor homologue, are implicated in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Mol. Cell. Endo.* *190*, 147-157.
- Sun, G.Q., Zhu, J.S., i Raikhel, A.S. (2004). The early gene E74B isoform is a transcriptional activator of the ecdysteroid regulatory hierarchy in mosquito vitellogenesis. *Mol. Cell. Endo.* *218*, 95-105.
- Suzuki, Y., Truman, J.W., i Riddiford, L.M. (2008). The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. *Development* *135*, 569-577.
- Swanhart, L., Kupsco, J., i Duronio, R.J. (2005). Developmental control of growth and cell cycle progression in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* *296*, 69-94.
- Tan, A., i Palli, S.R. (2008). Identification and characterization of nuclear receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *38*, 430-439.
- Tan, N.S., Michalik, L., Desvergne, B., i Wahli, W. (2005). Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* *93*, 99-105.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.-P., Yin, C.-M., i Garofalo, R.S. (2001). A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science* *292*, 107-110.
- Thummel, C.S. (2002). Ecdysone-regulated puff genes 2000. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *32*, 113-120.
- Thummel, C.S., Burtis, K.C., i Hogness, D.S. (1990). Spatial and temporal patterns of E74 transcription during *Drosophila* development. *Cell* *61*, 101-111.
- Tillman, J.A., Lu, F., Goddard, L.M., Donaldson, Z.R., Dwinell, S.C., Tittiger, C., Hall, G.M., Storer, A.J., Blomquist, G.J., i Seybold, S.J. (2004). Juvenile hormone regulates de novo isoprenoid aggregation pheromone biosynthesis in pine bark beetles, *ips* spp., through transcriptional control of HMG-CoA Reductase. *J. Chem. Ecology* *30*, 2459-2494.

- Tittiger, C., Barkawi, L.S., Bengoa, C.S., Blomquist, G.J., i Seybold, S.J. (2003). Structure and juvenile hormone-mediated regulation of the HMG-CoA reductase gene from the Jeffrey pine beetle, *Dendroctonus jeffreyi*. *Mol. Cell Endocrinol.* *199*, 11-21.
- Tittiger, C., Blomquist, G.J., Ivarsson, P., Borgeson, C.E., i Seybold, S.J. (1999). Juvenile hormone regulation of HMG-R gene expression in the bark beetle *Ips paraconfusus* (Coleoptera: Scolytidae): implications for male aggregation pheromone biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* *55*, 121-127.
- Tittiger, C., O'Keefe, C., Bengoa, C.S., Barkawi, L.S., Seybold, S.J., i Blomquist, G.J. (2000). Isolation and endocrine regulation of an HMG-CoA synthase cDNA from the male Jeffrey pine beetle, *Dendroctonus jeffreyi* (Coleoptera: Scolytidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* *30*, 1203-1211.
- Togawa, T., Shofuda, K., Yaginuma, T., Tomino, S., Nakato, H., i Izumi, S. (2001). Structural analysis of gene encoding cuticle protein BMCP18, and characterization of its putative transcription factor in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *31*, 611-620.
- Treiblmayr, K., Pascual, N., Piulachs, M.D., Keller, T., i Belles, X. (2006). Juvenile hormone titer versus juvenile hormone synthesis in female nymphs and adults of the German cockroach, *Blattella germanica*. *J. Insect Sci.* *6*, 1-7.
- Tsai, S.Y., i Tsai, M.J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): Coming of age. *Endocrine Reviews* *18*, 229-240.
- Tu, M.P., Yin, C.M., i Tatar, M. (2005). Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* *142*, 347-356.
- Ueda, H., Shinoda, T., i Hiruma, K. (2009). Spatial expression of the mevalonate enzymes involved in juvenile hormone biosynthesis in the corpora allata in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* *55*, 798-804.
- Velarde, R.A., Robinson, G.E., i Fahrbach, S.E. (2006). Nuclear receptors of the honey bee: annotation and expression in the adult brain. *Insect Mol. Biol.* *15*, 583-595.
- Votsch, W., Nicholson, G., Muller, R., Stierhof, Y.D., Gorb, S., i Schwarz, U. (2002). Chemical composition of the attachment pad secretion of the locust *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *32*, 1605-1613.
- Wang, S., Baumann, A., i Wilson, T.G. (2007). *Drosophila melanogaster* Methoprene-tolerant (Met) gene homologs from three mosquito species: Members of PAS transcriptional factor family. *J. Insect Physiol.* *53*, 246-253.
- Warren, J.T., Petryk, A., Marques, G., Jarcho, M., Parvy, J.P., Dauphin-Villemant, C., O'Connor, M.B., i Gilbert, L.I. (2002). Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 11043-11048.

- Warren, J.T., Petryk, A., Marques, G., Parvy, J.P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M.B., Dauphin-Villemant C., i Gilbert L.I. (2004). Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *34*, 991-1010.
- Wilson, T.G., i Ashok, M. (1998). Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 14040-14044.
- Wilson, T.G., i Fabian, J. (1986). A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Dev. Biol.* *118*, 190-201.
- Wittkopp, P.J., True, J.R., i Carroll, S.B. (2002). Reciprocal functions of the *Drosophila* Yellow and Ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development* *129*, 1849-1858.
- Wright, T.R. (1987). The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* *24*, 127-222.
- Wright, T.R., Hodgetts, R.B., i Sherald, A.F. (1976). The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. I. Isolation and characterization of deficiencies that delete the dopa-decarboxylase-dosage-sensitive region and the alpha-methyl-dopa-hypersensitive locus. *Genetics* *84*, 267-285.
- Xu, J., Tan, A., i Palli, S.R. (2010). The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Insect Physiol* *56*, 1471-1480.
- Yao, T.-P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M., i Evans, R.M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* *71*, 63-72.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P., i Evans, R.M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* *366*, 476-479.
- Yersen, S.O. (2005). Cuticular Sclerotization i Tanning. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, I.G. Lawrence, I. Kostas, and S.G. Sarjeet, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 145-170.
- Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H., i Niwa, R. (2006). Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* *133*, 2565-2574.
- Zelhof, A.C., Yao, T.P., Chen, J.D., Evans, R.M., i McKeown, M. (1995). Seven-up inhibits ultraspiracle-based signaling pathways in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6736-6745.
- Zhou, X., i Riddiford, L.M. (2002). Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* *129*, 2259-2269.

- Zhu, J.S., Miura, K., Chen, L., i Raikhel, A.S. (2003). Cyclicity of mosquito vitellogenic ecdysteroid-mediated signaling is modulated by alternative dimerization of the RXR homologue Ultraspiracle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 544-549.
- Zitnan, D., i Adams, M.E. (2005). Neuroendocrine Regulation of Insect Ecdysis. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, I.G. Lawrence, I. Kostas, and S.G. Sarjeet, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 1-60.
- Zitnan, D., Hollar, L., Spalovská, I., Takáč, P., Žitňanová, I., Gill, S.S., i Adams, M.E. (2002). Molecular cloning and function of ecdysis-triggering hormones in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Exper. Biol.* *205*, 3459-3473.
- Zitnan, D., Kim, Y.J., Zitnanová, I., Roller, L., i Adams, M.E. (2007). Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* *153*, 88-96.
- Zitnan, D., Kingan, T.G., Hermesman, J.L., i Adams, M.E. (1996). Identification of ecdysis-triggering hormone from an epitracheal endocrine system. *Science* *271*, 88-91.
- Zitnan, D., Žitňanová, I., Spalovská, I., Takáč, P., Park, Y., i Adams, M.E. (2003). Conservation of ecdysis-triggering hormone signalling in insects. *J. Exper Biol.* *206*, 1275-1289.