



El receptor d'insulina com a element clau en la senyalització nutricional a la panerola *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae)

Marc Abrisqueta Carol

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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 and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

**EL RECEPTOR D'INSULINA COM A ELEMENT CLAU EN LA
SENYALITZACIÓ NUTRICIONAL A LA PANEROLA BLATTELLA
GERMANICA (L.) (DICTYOPTERA, BLATTELLIDAE)**

Marc Abrisqueta Carol



PROGRAMA DE DOCTORAT DE FISIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA. UNIVERSITAT
DE BARCELONA

Treball realitzat en el Departament d'Evolució funcional d'insectes de
l'Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), sota la direcció del Dr. Jose
Luis Maestro, amb el títol:

**EL RECEPTOR D'INSULINA COM A ELEMENT CLAU EN LA
SENYALITZACIÓ NUTRICIONAL A LA PANEROLA BLATTELLA
GERMANICA (L.) (DICTYOPTERA, BLATTELLIDAE)**

Memòria presentada per Marc Abrisqueta Carol per optar al grau de doctor
per la Universitat de Barcelona

Marc Abrisqueta Carol
Doctorand

Dr. José Luis Maestro Garriga
Científic titular del CSIC
Director de la tesi

Dra. Encarnación Capilla Campos
Investigadora del programa
Ramon y Cajal
Departament de Fisiologia i
Immunologia
Tutora de la tesi

Dedicatòries i agraïments

La realització d'aquesta tesi ha estat un camí molt llarg, amb moments bons i moments més difícils. Però per damunt de tot això sempre em quedarà el record de tots aquells amb qui he compartit aquesta experiència, ja que si bé es important el camí i cap a on et porta, encara ho és més amb qui el recorres.

Voldria destacar a algunes persones, si bé l'espai i la meva memòria són limitats i podria ser que m'oblidés de nombrar a algú.

En primer lloc, un agraïment molt especial al meu director de tesi, el Dr. José Luis Maestro. Per donar-me l'oportunitat de realitzar-me com a investigador i per tot el que m'has ensenyat i he après treballant al teu costat durant aquests anys, què és molt més del que et deus pensar.

A la meva "germana gran" dins del laboratori, la Songül, amb la que he mantingut discussions científiques i d'altra mena d'allò més interessants i he compartit molts bons moments, com a companya de laboratori i com a amiga, i que fins hi tot m'ha ensenyat algunes paraules en turc. Teşekkür ederim. I gràcies per portar-nos delícies turques!

Als companys del grup del Dr. David Martin, que sempre està a punt per debatre qualsevol idea, amb els que he tingut el plaer de compartir laboratori i moltes altres coses. A en Ferran, que sempre va anar obrint camí amb tot això del doctorat. A l'Enric, què sempre va estar disposat a compartir les seves patates d'Olot i em va redescobrir la ratafia. A la Cristina Manjón, què mai sabies per on et sortiria i que ens ha fet passar tants bons moments a tots. I a la Pepi, la veu de l'experiència. Sense oblidar als antics membres del grup, el Dani, l'Oscar i la Claudia. Un record molt especial també per antics membres del departament, com la Núria, que ens va ajudar amb l'anticòs contra S6K, i la Lluïsa.

Als veïns dels grups de la Dra. Elena Casacuberta i del Dr. Xavier Franch, que sempre han estat uns "jefes" molt propers. Muito obrigado Rute, per demostrar que no tots els portuguesos són antipàtics. A l'Elisenda, per aportar proves sobre la teoria del caos. Al David, amb qui vaig descobrir un munt de lleis i regles que regeixen el nostre món quotidià i amb qui vaig tenir converses transcendents mentre cuidàvem la nostre higiene bucal. A la Maria, per alegrar-nos dos estius seguits i fer més divertit tenir que anar a treballar en ple agost. A la Neus, apassionada tant de la ciència com de l'anime i altres aficions. A la Cristina, que em va recomanar els millor llocs de pintxos de Bilbao.

A tots els companys del ara mal anomenat laboratori "de les noies". Al Jesús, la Paula, l'Eva, la Laura, l'Alba, la Mercedes, l'Aníbal, en Raül, l'Erica, la Nashwa, pels bons moments que hem compartit tant a dins com fora del laboratori. Així com als dos caps visibles del laboratori, la Dra. Dolors Piulachs i el Dr. Xavier Bellés, que sempre han estat un model a seguir. També vull agrair als altres companys de l'institut, com la Pepi González, la Lúdia, l'Amparo, la Margarita, la Rocío, l'Ana, en

Josep, en Pedro, el Javi, el Víctor, la Gissela, en Txus, l'Anabela i molts altres, amb els que he compartit aquests anys. Un agraïment molt especial a tots els tècnics que hem tingut i que ens han facilitat sempre moltíssim la feina, la Marisol, l'Olga, el "Joselito", i la Cristina. I a l'equip d'administració, la Blanca, la Rita, l'Anna i l'Emiliano, per la vostra bona tasca i bon humor.

Fora, o no tant alguns, del món de la ciència, un agraïment molt especial pels meus amics. A en Joan, que tot i la distància que ara ens separa segueix sent el meu millor conseller i confident, i tot un exemple a seguir en tots els sentits. A la resta de la colla, la Lucía, la Marta, la Sandra, la Laura, la Mireia i respectius. Sou molt importants. I també a la colla de "farmaco", per les bones estones passades, en especial al Dani, amb qui vaig passar l'any més divertit dins d'un laboratori. I també als nois de l'interjol.

La meva família és molt important per a mi, per això no vull deixar passar l'ocasió de dedicar-lis aquest treball a tots ells, en especial als meus pares, Pere i Gemma, pel seu suport i amor. Ja la tenim aquí! Un record molt especial per a la meva àvia Quimeta, que espero que segueixi sentint-se orgullosa del seu nét.

Finalment, l'agraïment més sentit i especial per a la persona que m'ha aguantat en el pitjor i que tot i així ha seguit sempre al meu costat. Gràcies Eva pels teus ànims i pel teu suport incondicional. Les paraules es queden curtes per dir-te tot el que sento.



Vinyeta de la pàgina 13 de Factor-X vol.1 de Comics Forum (X-Factor Vol.1 52 Marvel Comics). Fússió de feina i afició.

ÍNDIX

I. LLISTA D'ABREVIATURES	V
II. LLISTA DE TAULES I FIGURES	IX
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 Desenvolupament dels insectes	4
1.1.1 Control hormonal del desenvolupament dels insectes.....	6
1.1.1.1 20-Hidroxiccdisona, l'hormona de la muda	8
1.1.1.2 L'Hormona Juvenil.	8
1.2 Senyalització nutricional i reproducció.....	11
1.2.1 La via de TOR.....	13
1.2.2 La via del Receptor d'Insulina	15
1.3 El nostre organisme model: La panerola <i>Blattella germanica</i>	16
1.3.1 La reproducció de <i>Blattella germanica</i>	17
1.3.2 Fisiologia de <i>Blattella germanica</i>	18
1.3.3 Anatomia de <i>Blattella germanica</i>	20
2. OBJECTIUS	23
3. MATERIAL I MÈTODES	27
3.1 INSECTES	29
3.2 TÈCNiques QUIRÚRGiques.....	29
3.2.1 Dissecció dels teixits	29
3.3 EXTRACCIÓ D'ÀCIDS RIBONUCLÈICS.....	30
3.4 TRACTAMENT AMB DNasa.....	30
3.5 RETROTRANSCRIPCIÓ.....	31
3.6 CLONATGE	32
3.7 AMPLIFICACIÓ DELS EXTREMS 5' I 3'	32
3.8 LLIGACIÓ D'INSERTS EN PLÀSMIDS.....	32
3.9 PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS.....	33
3.10 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA	33

3.11 ELECTROFORESI DE DNA	34
3.12 PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL	34
3.13 INTERFERÈNCIA D'RNA <i>IN VIVO</i>	36
3.14 OBTENCIÓ DE L'RNA DE DOBLE CADENA (dsRNA)	36
3.14.1 Clonatge del fragment diana	36
3.14.2 Linearització del DNA plasmídic	37
3.14.3 Síntesi dels dsRNA	37
3.15 WESTERN BLOT	38
3.15.1 Extracció de proteïna	38
3.15.2 Quantificació de proteïna	39
3.15.3 Electroforesi en gel	39
3.15.4 Transferència semiseca	40
3.15.5 Detecció	40
3.16 PRODUCCIÓ IN VITRO D'HORMONA JUVENIL	41
3.16.1 Incubació dels <i>corpora allata</i>	41
3.16.2 Extracció de l'hormona juvenil	42
3.17 ANÀLISI FILOGENÈTIC	42
3.18 INCUBACIÓ DE COS GRAS IN VITRO	45
3.19 MESURA DE TRIACILGLICÈRIDS	45
3.20 TINCIÓ D'OÒCITS AMB DAPI	46
3.21 MESURA DE LA LONGITUD DELS PRONOTS	46
4. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DE BgInR	47
4.1 Antecedents	49
4.2 Resultats	50
4.2.1 Clonatge de BgInR	50
4.2.2 Anàlisi de la seqüència de BgInR	51
4.2.3 Estudi de l'expressió de BgInR	51
4.3 Discussió	55
5. ESTUDI FUNCIONAL DE BgInR	61

5.1 Antecedents	63
5.2 Resultats	65
5.2.1 Interferència del InR durant el primer cicle gonadotròfic	65
5.2.1.1 Efectes sobre el desenvolupament.....	65
5.2.1.2 Efectes sobre la reproducció.....	71
5.2.2 Silenciament del InR durant el segon cicle gonadotròfic.....	78
5.3 Discussió	79
6. EFECTE DEL dsInR SOBRE LA LONGEVITAT I LA RESISTÈNCIA AL DEJUNI ...	87
6.1 Antecedents	89
6.2 Resultats	90
6.2.1 Efecte sobre la longevitat	90
6.2.2 Efecte sobre la resistència al dejuni	92
6.3 Discussió	95
7. CLONATGE I ESTUDI FUNCIONAL DE PEPCK.....	99
7.1 Antecedents	101
7.2 Resultats	103
7.3 Discussió	108
8. CLONATGE I ESTUDI DE S6K	113
8.1 Antecedents	115
8.2 Resultats	118
8.2.1 Clonatge de la seqüència de BgS6K.....	118
8.2.2 Anàlisi de les seqüències de BgS6K	120
8.2.3 Estudi de l'expressió de BgS6K.....	122
8.2.4 Efecte de la interferència de S6K	123
8.2.5 Anàlisi dels nivells de proteïna S6K	127
8.3 Discussió	129
9. CONCLUSIONS	133
10. BIBLIOGRAFIA	137

I. LLISTA D'ABREVIATURES

- Akt:** veure PKB
- AMP:** Adenosinamonofosfat
- ATP:** Adenosinatrifosfat
- CA:** *Corpora allata*
- CC:** *Corpora cardiaca*
- cDNA:** DNA complementari
- CG:** Cos gras
- Cv:** Cervell
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DMSO:** Dimetil sulfòxid
- dsRNA:** RNA de doble cadena
- 20E:** 20-hidroxiecdisona
- 4EBP:** Proteïna d'unió al factor d'iniciació eucariota 4E
- EDTA:** Àcid etilendiamintetraacètic
- eEF2K:** Quinasa del factor-2 d'elongació eucariota
- eIF4B:** Factor d'iniciació de la traducció eucariota 4B
- FoxO:** *Forkhead box subgroup O*
- FPPS:** Farnesil difosfat sintasa
- GP:** Glàndules Protoràciques
- GTP:** Guanosinatrifosfat
- HJ:** Hormona Juvenil
- HMG-R:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
- HMG-S:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
- IGF:** Factor de creixement insulínic
- IGFR:** receptor del factor de creixement insulínic
- ILP:** *Insulin-like peptides*
- InR:** Receptor d'Insulin

IRS: Substrat del Receptor d'Insulina

JHAMT: Metiltransferasa de la forma àcida de l'hormona juvenil

Md: Mesodeu

Met: *Methropene-tolerant*

mRNA: RNA missatger

OAA: Oxalacetat

Ov: Ovaris

PBS: Tampó fosfat salí

PDK1: Quinasa 3-fosfoinositol dependent

PEP: Fosfoenolpiruvat

Pepck: Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PIP2: Fosfoenol piruvat bifosfat

PIP3: Fosfoenol piruvat trifosfat

PKB: Proteïna quinasa B, també Akt

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

RACE: Amplificació ràpida d'extrems de cDNA

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*

RNAi: RNA d'interferència

rRNA: RNA ribosomal

S6K: Quinasa de la proteïna ribosomal S6

TAG: Triacilglicèrids

TOR: *Target of rapamycin*

TSC: *Tuberous sclerosis complex*

Vg: Vitel·logenina

II. LLISTA DE TAULES I FIGURES

Figura 1.1 Diversitat dels insectes.	5
Figura 1.2 Estructura química de les hormones 20E i HJ III.	6
Figura 1.3 Marc endocrí durant el desenvolupament post embrionari de <i>Nauphoeta cinerea</i> i <i>Manduca sexta</i> .	7
Figura 1.4 Esquema de la via de síntesi de l'hormona juvenil.	10
Figura 1.5 Esquema de les vies del Receptor de la Insulina i de TOR, amb les seves principals interaccions.	12
Figura 1.6 Marc endocrí durant les últimes fases del desenvolupament postembrionari de <i>Blattella germanica</i> .	19
Figura 1.7 Anatomia de <i>Blattella germanica</i> .	21
Figura 4.1 Seqüència de BgInR.	51
Figura 4.2 Relacions filogenètiques del receptor d'insulina de <i>B.germanica</i> .	53
Figura 4.3 Patrons d'expressió de BgInR en cos gras i CA durant el primer cicle gonadotròfic.	54
Figura 4.4 Nivells d'expressió de BgInR en cos gras i CA de femelles adultes alimentades i dejunades.	55
Figura 5.1 Situació dels dos dsInR sobre la seqüència del BgInR.	66
Figura 5.2 Efecte del silenciament de BgInR en els CA i el cos gras de <i>B. germanica</i> .	66
Figura 5.3 Durada del cinquè estadi nimfal.	67
Figura 5.4 Durada del sisè estadi nimfal.	69
Figura 5.5 Fenotip d'ales i tegmines per l'acció del silenciament de BgInR.	70
Figura 5.6 Efecte del silenciament de BgInR sobre el creixement del pronot.	71
Figura 5.7 Efecte del silenciament de BgInR sobre la producció d'HJ.	72
Figura 5.8 Efecte del silenciament de BgInR sobre els nivells d'expressió de diversos enzims de la via de biosíntesi de l'HJ.	73

Figura 5.9 Efecte del silenciament de BgInR i el dejuni sobre l'expressió de BgVg en cos gras.	74
Figura 5.10 Efecte del silenciament de BgInR i el dejuni sobre el creixement de l'òocit basal.	75
Figura 5.11 Efecte del LY294002 sobre la inducció de l'expressió de Vg per HJ.	76
Figura 5.12 Efectes del dsInR-II en <i>B. germanica</i> .	77
Figura 5.13 Efectes del silenciament de BgInR en femelles adultes de <i>B. germanica</i> .	79
Figura 6.1 Efecte del dsInR sobre la longevitat de femelles i mascles de <i>B. germanica</i> .	92
Figura 6.2 Efecte del dsInR sobre la resistència al dejuni de femelles i mascles de <i>B. germanica</i> .	94
Figura 6.3 Efecte del dsInR sobre la quantitat de triacilglicèrids al cos gras.	94
Figura 7.1 Reacció catalítica de Pepck.	101
Figura 7.2 Seqüència de BgPepck.	104
Figura. 7.3 Relacions filogenètiques de Pepck de <i>B. germanica</i> .	105
Figura 7.4 Nivells d'expressió de BgPepck en cos gras i CA de femelles adultes alimentades i dejunades durant 1, 3 i 5 dies.	106
Figura 7.5 Efecte del dsInR sobre els nivells d'expressió de BgPepck en cos gras de femelles adultes alimentades i dejunades durant 5 dies.	107
Figura 7.6 Efecte del dsInR sobre els nivells d'expressió de BgPepck en cos gras de femelles adultes alimentades.	108
Figura 8.1 Activació per passos de S6K.	116
Figura 8.2 Seqüència de BgS6K.	120
Figura 8.3 Anàlisi de les seqüències de BgS6K.	122
Figura 8.4 Diferències d'expressió de les dues isofomes de S6K en diferents teixits.	122

Figura 8.5 Durada dels darrers estadis nimfals.	123
Figura 8.6 Efecte del dsS6K en els CA de <i>B. germanica</i> .	124
Figura 8.7 Efecte del dsS6K sobre els nivells d'expressió dels enzims de la via de biosíntesi de l'HJ.	125
Figura 8.8 Efecte del dsS6K en el cos gras de <i>B. germanica</i> .	125
Figura 8.9 Efecte del dsS6K sobre els nivells d'expressió de la Vg i sobre la longitud de l'oòcit basal.	126
Figura 8.10 Efecte del dsS6K sobre els nivells d'expressió de Pepck al cos gras.	127
Figura 8.11. Detecció per Western blot dels nivells de proteïna S6K total en cos gras.	128
Taula 4.1 Oligonucleòtids degenerats i seqüències d'aminoàcids utilitzades com a referència.	50

1. INTRODUCCIÓ

Actualment, a la Terra, hi ha descrites al voltant de 1.750.000 espècies d'éssers vius, la majoria animals pluricel·lulars, dels quals més d'un milió són artròpodes. Dins dels artròpodes hi destaquen els insectes que, amb més d'un milió d'espècies descrites, representen més de la meitat de formes de vida conegudes. La classe dels insectes, situada dins del filum dels artròpodes, es caracteritza per tenir un exosquelet quitinós, el cos dividit en tres segments -característica a la que deuen el seu nom, que prové del llatí *insectum*, "tallat pel mig"- , tres parells de potes, ulls compostos i un parell d'antenes. Els coleòpters (escarabats) són el grup amb més espècies, amb unes 400.000 descrites, seguits pels lepidòpters (papallones), dípters (mosques i mosquits), i himenòpters (abelles i formigues) (Fig.1.1). Els insectes també són els metazous més abundants pel que fa a nombre d'individus, estimant que hi ha 200 milions d'insectes per cada ésser humà.

Podem trobar insectes en pràcticament tots els habitats del planeta, si bé són poques les espècies que han colonitzat els oceans, on uns parents pròxims dels insectes, els crustacis, han tingut un major èxit. Tot i així trobem tant formes larvals que han desenvolupat brànquies com adultes amb adaptacions per nadar, habitant el medi aquàtic. Els insectes són els únics invertebrats amb ales, tret que els ha permès ocupar quasi tots els ecosistemes terrestres i ha estat un dels factors clau pel seu gran èxit evolutiu, al permetre'ls arribar i ocupar pràcticament tots els nínxols ecològics a terra ferma. Solen ser solitaris, però alguns d'ells, com les abelles, les formigues o els tèrmits, són animals socials i viuen formant grans grups en colònies ben organitzades. Entre ells es poden comunicar de diverses maneres, mitjançant feromones, sons o llum, com fan les lluernes.

Les relacions entre els insectes i els éssers humans són diverses. Alguns insectes són considerats plagues, des dels que s'alimenten o fan malbé els conreus humans, fins als que directament es nodreixen de la sang d'humans i animals domèstics. Alguns d'ells són de gran importància ja que actuen com a vectors de transmissió de malalties, tan per a les persones com per les mascotes o ramats. Per combatre'ls s'han desenvolupat diverses tècniques, sent la més emprada els insecticides sintètics, si bé cada cop es tendeix més a buscar sistemes més respectuosos amb el medi ambient. Altres insectes són considerats beneficiosos, ja sigui per l'important paper ecològic que juguen al participar de la pol·linització, pel

seu paper com a depredadors, o bé pel benefici econòmic que implica la seva explotació, com en el cas de la mel de les abelles o la seda dels cucs de seda.

La història dels insectes es va iniciar fa uns 400 milions d'anys i, evolutivament parlant, presenta grans explosions de diversitat coincidint amb l'aparició d'innovacions clau per la colonització de nous nínxols encara per explotar en aquell moment. Un exemple seria la capacitat per volar, amb l'aparició de les primeres ales, que va tenir lloc durant el Carbonífer o el Devonià, ja que el fòssil més antic d'una ala que s'ha trobat fins ara és del període Carbonífer i pertany al *Paleodictyoptera*, un ordre extint d'insectes. Les ales van permetre als insectes ser els primers animals en explotar el medi aeri, i la majoria dels insectes actuals en tenen, encara que no siguin sempre funcionals. Un altre punt clau per a la seva expansió va ser l'evolució cap a la metamorfosi completa dels insectes holometàbols, que permet que els individus adults i els juvenils no competeixin pels mateixos recursos. Que el 85% d'espècies d'insectes siguin holometàbols (Fig.1.1) és una prova de l'èxit evolutiu d'aquesta estratègia.

Els nostre organisme model, la panerola *B. germanica*, és un insecte hemimetàbol, amb metamorfosi incompleta, de l'ordre *Blattaria*, que juntament amb *Isoptera* (tèrmits) i *Mantodea* (mantis), formen el superordre *Dictyoptera*, format per unes 6000 espècies.

1.1 Desenvolupament dels insectes

El creixement dels insectes, com en tots els artròpodes, es veu limitat per la rigidesa del seu exosquelet, fet que fa necessàries un seguit de mudes per al seu correcte desenvolupament. Durant la muda, la cutícula es separa de l'epidermis (apòlisi), es parcialment digerida i finalment es separa de la nova cutícula (ècdisi). Aquest procés es va repetint en mudes successives que permeten a la forma juvenil assolir la mida necessària per a que es doni la muda imaginal. Durant la muda imaginal s'assoleix la maduresa sexual i es desenvolupen les ales en el cas que l'adult en tingui. Els estadis immadurs poden diferir dels adults en forma, comportament i hàbitat, i incloure una forma intermèdia de pupa en aquelles espècies que realitzen

una metamorfosi completa, coneguts com holometàbols (en diferents tons de blau a la Fig.1.1), sent els grups amb major representació dins dels insectes. En aquests, el creixement dels individus es dona durant les fases juvenils, mentre que la metamorfosi es realitza en la fase de pupa, substituint els teixits larvaris pels de l'adult.

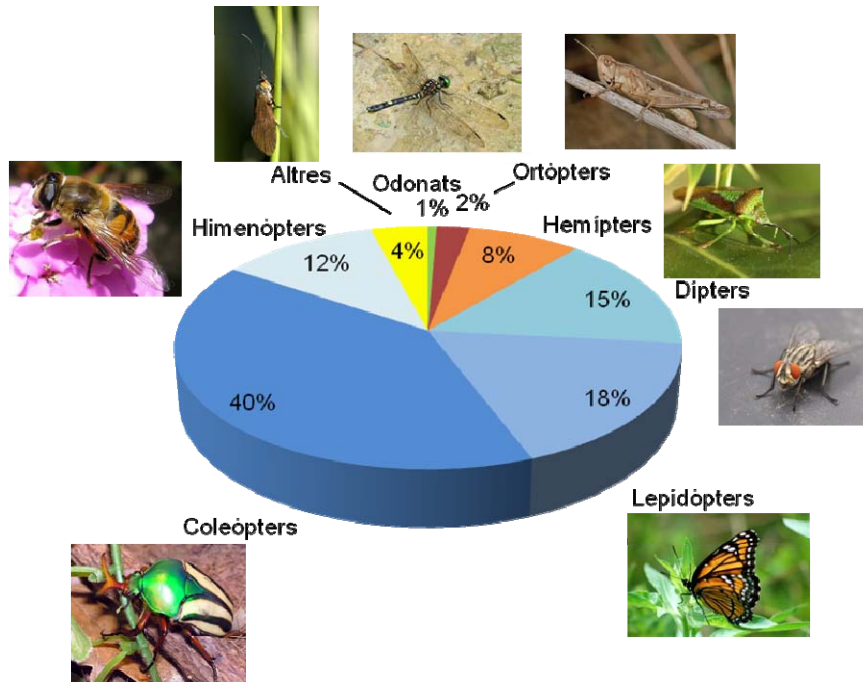


Figura 1.1 Diversitat dels insectes. Gràfic amb els diversos ordres de la classe *Insecta* representats segons el percentatge de nombre d'espècies. En diferents tonalitats de blau, els ordres amb metamorfosi completa (holometàbols), aproximadament el 85% de les espècies d'insectes. Adaptat de Grimaldi i Engel (2005), actualitzat amb dades de Chapman (2009).

En els insectes amb metamorfosi incompleta o hemimetàbols manca l'estadi de pupa i es passa per una sèrie d'estadis ninfals abans de mudar a adult. Aquestes nimfes tenen el mateix aspecte que un individu adult, si bé són més petites i sense ales, i són incapaces de reproduir-se.

Finalment, els insectes ametàbols surten dels ous amb l'aspecte dels adults, diferenciant-se d'ells només per la mida i la seva immaduresa sexual. Els adults no

tenen ales i continuen mudant després de la muda a adult. Evolutivament parlant, és l'estratègia més primitiva.

1.1.1 Control hormonal del desenvolupament dels insectes

Una característica comuna a tots els tipus d'insectes és que les transicions entre els diferents estadis del desenvolupament, tant durant l'embriogènesi, com en el desenvolupament post embrionari, estan controlades per dos tipus diferents d'hormones lipofíliques. Aquestes són, la 20-hidroxiecdisona (20E) i la hormona juvenil (HJ) (Figura 1.2 A i B, respectivament). La 20E és una hormona esteroïdal derivada del colesterol que indueix i controla el procés de la muda mitjançant els diferents pics que es donen a la hemolimfa al final de cada fase del desenvolupament. La presència d'HJ, una hormona sesquiterpènica, determina la naturalesa d'aquesta muda. Quan el pic de 20E es dona en presència d'HJ la muda es produeix cap a un nou estadi juvenil. En canvi quan els nivells d'HJ són molt baixos, el pic de 20E determina que la muda sigui cap a l'estadi adult (Dubrovsky, 2005) (Figura 1.3).

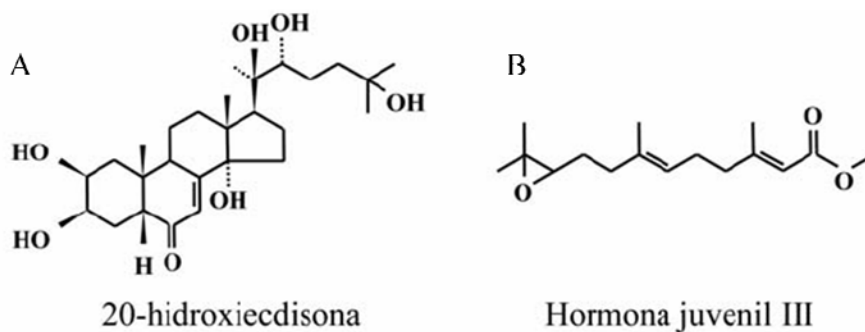


Figura 1.2 Estructura química de les hormones 20E (A) i HJ III (B).

Figura 1.3 Marc endocrí durant el desenvolupament post embrionari de *Nauphoeta cinerea* i *Manduca sexta*. Representació esquemàtica dels nivells de HJ (línia discontinua) i 20E (línia contínua) durant el desenvolupament de la panerola *N. cinerea* (a dalt) i l'arna *M. sexta* (a baix). E, ècdisi; (Truman i Riddiford, 2002) .

En els insectes holometàbols el seu cicle vital es divideix en 4 fases: ou, larva, pupa i adult. Els nivells de 20E augmenten durant l'embriogènesi, abans de cada muda durant les fases larvals, al formar-se la pupa i durant la metamorfosi (al final de la diferenciació de les estructures adultes), mentre que els pics d'HJ es produeixen durant la major part del cicle excepte durant la pupa, precisament quan té lloc la metamorfosi. És durant aquest procés que els òrgans larvals són destruïts mitjançant la mort cel·lular programada i són substituïts per les estructures adultes (Dubrovsky, 2005).

En els insectes hemimetàbols, en canvi, podem trobar dos moments del cicle vital en els que hi ha pics de 20E sense presència d'HJ. El primer es dona al final de l'embriogènesi, i provoca que de l'ou surti una nimfa amb la majoria d'estructures

desenvolupades i un aspecte molt similar al de l'adult. El segon el trobem durant la darrera fase nimfal, just abans de mudar a adult (Truman i Riddiford, 2002).

1.1.1.1 20-Hidroxicdisona, l'hormona de la muda.

Com ja hem comentat, la 20E indueix el procés de trànsit entre fases del desenvolupament dels insectes, motiu pel qual se la coneix com l'hormona de la muda. Les hormones ecdisteroïdals, de les quals la 20E n'és la forma més activa, deriven del colesterol, que els insectes es veuen obligats a obtenir de la ingesta, ja que no són capaços de produir-lo per ells mateixos *de novo*. A les glàndules protoràciques (GP) s'hi produeix l'ecdisona, que després és hidroxilada en teixits perifèrics, per passar a la forma activa 20E i realitzar la seva funció (Santos et al., 2004). La forma de les GP varia segons les espècies; en els insectes hemimetàbols consta de dos eixos musculars envoltats de cèl·lules secretores d'ecdisteroides, mentre que en insectes més modificats, com *Drosophila melanogaster*, la GP és una porció de la glàndula anular, en la que també hi trobem els *corpora allata* (CA), que sintetitzen l'HJ, i uns òrgans neurohemals i neurosecretors anomenats *corpora cardiaca* (CC), (Dai et al., 1991). Hi ha però, altres teixits capaços de sintetitzar ecdisteroides durant el desenvolupament. Un exemple clar es dona durant l'edat adulta, en que la GP ja ha degenerat i els ecdisteroides es sintetitzen principalment a les gònades, per tal de controlar diversos processos relacionats amb la reproducció (Romaña et al., 1995).

1.1.1.2 L'Hormona Juvenil

L'HJ és una hormona sesquiterpenoide que es sintetitza en els CA dels insectes, unes glàndules neuroendocrines especialitzades situades en una posició retrocerebral. L'absència d'aquesta hormona durant la muda és el factor clau per a que aquesta doni lloc a un individu adult. Aquest efecte s'ha observat en diferents ordres d'insecte, com ara Coleoptera, Orthoptera i Lepidoptera, mitjançant l'aplicació d'HJ o d'un anàleg durant la darrera fase juvenil, obtenint-ne una larva supernumerària (Riddiford et al., 2003). Un efecte similar s'ha observat en *B.*

germanica quan es silencia Dicer-1, gen implicat en la maduració dels microRNAs, si bé no causa un increment en la síntesis d'HJ (Gomez-Orte i Belles, 2009). Curiosament, aquest efecte no s'observa a *D. melanogaster* (Zhou et al., 2002). Recentment s'ha vist en aquestes mosques que la glàndula anular secreta altres productes a l'hemolimfa, com el metil farnesoat i el bisepoxi d'HJ III, assumint el rol de l'HJ durant l'estat larvari el primer, i durant la fase de pupa, juntament amb l'HJ III, el segon (Harshman et al., 2010). La majoria d'estudis previs es centraven únicament en l'HJ III.

A més del seu paper en la regulació de les mudes dels insectes, l'HJ també controla altres processos entre els quals s'inclouen el polifenisme, la diferenciació de castes, el comportament sexual i, en la majoria dels insectes, regula els principals processos associats a la reproducció, com la vitel·logènesi i el desenvolupament dels ovaris (Berger et al., 2005).

La síntesi de l'HJ es pot dividir en dues parts (Fig. 1.4). La primera, coneguda com via del mevalonat, és la que va des de l'acetil-CoA fins al farnesil bisfosfat, i es dona en tots els teixits, ja que es sintetitzen diversos productes intermediaris que són necessaris pel metabolisme, com la isopentenil adenina o la ubiquinona. La segona part només la trobem en els CA i és la part en què es sintetitza l'HJ a partir del farnesil difosfat. Aquesta part de la via és exclusiva dels insectes (Bellés et al., 2005).

Els nivells de síntesi d'HJ estan regulats a través de neuropèptids, les al·latotropines i les al·latostatines, que són alliberades des del cervell als CA a través de connexions neuronals. L'activitat dels enzims de la via de biosíntesi i dels encarregats del catabolisme de l'hormona determina la quantitat d'hormona circulant (Gilbert et al., 2000). Durant els darrers anys s'han clonat i caracteritzat diferents enzims de la via.

La 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMG-S) és el segon enzim de la via i produeix hidroximetilglutaril-CoA a partir d'acetoacetil-CoA. S'ha clonat en diversos insectes, entre ells la panerola *Blattella germanica*, en la qual s'han trobat dues isoformes, la HMG-S1 i la HMG-S2, que tenen un 78% d'identitat (Buesa et al., 1994; Martinez-Gonzalez et al., 1993a). El següent enzim de la via és la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-R), que catalitza la formació de mevalonat a partir

de l'hidroximetilglutaril-CoA. També ha estat clonat en diverses espècies, entre elles *B. germanica* (Martinez-Gonzalez et al., 1993b). La darrera reacció de la via, comuna a la via de síntesi del colesterol, és la formació de farnesil difosfat a partir de geranyl difosfat, catalitzada per la farnesil difosfat sintasa (FPPS), que ha estat clonada en diversos insectes model, entre ells *B. germanica* (Martin et al., 2007).

Figura 1.4 Esquema de la via de síntesi de l'hormona juvenil. La conversió d'acetil-CoA en farnesil-PP constitueix la via del mevalonat, comuna en diferents organismes, inclosos els vertebrats. En els CA dels insectes (requadre) és on té lloc la segona part de la via que acaba donant HJ. En canvi, en vertebrats, una variació del final de la via acaba produint colesterol (Bellés et al., 2005).

Les reaccions posteriors, exclusives dels insectes, pertanyen a la part de la via encarregada de la formació d'HJ. Els dos enzims més ben estudiats d'aquesta

darrera part són la metiltransferasa de la forma àcida de l'HJ (JHAMT) i l'epoxidasa de l'HJ. Totes dues s'han clonat en diverses espècies, entre elles *B. germanica* (Maestro et al., 2010; Maestro, comunicació personal).

L'acció antimetamòrfica de l'HJ va ser descoberta fa uns 70 anys però encara se sap poc sobre el seu mecanisme d'acció a nivell molecular. Algunes pistes sobre això van sorgir arrel d'un estudi realitzat en *D. melanogaster* per buscar mutants resistents a l'acció de l'HJ o als seus anàlegs durant la formació de la pupa, en el que es va trobar un gen, el *methoprene-tolerant (met)* (Wilson et al., 1986), que recentment s'ha demostrat que és el receptor de l'HJ (Charles et al., 2011), formant un heterodimer amb Taiman (Li et al., 2011). Aquest gen codifica per a una proteïna de la família basic helix-loop-helix amb un domini PAS. Tanmateix, els mutants de *met* en *D. melanogaster* són resistents a la toxicitat per HJ durant el període de prepupa. Sorprenentment, els mutants són viables (Ashok et al., 1998), si bé els adults presenten un retard en la producció d'ous i una fertilitat reduïda (Wilson et al., 1998).

1.2 Senyalització nutricional i reproducció

La nutrició i la reproducció són dos processos essencials per a tot ésser viu i estan clarament relacionats entre ells. Per a que un organisme sigui capaç de reproduir-se necessita trobar-se en unes condicions nutricionals adequades que garanteixin la viabilitat de la descendència i del propi progenitor en molts cassos. Però, ¿com un organisme es capaç de detectar els seus nivells nutricionals i fa que s'activin els processos necessaris per a poder reproduir-se quan les condicions li són favorables? La resposta no pot ser fàcil, doncs hi estan implicats factors metabòlics, endocrins i genètics.

En els insectes, la reproducció sol ser sexual, tot i que hi ha nombroses excepcions, i la major part de les espècies són ovíparas. Com s'ha comentat anteriorment, la HJ no només juga un paper fonamental en el desenvolupament dels insectes, sinó que també regula altres processos, entre ells la reproducció. En la majoria de les espècies d'insectes, l'HJ és la hormona gonadotròfica, és a dir, l'encarregada d'activar la producció de les proteïnes del vitel en el cos gras, fenomen

conegut com vitel·logènesi. Però per que això comenci hi ha d'haver algun tipus de senyal que indiqui que és el moment adequat per reproduir-se.

La responsabilitat de comunicar l'estat nutricional de l'individu recau sobretot en les vies del receptor de la Insulina i de TOR (de l'anglès *Target of Rapamycin*) (Fig. 1.5). Per una banda, els nivells circulants d'insulina o de pèptids similars a la insulina (insulin-like peptides, ILP), secretats en resposta a uns nivells nutricionals elevats, s'uneixen al receptor d'insulina, el qual inicia una cadena de senyalització molecular, activant els processos necessaris per respondre a l'estímul nutricional. D'altra banda, els aminoàcids presents a l'hemolimfa penetren a les cèl·lules i activen a TOR. TOR, a través de diferents activacions i inhibicions, modula la transcripció de gens, la traducció de RNA missatger i la biogènesi de ribosomes, entre d'altres processos cel·lulars, per tal de regular processos de creixement i reproducció (Maestro et al., 2009).

Figura 1.5 Esquema de les vies del Receptor de la Insulina i de TOR, amb les seves principals interaccions. Les fletxes indiquen interaccions, no necessàriament directes. Les acabades en punta indiquen activació i les que acaben en una barra indiquen inhibició.

Tot i que en molts casos se'n parla separatament per tal de facilitar la comprensió del seu funcionament –tal com farem a continuació-, a l'hora de la veritat aquestes dues vies presenten nombroses interaccions entre elles que cal tenir en compte, pel que convé considerar-les com una xarxa d'interaccions moleculars. D'aquesta manera totes dues vies actuen com integradores de la informació sobre l'estat nutricional i n'hi donen una resposta conjunta.

1.2.1 La via de TOR

La via de TOR rep el nom de la principal proteïna de la via. TOR és una serina/tirosina quinasa present i molt conservada al llarg de tots els eucariotes, que és activada principalment per la presència d'aminoàcids i regula diversos processos.

La història de l'estudi d'aquesta proteïna es remunta als anys setanta, quan d'una bactèria present a una mostra de sòl de l'Illa de Pasqua es va obtenir un metabòlit capaç d'inhibir la proliferació cel·lular i amb propietats immunosupresives. A aquest metabòlit se'l va anomenar Rapamicina, en honor al lloc on va ser descoberta (l'Illa de Pasqua s'anomena *Rapa Nui* en la llengua autòctona). Més tard es van trobar soques de llevat resistents a la rapamicina, que presentaven mutacions en les seves dues còpies de TOR. Fins ara s'ha clonat la seqüència de TOR en una gran quantitat d'organismes, però, al marge dels llevats, només s'han trobat dos gens de TOR a *Bombyx mori* (Zhou et al., 2010).

TOR respon a la presència d'aminoàcids circulants, bé directament, bé a través de l'activació de Rheb (sigles de *Ras homolog enriched in brain*), una proteïna d'unió al GTP responsable d'activar TOR (Roy et al. 2011). Si bé el mecanisme és poc conegut, els aminoàcids, un cop dins la cèl·lula, inhibeixen les proteïnes TSC1 i 2 (*tuberous sclerosis complex*), també conegudes com hamartina i tuberina respectivament, les quals són inhibidores de Rheb (Fig. 1.5). Però hi ha altres estímuls que poden regular TOR conjuntament amb els aminoàcids. Per exemple, els factors de creixement, com els ILP, que activen la quinasa Akt, com explicarem més endavant. Akt inhibeix TSC1 i TSC2, en el que és la primera prova de la interacció entre les dues vies de la que hem parlat anteriorment. L'estatus energètic, és a dir, els nivells

d'ATP, també modulen l'activitat de TOR, (Laplanche i Sabatini, 2012). Per últim, la via de TOR també és sensible a situacions d'estrès, com la hipòxia o el dany al DNA (Wullschleger, 2006; Zoncu et al., 2011).

Una de les principals dianes de TOR és la quinasa de la proteïna ribosomal S6 (S6K), que s'activa per fosforilació quan la via està activa (Fig.1.5). S6K, un cop activa, fosforila diverses proteïnes, principalment activant a la S6, de la que rep el nom, però també d'altres com el factor d'iniciació de la traducció eIF4B, al que activa, o la proteïna quinasa eEF2K, relacionada amb processos cancerosos, a la qual inhibeix. D'aquesta manera S6K participa en la regulació de la traducció de RNA missatgers, la síntesi d'RNA ribosomal i la biogènesi de ribosomes, sent un element clau a l'hora de determinar la mida de les cèl·lules, així com la progressió del cicle cel·lular d'aquestes (Fenton i Gout, 2011). Aquesta proteïna pertany a la família de les quinases AGC (proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, proteïna quinasa dependent de GMP cíclic i proteïna quinasa C) amb les que comparteix un domini catalític molt similar (Jastrzebski et al., 2007).

Una altra diana de TOR és la proteïna d'unió al factor d'iniciació eucariota 4E (4EBP), a la que inhibeix mitjançant fosforilació. 4EBP té efectes oposats a S6K, ja que al unir-se a la proteïna eIF4E inhibeix la traducció cap-dependent de proteïnes (Fig.1.5). Així, en situacions d'estrès nutricional, 4EBP atura la transcripció i dona a les cèl·lules més resistència enfront de condicions adverses (Savraj, 2009).

Bé sigui a través de S6K o 4EBP, o a través d'altres proteïnes, la via de TOR regula una gran diversitat de processos: el creixement cel·lular, la transcripció de diferents gens, la traducció de RNA missatger a proteïna, la biosíntesi dels ribosomes, diversos aspectes del metabolisme cel·lular, l'autofàgia o l'organització del citoesquelet d'actina. En tots els casos compleix la seva principal funció, donar resposta a les diferents condicions ambientals regulant els processos abans esmentats. Diversos estudis la vinculen amb processos cancerosos, malalties cardiovasculars, autoimmunitat, desordres metabòlics i envelliment (Zoncu et al., 2011). A més, dins del grup dels insectes, la via de TOR, juntament amb la de la insulina, regula processos específics d'aquests organismes com la diferenciació de castes (Patel et al., 2006; Barchuk et al., 2007).

TOR ha estat seqüenciada prèviament pel nostre grup de recerca en *B. germanica* i ja s'ha estudiat l'efecte de provocar un *knockdown* del transcrit mitjançant la tècnica del RNA d'interferència, observant una important disminució de la producció de HJ en el corpora allata de les femelles, així com dels nivells de RNA missatger dels enzims HMG-S1 i S2 i HMG-R, implicats en la seva síntesi. A més, també s'hi va observar una reducció del RNA missatger de vitel·logenina (Vg) en el cos gras, i que els ovaris no creixien. Aquests resultats recreen la situació que es produeix quan les femelles de *B. germanica* són privades d'aliment, indicant que la via de TOR està relacionada amb l'activació de la síntesi de la HJ i de la Vg deguda a senyals nutricionals (Maestro et al., 2009).

1.2.2 La via del Receptor d'Insulina

La insulina és una hormona polipeptídica produïda i secretada, en els mamífers, pels illots de Langerhans, al pàncrees. D'altra banda en vertebrats també hi trobem els IGF, unes proteïnes amb una seqüència molt similar a la de la insulina, secretades principalment pel fètge, però també en teixits diana, com el sistema nerviós, i que juguen un paper fonamental en el correcte desenvolupament i creixement del individu. En els insectes trobem els ILP, proteïnes amb una activitat similar a la insulina, codificats en diferents gens que s'expressen principalment en cèl·lules neuroendocrines del cervell, encara que també ho fan en altres teixits com el cos gras o l'aparell digestiu (Wu i Brown, 2006). Un cop secretats, aquests pèptids poden actuar com a hormones, neurotransmissors i factors de creixement. El nombre de representants pot variar entre espècies, coneixent-se 8 en *D. melanogaster* (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012), per exemple, i fins a 38 a *Bombyx mori* (Wu i Brown, 2006).

La via, encarregada de donar una resposta ràpida als nivells de nutrients i regular tant el creixement com la divisió cel·lular i el metabolisme, està present en els Metazous i molt ben conservada al llarg de l'evolució. Quan els nivells de nutrients són elevats els ILP es secreten i s'uneixen al seu receptor (InR) a la membrana cel·lular, activant-lo per autofosforilació. Aquest fosforila el substrat del receptor d'insulina (IRS), que s'uneix i activa la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K). PI3K

catalitza la transformació del fosfoenol piruvat bifosfat (PIP₂) en trifosfat (PIP₃), antagònicament al que fa la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), un gen supressor de tumors. El PIP₃ inicia una cascada de senyalització a través de les quinases Akt, també anomenada proteïna quiansa B (PKB) en alguns organismes, i la quinasa 3-fosfoinositol dependent (PDK1), que acaba, entre d'altres efectes, amb la regulació de diversos factors de transcripció (Fig.1.5), bé sigui activant-los o inhibint-los, de manera que quan hi hagi manca d'aliments i la senyalització baixi, els efectes siguin els oposats. És el cas de FoxO (*Forkhead box, subgroup O*), un factor de transcripció que està inhibit en la seva forma fosforilada. Quan l'estat nutricional és bo s'activa la quinasa Akt, encarregada de fosforilar a FoxO, fent que es quedi inactiu en el citoplasma. En canvi, quan les condicions són desfavorables i manquen els nutrients, FoxO desfosforilat migra al nucli i regula, incrementant o disminuint, la transcripció de diversos gens, entre els que podria trobar-se el propi receptor d'insulina, la transcripció del qual s'activa a *D. melanogaster*, donant com a resultat un increment de la sensibilitat a insulina (Puig et al., 2006). Un altre dels gens regulats per FoxO és el de la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (Pepck), un enzim de la via de la gluconeogènesi, la transcripció del qual incrementa com a resposta a estats de dejuni.

A nivell evolutiu aquesta via va sorgir en els metazous, i és posterior a la de TOR, pel que cal suposar que la seva aparició respon a la necessitat d'integrar uns estímuls externs que, com els propis organismes, són cada cop més complexos, permetent donar una resposta en tot l'organisme a través de la senyalització hormonal. D'aquesta manera poden donar una resposta a les diferents situacions de forma acurada, ràpida, coordinada i simultània, gràcies en bona part a l'aparició del sistema endocrí. Les interaccions entre les dues vies indiquen la necessitat d'actuar de manera coordinada per regular uns processos tan importants com el creixement o la reproducció, entre d'altres.

1.3 El nostre organisme model: La panerola *Blattella germanica*

Cal precisar que quan fem el terme panerola ens estem referint al grup d'insectes que formen el superordre *Dictyoptera*, juntament amb tèrmits i mantis. I és

que el mot panerola, derivat del llatí *pandus*, que vol dir “corbat, arquejat, bombat”, també serveix per referir-se a diversos gèneres de crustacis isòpodes, com el porquet de Sant Antoni, o a l’arriet o panerola de mar (*Ligia sp.*).

De forma comuna també se la coneix com “escarabat de cuina”, si bé poc tenen a veure amb els escarabats veritables, els coleòpters. Però no només el seu nom comú pot portar a confusió, i és que el seu nom científic, *B. germanica*, respon a la intenció per part de Linnaeus d’indicar-ne el seu lloc d’origen, que en aquest cas seria Alemanya. El que no sabia, però, era que l’espècimen al que va batejar, obtingut d’Alemanya, no provenia de la seva veritable regió nativa. No només això, sinó que en un principi se l’anomenà *Blatta germanica*, i va passar per cinc noms diferents més (*Blatta obliquata*, *Ectobius germanicus*, *Phyllodromia bivittata*, *Phyllodromia germanica*, *Ischnoptera bivittata*), fins acabar amb el setè i de moment definitiu *Blattella germanica*, des de l’any 1903 (Gordon, 1996).

Els individus de l’espècie fan menys de 2 cm de longitud i són de color marró cafè. Com moltes paneroles, tot i tenir ales, és incapaç de volar, si bé pot emprar-les per planejar. Se les acostuma a trobar vivint conjuntament amb els éssers humans, ja que aquests li aporten no sols aliments en abundància, sinó també les condicions de temperatura i humitat ideals pel seu desenvolupament. D’aquesta manera, podem trobar paneroles a gairebé qualsevol lloc on hi hagi establerts éssers humans.

1.3.1 La reproducció de *Blattella germanica*

B. germanica és una espècie d’insecte anautògena. Aquesta és una estratègia reproductiva per la qual les femelles de l’espècie necessiten alimentar-se per a poder reproduir-se. L’exemple clàssic d’anautogènia és el de certes espècies de mosquit, en les quals les femelles necessiten ingerir sang per iniciar la maduració dels seus oòcits (Hansen et al., 2004). Aquest és un cas molt ben estudiat degut a les seves repercussions sanitàries, ja que els mosquits actuen com a vectors transmissors de diverses malalties que afecten l’ésser humà. A *B. germanica* les femelles passen per diversos cicles gonadotròfics durant la seva vida, el primer dels quals comença

inmediatament després de la muda imaginal. Previ al augment en volum dels CA, que desembocarà en la producció d'HJ i conseqüent maduració dels oòcits basals, es dona un increment en la ingesta d'aliment, que es repeteix abans de cada cicle gonadotròfic (Osorio et al., 1997). A diferència dels mosquits, a *B. germanica* l'hormona gonadotròfica, la que activa la producció de les proteïnes del vitel en el cos gras, és l'HJ, tal com succeeix en la major part dels insectes. En canvi, en els insectes model més habituals, com són la mosca o el mosquit, la vitel·logènesi s'activa per 20E (Attardo et al., 2005), i en aquest sentit no es poden considerar com a models representatius del gran grup que són els insectes. A més, les paneroles són també un bon model d'estudi per tenir un cicle de vida curt, reproduir-se molt i ràpid, i perquè són fàcils de manipular.

En les femelles adultes de panerola es succeeixen diversos cicles reproductius marcats pels nivells d'HJ (Bellés et al., 1994). La HJ indueix la síntesi de Vg al cos gras i la seva incorporació als oòcits en creixement. El patró d'aquests cicles ve marcat per un increment progressiu dels nivells de la HJ després de la muda imaginal i una sobtada reducció d'aquests nivells després de l'oviposició. Aquests nivells es mantenen baixos durant el transport de l'ooteca, període durant el qual no es produeix la maduració de nous oòcits. L'ooteca està formada per l'embolcall que recobreix els ous per protegir-los i els propis embrions. Les femelles de *B. germanica* carreguen l'ooteca externament durant uns 17 dies fins que eclosionen en nimfes de primera fase. A l'inici de cada cicle, la femella necessita ingerir una dieta amb un contingut de proteïnes adequat. Gràcies a aquest fet, que les femelles de *B. germanica* necessitin menjar per poder reproduir-se, podem manipular les vies de la senyalització nutricional i la reproducció només posant o traient menjar a disposició dels animals.

1.3.2 Fisiologia de *Blattella germanica*

La formació de l'embrió de *B. germanica* dura 17 dies i acaba amb l'eclosió d'una nimfa, el creixement de la qual es produeix a través de 6 estadis nimfals separats per les diferents mudes. Els primers estadis nimfals duren entre 3 i 4 dies, el cinquè uns 6 dies, i el sisè i últim dura 8 dies. És en aquesta darrera fase nimfal en la que es dona la maduració de les ales i la capacitació dels òrgans sexuals, i finalitza

amb la muda imaginal, que donarà lloc a l'estadi adult. En les femelles s'inicia el primer cycle gonadotròfic, que dura entre 7 i 8 dies, durant els quals té lloc la vitel·logènesi, la maduració dels oòcits basals i les glàndules col·laterals, i acaba amb l'ovulació i finalment la formació de l'ooteca. Si la femella ha estat fertilitzada desenvoluparà entre 40 i 50 embrions a l'interior de l'ooteca. Un cop la femella ha deixat anar l'ooteca s'inicia un nou cycle gonadotròfic.

Diversos processos que es produeixen durant el desenvolupament embrionari i el postembrionari de *B. germanica* estan regulats per les fluctuacions dels nivells de la 20E i l'HJ, que s'han caracteritzat prèviament (Cruz et al. 2003, Treiblmayr et al. 2006). Així, els dos darrers estadis ninfals es caracteritzen per un pic de 20E, acompanyat per la presència d'HJ en la penúltima (5a) fase ninfal, que és absent durant la darrera (6a) fase. Finalment, després de la muda imaginal, es troben nivells molt baixos de 20E que augmenten només lleugerament durant el cycle gonadotròfic. En canvi, els nivells d'HJ augmenten durant l'estadi adult, arribant al màxim 5 dies després de mudar, amb pics cinc vegades superiors als observats durant la cinquena fase ninfal. I és que com hem dit, és l'HJ la que controla processos tant importants com la vitel·logènesi durant la fase adulta (Comas et al. 2001) (Fig. 1.6).

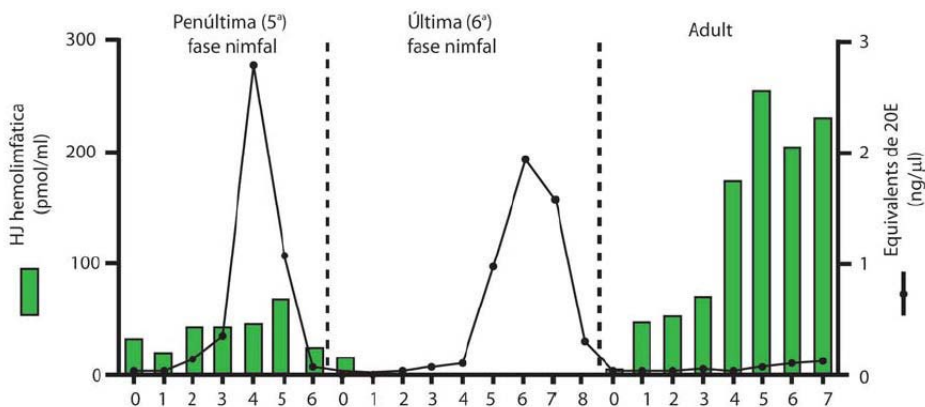


Figura 1.6 Marc endocrí durant les últimes fases del desenvolupament postembrionari de *Blattella germanica*. Nivells d'HJ i 20E durant les dues darreres fases ninfals i el primer cycle gonadotròfic. Dades de Cruz et al. (2003) i Treiblmayr et al. (2006).

1.3.3 Anatomia de *Blattella germanica*

El cos de *B. germanica*, com el de tots els insectes, està recobert per un exosquelet de quitina amb peces dures o esclerites, unides entre elles per membranes. Es pot dividir en 3 regions: cap, tòrax i abdomen. Al cap hi trobem els òrgans sensorials, dues antenes llargues i filiformes, dos ocells, dos ulls compostos i quatre palps (dos maxil·lars i dos labials), així com un complex aparell bucal mastegador. El tòrax és el centre de locomoció i està format per tres segments: el protòrax, el mesotòrax i el metatòrax. Presenta 3 parells de potes, un a cada segment, i dos parells d'ales a la zona dorsal del 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 metatoràciques, que són membranoses i li permeten planar. Per últim, l'abdomen està segmentat i no presenta apèndixs excepte en l'últim segment, que té un parell de cercs amb funció sensorial.

El cos gras és el principal teixit metabòlic i és un òrgan anàleg al fetge i al teixit adipós dels vertebrats. Es troba unit a diferents teixits, com l'epidermis, les gònades, el tub digestiu, la cadena nerviosa ventral, etc. Serveix com a teixit biosintetitzador i d'emmagatzematge.

Els principals òrgans endocrins de la panerola són la glàndula protoràcica (GP) i el complex format pels *corpora cardiaca* (CC) i els *corpora allata* (CA). També el cervell presenta diferents grups de cèl·lules neurosecretores especialitzades que alliberen neuropèptids a l'hemolimfa. La GP consta de dos feixos musculars creuats, units per la part central i recoberts de cèl·lules neurosecretores especialitzades. Està situada en el protòrax, entre l'estomodeu i el gangli protoràcic. La seva principal funció és la síntesi d'ecdisteroides que s'alliberen a l'hemolimfa (Fig. 1.7A). Després de la muda a adult, la GP degenera i mor. Els CC i els CA estan format per parelles de glàndules ganglionars, associades entre si en un complex retrocerebral situat sobre el tub digestiu. Els CC sintetitzen l'hormona hipertrehalosèmica, encarregada de la mobilització de carbohidrats i lípids. D'altra banda, els CA són els responsables de produir l'HJ (Fig.1.7B). CC i CA estan connectats per diferents nervis tant al cervell com al gangli subesofàgic, i al sistema nerviós estomatogèstic.

L'aparell reproductor de les femelles consta d'un parell d'ovaris panoístics, dels que parteixen oviductes que conflueixen en un de sol. Durant el cicle gonadotròfic només maduren els oòcits basals de cada ovariol. A l'oviducte comú s'obren les glàndules col·laterals, que sintetitzen les substàncies que formen l'ooteca, i les espermateques, on després de la còpula emmagatzemen l'esperma dels mascles per fecundar els ous a mesura que passen per l'oviducte durant l'ovulació (Fig. 1.7C).

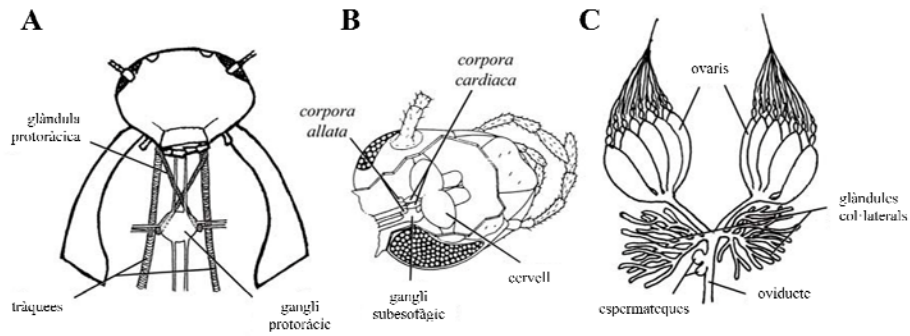


Figura 1.7 Anatomia de *Blattella germanica*. (A) Visió ventral del protòrax on s'observa la glàndula protoràcica sota el gangli protoràcic i la cadena nerviosa ventral. (B) Complex retrocerebral dels *corpora allata* i els *corpora cardiaca* connectat amb el cervell. (C) Aparell reproductor femení, mostrant els ovaris, les glàndules col·laterals i les espermateques.

2. OBJECTIUS

La present tesi doctoral s'emmarca dins d'un projecte focalitzat en l'estudi de les senyals nutricionals i la reproducció en els insectes, utilitzant com a organisme model la panerola *Blattella germanica*, possible model general dintre dels insectes per la seva reproducció regulada per l'hormona juvenil. Els principals objectius d'aquest treball van ser:

1. Identificació de l'homòleg del Receptor d'Insulina (InR), a *B. germanica*, el seu clonatge i l'anàlisi de la seva seqüència.
2. Caracterització de l'expressió del InR de *B. germanica* durant el primer cicle gonadotròfic i en situació de dejuni.
3. Estudi funcional del InR de *B. germanica* mitjançant la utilització de la tècnica del RNA d'interferència *in vivo*.
4. Estudi de l'efecte de la interferència del InR sobre la longevitat i la resistència al dejuni.
5. Establir l'expressió de Pepck com a possible indicador de l'activitat de la via del InR.
6. Posada a punt de la tècnica de *western blot* per a la detecció de l'activació per fosforilació de S6K a *B.germanica*.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 INSECTES

Els individus de *B. germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) necessaris per a realitzar els diferents assajos es van obtenir d'una colònia criada en foscor constant a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ i 60-70 % d'humitat relativa, alimentades amb pinso especial per gossos PANLAB 125 i aigua *ad libitum* (Piulachs 1987).

L'edat de les nimfes i els mascles adults es va calcular cronològicament després de la seva muda. Per determinar l'edat de les femelles adultes en el primer cicle gonadotròfic es va seguir com a paràmetre la longitud dels oòcits basals (Piulachs 1987). Per les proves de segon cicle gonadotròfic, s'induí l'entrada en aquest traient l'ooteca del primer cicle al dotzè dia del seu transport. Pels experiments de dejuni, només es va subministrar aigua als animals després de la seva muda imaginal o després de la inducció del segon cicle gonadotròfic.

3.2 TÈCNiques QUIRÚRGiques

Les disseccions dels *corpora allata* (CA), del cos gras i dels ovaris es van realitzar sota una lupa binocular Meiji en espècimens anestesiats prèviament amb CO_2 . Per a la manipulació i extracció dels teixits es van emprar 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

NaHCO₃ 0,2g/l

CaCl 0,2 g/l

3.2.1 Dissecció dels teixits

Per extreure els ovaris es realitzava una obertura longitudinal a la part ventral de l'abdomen del insecte, des del segment genital fins al tòrax. Seguidament, es separaven els esternits 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.

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 s'inclinava el cap de l'animal endavant i es retirava el teixit muscular i el cos gras que es troba just a sota de 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 dos tràquees dorsals disposades longitudinalment.

3.3 EXTRACCIÓ D'ÀCIDS RIBONUCLÈICS

Els teixits dissecats es van congelar ràpidament en nitrogen líquid per a l'extracció d'RNA i es van mantenir a -80°C fins a la seva utilització. Les extraccions d'RNA es van fer utilitzant el kit Sigma GenElute Mammalian Total RNA seguint les instruccions del fabricant. Per a les extraccions d'RNA total de cos gras, els teixits prèviament congelats en nitrogen líquid es trituraven amb l'ajuda d'un homogeneïtzador mecànic. En el cas dels CA les mostres es congelaven directament amb el tampó de lisi i just abans del procediment d'extracció de RNA es realitzava l'homogeneïtzació del teixit mitjançant una barreja vigorosa utilitzant el vòrtex. L'últim pas d'extracció consistia en l'elució del RNA de la columna amb $50\mu\text{l}$ d'aigua DEPC. L'RNA provinent de cos gras es quantificava per obtenir la seva concentració i puresa amb l'espectrofotòmetre ND-1000 UV-Vis (Nanodrop) llegint l'absorbància a 260 i 280 nm. Per l'RNA provinent dels CA, degut a la seva baixa concentració, es va liofilitzar la solució i es va resuspendre en $8\mu\text{l}$ d'aigua DEPC per procedir directament amb el tractament amb DNasa.

3.4 TRACTAMENT AMB DNasa

Degut a que en una extracció d'RNA sempre existeix una petita contaminació amb DNA genòmic que pot interferir en la posterior quantificació dels nivells dels diferents trànscrips, totes les mostres es tractaven amb DNasa.

Procediment:

1. En un volum final de 10 μ l afegir els components següents:
300 ng – 1 μ g d'RNA
1 μ l de Reaction Buffer (Promega)
1 μ l de RQ1 RNase-Free DNase (Promega)
2. Incubar 30 minuts a 37°C
3. Afegir 1 μ l de Stop Solution (Promega) i incubar 5 minuts a 75° per aturar la reacció.
4. Posar en gel per evitar hibridacions de les cadenes d'RNA.

3.5 RETROTRANSCRIPCIÓ

Amb aquesta tècnica s'obté una barreja de segments de DNA retrotranscrits a partir dels RNA de les mostres.

Procediment:

1. Afegir els següents reactius en un tub amb RNA motlle de la mostra tractada amb DNAsa :
4 μ l de First Strand Buffer 5X (Invitrogen)
0,5 μ l de Random Primers Hexamers (500 μ g/ml) (Promega)
0,5 μ l de dNTP Master Mix 100mM (Ecogen)
1 μ l de DTT 0,1 M (Invitrogen)
1 μ l de RNAsin Ribonuclease Inhibitor 40 u/ μ l (Promega)
2. Equilibrar la reacció durant 10 minuts a temperatura ambient.
3. Afegir 1 μ l de SuperScript™ II RNase H⁺ Reverse Transcriptase (200u/ μ l, Invitrogen) o 1 μ l d'aigua en un tub control per assegurar l'absència de DNA genòmic.
4. Equilibrar la reacció 10 minuts a temperatura ambient.
5. Incubar 50 minuts a 42°C per fer la transcripció reversa.
6. Incubar durant 10 minuts a 75°C per acabar la reacció.
7. Equilibrar 10 minuts a temperatura ambient.
8. Afegir 20 μ l de TE pH 8.0.

3.6 CLONATGE

Per obtenir el cDNA homòleg a les seqüències de InR, Pepck i S6K, es van utilitzar encebadors degenerats dissenyats agafant com a base regions conservades de les seqüències de diferents insectes i vertebrats. Amb aquests encebadors, mitjançant les tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es va obtenir, a partir de cDNA de cèl·lules UM-BGE-1 provinents d'embrions de *B. germanica* utilitzat com a motllo, un primer fragment de la seqüència.

- Oligonucleòtids utilitzats:

Molècula	Oligonucleòtid	Seqüència	Fragment amplificat
BgInR	IR-F-1	5'-TTYGGNATGGTNTAYRARGG-3'	786pb
	IR-R-1	5'-GYCATNCCRAARTCNCCNA-3'	
BgPepck	PEPCK-F-1	5'-ATGMGNATHATGACNMGNATG-3'	945pb
	PEPCK-R-1	5'-GGNCKCATNGCRAANGGRTC-3'	
BgS6K	S6K-F-1	5'-TAYGGNAARGTNTTYCARGT-3'	939pb
	S6K-R-1	5'-GCNACRTANGTRAANCCYTG-3'	

3.7 AMPLIFICACIÓ DELS EXTREMS 5' I 3'

Les seqüències es van completar mitjançant les tècniques de 5' i 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Aquesta tècnica va ser descrita inicialment per (Frohman, Dush and Martin 1988) i la vam 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), segons el cas.

3.8 LLIGACIÓ D'INSERTS EN PLÀSMIDS

Totes les lligacions de fragments de DNA generats per PCR es van fer en el vector pSTBlue-1 seguint les instruccions del Acceptor 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).

3.9 PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS

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

3.10 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

La determinació de les quantitats relatives dels mRNA d'interès es van realitzar en alguns casos mitjançant la tècnica de RT-PCR semiquantitativa. El número de cicles en la PCR es va ajustar de forma que el grau d'amplificació quedés dins de la zona lineal per cadascun dels diferents transcrits.

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

GoTaq Buffer (Promega)	1 x
dNTP Master Mix 100mM (Ecogen)	800 µM
encebador directe	200 nM
encebador invers	200 nM
cDNA	1 µl
GoTaq DNA polimerasa(Ecogen)	1 u

- Els oligonucleòtids utilitzats per l'estudi de les isoformes de S6K van ser:

Molècula	Oligonu cleòtid	Seqüència	Grandària fragment
BgS6K	S6K-F14	5'-TGACTCACCTGATGAGTCAACACT-3'	154/220pb
	S6K-R15	5'-AGCGGGTGTAGGATAAGCTGTTTT-3'	
BgActina	Actina-F	5'-TCGTTTCGTGACATCAAGGGAGAAGCT-3'	308pb
	Actina-R	5'-TGTCGGCAATTCCAGGGTACATGGT-3'	

3.11 ELECTROFORESI DE DNA

Les electroforesis de DNA es van realitzar en gels d'agarosa entre l'1 i el 1,5 % (p/v), preparats en tampó TBE 0,5X. Abans d'abocar l'agarosa al motllo del gel se li afegia SYBR Safe DNA gel stain (Promega) en una proporció de 1µl per cada 50 ml de gel. A cada carril es carregava la quantitat adequada de DNA (Sambrook et al 1989). Les electroforesis es van realitzar a un voltatge constant d'entre 100 i 130V. La visualització del cDNA es realitzava amb un transil·luminador de llum ultraviolada.

- Tampó TBE 0,5X:

Tris base 44,5mM

Àcid bòric 44,5mM

EDTA (pH 8.0) 1 mM

3.12 PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

La tècnica de la PCR quantitativa a temps real o qRT-PCR ens va permetre quantificar l'expressió d'un gen d'interès en relació a un gen control. Aquesta tècnica es basa en la unió a la doble cadena de DNA del fluorocrom SYBRGreen present en la barreja de la PCR i el seguiment al llarg del temps de la fluorescència emesa per aquest compost. La fluorescència és proporcional a la quantitat de DNA amplificat i aquest, al seu torn, és proporcional al nombre de còpies de cDNA inicial de la mostra. El nombre de còpies del gen d'interès es refereix respecte al gen usat com a referència. Les PCR en temps real es van fer en plaques de 96 pouets. Cada placa contenia 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 afegir 18 µl de la Master mix següent i 2 µl de la dilució adequada del cDNA:

Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 1x

Oligonucleòtid directe 100nM

Oligonucleòtid invers 100nM

La reacció de PCR és la següent:

1. 10 minuts a 95°C
2. 15 segons a 95°C
3. 1 minut a 60°C
4. Tornar a 2 durant 50 cicles
5. Corba de dissociació de l'amplicó

La monitorització de la fluorescència es va realitzar mitjançant el hardware MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) i el software iQ5 de Bio-Rad.

- Parelles d'oligonucleòtids emprades:

Molècula	Oligonucleòtid	Seqüència	Grandària fragment
BgInR	IR-F-13	5'-CACAGGGCCTAATTCCACAGA-3'	109pb
	IR-R-24	5'-ACAGCGCCGGTTCAGATACTT-3'	
BgS6K	S6K-F-12	5'-AAGGCATCAATTGTGCGAAAC-3'	110pb
	S6K-R-12	5'-TGAAACGCGTAGATCAGGTCC-3'	
BgPepck	Pepck-RT-F	5'-ATCTTGCCATGATGTGCCCT-3'	151pb
	Pepck-RT-R	5'-TTATTTGATGTGCCTGGTGCA-3'	
BgVg	Vg-RT-F1	5'-CTACATTGGAAGTGAGGACAGC-3'	200pb
	Vg-RT-R1	5'-CCAAAGTTTTAGGATCAGTAGGTG-3'	
BgHMG-S1	HMGS1-RT-F1	5'-CTTCGCTTTACGGAGGTTTGGTC-3'	200pb
	HMGS1-RT-R1	5'-GCTGCGGCTTGATGTGCGAGAG-3'	
BgHMG-S2	HMG-S2-F2	5'-GCACAGACAGGGAGGACATCA-3'	200pb
	HMG-S2-R2	5'-CCTACTTCCAGCCATCCAATG-3'	
BgHMG-R	HMGR-RT-F1	5'-TTGTAGCTGATGGAATGACTCGT-3'	200pb
	HMGR-RT-R1	5'-AGCAATGAAGCGTATAAACAAATG-3'	
BgActina	Actina-Fwd	5'-AGCTTCCTGATGGTCAGGTGA-3'	200pb
	Actina-R	5'-TGTCGGCAATTCCAGGGTACATGGT-3'	

3.13 INTERFERÈNCIA D'RNA *IN VIVO*

Una aproximació 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 trànscrits que les codifiquen. Aquest procediment es basa en el tractament amb una doble cadena de RNA (dsRNA) homòloga a un fragment del RNA missatger que es pretén silenciar, el qual, en penetrar dins de les cèl·lules es processa en fragments de 21-23 nucleòtids que desencadenen la degradació del missatger endogen diana (Plasterk, 2002; Schutze, 2004).

3.14 OBTENCIÓ DE L'RNA DE DOBLE CADENA (dsRNA)

3.14.1 Clonatge del fragment diana

En primer lloc es va amplificar i clonar una regió del cDNA del gen que es volia interferir per poder sintetitzar el corresponent dsRNA. Per als controls dels experiments es va utilitzar un fragment d'RNA de doble cadena no present en els insectes, en aquest cas es va utilitzar un fragment de 307pb d'un mRNA que codifica per a la polihedrina del nucleopolihedrovirus de *Autografa californica* (dsControl). Els fragments amplificats es lligaven entre els promotors SP6 i T7 del vector pSTBlue-1.

- Els oligonucleòtids utilitzats van ser:

dsRNA	Oligonucleòtid	Seqüència	Grandària
dsInR-I	IR-F-5	5'-ATGCAACAGATCGTGAGAGAAGTG-3'	326pb
	IR-R-6	5'-ATCTTCAGCAACCATGCAATTCC-3'	
dsInR-II	IR-F-14	5'-ACAACGAATTGCTCTCAGCAAAGTT-3'	349pb
	IR-R-7	5'-AGCGTACAGCTGTGTAATCTCCAA-3'	
dsS6K	S6K-F-5	5'-CAAAGTCACAGGCCAAGATGCAG-3'	519pb
	S6K-R-4	5'-AGTGCTCCTAATGACCACCACAGTC-3'	
dsControl	Polyh-F-1	5'-CCTACGTGTACGACAACAAGTACT-3'	441pb
	Polyh-R-1	5'-ATGAAGGCTCGACGATCCTAATCA-3'	

3.14.2 Linearització del DNA plasmídic

Per sintetitzar el dsRNA calia partir de dos fragments lineals de DNA, un que contingués el promotor T7 i la seqüència a amplificar que acabés amb un extrem 5' protuberant, i un altre amb el promotor SP6 i igualment la seqüència amb un extrem 5' protuberant. Per obtenir aquests cDNAs es preparaven dues digestions amb l'enzim de restricció adequat per a cada cas i 15 µg de 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-isoamílic (25:24:1). El precipitat es resuspensia en 23,5 µl d'aigua DEPC i s'utilitzava com a motlle per sintetitzar les cadenes senzilles d'RNA (ssRNA), sentit i antisentit.

3.14.3 Síntesi dels dsRNA

Procediment:

1. Les reaccions de síntesi de ssRNA es realitzaven de forma independent, afegint en dos tubs:

23,5 µl	fragment lineal de DNA
10 µl	Transcription 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)
	o T7 RNA polymerase (18 u/ µl; Promega)

 Incubar 4h a 37°C
2. Verificar el correcte funcionament d'ambdues reaccions mitjançant electroforesi en gel d'agarosa d'1 µl de cada reacció.
3. Ajuntar les dues reaccions de ssRNA
4. Incubar en un bany a 95°C durant 10 min.
5. Deixar disminuir la temperatura del bany fins a temperatura ambient durant unes sis hores aproximadament per permetre que les dues cadenes de ssRNA hibridin.
6. Concentrar el dsRNA obtingut mitjançant precipitació amb fenol-cloroform-isoamílic. Resuspendre el precipitat en 39,5 µl H₂O DPEC.

7. Realitzar un tractament amb DNasa i RNasa per eliminar el DNA plasmídic i el ssRNA que no hagi hibridat correctament:
Afegir a la solució anterior fins a un volum de 50µl:
5 µl Tampó de la DNasa (10 x; 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.
8. Netejar i concentrar el dsRNA mitjançant precipitació amb fenol-cloroform-isoamílic. Resuspendre el precipitat en 40 µl en H₂O DPEC.
9. Quantificar les concentracions de dsRNA en Nanodrop i verificar la seva integritat i puresa separant una alíquota en un gel d'agarosa.

3.15 WESTERN BLOT

A partir d'un pèptid sintètic corresponent als 18 primers aminoàcids de la proteïna S6K, lligat a la proteïna KLH (Keyhole limpet hemocyanin) que va actuar com a transportador, es va fabricar un anticòs policlonal en conill en el Servei de Síntesi de Anticòsos del Grup de Receptors Moleculars Aplicats del Institut de Química Avançada de Catalunya, (AMRg, IQAC-CSIC).

3.15.1 Extracció de proteïna

Les mostres de cos gras, conservades a -20°C en tampó de trencament, es van homogeneïtzar manualment. A continuació es van centrifugar a 13000 g a 4°C durant 10 minuts. Després es va separar el sobrenedant de les restes de teixit que quedaven al fons del tub i el sobrenedant es va traspasar a un nou tub.

- Tampó de trencament:

50mM Tris, pH 7,4

1% IGEPAL

0,25% Desoxicolat sòdic

150mM NaCl

1mM àcid etilendiamintetraacètic (EDTA)

1x Phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma-Aldrich)

1x Protease inhibitor cocktail (Roche)

3.15.2 Quantificació de proteïna

Per a la quantificació de proteïnes es va utilitzar el mètode colorimètric de Bradford (1976) realitzant lleugeres modificacions per adaptar-lo a les nostres necessitats. Es van emprar plaques de poliestirè de 96 pous de fons pla (Nunc MaxiSorp 96F). El volum final de la mostra va ser de 30 μl als que es van afegir 250 μl de reactiu Bradford. Després de 5 minuts d'incubació es va quantificar la coloració resultant amb un espectrofotòmetre Titertek Multiscan Plus NLK II Type 314, realitzant la lectura de l'absorbància a 595nm, i els valors es van extrapolar en una recta patró de BSA amb un rang de concentracions entre 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ i 7.81 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Es va utilitzar NaCl 0.4M per a totes les dilucions.

3.15.3 Electroforesi en gel

La electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS permet separar proteïnes segons el seu pes molecular a mesura que migren per una matriu de poliacrilamida. Per a la realització del nostre experiment es va posar la mateixa quantitat de proteïna (entre 50 i 75 μg de proteïna) per a cada mostra, afegint el mateix volum de tampó Laemli i 2 μl de blau de bromofenol. Les mostres es van bullir durant cinc minuts per desfer les estructures terciàries i secundàries de les proteïnes i es van refredar en gel per mantenir-les en aquest estat desnaturalitzat, per tal que quedessin separades només segons la seva mida. Es va emprar el marcador Pageruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) com a indicador del pes molecular de les proteïnes. Es van utilitzar gels de poliacrilamida al 7,5% (Mini-PROTEAN TGX precast gels, Bio-Rad) amb deu pous amb capacitat per 50 μl de mostra cada un. Es van col·locar els gels en un tanc amb tampó de migració i es van omplir els pous amb les mostres i el marcador. Es va realitzar l'electroforesi del gel a 20mA.

- Tampó de migració 10x:

0.25M Tris base

1.92M Glicina

1% SDS

Aigua

El pH ha de quedar entre 8,3 i 8,7.

3.15.4 Transferència semiseca

En primer lloc es preparaven 5 trossos de paper de filtre (Whatman 3MM Chr) i un de membrana de nitrocel·lulosa (Whatman Protran) de la mida aproximada del gel, i es posaven en remull amb tampó de transferència. Es col·locaven 2 trossos de paper de filtre sobre l'ànode de l'aparell de transferència, un TE70 ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences). Sobre d'aquests es col·locava la membrana de nitrocel·lulosa. A continuació es desmuntava l'aparell d'electroforesi i s'extreia el gel, que es posava damunt de la membrana. Al damunt de tot es col·locaven la resta de papers de filtre amb compte de que no quedessin bombolles d'aire. Finalment es realitzava la transferència a 50mA durant 1 hora. Un cop finalitzada la transferència, es va submergir la membrana durant 5 minuts en una solució de Ponceau S i es va destenyir amb aigua durant 10 minuts. La tinció de les bandes de proteïna amb el Ponceau S permetia comprovar que la transferència s'havia realitzat correctament.

- Tampó de transferència:

48mM Tris base
39mM Glicina
0,037% SDS
20% Metanol
Aigua

- Solució Ponceau S:

2g Ponceau
30g àcid tricloroacètic
30g àcid sulfosalicílic
100 ml d'aigua
Diluir 1:10 en aigua abans d'usar

3.15.5 Detecció

El procés de detecció va començar amb el bloqueig dels punts d'unió inespecífics de la membrana amb tampó de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació, o es deixava fins a l'endemà a 4°C i en agitació. Després de descartar el tampó de bloqueig es va incubar la membrana amb l'anticòs primari diluït en tampó de bloqueig a la concentració adequada, durant 2 hores a temperatura ambient i en agitació. Seguidament es van realitzar 3 rentats de 10 minuts amb tampó de neteja. A continuació es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari anti-IgG de conill subministrat en el kit de detecció per luminescència (Thermo Scientific) diluït en tampó de bloqueig a la concentració adequada durant una hora a temperatura ambient i en agitació. Les membranes es van tornar a rentar com s'ha descrit anteriorment i es van revelar per luminescència seguint el protocol del kit de

Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific). Tot seguit es va posar la membrana a contactar amb films Kodak, de 1 minut a una hora, segons el cas.

- PBS:

80 mM Na₂HPO₄·2H₂O

20 mM NaH₂PO₄·2H₂O

100mM NaCl

Aigua

Ajustar el pH a 7.5 amb NaOH.

- Tampó de bloqueig:

5% llet en pols

0,1% tween 20 (Sigma)

PBS

- Tampó de neteja:

0,1% tween 20

PBS

3.16 PRODUCCIÓ IN VITRO D'HORMONA JUVENIL

3.16.1 Incubació dels *corpora allata*

Els CA s'incubaven en medi TC-199 (Sigma) prèviament esterilitzat amb filtres Millipore de 0,22µm, al que se li va afegir tampó Hepes (Sigma) a una concentració de 20mM, i Ficoll (GE Healcare) per obtenir una concentració de 20mg/ml, i es va ajustar el seu pH a 7,2. A continuació s'incubaven els CA durant 3 hores a 30°C en un tub de vidre estèril revestit amb carbowax (polietilenglicol, 2000, Merck), amb 100µl de medi al que se li havia incorporat el precursor marcat L-[metil-³H] metionina a una activitat específica de 7,4 Gbq/mmol.

3.16.2 Extracció de l'hormona juvenil

L'HJ es va extreure segons (Pratt i Tobe, 1974) i adaptat a *B. germanica* per (Bellés et al., 1987).

Un cop finalitzada la incubació s'afegien 200µl de metanol per aturar l'activitat enzimàtica, 100µl d'EDTA 1% per facilitar la separació entre la fase orgànica i l'aquosa i 500µl de cloroform per dissoldre l'HJ. Es separava la fase clorofòrmica i a la fase aquosa se li realitzava una segona extracció amb cloroform. S'ajuntaven les dues fases clorofòrmiques i s'afegien 10 µg d'HJ III, per tal de facilitar la posterior separació i el revelat amb llum UV. Seguidament s'evaporava l'extracte clorofòrmic per centrifugació al buit (Univap, Unscience). L'extracte obtingut es tornava a dissoldre en 80µl de cloroform i es sembrava en capes fines de Silicagel sobre suport plàstic (Merck, 5735). La cromatografia es feia amb una mescla Hexà:Acetat d'etil (4:1). Després es detectava la zona corresponent a l'HJ amb llum UV, es retallava i es col·locava en un vial d'escintil·lació, on s'afegien 10ml d'Optiphase II. Tot seguit es quantificava la radioactivitat, obtenint els resultats en dpm.

La quantitat d'HJ sintetitzada es calculava posteriorment a partir de les dpm obtingudes i coneixent la quantitat de metionina afegida al medi, la seva activitat específica i la relació d'incorporació molar de la metionina.

3.17 ANÀLISI FILOGENÈTIC

Per construir els arbres filogenètics del InR, Pepck i S6K es van utilitzar les seqüències de diverses espècies, detallades més avall. Les seqüències aminoacídiques es van alinear amb el programa ClustalX (Thompson et al., 1997). A continuació es van eliminar les posicions que no alineaven i les regions més divergents amb el programa Gblock 0,91b amb els paràmetres que venien prefixats (Castresana, 2000). D'aquesta manera es van poder utilitzar pels arbres el 27% de les posicions (681 de les 2475 originals) per InR, el 70% (544 de 767) per Pepck i el 48% (349 de 715) per S6K. El nou alineament obtingut es va analitzar amb el programa PHYML (Guindon i Gascuel, 2003), basat en el principi de màxima versemblança en les posicions aminoacídiques. Es van realitzar 100 interaccions "bootstrap".

- Seqüències utilitzades per construir l'arbre de InR:

Espècie	Nombre d'accés a GenBank™
<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002430961
<i>Apis mellifera</i> 1	XP_001121597
<i>Apis mellifera</i> 2	XP_001121628
<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001606180
<i>Ixodes scapularis</i>	XP_002416224
<i>Aedes aegypti</i>	AAB17094
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAC47458
<i>Bombyx mori</i>	NP_001037011
<i>Anopheles gambiae</i>	XP_320130
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001952079
<i>Tribolium castaneum</i>	EFA11583
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	AAB50848
<i>Caenorhabditis elegans</i> Daf-2	AAC47715
<i>Manduca sexta</i> incompleta	ACI02334
<i>Mus musculus</i> IGF	NP_034643
<i>Mus musculus</i> InR	AAA39318
<i>Homo sapiens</i> IGF	AAI13611
<i>Homo sapiens</i> InR	AAA59452

- Seqüències utilitzades per construir l'arbre de Pepck:

Espècie	Nombre d'accés a GenBank™
<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002428178
<i>Apis mellifera</i>	XP_396295
<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	JAA58213
<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001600227
<i>Aedes aegypti</i> 1	XP_001647935
<i>Aedes aegypti</i> 2	XP_001647937
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG17725
<i>Drosophila melanogaster</i> mitocondrial	CG10924
<i>Danio rerio</i> citosòlic	NP_999916

<i>Danio rerio</i> mitocondrial	NP_998357
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001949386
<i>Tribolium castaneum</i>	XP_975997
<i>Gallus gallus</i> citosòlic	NP_990802
<i>Gallus gallus</i> mitocondrial	P21642
<i>Caenorhabditis elegans</i> 1	NP_497134
<i>Caenorhabditis elegans</i> 2	NP_001021587
<i>Mus musculus</i> citosòlic	NP_035174
<i>Mus musculus</i> mitocondrial	AAH10318
<i>Homo sapiens</i> citosòlic	NP_002582
<i>Homo sapiens</i> mitocondrial	NP_004554

- Seqüències utilitzades per construir l'arbre de S6K:

Espècie	Nombre d'accés a GenBank™
<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002425139
<i>Apis mellifera</i> 1	XP_395876
<i>Apis mellifera</i> 2	XP_624928
<i>Nasonia vitripennis</i> 1	XP_001606867
<i>Nasonia vitripennis</i> 2	XP_003424918
<i>Aedes aegypti</i>	XP_001650653
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAC47429
<i>Bombyx mori</i>	NP_001124378
<i>Anopheles gambiae</i>	XP_308496
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001947963
<i>Tribolium castaneum</i>	XP_001813080
<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	JAA56796
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_499447
<i>Danio rerio</i>	NP_998241
<i>Gallus gallus</i>	NP_001025892
<i>Mus musculus</i>	NP_001107806
<i>Homo sapiens</i>	NP_001258989

3.18 INCUBACIÓ DE COS GRAS IN VITRO

Es va dissecar el cos gras adherit a l'epidermis de femelles recent emergides de la muda imaginal. A continuació, el cos gras es va incubar en 1ml de medi Grace, amb L-glutamina i sense hemolimfa d'insecte (Sigma) a 30°C en foscor durant 30 minuts. Després es van incubar durant 4 hores amb 50µM de LY 294002 (Calbiochem) o el mateix volum de DMSO (el dissolvent del LY 294002), i llavors van ser transferits a una altre pou amb medi que contenia, a part de l'anterior tractament, 800nM d'HJ III o el mateix volum d'acetona (el dissolvent de l'HJ III), i van ser incubats duran 6 hores. Al finalitzar, els teixits es van congelar en nitrogen líquid i van ser guardats a -80°C fins a procedir amb l'extracció d'àcids ribonucleics.

3.19 MESURA DE TRIACILGLICÈRIDS

El cos gras va ser homogeneïtzat en 100µl de tampó d'extracció i immediatament incubat durant 5 minuts a 70°C. A continuació s'agafà una alíquota de 20µl de l'extracte i es va mesclar amb 20µl del reactiu de triglicèrids (Sigma, T2449) que conté activitat lipasa que separarà els triacilglicèrids en glicerol i àcids grassos lliures. Alhora, una altra alíquota de 20µl es va mesclar amb tampó d'extracció per a tenir la mesura dels nivells de glicerol en la mostra no provinents dels TAG. Totes dues es van incubar a 37°C durant 30 minuts. Després es van centrifugar a màxima velocitat durant 3 minuts a temperatura ambient. Tot seguit, 30µl de les alíquotes es van incubar amb 100µl del reactiu de glicerol lliure durant 5 minuts a 37°C. Finalment es va llegir l'absorbància de cada mostra a 540nm. Els nivells de TAG es van estimar a partir de la quantificació dels nivells de glicerol provinents dels TAG, és a dir, del glicerol quantificat després després del tractament amb lipasa menys el glicerol de l'alíquota sense tractament.

- Tampó d'extracció:

200mM Potassi fosfat pH 4.8

0,1% Tween

Aigua

3.20 TINCIÓ D'OÒCITS AMB DAPI

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 per a la tinció dels oòcits va ser el següent:

1. Incubar el teixit durant 30 minuts en paraformaldehid 4% per fixar-lo.
2. Rentar dues vegades durant 10 minuts amb PBS 0,2M pH 6,8.
3. Permeabilitzar el teixit incubant-lo durant 10 minuts en una solució de Tritó-X100 al 0,1% en PBS 0,2M pH 6,8 (PBST).
4. Incubar durant 10 minuts amb una solució d'1µg de DAPI (Sigma)/ml PBST.
5. Eliminar l'excès de marcatge mitjançant dos rentats de 5 minuts amb PBS 0,2M.
6. Muntar les preparacions en medi de muntatge Mowiol 4-88 (Calbiochem).

Les observacions i fotografies es van realitzar en un microscopi Imager.Z1 amb Apotome de Zeiss.

3.21 MESURA DE LA LONGITUD DELS PRONOTS

Els pronots van ser dissecats i conservats en solució Ringer a 4°C. Posteriorment es van fotografiar amb una Axiocam MRc5 acoblada a una lupa binocular Zeiss. La mesura de la longitud dels pronots es va realitzar utilitzant el software AxioVision.

4. CLONATGE I CHARACTERITZACIÓ DE BgInR

4.1 Antecedents

Quan es planteja l'estudi de la via del receptor d'insulina, un ràpidament pensa en modular els nivells de l'hormona, augmentant-los o reduint-los, per tal d'estudiar les seves funcions. Els ILPs han estat clonats i caracteritzats en diversos insectes holometàbols com *D. melanogaster* (Gronke et al., 2010), *Aedes aegypti* (Riehle et al., 2006), *Bombyx mori* (Masumura et al. 2000), *Apis mellifera* (Wheeler et al., 2006) i *Spodoptera littoralis* (Van de velde et al., 2007); i hemimetàbols com *Schistocerca gregaria* (Badisco et al., 2008) i *Locusta migratoria* (Lagueux et al., 1990).

En el nostre model això és molt complicat de fer per dues raons: la primera és que no es disposa de la seqüència del genoma de *B. germanica*, cosa que dificulta el clonatge dels ILPs com a primer pas. La segona, lligada amb la primera, és que no sabem quants ILPs tenen les paneroles, però considerant que *D. melanogaster* en té 8 (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012), *A. aegypti* en té 8 (Riehle et al., 2006), *B. mori* en té 39 (Iwami., 2000; Aslam et al., 2011), *A. mellifera* en té 2 (Nilsen et al., 2011) i a *S. littoralis* se n'han trobat 2 (Van de Velde et al., 2007), seria impossible estar segurs que els hem clonat tots. És per això que en el nostre model ens hem centrat en el receptor d'insulina (InR), ja que la seva via d'acció està molt conservada i emprant tècniques com el RNAi per a reduir els nivells del seu mRNA es pot afectar a tota la via de senyalització. El InR ha estat prèviament clonat i estudiat en diverses espècies com *D. melanogaster* (Fernández et al.1995), *A. aegypti* (Graf et al., 1997), o *S. littoralis* (Iga et al., 2011). A *A. mellifera* (de Azevedo i Hartfelder, 2008) s'han trobat dos InR, de la mateixa manera que a *Solenopsis invicta* (Lu et al., 2011), tret que podria ser característic dels himenòpters. De fet, el més habitual en insectes és que només hi hagi un InR i el més plausible és que a *B. germanica* també sigui així. D'aquesta manera, modificant els nivells del receptor podem modificar l'activitat de la via.

La regulació de l'expressió del gen del InR segons la disponibilitat de nutrients és un altre punt clau en la regulació de l'activitat de la via. S'ha observat que els nivells d'expressió del gen augmenten en situacions de manca d'aliments a larves i pupes de *B. mori* (Liu et al., 2010), així com en les cèl·lules S2 de *Drosophila*, en les que s'ha vist que l'expressió del InR és induïda per l'activitat del factor de transcripció FoxO, de la mateixa forma que succeeix en cultius de cèl·lules humanes

293 (Puig et al., 2005). Contràriament, en l'escarabat vermell de la farina *Tribolium castaneum*, l'absència d'aliment fa disminuir els nivells de transcrit del InR (Parthasarathy et al., 2011).

En aquest capítol es presenta el clonatge del cDNA que codifica pel InR de *B. germanica*, que anomenarem BgInR. A continuació s'ha realitzat un anàlisi de la seqüència comparant-la amb altres de diferents espècies d'insectes i vertebrats. Per tancar el capítol s'ha estudiat l'expressió del gen en diferents teixits durant el primer cicle gonadotròfic de les femelles, i en diferents situacions nutricionals.

4.2 Resultats

4.2.1 Clonatge de BgInR

El clonatge de BgInR es va realitzar mitjançant la tècnica de PCR, utilitzant oligonucleòtids degenerats dissenyats basant-se en dominis conservats en diferents espècies (Taula 4.1) i fent servir com a motllo cDNA de cèl·lules embrionàries de *B. germanica* UM-BGE-1. Així es va obtenir un primer fragment de 399 parells de bases (pb).

oligonucleòtid	seqüència	sentit
TTYGGNATGGTNTAYRARGG	FGMVYE/KG	Forward
GYCATNCCRAARTCNCCNA	V/YGDFGMT/A	Reverse
CATRCARTTNCKNGCNGC	AARNCM	Reverse

Taula 4.1 Oligonucleòtids degenerats i seqüències d'aminoàcids utilitzades com a referència. A l'esquerra els encebadors degenerats dissenyats i utilitzats per iniciar el clonatge de BgInR. Al centre les respectives seqüències aminoacídiques conservades que van servir per realitzar el disseny, i a l'esquerra l'orientació dels oligonucleòtids dins de la seqüència.

A partir d'aquest primer fragment, i mitjançant les tècniques del 3' i 5' RACE, es va anar amplificant cap als dos extrems de la seqüència, utilitzant ja oligonucleòtids específics de la nostra seqüència d'estudi. Finalment es va obtenir una seqüència de 4562 pb que conté una pauta de lectura que codifica per una proteïna de 1403 aminoàcids (Fig.4.1A).

4.2.2 Anàlisi de la seqüència de BgInR

Amb l'anàlisi d'aquesta seqüència amb la base de dades de BLAST i Pfam (*Protein families*) es va comprovar que la proteïna posseïa un domini catalític tirosina quinasa, típic de la família dels InR. També tenia un domini de fibronectina tipus 3, present en diverses proteïnes extracel·lulars d'animals. A més, es van veure dos dominis d'unió al lligand, així com una regió rica en cisteïnes *furin-like* entre tots dos, característiques de la regió extracel·lular dels InR (Fig 4.1B).

Amb seqüències dels InR d'altres espècies es va fer un alineament i anàlisi filogenètic. La nostra seqüència quedava dins del grup dels insectes, que clarament es diferenciava dels vertebrats, on es troben els receptors d'insulina i de IGF, indicant que es tractava de l'homòleg del InR de *B. germanica* i per això se la va anomenar BgInR (Fig. 4.2).

4.2.3 Estudi de l'expressió de BgInR

Un cop clonada la seqüència es van dissenyar encebadors específics per utilitzar en PCR quantitativa. D'aquesta manera es podien conèixer els nivells d'expressió del gen en diferents condicions. El primer que es va analitzar van ser els nivells de BgInR durant el primer cicle gonadotròfic de les femelles en CA i cos gras (Fig.4.3). Es van utilitzar els CA i el cos gras perquè són dos òrgans implicats en la reproducció però amb activitats molt diferents. Els primers són unes glàndules endocrines que sintetitzen l'HJ i el segon és el major òrgan metabòlic i de reserva dels insectes, anàleg al fetge i al teixit adipós de vertebrats. En tots dos casos els nivells es mantenen estables al llarg de tot el període.

A

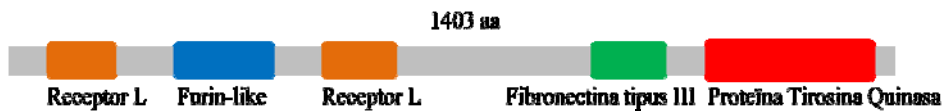


Figura 4.1 Seqüència de BgInR. (A) Seqüència de nucleòtids i aminoàcids de BgInR. La seqüència aminoacídica es mostra a sota de la nucleotídica. (B) Representació esquemàtica dels dominis funcionals de la proteïna de BgInR. Els dominis funcionals estan representats en caps de diferents colors i indicats a la part de sota.

B

ATCTTTAAAGTCATAGCAGCAGTASTACARATACAGCAGTAGTGAAAGTTCAAGAATTTGTTTTGGTGTGGAGTGTGTAGTATTAGAGCAAGATATATGATGATT 100
ATGGTGCAGCCAGGGAGCGTATGGACCTGTGTGTAAAAAGTCGCTGTAAGTAATAGGGTGGAGGGTCTCAAAATGAGACCACCATATATATAGTA 200
TTATGACCGCTGTGTGTGACACTATTTTCATAAACAATGGACACTGACTGCTGGAGCGTGCCGATGCAAAAGCCCTCATCATCATATTTCTTTCTTGTGTGGATGG 300
TGGCTGCACAGCTCATCCCCAGAAATGACATCAAAAGTAGTGCAAAAGAGGTGGTGTCCAAAGCATAGATATACGAAACAGAGTGGAGCGCTTCAAGCG 400
VPAQDLIPDRIKAVVQKSGVCPSIDLRNRRVEAFKRGCTGTAATGGTGGAAAGCGCTGTACAGATTGTGCTATATAGAACAGCATGGAGCAGCGCTTTGCCAACTCCCTTCCCAGAACTACGSC 500
LNGCKKVVEGFVQIVLDDQAASESSTFANLPFERBAGATCAGGATATCTGCTGCTGACCGTTCAAATGGCTTGCAATCTATTTGGCAGCCTTTTCTTAACCTTGTGATCGTGGGGAACCGCTGTTTC 600
EITDYLLLLRYRNVNGLRSLFNPNTLVIRGETLFTGAACTATGACTTGTGCTTTGAGATGATCACTCTGAGGAAATGGATTGATTTCTTAAGGACATTTGGGGGTAAGTGGATGGTATGGAAAAAA 700
LNYALVAFFEMIHLEDFEIGLIYSLTDILLRGVSRIEKNCCCACTGCTGTTCGTGGACAGTGGAAATGGAAATGGTGGCCAAAAGAGGGCTGGGAGAACATTTTCATTAACAGGTAACAGGAGTCCAAATGAAATG 800
PLLLCFVDTVEWDLIAKKGRRGEHFITGNRSPNECCAAATGGCAATGTACTATGACTTGGGGAGCAAGCAGTAGACTGCTTTTGTGGAACTTARCAIAGTGTGAGAAATTTGTCACCTTGGAT 900
PMDAHNHCNWAJSTKPLCWNJTKCQKICTPEGTGGCAGCAGAGTTGCACTGATTCTGGCAGTGTGCTGGCATGAGTATGCTTGGAGGTTGCAAGGGCTAAATCCACAGATTTGATGGCATGAGAGA 1000
CGSRSSTCTDSGMCCHCLLGGCTGPNSTDCMAACRDTGTTGGTGGTAAJGCTGTATTAJAJJAGTGGTCTCTAACCATTTCAGATCTGAAJCGGGGCGTGTATGAGTGGATTTGAAJTGCCMAAJATTAACA 1100
VVFENRCKIKKCTPTNHFKYLNRRCMSDIECRNITAAACAAAGAGAAGCTAAITAGACATGGAATGAAACCTTACAAGCATTCAATGACTTTGTGTTCGAATGCCCCTGGTATGTGAGACAGAGT 1200
KPREERNYDMRMRMKPYKPFNDSVLECPFGYVETE TTAGACCAACAGATATACTGTAGCCCTGCAAAAGGACCGTGTGCTGAAGAGTGTCTGGAGTGAATGGGATAGATTTGACAGCAGCTCAAAAALFTGG 1300
EHHRVNGTTPCKGDKRKEFPDWNVDSJAAAKMR TGCATGATATATTAGAGCCTCTGCGACATCCAGATCCCTGGTGGAAAAATGGTGAATGAGATTTAGACAGGAAATTAATATGTCCAGCAAGATA 1400
GCTYIRGRSLEIQRGKKNVVKELEENLNMEEI GAGGGTACCTCAAGATTGACTGCTTCTCTGCTGCTCAACTCTGCGCAGCAGTGTGTTGATGGCAAGAAATGAGATTATACAACT 1500
EGLKIVRFLSLNLFRLKLRVVGKGLD SNKATGCCATTGGTAAACCCGATAAACCAGAAATTTACAGAACTATGGGATGGGCACTCTCCAGAGAAATGGCAGATCCCAATGGSCCGTCTCTCTTCCA 1600
YAFVLPDNGNQLQELWDWVDRPEKLQILNGLRFHCTTCACCCCAAGCTCTGCTATGATGATGAGAAAGTGAACAGCGTGGCAAACTGCTGACTTTACAGATGTAAGAGTGGCTGCCAACTCAAAATGGA 1700
FNPLCMLCMYHIEKLRQVYNLPDFEITDLVAANMGGATAAATGGCATTGAAAGTCAAAAAGCTAAGAGCTATGTTACCAACCGGGTATGCTAGCTGTGCTGATACAGTGGCAGCAGTTCCAGCATATGACT 1800
DKMAACNVTKLRAATVTKRDHVAVLVLEWQD FEHYDCTGACTTTTATAGGCATATATAGAGCTCCCTTACAAJACTAACTGCTGATGATGAAGAGCAGCATGTAAGAGATGGAAGGCA 1900
PRTLGLGVVYYIIEAPYQNLTLVDGRDACGGDWGH TGTTCAGAGCAGCGCTGTCAACAAACAAATAACTTTTACTGCTCATCTCAAACTTACACACAGATGCAATTTTATGTGAAGAACTACAACCATGCAACCC 2000
VTDMGPVNQTITLLPLHLPKPYTQYAFYVKTVTIATGAGAGGATGGAGTATACAGATATTTCCGCACTGCTTATGCTCCATCCGCTTATGGAGTATGATGTAAGAGTGTAGTGTG 2100
ERTGARSDFIDQYRTLPAAPSPGMLDVKAAQSSACTGATAACTGAGCTCCCATACCCCAAGGAAATGAAACACTACCTCACTGAGGATAGGATGAGTAAACCAACACTGGA 2200
EFLWLPDQVYNHNHTWLLTGTGLMKDQLEGCAACGSAATTTGCTGAGAACCCGCTGTTTACCAGAGATGCTCGGAACCCCTGCTTGGATGGTTCAGCAGATAAAAAGAAAGTACTTACAAK 2300
QNRYSREPP LPLPGDARKPLPLDGLDQSKKEVTNK TGTTCATGGAAGCAGAGCATTAACCAACAGAGCGCGGCTGAAGTGGAGTACAAGCTCAGATCCACTTGGAGACTCACTTACAACTGGCTGCTATG 2400
CSEDEKTDKTKTLRREVEVQAGIHFENSLHNLLY TTAAGAACCCCACTCAGAGTCTGCGCAAGAGAGATGTGCAATGTTGGGGTGAATTTCTCAAACTCCATGAGCCTCCAAATGCCCTGGAGTACGACCA 2500
VKRPTQSRKRDRVDSMWGDVYSHNSIEPPMPGD DYC CCARACTGGCTCAGTAGGATCCCGACTCAGTGTGCTCATATAGGACGTGGTATCAGAGGAACCCATCCCGCCATAAATAGGATTTGACTTATGACTTCAA 2600
PNDMLKHYDPSVDHPHDVVGQEDIPPKVMYDFG CATGGCTCATGGAATACAGACTTTGGGATAAACAACTTTCACACAGTATACCAATTCAGTAGAGGCTGGCTGGACAGCATG 2700
HVVVYQNTQFVINNLNLSHFTEYTI3VEACREIAPD ARCTGCCAATCAACACAGAAATGCTCCAGCAAGGTTTTCTGACTGAGTACAACATTACGTTTACGGTGGCAGACAATGTGTGACTGCCAAAGTGTG 2800
EPANTTNTNCSQSQSFLTARTLRLPGADNVLSSKLV GGTTCAGGCTGGAATGAAAATGCAATGTAAGTCAAGTGGGAGGAACCTGCACACCAATGGCATTTGATCTTACAGAGATTGGATACAACTG 2900
VEVLNESRIVKLLKWEPEPAQPNGLIIVSYQIQIGYKR GTGGCAATGCAGATATACCAACAGTGGAAATGATTAACAGTCCCAATTTATACAAAGGAGTCAATCATAACAGGTAACAACTTCAGCGTGGAG 3000
VGNADYTFPTVESCITRTQFDGGSYTLNKLDP SACTACAGCCTTGATGGCAGTCACTCTGGCAGGGTGGAGATTACACAGCTGTACGCTACTTCTTATTAAAGAGGCAACCAACAACTAT 3100
DYSRLRLRATSLRAGVGDVYAVRYVFFIKEAATNM GGAATTTGATGGCAGTGGGAGCAGCTGTGTGACTAGATGCTGTGCTTTGCAGTATGATGCTGCTCGCAATACATTTCTGGTATTTCCC 3200
EILIGALVGTAVVTTMLCIAVVYVLLRKYIPGI PAACTAAAATTAAGCTCTGTAAATCTAGATGTGGAGCATTGATGAACTGATGAATGGAGGTAACCTCGCAAGAAAGTGGAGCTACTGCGAG 3300
NVKLIASVNP EYVSTLLEYEPDEWEVPRKKEVLLR AACITGGCCAAAGCAGCTTTGAAATGGTTTTATGAAGGCAATGTCGAGATGGTGGAGGACCCAGAAATGCGATGTGCCATTAAGACTGTAATG 3400
FLRGGSFVRGVVFGHPEMR A IKT V T V G ACAGGCACAGTGTGGAGAAAGTGAATTTGAAATGAGCATGAGTAAGAAACAGTTCRLNACTCACACGCTGTGGCCTGTGGCCTGTGGTGT 3500
HAATDRERS EFLNEASVMKQFNTHHV VRL LGI V S CARGGCAGCCGCTAGTGGTCAAGCTCAGTGGCAATGGTGAATCTCAAAACTACCTGCGTTCACACCGCCAGAGTGGAGTATGATGCTTACA 3600
QGQPVYLVVMEELMANGDGLKTYLRSRHRPDVSDP T ARCACCTTCAACCTCAAGAGAAATTTGAGATGGCTGGAGATGGCAATGGCAIATCTTGGTGGCAAGAGTATGATACATCGGCACTAGC 3700
KQPPTLKRILQMAVEIADGMAYLAGKKYVHRDLA A CTCTCGAAATTCATGCTGTGCAAGATCTCAGACTAAAGATTCCTGACTTTCCCATGCACACACATATATGAAACAGATTACTATCTTAAAGCAGCA 3800
ARNCMVAEEDLT VKIGDFGMTRDLYETD Y Y R K G T AAAGACTACTGCTGTGGAGTGGATGACCCAAAGGCGTGGAGGATGGAGTGGTTCACCACTACTTCAGAGTATGGAGTATGGTGTGGTGTGG 3900
KGLLPVRWMAPE SLKDG VFTSYSDVWVS YGYVLLW AGATGGCAACTCGCATCGCAGCATACTAAGTCTATCAATGACTGCTGGCTGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 4000
EMATLASSQPLVQLLSNDDQVLRVVIDGGVMERPEN E C C C G C A C A C T T T A C C C A T A T G C C A C A T A T G C C C A C A C A A C C C A C C C C C C C T C A A T T A G A A C T G T C C T C C T C C C C C C C T A 4100
PDRLYQLMRLCWQH K P K A R P P F M E L V S L L L P D Y AGTCCGAACTTTGGCAAGTGTGTTTTACCATAGTAATGAAGGGAGAGAGCAGCGTGTTCACCAGGGCCGAACTGACTGACGACCCCTCCACGCCTC 4200
SPNFYQVSYFYNHNEGFRVQRVPPRAELTD DPSTP TTAGAGAGACTGGTATGGAAAGCTTTTCTGTTGGTGGTCCAGAAAGAGAGAGAGACTTTGGCAGATGGGATGGAGAGTGGATACCAACC 4300
RDETRDVEDTAFLGGGSEEEEDDLPGA D V E V G Y Q P TCATACCATACTGCTGGTTCAGAGGACCTTCCACTCCACCAAATGGAATGTTGGCAATGGGAGTGGGCACTTCCCTCCACTCAGGCTTGT 4400
HYHTMSYP R K L S T P N G I V G N G S A A T S P T A A N G TGGTAGTGGAAACCGGACTGGTATGAAGACTACACAGTGTGATTTCTGTTGGCTGTGATTTCTGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 4500
WVVGNGTGGMKT T O C GACTGCAATGCTGCTGCTGCTAATTAATATTTTTAAATGACAAAAAAMAAAAA

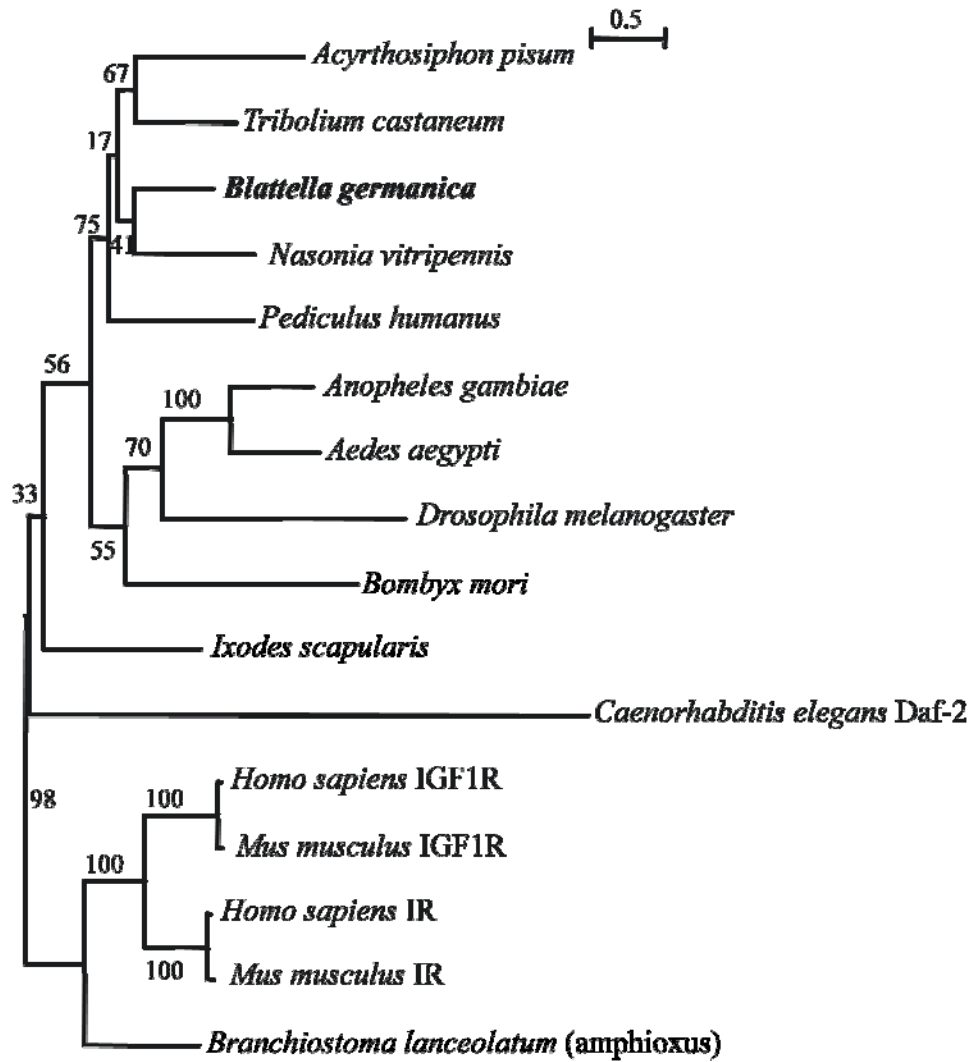
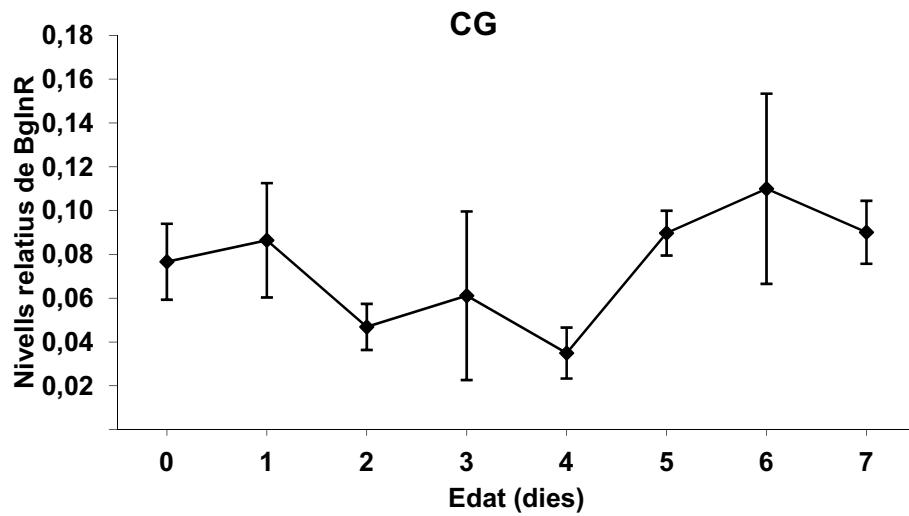


Figura 4.2 Relacions filogenètiques del receptor d'insulina de *B. germanica*. L'arbre es va construir utilitzant l'aproximació de la màxima versemblança. La longitud de les branques és proporcional a la divergència entre seqüències. La barra representa 0,5 substitucions per lloc. Les xifres representen els valors de *bootstrap* per un total de 100 interaccions. L'arbre està arrelat a la separació entre invertebrats i cordats.

A



B

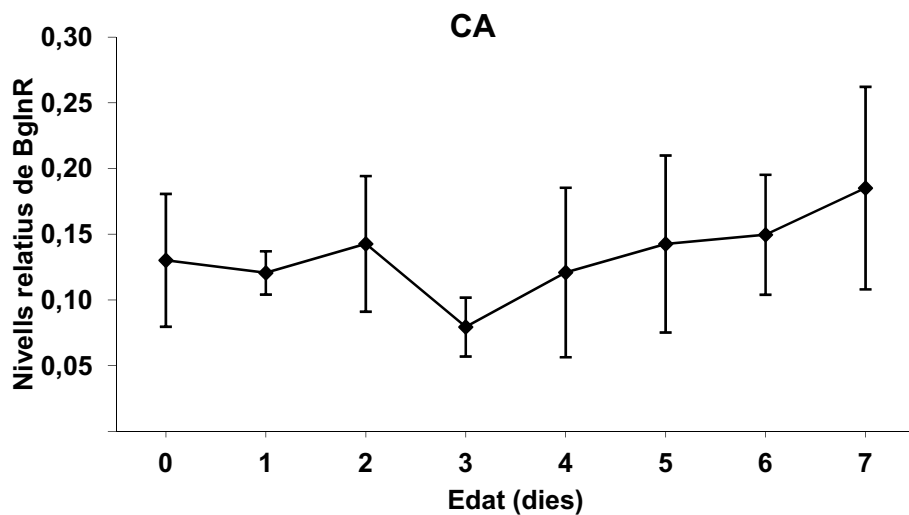


Figura 4.3 Patrons d'expressió de BgInR en cos gras i CA durant el primer cicle gonadotròfic. Per a cada rèplica es van dissecar els cossos grassos i els CA de 3 femelles per cada un dels 8 dies del cicle i es van posar en un mateix tub per ser processades. Les barres indiquen la mitjana \pm error estàndard. (A) Nivells de BgInR durant el primer cicle gonadotròfic en cos gras (CG) (n=3). (B) Nivells de BgInR durant el primer cicle gonadotròfic en CA (n=3).

A continuació es van estudiar els nivells de BgInR en CA i cos gras de femelles mantingudes en dejuni des de la seva muda a adult fins al cinquè dia d'adult, quan es van realitzar les disseccions, en comparació amb femelles alimentades (Fig.4.4). Els resultats indicaven que l'expressió del InR de *B. germanica* s'incrementava significativament en els cossos grassos de femelles dejunades, mentre que en els CA s'observa un cert increment que no és significatiu.

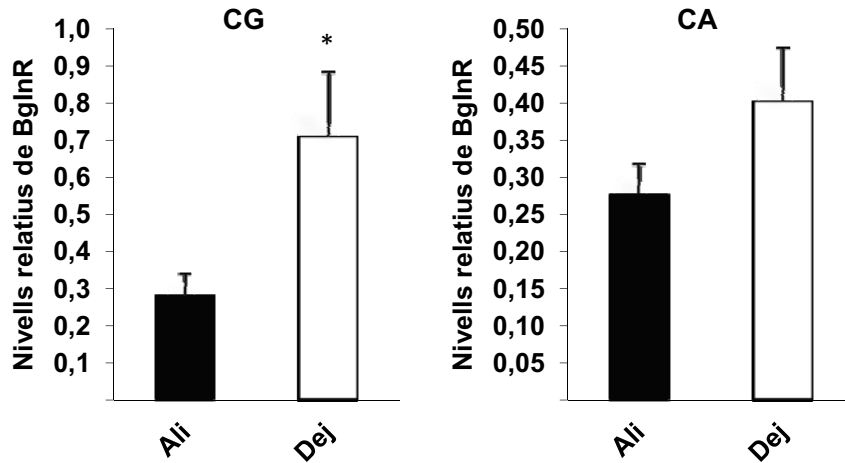


Figura 4.4 Nivells d'expressió de BgInR en cos gras i CA de femelles adultes alimentades i dejunades. Nivells de mRNA de BgInR en cos gras (CG) (n=17-9) i CA (n=17-10) de femelles de *B. germanica* alimentades (Ali) i dejunades (Dej) a dia 5 de la fase adulta. Les femelles dejunades només van rebre aigua a partir de la muda imaginal. Els resultats expressen la mitjana \pm error estàndard. L'asterisc representa diferències significatives (test *t* d'Student, * $p < 0,05$).

4.3 Discussió

En aquest capítol s'ha presentat el clonatge i l'anàlisi de la seqüència del InR de *B. germanica* (BgInR), així com un primer estudi dels nivells transcripcionals del gen. L'anàlisi de la seqüència indica que el codó d'inici està precedit per un codó d'aturada, i el codó d'aturada final va seguit d'una seqüència poliA, fets que indiquen que tenim la longitud completa de la pauta oberta de lectura de la proteïna.

BgInR té la típica organització dels InR, amb els dos dominis d'unió al lligand (dominis L) a l'inici, separats per un domini *furin-like* ric en cisteïnes. Cada un dels dominis L consta d'un filament beta-hèlix dextrogira. La regió rica en cisteïnes es compon de 8 mòduls units per enllaços disulfur. Els tres dominis envolten un espai central de grandària suficient com per acomodar una molècula de lligand (Garrett et al., 1998). A continuació trobem un domini tipus III de fibronectina, un domini evolutivament conservat en un ampli ventall de proteïnes extracel·lulars, que s'uneix a una gran varietat de substàncies, incloent heparina, col·lagen, DNA, actina, fibrina i receptors de fibronectina. El domini, d'uns 100 aminoàcids, té una estructura de sandvitx beta.

El domini més ben conservat és el seu domini catalític tirosina quinasa. Les tirosina quinases són un subgrup dins de la gran classe de proteïnes quinases que uneixen grups fosfat a d'altres proteïnes. En aquest cas, el grup fosfat s'uneix al aminoàcid tirosina de la proteïna, d'on li ve el nom, diferenciant-se dels altres 2 grups de proteïnes quinases: serina/treonina quinases i doble específiques. Les quinases poden transferir un grup fosfat des d'un ATP a una altra proteïna, canviant la seva conformació i afectant la seva funcionalitat. Actuen com un interruptor *ON/OFF* que regula diversos processos cel·lulars. El procés invers es catalitza per les proteïnes fosfatases. La fosforilació de proteïnes per part de les quinases és un mecanisme important per la comunicació de senyals cap a l'interior de les cèl·lules i la regulació d'activitat cel·lulars. Les tirosina quinases es poden dividir en 2 grups: els receptors tirosina quinasa, que són proteïnes transmembrana implicades en transducció de senyal, entre les que trobaríem el InR; i les tirosina quinases citoplasmàtiques, que actuen com a proteïnes reguladores (Manning et al., 2002).

El BgInR es compon doncs de 3 dominis clars, característics dels receptors tirosina quinasa, entre els que es compta el InR: un domini extracel·lular, que uneix al lligand; un domini intracel·lular catalític que fosforil·la el seu substrat; i un domini transmembrana entre tots dos. El domini transmembrana juga un paper molt important en el procés de dimerització, necessari per la transducció de senyal (Li i Hristova, 2006).

Per la importància de la insulina i el seu receptor en medicina (en la diabetis, per exemple) hi ha molts estudis sobre la conformació de la proteïna, modificacions

postraduccionals i el domini tirosina quinasa, però gairebé sempre en mamífers. No obstant això, l'alt grau de conservació de les seqüències fa que tots aquests descobriments també es puguin extrapolar als insectes i predir possibles llocs de modificació postraduccionals, com llocs de N-glicosilació o punts de fosforil·lació (Lu et al., 2011).

Si bé en himenòpters com les abelles (*A. mellifera*) o les formigues (*S. invicta*) s'han trobat dos InR diferents (de Azevedo i Hartfelder, 2008; Lu i Pietrantolino, 2011), això sembla restringit a aquest ordre d'insectes, doncs en la majoria d'ells només s'ha trobat un de sol. Això suggereix que aquest serà el cas també de *B. germanica*.

En l'anàlisi filogenètic de màxima versemblança, amb el que es va obtenir l'arbre mostrat a la Fig.4.3, s'ha observat que BgInR queda agrupat amb la majoria d'insectes, confirmant que estem davant de l'homòleg del InR de la nostre espècie model. Amb l'arrel de l'arbre situada en la divergència entre invertebrats i cordats, la topologia no difereix de la filogènia més acceptada per a les espècies incloses. A més, l'arbre ens indica que la diversificació entre el InR i el IGFR present a vertebrats deriva d'una duplicació dins d'aquest llinatge en particular. Que les seves branques siguin particularment curtes indica una gran conservació d'aquestes seqüències, mentre que les branques dels insectes tenen una mida intermitja. En canvi, la longitud del braç corresponent a l'homòleg del InR de *C. elegans* suggereix una ràpida taxa de divergència respecte als altres metazous. També es pot veure com els dípters i els lepidòpters, amb la ben coneguda *D. melanogaster* acompanyada dels mosquits per una banda i *B. mori* per l'altra, queden agrupats en un subgrup ben definit dins dels insectes. Si bé són els model d'insecte més ben estudiat, sobretot els dípters, aquest resultat reflexa la seva condició d'insectes més modificats. En canvi, *B. germanica* queda en aquest arbre filogenètic més propera a d'altres insectes holometàbols, com *Nasonia vitripennis* o *T. castaneum*, i hemimetàbols com *Acyrtosiphon pisum*. Això indica que pot ser un bon model general d'insecte, al no ser tan evolucionat com els dípters. I és que en molts casos, el que és vàlid per *D. melanogaster* o *A. aegypti* pot no ser-ho per la resta d'insectes, i es pot caure en l'error de generalitzar un mecanisme o procés descrit en aquests models.

A continuació, s'ha mostrat com el nivell de mRNA de BgInR no varia significativament al llarg del cicle gonadotròfic en cap dels dos teixits estudiats, el CA i el cos gras. Cal tenir en compte que les femelles tenen menjar disponible durant tot el cicle, i si bé la ingesta pot variar segons el dia (Osorio et al., 1997), això no sembla que arribi a afectar la transcripció del InR, ni en CA ni en cos gras, ja que l'organisme utilitzaria les reserves emmagatzemades i la via seguiria estant activa, i el gen expressant-se en els mateixos nivells. La majoria d'estudis sobre el paper de la via del InR en d'altres insectes es centra en les formes juvenils, ja que la via té un paper crucial regulant el creixement, però no s'han realitzat molts estudis sobre els nivells de InR en insectes adults, sent el nostre, doncs, un resultat innovador. Els més destacats es centren en himenòpters, com *A. mellifera* o *S. invicta*, focalitzant la recerca en les diferències entre castes i els dos InR que trobem en aquestes espècies. En molts dels estudis només s'ha investigat en estadis juvenils, ja que és durant el desenvolupament que la via del InR pot regular els processos de diferenciació que donen lloc al polifenisme. Així, a *S. invicta*, per exemple, les dues versions del InR s'expressen a nivells més elevats en els ous que en tots els altres estadis analitzats. Pel que respecta als estadis adults, tots dos InR tenen nivells més elevats d'expressió en les femelles reines i mascles reproductius que en les femelles treballadores, probablement degut a una major expressió dels gens a les gònades (Lu i Pietrantonio, 2011). En les abelles, els nivells de tots dos InR disminueix dràsticament a la quarta fase larvària de les futures reines, fins arribar a nivells d'expressió equivalents als de les larves que donaran lloc a treballadores, que mostren poca variació entre fases. Considerant l'elevat ritme de creixement de les reines, aquests resultats són poc intuïtius, ja que un esperaria una major expressió durant totes les fases larvals de les reines (de Azevedo i Hartfelder, 2008). En ambdós casos es demostra l'estret lligam que la via de la insulina té amb la reproducció, ja que aquesta és una de les principals diferències entre les dues castes.

En qualsevol cas, aquests estudis en espècies socials són difícils de comparar amb el nostre model degut a l'absència de castes i a que *B. germanica* té només un InR. Un altre model amb el que comparar el nostre en el que s'ha realitzat alguna mesura de l'expressió del InR en adults seria *A. aegypti*. En aquests mosquits es va comprovar que l'expressió del InR en ovaris augmenta durant la fase previtel·logènica i es manté constant durant aquesta. Els nivells de InR en ovaris es mantenen constants

fins a 12 hores després de la ingesta de sang per part de les femelles de mosquit, però llavors comencen a baixar i no es recuperen fins a 72 hores després de la ingesta, just després de l'oviposició (Riehle et al., 2002). La vinculació entre els nivells d'expressió de InR als ovaris de *A. aegypti* amb els cicles vitel·logènics sembla clara i resulta interessant per tractar-se d'un insecte anautògen, com *B. germanica*, però cal tenir en compte que la vitel·logènesi dels dípters s'activa per via de l'ecdisona, i no de l'HJ, com en les paneroles i molts altres insectes. Els nostres resultats no semblen indicar cap variació evident durant el cicle gonadotròfic de les femelles de *B. germanica*, si bé no disposem de dades en ovaris de les paneroles, ni d'altres teixits en mosquit, per a poder fer una comparació més exacta. En el nostre cas ens hem centrat en CA i cos gras perquè ens interessa particularment el procés de producció d'HJ i de vitel·logènesi.

Per finalitzar aquest capítol s'ha constatat l'efecte que té la manca de nutrients sobre l'expressió del gen del InR. Si bé en CA els nivells no augmenten de forma significativa, tot i que es pot observar un petit increment, al cos gras sí que s'aprecia un increment significatiu de la seva expressió. Aquesta diferència en la resposta al dejuni entre teixits molt probablement es deu al paper fonamental del cos gras en el metabolisme de l'organisme i com a òrgan de reserva. Tenir uns nivells alts de InR en situació de dejuni li permet al cos gras estar sensibilitzat enfront d'un augment en els nivells de ILPs i poder donar així una resposta ràpida quan l'animal torni a menjar. Resultats similars, en els que els nivells de transcrit de InR s'incrementen en resposta al dejuni, han estat observats prèviament en d'altres organismes, com *D. melanogaster* (Puig et al., 2003) o a les glàndules protoràciques de *M. sexta* (Walsh et al., 2011), si bé sempre s'han centrat en estadis juvenils, en els que la regulació del creixement és especialment important, degut a que l'organisme es troba en ple procés de desenvolupament. En canvi, en el cas de les femelles adultes de *B. germanica* els elevats nivells de InR servirien per donar una resposta ràpida i eficaç a la disponibilitat de nutrients per tal d'iniciar els processos reproductius. No obstant, d'altres treballs mostren una reducció dels nivells de InR quan l'accés als aliments és limitat o inexistent. Així, quan en el segon dia del cinquè estadi larvari de *M. sexta*, els individus són privats de nutrients, els nivells d'expressió de InR en el disc imaginal de l'ala són més baixos al cap de 24 hores, però no és així si el dejuni té lloc al quart dia del mateix estadi, quan la larva ja assolit el pes crític (Tobler i Nijhout,

2010). Curiosament, els nivells relatius d'expressió del InR mesurats en el cos sencer d'individus de *T. castaneum* en el quart dia posterior de la seva eclosió a adult, mostra una clara reducció en dejunats respecte a alimentats (Parthasarathy et al., 2011). La diferència entre escarabats i paneroles es podria explicar per la metodologia, ja que en un estudi s'utilitza el cos sencer de l'insecte, mentre que en *B. germanica* ens centrem en un teixit en particular, com el cos gras. També podria ser deguda a una diferent estratègia reproductiva, si bé no cal oblidar que la via de la insulina, juntament amb la de TOR, canalitzen la senyalització nutricional per regular, no només la reproducció, sinó molts altres processos, i això podria explicar aquesta diferència entre espècies.

5. ESTUDI FUNCIONAL DE BgInR

5.1 Antecedents

Els primers estudis en insectes sobre la funció del InR es van realitzar en insectes holometàbols, especialment en *D. melanogaster*, gràcies a la facilitat per generar mutants en aquesta espècie. Les primeres dades ja indicaven que el InR era requerit pel correcte desenvolupament dels embrions i la formació del sistema nerviós, donant la seva eliminació en larves una extrema letalitat com a resultat (Fernandez et al., 1995). Una reducció més moderada dels nivells de InR donava lloc a un retard en el desenvolupament que resultava en una reducció de la mida dels adults, que a més presenten nivells elevats de sucres i lípids circulants (Shingleton et al., 2005).

La facilitat per treballar-hi, així com la menor complexitat de la via als insectes en comparació amb la dels mamífers, ha fet de *D. melanogaster* el model més ben estudiat. I és que a *Drosophila* s'ha trobat pràcticament un homòleg per cada un dels components de la via de senyalització de la insulina dels mamífers, amb la particularitat que diversos gens de mamífers es corresponen a un sol homòleg de la mosca, simplificant molt el seu estudi. Aquesta simplicitat es troba, en general, en tots els insectes. Cal, però, anar amb precaució si volem extrapolar els resultats cap a sistemes més complexos.

Els estudis en *Drosophila* han permès doncs aclarir moltes qüestions sobre la via de senyalització de la insulina, des del seu inici, amb els ILPs, fins al darrer dels components coneguts de la via. Les manipulacions genètiques que alteren la senyalització de la insulina en les mosques durant els estadis larvals resulten en fenotips que afecten tant el creixement com el metabolisme, mentre que les que ho fan en les adultes tenen conseqüències metabòliques i reproductives (Teleman, 2010). Cal destacar que la majoria d'estudis es centren en les fases larvals. És per això que la funció de molts components de la via en adults i qualsevol rol que puguin tenir en la reproducció i l'envelliment encara són poc coneguts, si bé sembla clar que hi juguen un paper important.

En relació amb la reproducció, a *D. melanogaster* s'ha vist que al reduir o suprimir alguns dels components de la via de senyalització de la insulina en estadis larvals, s'obtenen femelles més petites i amb una baixa o nul·la fecunditat, que sovint pot ser restaurada amb l'aplicació de metoprè, anàleg de l'HJ (Tatar et al., 2001;

Ikeya et al., 2002). Però en general aquest aspecte ha quedat relegat a segon pla quan s'ha utilitzat *Drosophila* com a model d'estudi.

En canvi, la vinculació de la via de la insulina amb la reproducció ha estat més ben estudiada en els mosquits. Aquest interès per la reproducció dels mosquits respon al seu paper clau com a vectors de malalties que transmeten quan piquen als vertebrats per obtenir la sang. S'ha comprovat, per exemple, com la insulina estimula la producció d'ecdisteroides als ovaris de les femelles d'*A. aegypti*, mentre que el bloqueig del InR atura aquesta estimulació (Riehle i Brown, 1999). Els nivells d'expressió del InR en ovaris també han estat caracteritzats, observant-ne dos pics en la seva transcripció, un immediatament després de la ingesta de sang i un altre a les 72 hores, després de l'ovoposició (Riehle i Brown, 2002). Els aminoàcids presents a la sang ingerida activen la via de TOR i mitjançant l'activació de S6K es regula l'expressió de la Vg (Hansel et al., 2005).

Estudis recents, emprant RNAi per reduir l'expressió del InR del mosquit, han demostrat que la disminució de InR retarda la digestió de la sang, la producció d'ecdisteroides als ovaris i l'expressió de Vg al cos gras, si bé cal acompanyar-la d'un bloqueig de la via de TOR per aturar completament la producció d'ous (Roy et al. 2007; Gulia-Nuss et al., 2011).

Diversos estudis en himenòpters confirmen la vinculació de la via de la insulina i la via de TOR amb la diferenciació de castes, incloent el desenvolupament de la capacitat reproductora, reservat només per aquelles castes destinades a tenir descendència (Okada et al., 2010; Azevedo et al., 2008; Lu et al., 2011; Mutti et al., 2011). De moment, però, els treballs utilitzant RNAi s'han limitat a reduir l'expressió de l'homòleg del substrat del InR (IRS) d'*A. mellifera*, element clau pel funcionament de la via i sobre el que actua el InR. Quan es subministra gelea reial, una dieta rica en nutrients, a larves femelles, aquestes es desenvolupen com a reines, però quan se'ls administra alhora RNAi contra el IRS s'obtenen abelles obreres, demostrant l'important paper de la senyalització nutricional canalitzada per la via de la insulina per a la correcta diferenciació de castes (Wolschin et al., 2011).

A *T. castaneum* s'ha investigat el paper de diversos components de la via del InR emprant la tècnica del RNAi. Es va obtenir una reducció en l'expressió del InR d'entre el 50 i el 60%, i disminucions superiors per altres trànscrits. La interferència

del InR repercutia negativament en l'expressió de la Vg, reduint-la significativament més d'un 80%. Com a conseqüència, les femelles resultaven estèrils, de forma similar al que passa quan es mantenen les femelles en dejuni (Parthasarathy i Palli, 2011).

Un cop clonada la seqüència de BgInR i caracteritzada la seva expressió durant el cicle gonadotròfic de les femelles i els efectes que hi té el dejuni, el següent objectiu va consistir en determinar la seva funcionalitat i esbrinar el seu paper en la senyalització nutricional i la reproducció de *B. germanica*.

5.2 Resultats

5.2.1 Interferència del InR durant el primer cicle gonadotròfic

5.2.1.1 Efectes sobre el desenvolupament

Per tal d'estudiar el paper de la via de senyalització de la insulina una possibilitat consisteix la utilització de RNAi contra el InR de *B. germanica*. Tenint en compte que en els insectes s'ha descrit que existeixen diversos *Insulin-like peptides* (ILPs) en una mateixa espècie i, per contra, en la majoria de les espècies s'ha descrit l'existència d'un sol receptor, la interferència del InR ens va permetia afectar a tota la via, independentment de l'efector que s'unís al receptor. Es va sintetitzar RNA de doble cadena (dsRNA) homòleg a un fragment del mRNA de BgInR de 326 parells de bases (dsInR), part de la regió que codifica el domini tirosina quinasa de la proteïna (Fig.5.1). Es van injectar 2 µg de dsInR a nimfes femelles en el primer dia del cinquè estadi, el penúltim, i es va repetir el tractament quan les femelles mudaven al sisè i darrer estadi ninfal. Es van deixar créixer les femelles i mudar a adultes, realitzant les disseccions dels diferents teixits el cinquè dia de vida adulta, per poder observar possibles efectes en la reproducció. Paral·lelament, i com a control negatiu, es va utilitzar un dsRNA heteròleg, sintetitzat a partir d'una seqüència de 307 pb d'un mRNA que codifica per a la polihedrina del nucleopolihedrovirus de *Autographa californica*.

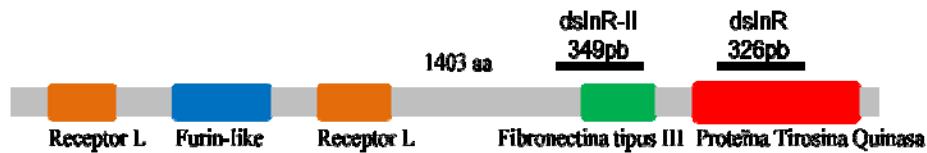


Figura 5.1 Situació dels dos dsInR sobre la seqüència del BgInR. Organització per dominis de BgInR amb les dues regions emprades com a dianes dels RNAi.

Els nivells de mRNA de BgInR van ser mesurats per PCR quantitativa (qPCR) tant en CA com en cos gras. En els CA es va observar una reducció del 74%, mentre que al cos gras es va arribar a una disminució del 85% (Fig. 5.2).

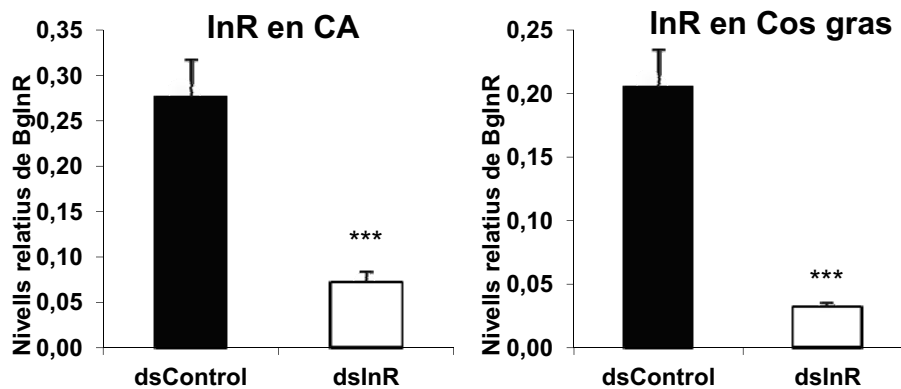


Figura 5.2 Efecte del silenciament de BgInR en els CA i el cos gras de *B. germanica*. Nivells de mRNA de BgInR, mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA de InR per còpia de mRNA d'actina 5C, en CA i cos gras de femelles tractades amb dsRNA de InR (dsInR) i amb dsRNA de polihedrina (dsControl) (n=17). Els asteriscs representen diferències significatives (test *t* d'Student, *** $p < 0,001$).

El primer que es va observar va ser que les femelles tractades amb dsRNA contra el InR (dsInR) mudaven més tard que les punxades amb el dsRNA control. Mentre que més del 70% de les nimfes control mudaven del cinquè al sisè i últim estadi ninfal al sisè dia del 5è estadi, la majoria de les interferides per l'InR ho feien

més tard, sent poc més del 30% les que mudaven el sisè dia, tal com passa en les femelles control, mentre que la major part, més d'un 40%, mudaven un dia després (Fig. 5.3).

Dies	dsControl	dsInR
5	7,3	
6	70,7	32,5
7	14,7	43,2
8	7,3	16,2
9		8,1
Mitjana	6,22±0,11	7,00±0,15

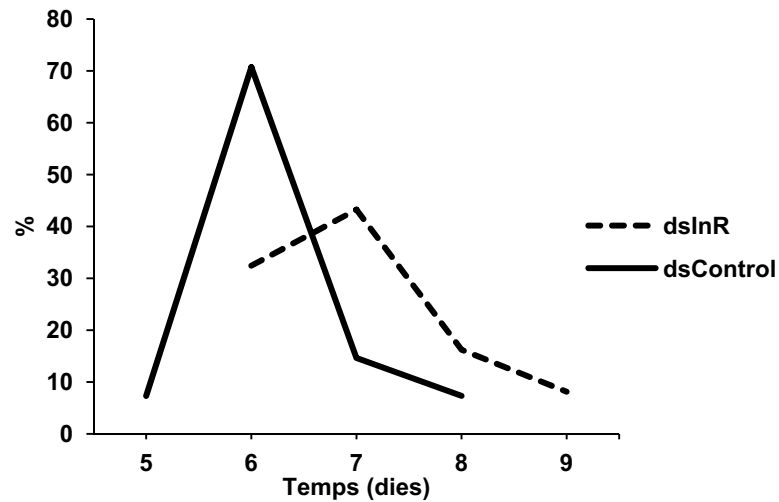


Figura 5.3 Durada del cinquè estadi nimfal. La taula indica, en la seva primera columna, els dies en que es va produir la muda, i en la segona i tercera columna s'indica el percentatge de nimfes dsControl i dsInR que van mudar cada dia. La darrera fila indica la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana. La figura és la representació gràfica de les dades de la taula. $n=41$ pel grup dsControl, i $n=37$ pel dsInR ($p<0,001$ test t d'Student).

Pel que fa a la darrera fase nimfal, més de la meitat de les femelles control mudaven el vuitè dia. En les femelles dsInR, en canvi, la seva darrera muda durava entre els 8 i 11 dies, amb al voltant d'un 20% de mudes per cada dia, i fins i tot es podia trobar alguna femella amb una sisena fase nimfal de 13 dies (Fig. 5.4).

A més de cert retard en el seu desenvolupament, gairebé la meitat (24 de 51) de les femelles tractades amb dsInR es van poder observar certes malformacions, quan van mudar a adult, en les ales i en les tegmines, les endurides ales anteriors que presenten alguns insectes, com les paneroles, els pregadéus o els grills (Fig. 5.5). Quan les paneroles, com la majoria dels insectes, emergeixen com a adults, encara no tenen les ales ni les tegmines desplegadas. El procés que permet que ales i tegmines s'estirin es dona durant els minuts posteriors a la muda imaginal, alhora que es va endurint la cutícula de tot el cos. Tant les tegmines, com sobretot les ales, que no s'arriben a desplegar en absolut en la major part dels casos, semblen no haver pogut desplegar-se correctament.

També es va mesurar la longitud del pronot com a mesura de la mida de l'insecte i per tant del creixement. El pronot és la placa exoesquelètica dorsal del primers segment toràctic que en les paneroles i d'altres insectes cobreix completament el tòrax dorsal. Així, es va realitzar la mesura de la longitud del pronot en femelles tractades al penúltim i a l'últim estadis ninfals amb dsInR i dsControl. Igualment es va mesurar el pronot en el cas de femelles tractades amb dsRNA pel factor de transcripció FoxO (dsFoxO) i el doble interferit dsInR+dsFoxO. En la figura 5.6 es mostren les diferències de mida del pronot entre les femelles dsControl, dsInR, dsInR + dsFoxO i dsFoxO, expressat com a creixement del pronot, és a dir, la mida del pronot de l'adult menys la mida mitjana del pronot a nimfes en el penúltim estadi.

Dies	dsPolyH	dsInr
7	12,5	4,55
8	53,1	22,7
9	18,8	18,2
10	9,4	18,2
11	3,1	22,7
12	3,1	9,1
13		4,55
Mitjana	8,47±0,20	9,77±0,34

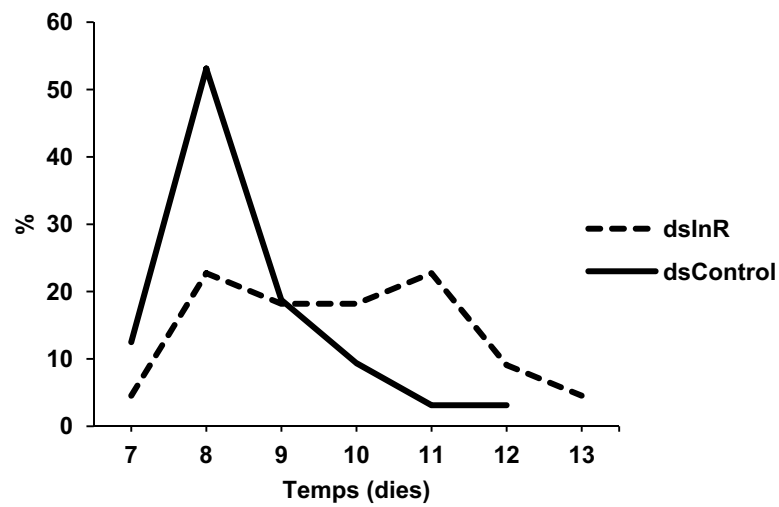


Figura 5.4 Durada del sisè estadi nimfal. La taula indica, en la seva primera columna, els dies en que es va produir la muda, i en la segona i tercera columna s'indica el percentatge de nimfes dsControl i dsInR que van mudar cada dia. La darrera fila indica la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana. La figura és la representació gràfica de les dades de la taula. $n=32$ pel grup dsControl, i $n=22$ pel dsInR ($p<0,001$ test t d'Student).

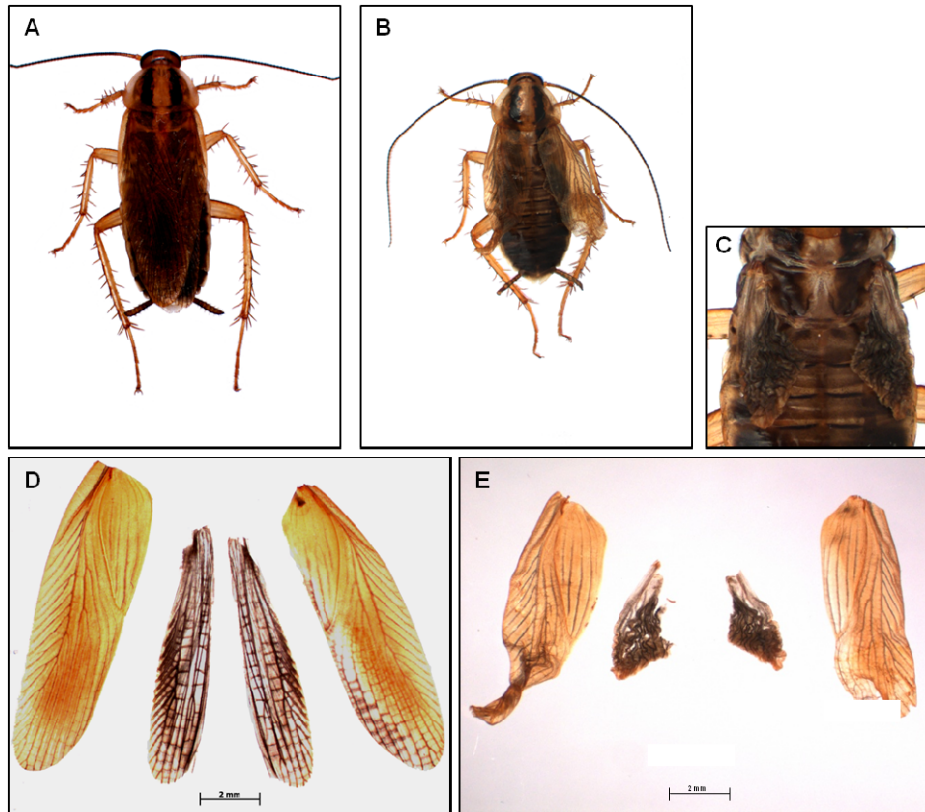


Figura 5.5 Fenotip d'ales i tegmines per l'acció del silenciament de BgInR. (A) Vista dorsal d'una femella dsControl. (B) Vista dorsal d'una femella dsInR amb ales i tegmines sense desplegar. (C) detall de les ales sense desplegar d'una femella dsInR. (D) Tegmines i ales d'una femella dsControl. (E) Tegmines malformades i ales sense desplegar d'una femella dsInR. Barra d'escala: 2mm.

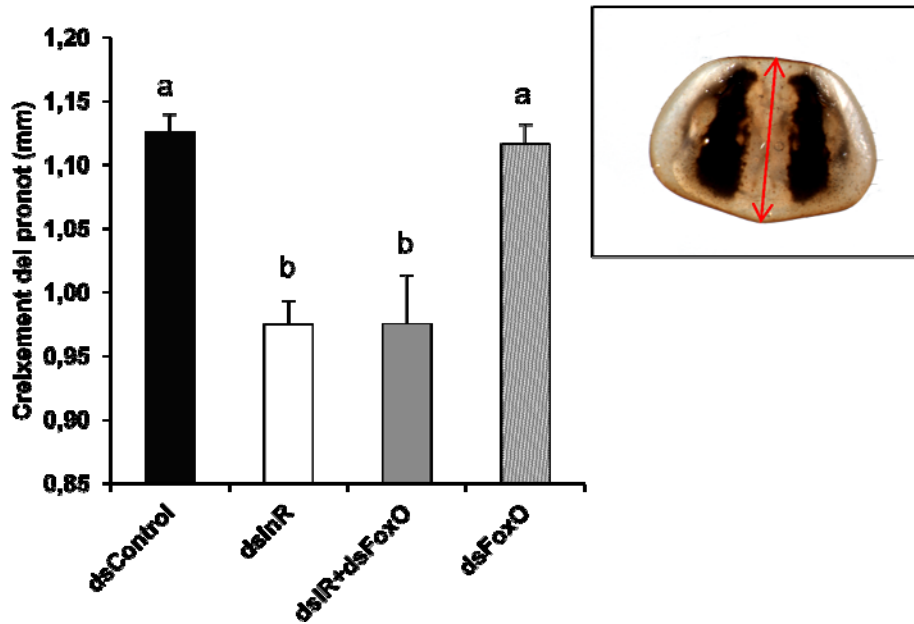


Figura 5.6 Efecte del silenciament de BgInR sobre el creixement del pronot. Les barres indiquen el creixement del pronot durant la penúltima i última fases ninfals expressat com a mitjana \pm l'error estàndard en les femelles dsControl (n=65), les dsInR (n=34), les dobles interferides amb dsInR i dsFoxO (n=27) i les interferides només amb dsFoxO (n=12). Les diferents lletres (a-b) es refereixen a grups que mostren diferències significatives segons el test Anova (Tukey, $p < 0,0001$). La imatge mostra un pronot dsInR.

5.2.1.2 Efectes sobre la reproducció

A continuació es van mesurar els nivells d'HJ produïts en CA de femelles tractades amb dsControl i dsInR. Els resultats mostren una reducció dràstica de la producció d'HJ en les femelles tractades amb dsInR respecte les femelles dsControl (Fig5.7).

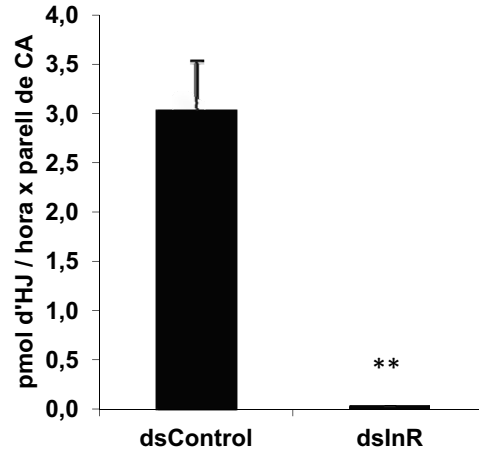


Figura 5.7 Efecte del silenciament de BgInR sobre la producció d'HJ. Nivells de síntesi d'HJ en CA incubats *in vitro*. Les barres indiquen la mitjana \pm l'error estàndard pels CA provinents de femelles controls (n=9) i els de femelles dsInR (n=6). Els asteriscs indiquen diferències significatives (test *t* d'Student, **p<0,001).

Els enzims HMG-S1, el HMG-S2 i el HMG-R formen part de la via del mevalonat, precursor de l'HJ, i l'epoxidasa regula el darrer pas de la síntesi d'HJ als CA. Al observar que el tractament amb dsInR resultava en una reducció en la producció d'HJ, es van analitzar els efectes del dsInR en l'expressió d'aquests enzims al CA de les femelles tractades. Els nivells obtinguts en el grup dsInR resultaven significativament inferiors als que presentaven les femelles control i lleugerament superiors als observats en femelles dejunades(Fig. 5.8).

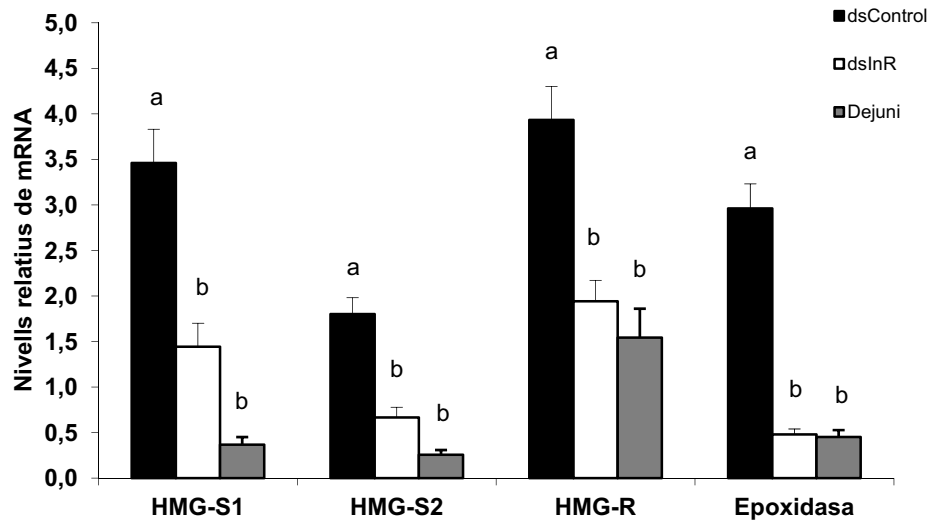


Figura 5.8 Efecte del silenciament de BgInR sobre els nivells d'expressió de diversos enzims de la via de biosíntesi de l'HJ. Nivells de mRNA mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA del gen d'estudi per còpia de mRNA d'actina 5C, a partir de cDNA de CA obtingut de femelles tractades amb dsControl (n=15), dsInR (n=15) i femelles mantingudes en dejuni (n=7) (dades no disponibles per epoxidasa). Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard i les diferents lletres (a-b) es refereixen a grups que mostren diferències significatives segons el test Anova (Tukey, $p < 0,0001$). L'asterisc indica diferències significatives (test *t* d'Student, $*p < 0,05$).

Ja que l'HJ és la responsable d'estimular la producció de Vg, es van analitzar els nivells d'expressió d'aquest gen al cos gras de les femelles interferides, així com en femelles mantingudes en dejuni. Es va obtenir una reducció en l'expressió de la Vg en cos gras de femelles dsInR respecte al grup control, si bé no tan dràstica com la mostrada al cos gras de les femelles dejunades (Fig.5.9).

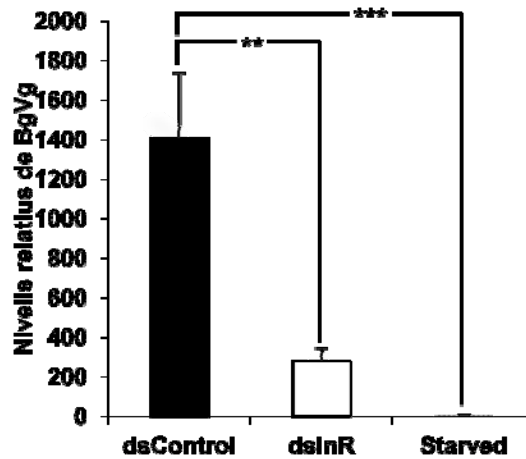


Figura 5.9 Efecte del silenciament de BgInR i el dejuni sobre l'expressió de BgVg en cos gras. Nivells de BgVg mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA de Vg per còpia de mRNA d'actina 5C, a partir de cDNA de cos gras obtingut de femelles tractades amb dsControl (n=17), dsInR (n=17) i femelles mantingudes en dejuni al mudar a adultes (n=7). Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard. Els asteriscs indiquen diferències significatives (test *t* d'Student, **p<0,01; ***p<0,001).

També vam analitzar la longitud dels oòcits basals i vam comprovar que els de les femelles del grup control havien crescut i s'havien desenvolupat normalment, mentre que els de les femelles del grup dsInR medeixen pràcticament el mateix que els d'una femella recent emergida com a adulta (0,42-0,47 mm) o els de les femelles mantingudes en dejuni (Fig.5.10).

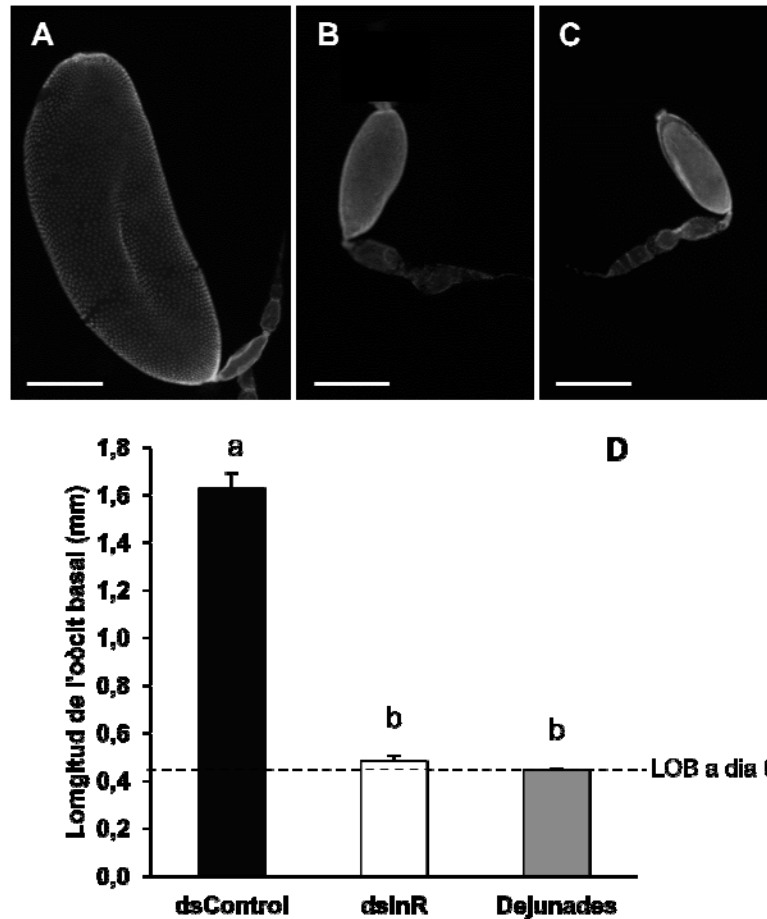


Figura 5.10 Efecte del silenciament de BgInR i el dejuni sobre el creixement de l'òcit basal. Fotografies d'òcits basals tenyits amb DAPI: A. d'una femella control, B. d'una femella dsInR, i C. el d'una femella dejunada. D. Longitud de l'òcit basal mesurada en mm, n= 14. Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard, la línia de punt indica la longitud de l'òcit basal de femelles recent emergides i les diferents lletres (a-b) es refereixen a grups que mostren diferències significatives segons el test Anova (Tukey, $p < 0,05$). La barra d'escala en A, B i C equival a 300 μ m.

A continuació es van incubar cossos grassos de femelles adultes recentment emergides amb LY294002, un potent inhibidor de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), la quinasa encarregada d'iniciar la senyalització de la via del InR (Fig. 1.5). Els cossos grassos es van posar amb l'inhibidor o amb DMSO, l'adjuvant en el que es troba dissolt l'inhibidor, com a control. Tant uns com els altres es van incubar amb HJ

o amb acetona. L'objectiu de l'experiment era determinar si l'efecte observat sobre la producció de Vg era degut únicament a la reducció d'HJ o a una acció directa de la interferència del BgInR sobre la producció de Vg, al marge de l'efecte de la interferència sobre els nivells d'HJ. A l'haver emergit recentment com adultes, aquestes femelles no han pogut encara sintetitzar Vg, ja que els CA encara estan inactius i no han pogut iniciar la producció d'HJ. És per això que es va afegir HJ al medi d'alguns cossos grassos com a control positiu, i veure si l'inhibidor LY294002 contrarestavava l'efecte de l'HJ sobre l'expressió de Vg. Al mesurar l'expressió de Vg es va poder constatar que en els cossos grassos tractats amb l'inhibidor de la PI3K aquesta era molt més baixa que en els tractats amb DMSO i HJ com a controls (Fig.5.11).

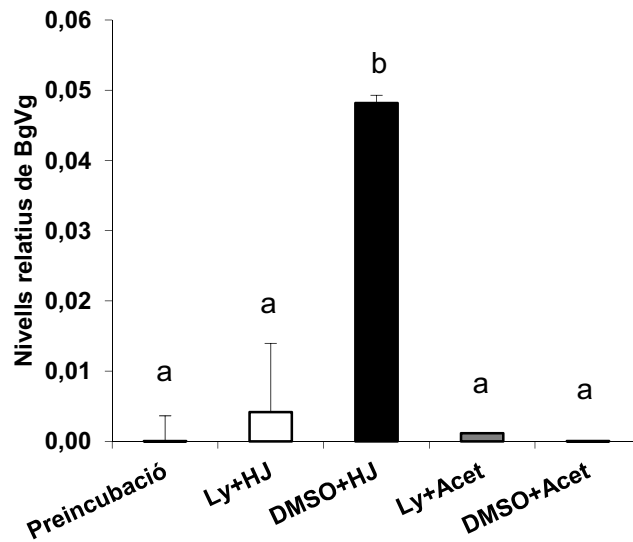
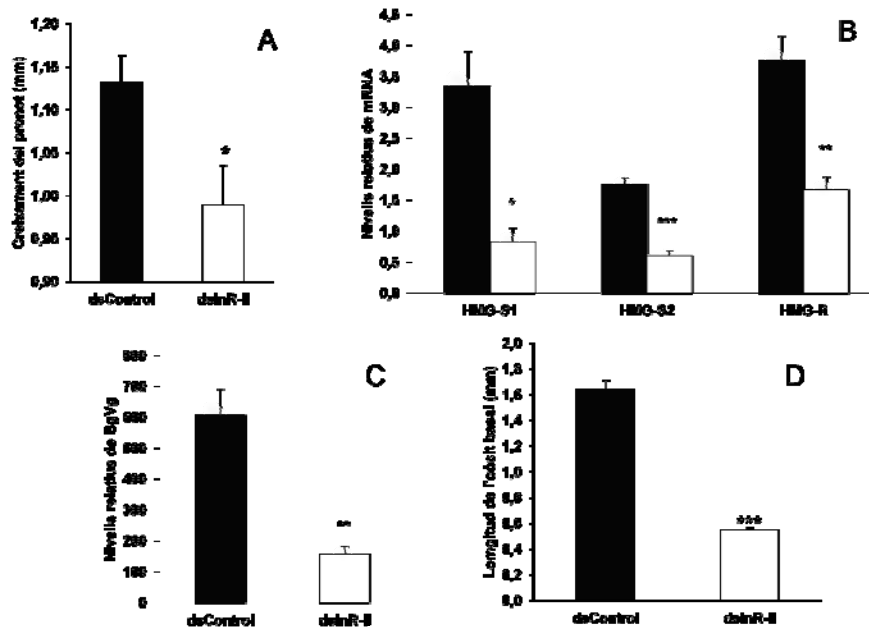


Figura 5.11 Efecte del LY294002 sobre la inducció de l'expressió de Vg per HJ. Nivells de mRNA de BgVg mesurats per qPCR en cossos grassos incubats *in vitro* amb HJ i LY294002 (Ly), HJ i DMSO, acetona i Ly, acetona i DMSO o sotmesos només a una preincubació amb medi de cultiu. Nivells expressats com a còpies de mRNA de Vg per còpia de mRNA d'actina 5C, n= 7. Les lletres (a-b) es refereixen a grups amb diferències significatives entre ells segons el test Anova (Tukey, *p<0,05).

Un cop definits els efectes de la interferència del InR sobre els processos reproductius, així com en el desenvolupament i creixement de les femelles de *B. germanica*, ens vam voler assegurar que els efectes observats eren deguts específicament per la dràstica reducció del InR i que no estàvem veient efectes *off-target*, és a dir, deguts a un efecte del dsRNA sobre altres gens que no fossin el InR. Per fer-ho es va dissenyar un segon dsRNA contra la regió del domini fibronectina del InR de 349 parells de bases (dsInR-II) (Fig.5.1).

Els experiments realitzats amb el dsInR-II, a més de fer disminuir els nivells d'mRNA de BgInR en un 78% al cos gras i un 86% en CA (n=7), van donar fenotips similars als obtinguts amb el primer dsInR. Per exemple, els pronots són significativament més petits que els dels controls (Fig.5.12A). Els enzims de la via del mevalonat, necessaris per la síntesi d'HJ als CA, presenten nivells molt reduïts en les femelles del grup dsInR en relació amb les del grup control (Fig.5.12B). De forma similar, l'expressió de la Vg en cos gras també es veu clarament afectada, sent molt menor en les interferides pel InR que en les control (Fig.5.12C). L'oòcit basalt tampoc creix en les femelles dsInR-II, amb longituds significativament menors que les assolides en els control (Fig.5.12D).

Figura 5.12 Efectes del dsInR-II en *B. germanica*. A. Creixement del pronot en mm. B. Nivells d'expressió dels tres enzims de la via de biosíntesi de l'HJ estudiats en femelles dsControl (negre) i dsInR (blanc) (n=7). C. Diferències en els nivells de mRNA de Vg en cos gras (n=7). D. Longitud de l'oòcit basal de femelles dsControl i femelles interferides amb dsInR-II (n=4). Les barres indiquen la mitjana \pm l'error estàndard. Els asteriscs indiquen diferències significatives (test T d'Student, *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001).



5.2.2 Silenciament del InR durant el segon cycle gonadotròfic

Per tal de discriminar si els efectes del dsInR sobre la reproducció eren deguts a l'efecte directe de la reducció dels nivells del transcrit del InR sobre els processos reproductius, i no una conseqüència dels efectes d'aquest sobre el creixement i el desenvolupament, es van realitzar experiments amb RNAi en femelles adultes. Així doncs, es van injectar 2µg de dsInR en femelles adultes al seu primer dia de transport de l'ooteca, mentre que espècimens tractats de forma equivalent amb el dsControl van servir com a controls negatius. Traient l'ooteca dotze dies més tard, s'induí un segon cycle gonadotròfic. Al cinquè dia d'aquest segon cycle s'observaren els nivells de BgInR, que eren significativament més baixos en el cos gras i els CA de les femelles dsInR (Fig.5.13).

Figura 5.13 Efectes del silenciament de BgInR en femelles adultes de *B. germanica*. A. Caiguda del transcrit de BgInR en CA degut a la interferència del InR (n=10). B. Reducció dels enzims de la via de biosíntesi de l'HJ estudiats en CA de femelles dsControl (negre) i dsInR (blanc) interferides en estadi adult. (n=10). C. Caiguda del transcrit de BgInR en cos gras degut a la interferència del InR (n=10). D. Disminució en l'expressió de BgVg al cos gras de femelles dsInR respecte al grup dsControl (n=10). E. Longitud de l'òocit basal de femelles dsControl i femelles dsInR al cinquè dia del segon cicle gonadotròfic (n=15). Les barres indiquen la mitjana \pm l'error estàndard. Els asteriscs indiquen diferències significatives (test T d'Student, *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001).

Els resultats obtinguts van ser molt similars als observats en els experiments realitzats quan es tractaven nimfes. L'expressió dels enzims de la via de biosíntesi de l'HJ en els CA es veu clarament reduïda per la disminució del InR, i la Vg en cos gras també presenta nivells de mRNA inferiors als mostrats pels del grup control. Conseqüentment, l'òocit basal de les femelles interferides amb RNAi contra BgInR gairebé no creix (Fig. 5.13).

5.3 Discussió

Al present capítol s'ha realitzat l'estudi funcional del InR de *B. germanica* principalment mitjançant la utilització de RNAi específic per aquest transcrit, per tal de reduir els seus nivells d'expressió i poder analitzar quins fenotips es produeixen,

parant especial interès en aquells relacionats amb la reproducció. Per començar, es va dissenyar l'experiment del primer cicle gonadotròfic en el que el tractament amb RNAi s'administrava a l'inici de les dues darreres etapes nimfals, i els teixits a analitzar es dissecaven al cinquè dia de vida adulta. En els dos teixits estudiats es va poder constatar l'eficiència de l'efecte del dsInR, mesurant una reducció significativa dels nivells de BgInR, d'un 74% en CA i un 85% en cos gras. Considerant la reducció de l'expressió del InR observada en altres insectes models en els que s'ha utilitzat la tècnica del RNAi, com per exemple un 63% en el cos sencer d'exemplars adults de *T. castaneum* (Parthasarathy i Palli, 2011), 65% en el cos sencer de nimfes de *Gryllus bimaculatus* (Dabour et al., 2011) o més del 75% al intestí mig de femelles adultes de *A. aegypti* (Gulia-Nuss et al., 2011), podem dir que l'eficiència del dsInR a *B. germanica* és equiparable a l'aconseguida en d'altres insectes.

Fent el seguiment de l'experiment es va observar com les nimfes femelles interferides pel InR mudaven amb cert retard respecte a les control. La penúltima fase nimfal dura de mitjana 6,2 dies en les nimfes control i 7 dies, gairebé un dia més, en les nimfes dsInR. La muda a adult es veia també endarrerida; mentre que en les femelles control la darrera fase nimfal dura 8,5 dies de mitjana, per les nimfes dsInR aquesta etapa s'allarga fins a 9,8 dies de mitjana. Aquest retard en el desenvolupament dels estadis juvenils és similar al que s'ha observat en larves de *D. melanogaster* quan s'elimina el InR per mutació (Shingleton et al., 2005). Per a que les larves de mosca facin la pupa cal que assoleixin una mida crítica, i la manca de senyalització nutricional a través del InR fa que a aquestes larves els hi costi més créixer i arribar a aquesta mida crítica. *D. melanogaster* és, però, un insecte holometàbol, mentre que *B. germanica* és hemimetàbol, i no s'han trobat evidències de que les paneroles necessitin assolir una mida crítica per poder mudar.

El que sí que s'ha observat, és que les paneroles tractades amb dsInR a les darreres fases nimfals són més petites que les femelles del grup control. Això ha estat quantificat mesurant la longitud del pronot. Així mateix s'ha comprovat que el silenciament de FoxO no afecta a la mida del pronot i no és capaç de contrarestar l'efecte del dsInR sobre el creixement quan es silencien tots dos alhora, indicant que la reducció de la mida és independent de la possible activació de FoxO quan s'interfereix el InR. Altres estudis focalitzats en el InR han mostrat efectes sobre la mida a *D. melanogaster* (Brogiolo et al., 2001; Demontis et al., 2009), però també a

d'altres insectes com el grill *G. bimaculatus* (Dabour et al., 2011). De fet, a *D. melanogaster*, s'ha demostrat que el InR regula de manera autònoma la mida de les cèl·lules i òrgans. Mentre que la supressió del InR en estadis larvaris resulta en mosques de menor mida, la seva sobreexpressió provoca l'efecte contrari, mosques adultes més grans que les control. L'efecte també es pot observar quan les modificacions s'apliquen només a un òrgan, com per exemple els ulls (Brogiolo et al., 2001; Britton et al., 2002). Estudis més recents confirmen que la pèrdua parcial de la funció de diversos gens que formen part de la via de senyalització de la insulina, com el InR, el substrat del InR (Chico), PI3K o S6K, resulta en mosques amb reduccions significatives de pes corporal, si bé tenen un major contingut de lípids totals (Murillo-Maldonado et al., 2011). Així doncs, l'afectació de la via del InR, alterant el propi InR o altres components de la via durant el desenvolupament dels insectes acabarà afectant la mida de l'animal un cop esdevingui adult. En el cas de *B. germanica*, la inactivació de la via és la responsable de la menor mida de les femelles tractades amb dsInR, si bé no sembla que el factor de transcripció FoxO hi estigui involucrat.

A part d'una menor mida, quan les paneroles femelles dsInR muden a adult, aproximadament la meitat d'elles presenten tegmines arrugades i ales sense desplegar. Aquest és un fenotip molt similar a l'observat al reduir l'expressió de la isoforma A del receptor de l'ecdisona (EcRA) mitjançant RNAi, que assenyala la relació que hi ha entre senyalització de l'ecdisona i el correcte desplegament de les ales (Cruz et al., 2006). La similitud entre els fenotips produïts pel silenciament del InR i de EcRA apunta a una relació entre la via de InR i la via de senyalització de l'ecdisona. Una possibilitat seria que el silenciament del InR provoqués una disminució en el creixement de la glàndula protoràcica, la glàndula que produeix l'ecdisona, i això donés com a resultat una reducció en la producció de l'hormona i, com a conseqüència, dels processos regulats per aquesta. Resultats preliminars obtinguts en el nostre laboratori assenyalen a una afectació en la via de senyalització de l'ecdisona en glàndules protoràciques de nimfes tractades amb dsInR (Abrisqueta, Mané-Padrós i Maestro, resultats preliminars).

Diversos estudis, utilitzant *D. melanogaster* com a model, suggereixen que l'activitat de la via del InR a la glàndula protoràcica modula la síntesi d'ecdisona influint sobre la duració dels estadis larvaris i el ritme al que creixen les larves (Caldwell et al., 2005; Mirth et al. 2005; Colombani et al. 2005). La mida final de les

mosques depèn d'aquests dos factors, el ritme de creixement i la durada dels estadis larvaris. Per exemple, s'ha observat que PI3K, un enzim que forma part de la via del InR, regula la mida de les cèl·lules de la glàndula protoràcica, afectant els nivells de producció d'ecdisona, claus per determinar la durada de cada fase larval. Les modificacions en l'expressió de PI3K resulten en mosques més grans i estadis larvaris més llargs (si s'inhibeix) o més petites (si es sobreexpressa) que les controls (Caldwell et al., 2005). Altres estudis conclouen que el creixement de les cèl·lules de la glàndula protoràcica, dependent de la via de la insulina, determina quan s'ha assolit la mida crítica i les larves poden pupar (Mirth et al., 2005). Aquests resultats apunten a que hi hauria prou amb el creixement de la glàndula protoràcica i que aquesta sigui capaç de produir ecdisona en quantitat suficient per desencadenar la muda. Alguns treballs, però, apunten cap a un possible control negatiu del creixement de l'animal per part de l'ecdisona a través del cos gras, contrarestant el creixement induït per la via de la insulina, al activar el factor de transcripció FoxO i la transcripció de 4EBP (Colombani et al., 2005). En altres insectes, com *Manduca sexta*, s'ha demostrat la importància del InR per a la síntesi d'ecdisona per part de la glàndula protoràcica a la darrera fase larval, provant la presència del InR a la pròpia glàndula i l'activació de la via quan les larves s'alimenten durant la primera meitat de la fase. És llavors que la glàndula creix i s'incrementa la síntesi d'ecdisona (Walsh i Smith, 2011). A *B. germanica*, que els estadis ninfals durin més podria apuntar a defectes en la senyalització de l'ecdisona, necessitant més temps per a que es produeixi la suficient senyal, en forma d'hormona o d'activació de la via, per a que es produeixin les mudes. Tant el retard en les mudes com els defectes en el desplegament de les tegmines i de les ales observat en les nimfes tractades amb dsInR podrien indicar una reducció en el creixement de la glàndula protoràcica i de la producció d'ecdisona.

La significativa reducció en la síntesi d'HJ observada en els CA de femelles tractades amb dsRNA contra el InR indica la importància del InR i de la seva via de senyalització per a la síntesi d'HJ. Una mutació hipomòrfica del gen del InR a *D. melanogaster* redueix la producció d'HJ per part dels CA al 23% de la producció del grup de mosques control (Tatar et al., 2001), sent aquestes mosques mutants més petites que les control. També mutacions en *chico*, l'homòleg de *Drosophila* pel substrat del InR (IRS), redueixen la síntesi d'HJ al 47%, a més de disminuir la mida corporal i allargar-ne la longevitat (Tu et al., 2005). Dades recents indiquen que el

bloqueig de la via del InR en el mosquit *A. aegypti* també redueix la producció d'HJ (Pérez-Hedo et al., 2013). En dípters, però, l'hormona encarregada d'activar la vitel·logènesi és l'ecdisona, no l'HJ. Al mosquit *A. aegypti* la senyalització nutricional a través de la via del InR és necessària per la síntesi d'ecdisona, de forma semblant al que observem a *B. germanica* amb l'HJ (Graf et al., 1997; Riehle i Brown, 1999). Així doncs, la importància de la via del InR per a la síntesi d'HJ està present tant en insectes on aquesta és l'hormona activadora de la vitel·logènesi, com en aquelles on ho és l'ecdisona, la síntesi de la qual també regula la via del InR. D'altra banda, a *B. germanica* s'ha observat com la supressió del factor de transcripció FoxO, que és el efector transcripcional principal de la via del InR (Fig. 1.5), mitjançant l'aplicació de RNAi, en femelles mantingudes en dejuni multiplica per 7 els nivells de producció d'HJ als CA (Süren-Castillo et al., 2012). Per tant, FoxO juga un paper clau com a inhibidor de la síntesi d'HJ en dejuni i és probable que sigui responsable, almenys en part, de la reducció en la producció d'HJ observada al interferir el InR.

Per comprovar a quin nivell estava afectada la producció d'HJ es van mesurar els nivells de mRNA de HMG-S1, HMG-S2, HMG-R i epoxidasa, enzims implicats en la síntesi d'HJ. Els resultats van mostrar com aquests estan significativament disminuïts en els CA de les femelles dsInR respecte a les control, a nivells propers als de les femelles dejunades. Aquests resultats suggereixen que quan la via del InR està activa contribueix a produir en el CA un increment en la síntesi d'HJ mitjançant l'increment d'expressió dels enzims responsables de la seva biosíntesi. Per altra banda, el silenciament de BgFoxO en femelles dejunades, encara que incrementa significativament la producció d'HJ, no ve acompanyat per un augment significatiu dels nivells de mRNA d'aquests enzims (Süren-Castillo et al., 2012). Essent FoxO el principal efector transcripcional de la via del InR, l'efecte sobre els nivells de mRNA dels enzims observat en situació de dejuni no es produeix únicament per la inhibició de la via. De fet, el silenciament de BgTOR també provoca una reducció en els nivells de producció d'HJ i dels enzims de la seva biosíntesi (Maestro et al., 2009), indicant que també la via de TOR senyalitza l'activació dels CA. Aquesta podria ser la raó per la qual en situació de dejuni, encara que haguem silenciats FoxO, no s'incrementin els nivells d'expressió dels enzims per la manca d'activació de la via de TOR deguda al dejuni o per altres factors.

A continuació es van mesurar els nivells d'expressió de la Vg en el cos gras. Amb una reducció significativa del 80% en les femelles dsInR respecte a les femelles control, s'apropa als de les femelles dejunades. En conseqüència, l'oòcit basal de les femelles dsInR pràcticament no creix i mesura el mateix que el de les femelles dejunades i el de femelles adultes acabades d'emergir (Bellés et al., 1987). Aquests resultats coincideixen amb el que s'ha observat recentment en *T. castaneum*, on la interferència del InR i d'altres elements de la senyalització nutricional (vies del InR i de TOR) com els ILPs, PI3K, o TOR, resulta en femelles amb nivells molt reduïts de Vg i oòcits més petits que les femelles control (Parthasarathy i Palli, 2011; Sheng et al., 2011). Tot i que, com ja em esmentat, en dípters la vitel·logènesi està regulada per l'ecdisona i no per l'HJ, a *A. aegypti* s'ha comprovat que l'ecdisona per si sola no pot iniciar el procés de la vitel·logènesi, sent essencial la senyalització nutricional a través de la via de TOR (Hansen et al., 2004) i la de la insulina (Roy et al., 2007). En altres espècies d'insecte, com la llagosta *Schistocerca gregaria*, la supressió del InR mitjançant dsRNA, també redueix els nivells d'expressió de la Vg i el creixement dels oòcits (Badisco et al., 2001). En el cas del mosquit *Culex pipiens*, la via del InR regula la seva entrada en diapausa durant l'hivern a través de FoxO. Quan les hores diàries de sol s'escurcen i les condicions els hi són desfavorables, aquests mosquits, com d'altres insectes, són capaços d'aturar els processos reproductius, com la maduració dels oòcits, i incrementar les seves reserves de greix corporal per sobreviure fins que les condicions els hi siguin favorables. Al utilitzar RNAi per reduir l'expressió del InR d'aquests mosquits els fol·licles primaris deixen de créixer, igual que quan entren en diapausa, fenotip que es pot contrarestar amb l'aplicació d'HJ (Sim i Denlinger, 2008). A *B. germanica*, el tractament amb RNAi contra BgTOR també redueix els nivells de mRNA de Vg i evita el creixement dels oòcits basals (Maestro et al., 2009). La senyalització nutricional, per tant, mitjançant totes dues vies (TOR i InR), regula l'expressió del gen de la Vg al cos gras, permetent la maduració dels oòcits només quan les condicions nutricionals són favorables.

Seguidament es va dissenyar un segon experiment en el que s'incubaren cossos grassos *in vitro* amb LY294002, inhibidor de la PI3K, la quinasa que rep la senyalització del InR. L'objectiu era comprovar si la reducció en la expressió del gen de la Vg era causada per la interferència del BgInR de forma directa o només era deguda a la reducció de la síntesis d'HJ als CA. Es va constatar que la presència d'HJ

en el medi d'incubació feia incrementar l'expressió del gen de la Vg, mentre que la presència de l'inhibidor LY294002 contrarestava l'efecte de l'HJ sobre aquesta expressió. De forma similar, al mosquit *A. aegypti*, una concentració de 5µM de LY294002 és suficient per inhibir l'estimulació que la insulina i l'ecdisona provoquen conjuntament sobre els nivells de mRNA de Vg al cos gras (Roy et al., 2007). Per tant, la via del InR és necessària en el cos gras per a la síntesi de Vg, independentment de l'efecte de l'HJ.

Els experiments realitzats amb el dsInR, equivalents als fets amb el primer RNAi contra BgInR, van resultar en fenotips similars. Tant en CA com en cos gras es va aconseguir una reducció significativa dels nivells de BgInR, similar a la obtinguda amb el primer dsInR. Els enzims implicats en la síntesi de l'HJ en els CA també mostren nivells de mRNA significativament disminuïts, confirmant l'efecte sobre la síntesi d'HJ. Al cos gras, la transcripció del gen de la Vg també es va veure clarament reduïda i com a conseqüència l'òcit basal no creix pràcticament res en els cinc dies de vida adulta, amb longituds significativament menors que les presents en el grup control. Aquests resultats validen els obtinguts amb el primer dsInR i confirmen que els fenotips observats són conseqüència de la disminució específica en els nivells de mRNA de InR.

Els experiments descrits fins ara es van fer tractant els animals a l'inici del penúltim i últim estadi ninfals. Cal considerar, doncs, que la reducció dels nivells de InR podrien afectar algun procés del desenvolupament dels CA o el cos gras durant les dues darreres fases ninfals, evitant el seu correcte funcionament. Així, per assegurar que els efectes de la interferència de BgInR són independents dels efectes sobre el desenvolupament i la muda a adult, es van dur a terme experiments amb RNAi en femelles adultes, obtenint resultats molt similars als observats en els primers estudis. El tractament en adults inhibeix igualment l'activitat als CA dels enzims necessaris per la síntesi d'HJ, indicant que el InR és essencial per a la biosíntesi d'HJ en els CA, independentment del possible efecte en el creixement o el desenvolupament i dels processos metamòrfics que tenen lloc durant la muda a adult. Paral·lelament a la inhibició de l'HJ, els espècimens tractats amb RNAi contra BgInR mostren nivells molt baixos de mRNA de Vg en cos gras, i els òcits basals no es desenvolupen. En conjunt, aquestes dades ens confirmen el paper clau del InR i la

seva via en la regulació dels processos necessaris per a la producció d'HJ i la maduració dels oòcits de les femelles de *B. germanica*.

En estudis previs s'havia comprovat el paper que la via de TOR té en la transmissió de la informació nutricional que activa la síntesi de l'HJ i la producció de Vg (Maestro et al., 2009). Aquestes evidències, juntament amb els resultats mostrats en aquest capítol, indiquen que totes dues vies, la de TOR i la del InR, són necessàries per a la senyalització nutricional, tal com passa en *A. aegypti* (Hansen et al., 2004; Roy et al., 2007). El fet que cap de les dues vies pugui suplir la supressió de l'activitat de l'altra suggereix una altra vegada que conformen una única xarxa complexa responsable d'actuar com a sensor del nivell nutricional i donar la resposta corresponent a cada situació.

**6. EFECTE DEL dsInR SOBRE LA LONGEVITAT I LA RESISTÈNCIA AL
DEJUNI**

6.1 Antecedents

El decisiu paper del InR pel correcte desenvolupament, així com la seva importància per la capacitat reproductiva de les femelles de *B. germanica*, ha estat provat al capítol anterior. En aquest capítol ens centrarem en un aspecte de la senyalització nutricional que ha anat cobrant protagonisme durant els darrers anys. Tot i tractar-se d'un procés molt complex, l'envelliment sempre ha estat una qüestió interessant d'estudi, i descobriments recents han mostrat com simples intervencions genètiques poden incrementar l'esperança de vida, així com millorar la salut durant l'envelliment (Partridge et al., 2011). Moltes d'aquestes alteracions que atorguen una major esperança de vida afecten a gens que formen part, d'una manera o d'una altra, de les vies implicades en la sensibilitat nutricional, com les de TOR i del InR. En situacions de bonança nutricional, aquestes vies estimulen el creixement i la reproducció, però sota una situació de manca d'aliments les accions de la via semblen ser diferents, enfocades més cap a la protecció i manteniment de les cèl·lules, per tal de protegir l'organisme de les circumstàncies adverses, afavorint l'extensió de la vida (Kenyon, 2010).

Les primeres evidències van ser proveïdes per investigacions amb la mosca del vinagre que mostraven evidències d'un efecte anti-envelliment per la pèrdua de CHICO, que és l'homòleg del substrat del InR (IRS) de vertebrats (Clancy et al. 2001) i per la pèrdua del propi InR (Tatar et al., 2001). La reducció de l'expressió del ILPs de la mosca de la fruita (Gronke et al., 2010), així, com la sobreexpressió del regulador negatiu de la via del InR, PTEN, i del factor de transcripció FoxO (Hwangbo et al., 2004), també amplien l'esperança de vida. Paral·lelament, es va observar com la reducció de l'activitat de la via de TOR, a través de la modulació de diversos gens, com TSC1, TSC2, TOR o S6K, també perllongava la vida en el nematode *C. elegans* (Vellai et al., 2003), confirmant-se més tard en d'altres organismes com *D. melanogaster* (Kapahi et al., 2004). Sembla, doncs, que la reducció de l'activitat de totes dues vies és capaç d'incrementar l'esperança de vida de mosques i nematodes. Posteriorment, la conservació d'aquestes vies en mamífers van permetre relacionar aquests resultats amb estudis sobre la longevitat en ratolins i humans (Barbieri et al., 2003). Per exemple, l'eliminació del InR específicament al teixit adipós de ratolins allarga un 20% la vida dels ratolins mutants, que són més primis i sensibles a la insulina que els ratolins control (Blüher et al., 2003).

D'altra banda, molts animals han d'afrontar períodes de temps de manca d'aliments, motiu pel qual han desenvolupat tot un seguit d'estratègies que els hi confereixen una certa resistència al dejuni. Bona part del coneixement que es té sobre aquestes adaptacions prové d'estudis realitzats en *D. melanogaster*, especialment en larves. Aquestes adaptacions inclouen un increment en l'acumulació de lípids com a reserva, canvis en el metabolisme i una reducció de la reproducció (Rion i Kawecki, 2007). La resistència al dejuni s'acostuma a quantificar mesurant el temps que triguen els individus en morir sota unes condicions de privació total de l'aliment o restriccions dietètiques. Les mosques a les que els hi ha estat practicada una ablació

de les cèl·lules cerebrals responsables de la síntesi dels ILPs mentre eren larves, al mudar a adultes mostren una major acumulació de lípids de reserva, viuen més i tenen una resistència al dejuni i al estrés oxidatiu més elevada, si bé mostren una fecunditat reduïda (Broughton et al., 2005). En canvi, les modificacions realitzades en components de la via de TOR, si bé allarguen l'esperança de vida, no mostren cap efecte sobre la resistència al dejuni (Kapahi et al., 2004). D'aquesta manera, sembla que la via del InR, independentment de la via de TOR, jugaria cert paper en l'adaptació a situacions de limitació nutricional en *D. melanogaster*.

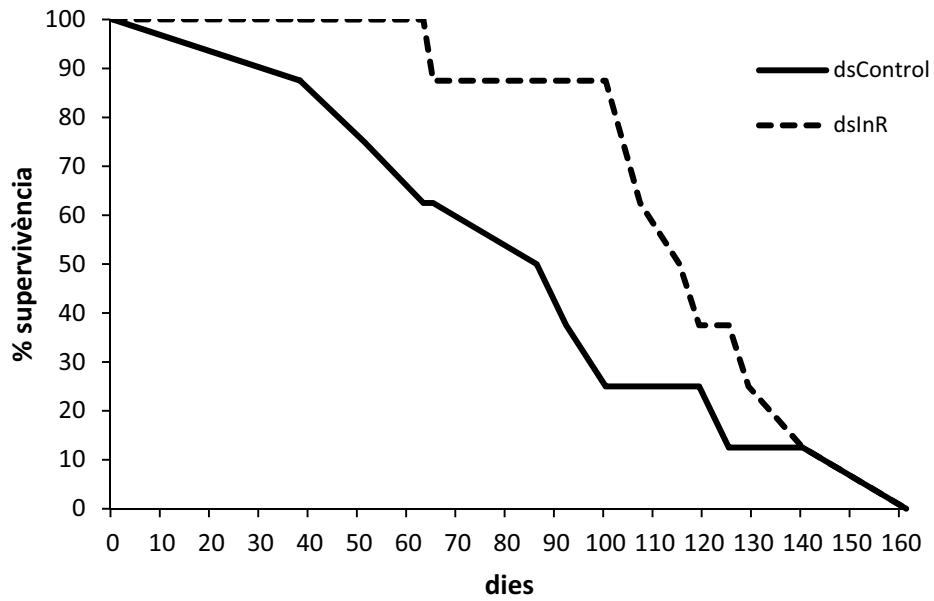
6.2 Resultats

6.2.1 Efecte sobre la longevitat

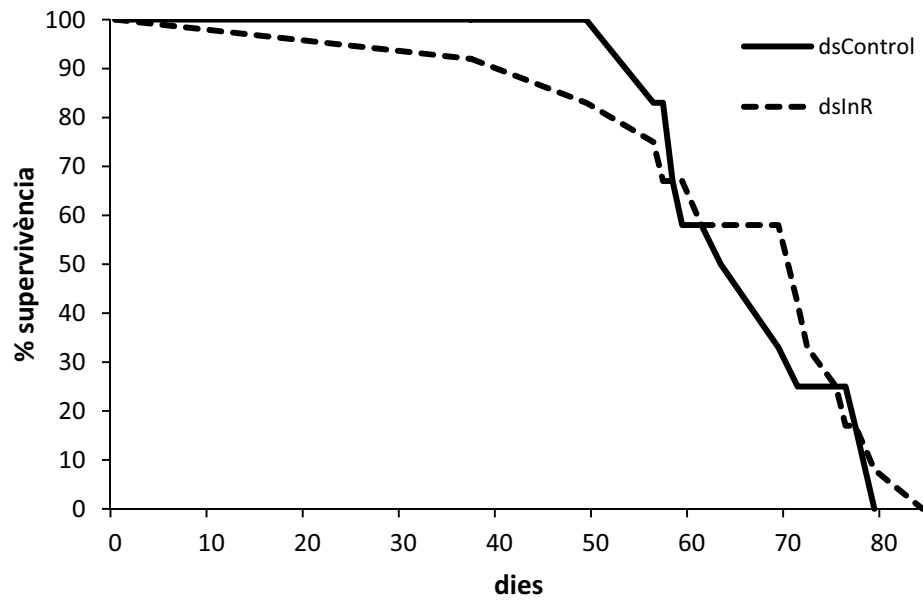
Amb el propòsit d'estudiar un possible efecte del silenciament del InR a *B. germanica* sobre la longevitat, es va dissenyar un primer experiment en el que s'injectaven 2µg de dsInR a femelles adultes, que havien estat amb mascles adults, al final del primer cicle gonadotròfic, just quan treien l'ooteca. Després de dotze dies de transport de l'ooteca, aquesta era extreta manualment i des de llavors es controlava diàriament el seu estat així com que no els hi manqués ni menjar ni aigua. Els resultats obtinguts demostren com les femelles tractades amb RNAi contra el InR tenen una vida mitja significativament més gran que les femelles control segons el Long-rank test (Fig. 6.1). Mentre una panerola femella control viu de mitjana uns 3 mesos (\bar{x} =89,5 dies), les que han estat tractades amb dsInR viuen gairebé 4 mesos de mitjana (\bar{x} =117,9 dies). Cal destacar, però, que el màxim de temps que arriben a viure no es veu modificat, sent d'uns 160 dies per tots dos grups. Una altra dada interessant, en referència a la reproducció, és que gairebé cap de les femelles dsInR va ser capaç de produir una ooteca amb nimfes viables (una de vuit), tot i passar mesos des de la injecció del RNAi i no realitzar cap altra injecció, mentre que les femelles control es reproduïen normalment durant 2 o 3 cicles.

Per poder determinar fins a quin punt els efectes del dsInR sobre la capacitat reproductora de les femelles estava influenciant la seva longevitat, es va realitzar un segon experiment, similar a aquest primer, però utilitzant mascles en comptes de femelles. Quan eren recent emergits a la forma adulta, se'ls punxava amb els dsRNA i eren col·locats en recipients de forma individualitzada. Les dades mostren una vida mitjana sense diferències significatives, segons el Long-rank test, entre els dos grups, \bar{x} =66,2 dies pel grup control i \bar{x} =65,7 dies pel grup dsInR (Fig.6.1).

Longevitat en femelles



Longevitat en mascles



6.2.2 Efecte sobre la resistència al dejuni

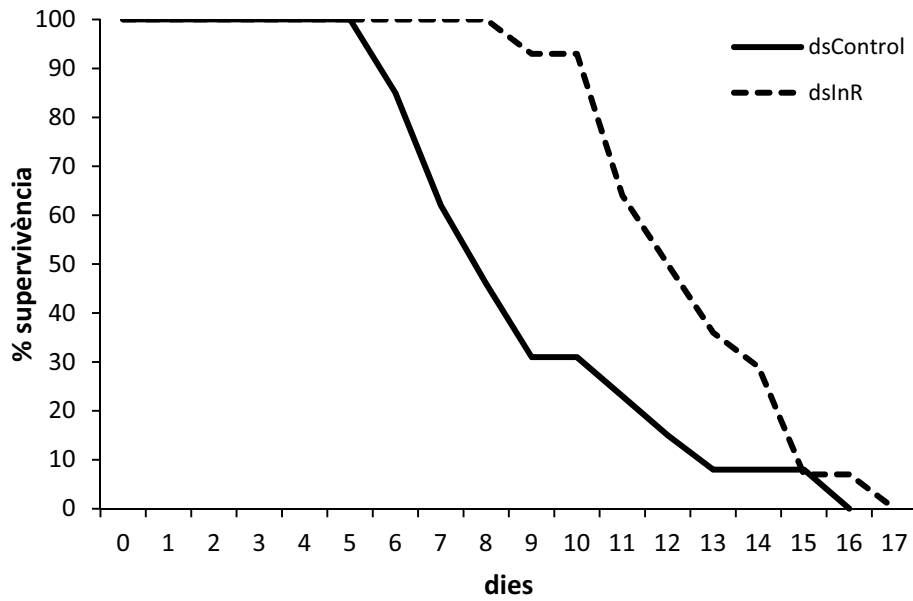
Un segon aspecte de l'efecte del silenciament del InR a *B. germanica* que es va voler considerar va ser l'alteració de la capacitat de resistència al dejuni que mostraven les paneroles. Amb aquesta finalitat es va dissenyar una prova en la que les femelles eren punxades amb 2µg del dsRNA al final del primer cicle gonadotròfic, a l'iniciar el transport de l'ooteca. Al cap de 12 dies s'extreia l'ooteca manualment per induir el segon cicle gonadotròfic i es separaven individualment i sense aliment, només amb aigua *ad libitum*. Diàriament es comprovava si les paneroles eren vives. Tot i que una de les femelles del grup control, d'un total de nou, va ser capaç de sobreviure fins a 16 dies, la mitjana de supervivència en dejuni es va quedar en 8,4 dies. En canvi, les femelles interferides amb RNAi contra el InR resisteixen, de mitjana, 12 dies sense aliment (Fig.6.2). Mitjançant un Log-Rank test es va certificar que hi havia diferències significatives entre la resistència al dejuni dels dos grups ($p<0,05$).

De manera similar al que es va fer amb la longevitat, es va realitzar un experiment equivalent utilitzant mascles en comptes de femelles. Els mascles, recent emergits com a adults, eren punxats amb el dsRNA i al cap de cinc dies eren separats d'un en un i sense menjar però amb aigua. Igual que amb les femelles, eren controlats diàriament per comprovar la seva supervivència. Tot i que la diferència entre les mitjanes de supervivència és de poc més d'un dia, sent de 7,69 pels controls i de 8,76 pels mascles dsInR, segons el Log-Rank test hi ha diferències significatives en quan a la supervivència en situació de dejuni ($p<0,05$) (Fig. 6.2).

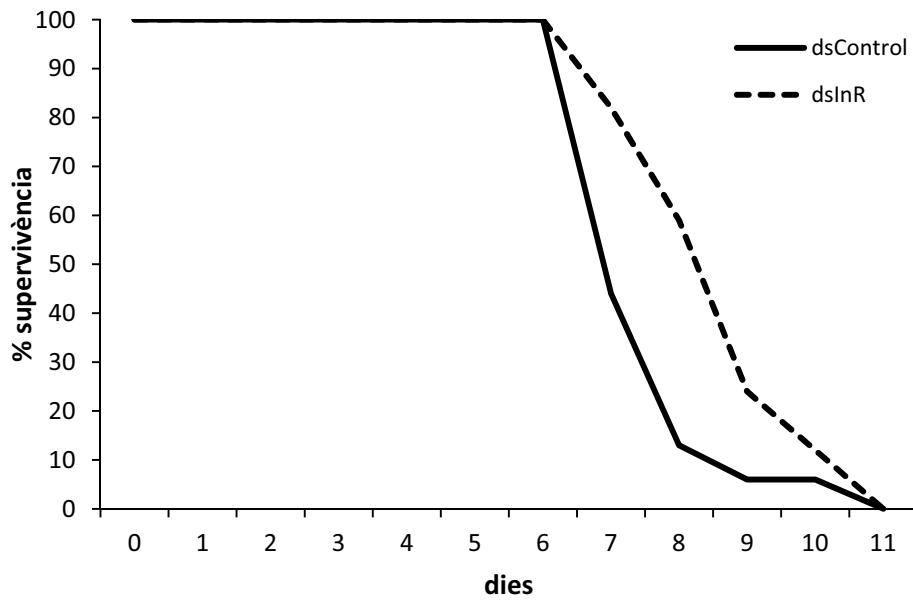
Donat que la interferència amb dsInR en femelles de *B. germanica* es realitzava uns dies abans de posar-les en dejuni, es van quantificar els triacilglicèrids (TAG) presents al cos gras, òrgan de reserva de les paneroles. Els resultats indicaven una major quantitat de TAG presents al cos gras de les femelles dsInR respecte a la quantitat mesurada en el grup control (Fig. 6.2).

Figura 6.1 Efecte del dsInR sobre la longevitat de femelles i mascles de *B. germanica*. Supervivència expressada com a percentatge d'individus vius en un determinat moment del temps. En la gràfica superior, supervivència de les femelles punxades amb 2µg de dsInR ($\bar{x}=117,9$ dies) o dsControl ($\bar{x}=89,5$ dies) al final del primer cicle gonadotròfic (n=8). $p<0,05$ en Long-Rank test. A la gràfica inferior, supervivència de l'experiment equivalent realitzat amb mascles (n=12) punxats amb dsInR ($\bar{x}=65,7$ dies) o dsControl ($\bar{x}=66,2$ dies).

Resistència al dejuni en femelles



Resistència al dejuni en mascles



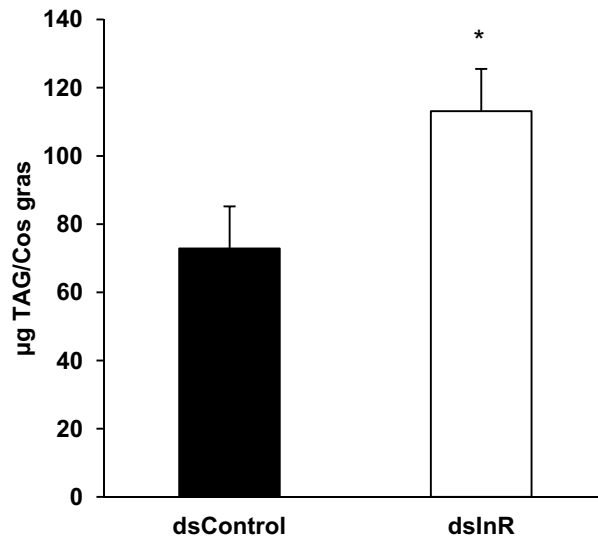


Figura 6.3 Efecte del dsInR sobre la quantitat de triacilglicèrids al cos gras. Nivells de TAG expressada com a µg de TAG per cos gras de femelles dsControl (n=5) i dsInR (n=6). L'asterisc representa diferències significatives (test *t* d'Student, *p<0,05).

Figura 6.2 Efecte del dsInR sobre la resistència al dejuni de femelles i mascles de *B. germanica*. Supervivència expressada com a percentatge d'individus vius en un determinat moment del temps. En la gràfica superior, supervivència de les femelles punxades amb 2µg de dsInR (\bar{x} =12,79 dies; n=14) o dsControl (\bar{x} =9,15 dies; n=13) a l'inici del transpòrt de l'ooteca i posades a dejunar 12 dies més tard, un cop extreta l'ooteca. p<0,05 en Long-Rang test. A la gràfica inferior, supervivència de l'experiment equivalent realitzat amb mascles punxats amb dsControl (\bar{x} =7,69 dies; n=16) o dsInR (\bar{x} =8,76 dies; n=17). p<0,05 en Long-Rang test.

6.3 Discussió

Aquest capítol es centra en el paper que la via del InR té sobre la longevitat i la capacitat d'adaptar-se a situacions de manca de nutrients. En primer lloc, per comprovar els efectes que la interferència del InR pogués tenir sobre la longevitat de les paneroles, es va dissenyar l'experiment amb femelles adultes que ja s'havien aparellat i que disposaven de menjar i aigua *ad libitum*. Els resultats demostren que la reducció del InR atorga una major longevitat a les paneroles femelles, que viuen gairebé un mes més de mitjana respecte al grup control, si bé el màxim que poden arribar a viure no varia. En canvi, a *Drosophila*, les mosques mutants pel InR no només viuen més de mitjana, sinó que augmenta també el màxim de temps que poden sobreviure (Tatar et al., 2001).

A més, les femelles de *Blattella* tractades amb dsInR són pràcticament incapaces de reproduir-se. Cal considerar aquest factor, el de la reproducció, com un dels elements clau per explicar que les femelles dsInR visquin durant més temps que les control, que sí que dipositen ooteques viables cíclicament. En diversos organismes model, com *C. elegans*, *D. melanogaster* o *M. Musculus*, s'ha vist com les modificacions de la via de la insulina, així com una dieta hipocalòrica, poden ampliar l'esperança de vida, però alhora mostren, gairebé sempre, efectes sobre la fecunditat, reduint-la o directament anul·lant-la (Partridge et al., 2005). L'augment de la longevitat es podria donar per un reajustament en l'ús dels recursos, que en lloc de ser utilitzats per a la reproducció s'empren per al manteniment de les funcions vitals de l'organisme, allargant-ne la vida. Una altra possibilitat seria que la reproducció causés per si mateixa uns danys en l'organisme que aquells que no es reproduïen no reben, i per tant viuen més (Partridge et al., 2005).

Per tal de discriminar l'efecte que la reproducció pot tenir sobre la longevitat, es va dissenyar un experiment similar al primer però utilitzant mascles en comptes de femelles, ja que la despesa energètica lligada a la reproducció que pateixen els mascles és molt menor perquè aquests no han de realitzar la vitel·logènesi. Els resultats no mostren diferències significatives entre els mascles dsInR i els del grup control. Aquesta dada demostra la importància que té el desgast degut a la vitel·logènesi en la possibilitat de que les paneroles puguin viure durant més temps, ja que la reproducció és un procés que s'emporta bona part dels recursos dels que disposa una femella adulta i sexualment madur. Tal com s'ha mostrat al capítol 5 d'aquest treball, la interferència del InR evita el correcte creixement i desenvolupament dels oòcits. Aquest resultat concorda amb el presentat al present capítol, que prova com les femelles dsInR no produeixen ooteques viables, i per tant, podrien aprofitar les reserves acumulades, que normalment estarien destinades a la producció de descendència, per altres processos vitals que els hi permetrien viure durant més temps. Aquestes dades contrasten amb algunes de les que s'han obtingut prèviament a *Drosophila*. La mutació del gen *chico*, l'equivalent del *Insulin Receptor Substrat* (IRS) a la mosca, produeix femelles amb major longevitat mitjana i màxima respecte les control, mentre que els mascles només sobreviuen durant més temps si

són heterozigots, però no si són homozigots, indicant un possible efecte deleteri per la manca de *chico* en les mosques mascle (Clancy et al. 2001). Cal tenir en compte, doncs, la possibilitat que la disrupció de la via del InR pugui allargar la vida a través d'altres processos que no impliquin a la reproducció, si bé a *Blattella* la reproducció i la longevitat semblen clarament relacionades.

D'altra banda, i relacionat en certa manera amb el primer punt, es va voler estudiar la possible vinculació de la via de senyalització nutricional del InR amb la resistència al dejuni de les paneroles. Com hem vist en capítols anteriors, la supressió del InR causa, a diversos nivells, un fenotip similar al que s'observa quan les paneroles són sotmeses a dejuni. Això fa suposar que la via del InR està activa principalment quan l'animal està alimentat i hi ha nutrients en circulació, provinents d'aquests aliments o de les pròpies reserves de l'individu.

És destacable que les femelles dsInR sotmeses a dejuni siguin capaces de sobreviure durant més temps que les control. Ja que les femelles en dejuni, tan control com dsInR, no són capaces d'iniciar la maduració dels oòcits, s'ha de descartar la destinació de recursos a la reproducció com a causant d'aquesta diferència, tal com passava en el cas de les femelles alimentades. Per tant, deuen ser altres processos regulats per la via del InR els que es veuen afectats per la seva interferència, permetent que les femelles dsInR tinguin més reserves disponibles o potser mobilitzin o aprofitin les reserves d'una manera més eficient per adaptar-se al dejuni i sobreviure durant més temps. Alguns autors consideren que sota condicions adverses, com ara una dieta restrictiva, les vies que actuen com a sensors nutricionals canviarien la seva activitat, conduint a l'animal a un canvi fisiològic global dirigit a la protecció enfront de l'estrès nutricional (Kenyon 2010). Aquest canvis implicarien una reducció del creixement i la reproducció, acompanyada d'un increment de la protecció i el manteniment cel·lular. Com a conseqüència d'aquesta adaptació fisiològica, l'animal veuria ampliada la seva esperança de vida. Es pot considerar la vinculació de la via del InR amb la resistència al dejuni com una adaptació evolutiva que permet als individus sobreviure a condicions adverses per a poder reproduir-se quan la situació millori.

Tot i que amb una diferència més ajustada, però igualment significativa, els mascles de *B. germanica* també mostren una major resistència a la desnutrició quan tenen l'expressió del InR silenciada. Aquest resultat ens confirma, com ja s'ha comentat, que la interferència del InR dona una major adaptabilitat enfront l'estrès produït per la manca d'aliments, sense que l'afectació en la capacitat reproductiva hi estigui implicada. La inhibició de la senyalització nutricional via la reducció en l'expressió del InR produeix canvis en l'expressió de diversos gens que afectarien l'esperança de vida, mitjançant la regulació de diversos factors de transcripció, com FoxO (Kenyon 2010). A *Drosophila* la mutació de FoxO redueix significativament l'increment de la longevitat que té la mutació del IRS (Yamamoto i Tatar, 2011). Cal considerar que FoxO, entre d'altres factors que veuen incrementada la seva activitat davant la manca de senyal nutricional, serien els responsables d'iniciar els processos

necessaris per la major conservació de les cèl·lules i els teixits dels organismes, regulant l'expressió d'una gran diversitat de gens que resultarien en una major resistència al dejuni.

Al tractar les femelles amb l'RNAi uns dies abans d'iniciar la fase de dejuni, la interferència començaria quan les paneroles encara estaven alimentant-se. Al mesurar els nivells de TAG al cos gras, just abans de posar els animals en dejunji, es va confirmar que les femelles dsInR havien emmagatzemat més TAG durant aquests dies que les femelles control. Això podria explicar la major capacitat de resistència en situacions de dejuni que mostren les femelles de *Blattella*. De forma similar, en els mascles, el període de dejuni es va iniciar cinc dies després de realitzar el tractament amb RNAi i es va observar igualment una resistència al dejuni més elevada en els dsInR respecte als control. Aquests resultats indicarien que tot i que les femelles dsInR tenen més reserves al iniciar el dejuni no es pot descartar l'efecte d'altres factors en la seva major resistència al dejuni. En d'altres models, com *D. melanogaster*, l'ablació de les cèl·lules neurosecretores dels ILPs provoca, entre d'altres conseqüències, un augment en les reserves de TAG, un increment de la resistència al dejuni, disrupcions en la fecunditat de les femelles, així com un increment en la longevitat (Haselton et al., 2010). Aquests resultats suggereixen una modulació del metabolisme lipídic quan la via del InR s'inactiva.

En conjunt, aquests resultats ens indiquen la importància de la via del InR en la senyalització nutricional, actuant com una mena d'interruptor, que activa uns processos i en deté uns altres segons la situació. Quan l'animal es pot alimentar bé, la via està activa i es posen en marxa processos com la reproducció i el creixement. Si la via es bloqueja, com quan injectem RNAi contra el InR, aquests processos s'aturen i els nutrients, si segueixen entrant en l'organisme, s'acumulen en forma de lípids de reserva que podran ser emprats més endavant. No es pot descartar, però, l'efecte negatiu que la reproducció pot tenir sobre l'esperança de vida per si mateixa.

Durant el dejuni l'activitat de la via del InR està molt reduïda, minvant el seu efecte sobre el creixement i la reproducció. Per tant, la interferència del InR i el dejuni tenen efectes molt similars. Com és que al aplicar-los alhora confereixen un major adaptació al dejuni? Com s'ha explicat en capítols previs, el dejuni estimula l'expressió del propi InR, possiblement a través del factor de transcripció FoxO (Puig et al. 2006), fet que incrementa la sensibilitat de la via, ja que al augmentar la quantitat de receptors incrementaria la capacitat d'unir-se amb els ILPs, encara que hi hagués concentracions molt baixes d'aquests. El dsInR provoca una reducció d'aquest increment en l'expressió del InR en individus dejunats, reduint encara més l'activitat de la via del que ja ho fa de per si el dejuni, i promovent diversos processos, com l'activació del factor de transcripció FoxO, i la resposta al dejuni que aquests donen (Kenyon, 2010). El dejuni i la interferència del BgInR tindrien, doncs, un efecte acumulatiu, que podria explicar els resultat observats.

Un darrer punt a assenyalar són les diferències entre femelles i mascles de la mateixa espècie pel que pertoca a la longevitat i la resistència al dejuni. Com succeeix en moltes espècies amb dimorfisme sexual, els mascles i les femelles de *B. germanica* són diferents en forma però també en fisiologia. Les femelles han de fer front al desgast que suposa reproduir-se, especialment al tenir que desenvolupar els ous i formar l'ooteca. Tot i així viuen més temps que els mascles i demostren ser capaces de resistir millor situacions de dejuni. Evolutivament parlant, té sentit que els mascles visquin menys, ja que les femelles en tenen prou amb aparellar-se una vegada per omplir les seves espermateques, estructures genitals de les femelles on emmagatzemen l'esperma dels mascles, i utilitzar aquest esperma per diversos cicles fèrtils.

7. CLONATGE I ESTUDI FUNCIONAL DE PEPCK

7.1 Antecedents

El InR, un cop se li han unit els ILPs, regula molts processos cel·lulars així com l'expressió de diversos gens. En alguns casos inhibeix la transcripció de gens, mentre que en d'altres l'activa. Aquest control sobre la transcripció gènica el realitza a través de l'activació de PI3K, que augmenta la producció de fosfatidilinositol trifosfat, segon missatger que recluta la Akt cap a la membrana plasmàtica, on és fosforilada i fosforila ella mateixa diverses proteïnes, entre elles el factor de transcripció FoxO, al que la via, quan està activa, manté fosforilat i inactiu al citoplasma (Puig et al., 2003). En canvi, quan hi ha restricció de nutrients, la via està inactiva i FoxO es manté desfosforilat i es desplaça cap al nucli on realitza la seva activitat transcripcional. FoxO és l'element més important en la coordinació de la resposta transcripcional a la situació nutricional donada per la via del InR (Gershman et al., 2007).

La fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (Pepck), en la seva forma citosòlica, és un enzim clau per la gluconeogènesi, encara que també pot actuar en altres processos, com la gliceroneogènesi, necessària per a la síntesi de triacilglicèrids, la síntesi de serina, i el reciclatge dels esquelets de carboni del glutamat i la glutamina en piruvat (Reshef et al., 2003; Yang et al., 2009). Pepck converteix l'oxaloacetat en fosfoenolpiruvat i diòxid de carboni, pas que es considera limitant en aquests processos (Fig. 7.1). La gluconeogènesi és un procés necessari per a la supervivència en períodes de dejuni que pot activar-se inapropiadament en pacients amb diabetis mellitus. La seva implicació en desordres metabòlics és el principal motiu pel que Pepck ha estat estudiada en diversos models, especialment en mamífers.

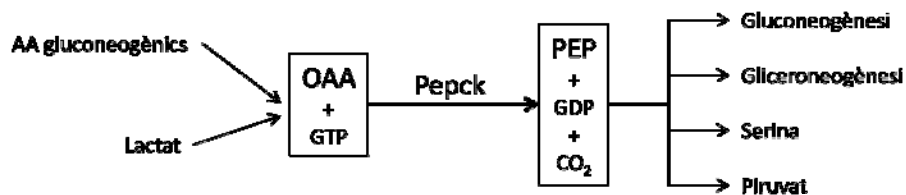


Figura 7.1 Reacció catalítica de Pepck. L'esquema representa la conversió de l'oxaloacetat (OAA) en fosfoenolpiruvat (PEP) per part de l'enzim Pepck, gastant un GTP i produint CO_2 . Igualment s'indiquen les principals fonts d'OAA així com els processos en els quals està implicat Pepck. AA: aminoàcids.

Ja fa temps que es coneix que l'expressió del gen es troba sota la regulació negativa de la insulina en fetge de rates (Shrago et al., 1963). Més recentment, estudiant hepatòcits de ratolins, s'ha constatat que l'expressió de Pepck l'estimulen el glucagó, els glucocorticoides, l'àcid retinòic i l'AMP cíclic, però sempre sota una inhibició dominant per part de la insulina. Això ha estat confirmat per la presència, en la seqüència del promotor de Pepck, d'elements de resposta al glucocorticoide i a l'AMP cíclic i seqüències sensibles a la insulina. Així, la presència d'insulina inhibeix l'acció del AMP cíclic i la unió dels glucocorticoides al promotor de Pepck (O'Brien et al., 1990). A més a més, el glucocorticoide facilita la unió de diversos factors de transcripció a la regió, com FoxO, que coordinen la transcripció del gen (Yang et al., 2009). Però la insulina, a través de la via del InR, tal com ja hem dit, fosforila FoxO i el reté al citosol, sent aquest un altre dels mecanismes pels qual inhibeix l'expressió de Pepck (Puigserver et al., 2003). La regulació de FoxO sobre la transcripció de Pepck ha estat comprovada en cèl·lules hepàtiques de mamífers, sent responsable de la hiperglucèmia present en aquells animals amb resistència a la insulina (Cheng i White, 2011).

La sobreexpressió de Pepck en ratolins resulta en simptomatologies similars a la diabetis de tipus II, la més comuna en humans (Sun et al., 2002). Si la sobreexpressió es focalitza només en el múscul esquelètic, s'obtenen ratolins que poden recórrer distàncies més grans, que són més agressius i viuen més temps que un ratolí control (Hanson i Hakimi, 2008).

En els insectes, s'ha utilitzat la seqüència de Pepck com a referència per reconstruir divergències filogenètiques (Friedlander et al., 1996), però són poques les investigacions sobre la seva regulació, descobrint-se recentment la seva inducció via hormona juvenil en cultius tissulars de *D. melanogaster*, que pot ser bloquejada per la presència d'ecdisona (Beckstead et al., 2007). Un altre estudi en mosques determina que Pepck és un dels gens inhibits quan les mosques s'alimenten amb nectarina, promovent la longevitat i la salut (Boyd et al., 2011). Destaquen els estudis que mostren com incrementa l'expressió de Pepck en larves de *D. melanogaster* mantingudes en dejuni (Zinke et al., 1999), de forma similar a com ho fa el InR (Zinke et al., 2002). En general, però, Pepck no és un enzim sobre el que s'hagi aprofundit massa en insectes, probablement degut a la existència prèvia de bons models en mamífers per als estudis sobre desordres metabòlics, com la diabetis.

En el nostre cas es va considerar interessant estudiar els nivells d'expressió de Pepck pel seu ús com a indicador de l'activitat de la via del InR, assumint una regulació similar a l'observada en estudis previs en altres organismes model, i per tal d'aprofundir en el coneixement que es té sobre aquesta via en insectes.

7.2 Resultats

En primer lloc, i tal com es va fer amb el InR, es va clonar la seqüència completa de Pepck. Es van emprar oligonucleòtids degenerats, basats en dominis conservats en diferents espècies, i mitjançant la tècnica de RT-PCR, i utilitzant com a motllo cDNA de cèl·lules embrionàries de *B. germanica* UM-BGE-1, es va obtenir un primer fragment de la seqüència. A partir d'aquest i gràcies a les tècniques del 3' i 5' RACE, es va anar amplificant la seqüència cap als dos extrems, fins a obtenir-la completa (Fig. 7.2). Comparant aquesta seqüència amb les existents en les bases de dades es va comprovar que la nostra seqüència coincidia amb la de Pepck d'altres espècies. Al alinear aquesta seqüència de Pepck de *B. germanica* amb d'altres de diverses espècies i fer un anàlisi filogenètic ens vam assegurar que efectivament es tractava de la seqüència homòloga de Pepck a la nostra espècie model, a la que anomenarem BgPepck a partir d'ara (Fig.7.3).

A continuació es van dissenyar una parella d'oligonucleòtids per tal d'analitzar els nivells d'expressió de Pepck. Ja que la gluconeogènesi, el principal procés en el que està implicat l'enzim Pepck, s'activa en moments de manca de nutrients, es van comparar els nivells de mRNA d'aquest gen en CA i cos gras de femelles dejunades i femelles alimentades, després de 1, 3 i 5 dies. Si bé no es van apreciar diferències significatives en CA, al cos gras els nivells de Pepck obtinguts eren significativament més elevats en les femelles dejunades que en les alimentades (Fig.7.4). Cal destacar també que els nivells relatius de mRNA de Pepck en cos gras són entre 20 i 50 vegades més alts que en CA.

Figura 7.2 Seqüència de BgPepck. Seqüència de nucleòtids i aminoàcids de BgPepck. La seqüència aminoacídica es mostra a sota de la nucleotídica.

Figura 7.3 Relacions filogenètiques de Pepck de *B. germanica*. L'arbre es va construir utilitzant l'aproximació de la màxima versemblança. La longitud de les branques és proporcional a la divergència entre seqüències. La barra representa 0,1 substitucions per lloc. Les xifres representen els valors de *bootstrap* per un total de 100 interaccions. L'arbre està arrelat a la separació entre invertebrats i cordats.

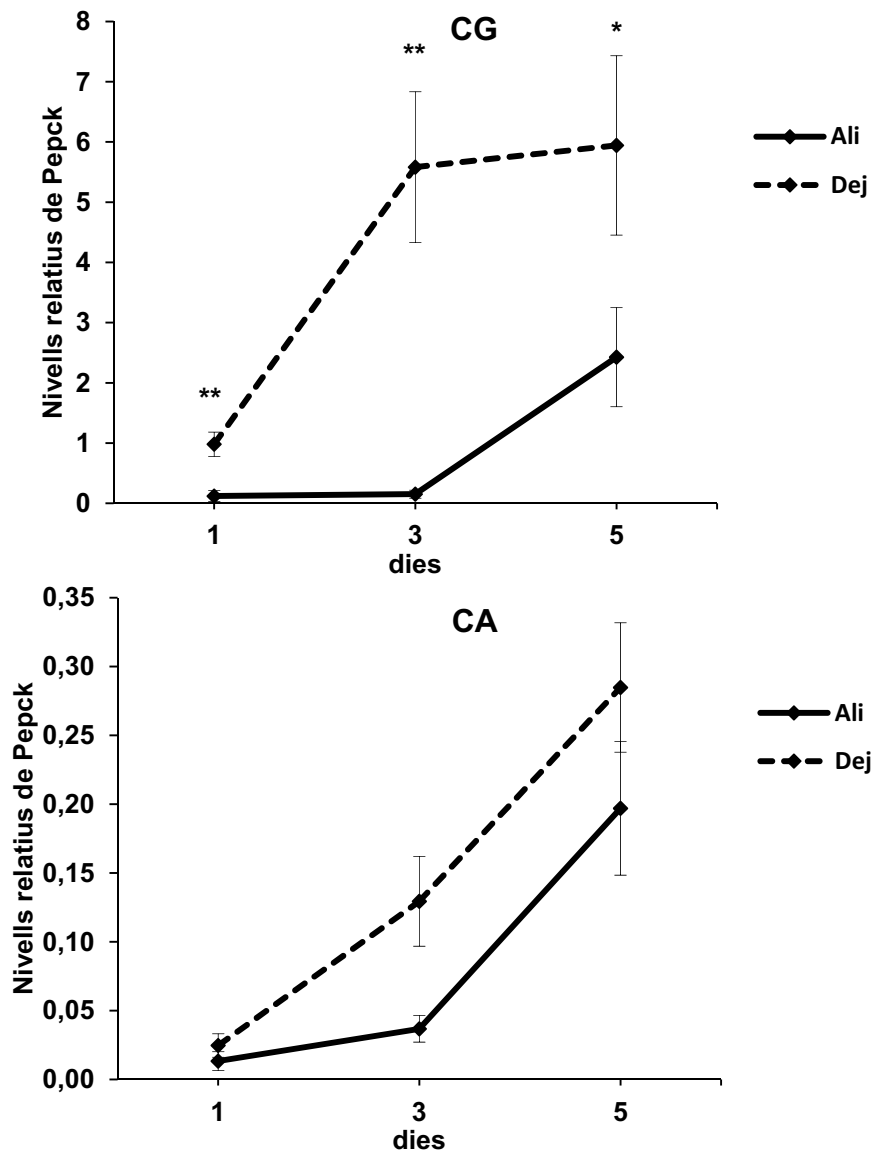


Figura 7.4 Nivells d'expressió de BgPepck en cos gras i CA de femelles adultes alimentades i dejunades durant 1, 3 i 5 dies. Nivells de mRNA de BgPepck en cos gras (CG) i CA de femelles de *B. germanica* alimentades (Ali) i dejunades (Dej) a dia 1 (n=6), dia 3 (n=10) i dia 5 (n=9) de la fase adulta. Les femelles dejunades només van rebre aigua a partir de la muda imaginal. Els resultats expressen la mitjana \pm error estàndard. Els asteriscs representen diferències significatives (test *t* d'Student, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Com hem vist en capítols anteriors, el silenciament del InR resulta en fenotips molt similars als observats en situació de dejuni. Per tal de verificar si aquesta idea era vàlida per a Pepck, una vegada havíem verificat que els nivells d'expressió de BgPepck pujaven en dejuni, en vam analitzar els nivells del seu mRNA en els cossos grassos de femelles adultes de cinc dies tractades amb dsInR i els vam comparar amb els nivells que presentaven femelles tractades amb un dsControl. Una part de tots dos grups de paneroles es van mantenir amb menjar i aigua, mentre que una altra part es va mantenir en dejuni, col·locant-les individualment sense menjar però amb aigua. Resulta interessant i sorprenent, però, veure com els nivells d'expressió de Pepck no augmenten en els teixits de les femelles tractades amb dsInR, sinó tot el contrari, ja que són significativament menors en comparació amb els obtinguts en femelles control (Fig. 7.5). A més, la interferència del InR també sembla contrarestar l'increment en els nivells de transcrit de Pepck deguts al dejuni (Fig. 7.5).

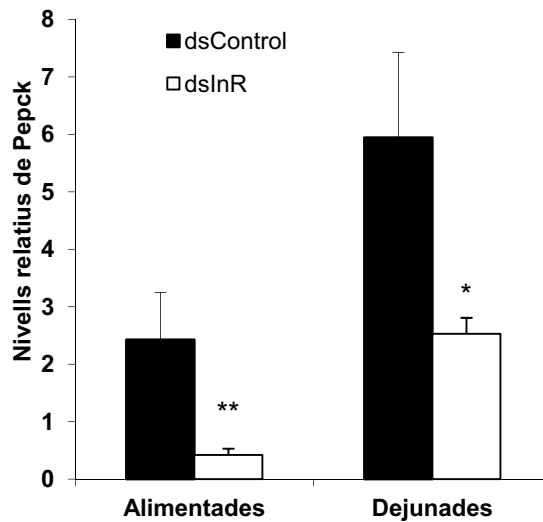


Figura 7.5 Efecte del dsInR sobre els nivells d'expressió de BgPepck en cos gras de femelles adultes alimentades i dejunades durant 5 dies. Nivells de mRNA de BgPepck en cos gras de femelles de *B. germanica* alimentades tractades amb dsRNA de polihedrina (dsControl) (n=15) i dsInR (n=13), i dejunades dsControl (n=9) i dsInR (n=4) a dia 5 de la fase adulta. Les femelles dejunades només van rebre aigua a partir de la muda imaginal. Els resultats expressen la mitjana \pm error estàndard. Els asteriscs representen diferències significatives entre dsControl i dsInR (test *t* d'Student, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Els resultats van ser els mateixos quan es va realitzar el mateix estudi en femelles adultes (Fig. 7.6). Aquest cop només es van estudiar femelles alimentades.

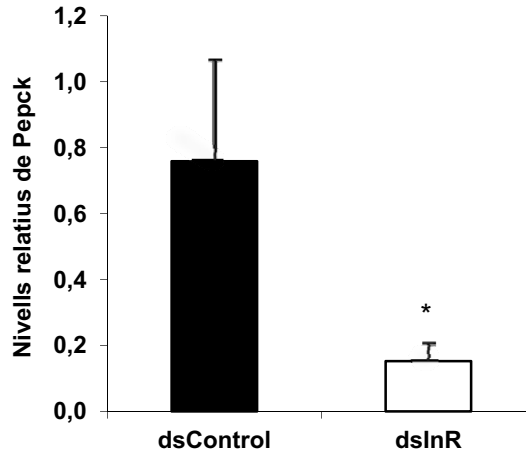


Figura 7.6 Efecte del dsInR sobre els nivells d'expressió de BgPepck en cos gras de femelles adultes alimentades. Nivells de mRNA de BgPepck en cos gras de femelles de *B. germanica* alimentades tractades amb dsRNA de polihedrina (dsControl) i dsInR (n=10) a dia 5 del segon cicle gonadotròfic. Els resultats expressen la mitjana \pm error estàndard. L'asterisc representa diferències significatives (test *t* d'Student, * $P \leq 0,05$).

7.3 Discussió

En aquest capítol hem clonat i analitzat la seqüència i la funció de Pepck a *B. germanica* (BgPepck). La comparació de la nostra seqüència amb les bases de dades BLAST i Pfam ens va confirmar la presència de dominis característics de la proteïna Pepck. BgPepck presenta un codó d'inici precedit en pauta de lectura d'un codó d'aturada, així com una seqüència poliA a continuació del codó d'aturada final, indicant que es va obtenir la longitud completa de la pauta oberta de lectura de la proteïna. L'anàlisi filogenètic, representat en la figura 7.3, mostra com BgPepck s'agrupa amb les seqüència de la resta d'insectes. L'arbre té l'arrel en la divergència entre invertebrats i vertebrats, mostrant una topologia similar a la filogènia més acceptada de les espècies incloses. L'arbre també mostra com la divergència entre les formes citosòlica i mitocondrial que trobem en vertebrats va ser prèvia a la separació

de les espècies dins d'aquest llinatge. Això no passa en les espècies d'invertebrats, com *C. elegans* o els dípters, que presenten més d'una forma per Pepck, apareixent les diverses formes un cop les espècies havien divergit. L'anàlisi de la seqüència i l'arbre filogenètic ens indiquen que la seqüència que hem clonat correspon a l'homòleg de Pepck a *B. germanica*.

Com a enzim implicat en la gluconeogènesi, resulta lògic que els nivells de mRNA de Pepck incrementin en situació de dejuni, ja que és en aquestes ocasions quan l'organisme necessita la producció de glucosa a partir d'altres substrats com els aminoàcids glucogènics o el lactat, per tal d'obtenir la glucosa que no pot obtenir de la dieta. El fet que no s'observin diferències als CA, però sí al cos gras, així com que en aquest els nivells d'expressió siguin molt més elevats que els de CA, respon a la diferent natura dels teixits. Mentre els primers són en essència un òrgan endocrí, en els que la gluconeogènesi podria ser poc rellevant, el cos gras és l'equivalent funcional del fetge i el teixit adipós dels mamífers. Ja que en aquests, el fetge és el principal encarregat de dur a terme la biosíntesi de glucosa a partir de precursors no glucídics, era d'esperar que en els insectes fos el cos gras el major responsable de l'activitat d'aquesta via metabòlica, tal com ens suggereixen aquests resultats, que coincideixen amb els observats en larves de *D. melanogaster* en dejuni (Zinke et al., 2002). Cal suposar, doncs, que de la mateixa manera que succeeix en mamífers, en els insectes la gluconeogènesi també s'activa quan els animals entren en períodes de dejuni i no tenen glucosa disponible provinent de la dieta, per tal de mantenir uns nivells circulants estables. Si bé en els insectes el sucre predominant que circula per la hemolimfa és el disacàrid trehalosa, aquesta deriva de la glucosa, estant formada per la unió de dues d'elles. El fet que Pepck s'expressi també en CA, i és probable que en altres teixits, i no només al cos gras, demostra que, tal com passa en mamífers, Pepck pot tenir un paper essencial en altres processos metabòlics, com la gliceroneogènesi (Reshef et al., 2003).

Resultats preliminars del nostre grup indiquen que l'increment en els nivells d'expressió de Pepck en situació de dejuni són modulats, almenys en part, pel factor de transcripció FoxO. Com hem mostrat, el dejuni estimula l'expressió de Pepck, però quan s'aplica un tractament amb dsRNA per silenciar FoxO s'anul·la l'increment de Pepck que provoca el dejuni (Songül Süren-Castillo, comunicació personal). Aquestes dades indicarien una regulació de l'expressió de Pepck en insectes similar a la

observada en mamífers, on FoxO indueix la gluconeogènesi al fetge mitjançant l'activació de la transcripció de Pepck (Cheng i White, 2011). Resultats similars es van trobar en cèl·lules de *D. melanogaster*, on l'activació constitutiva de FoxO provocava un increment en l'expressió de Pepck, similar al que s'observava a larves en situació de dejuni (Gershman et al., 2007). En canvi, la interferència del InR a *B. germanica*, que com hem vist al segon capítol de resultats, resulta en fenotips reproductius molt similars als obtinguts al sotmetre els insectes a períodes de dejuni, no sembla produir el mateix efecte sobre l'expressió de Pepck. Tot i que a l'inhibir la via del InR, FoxO hauria d'estar actiu, l'expressió de Pepck no només no augmenta com en el dejuni, sinó que es redueix significativament. Tenint en compte que les paneroles s'alimenten normalment, es podria considerar una via alternativa a FoxO per la qual s'inhibís la transcripció de Pepck quan els animals mengen. Una altra possibilitat seria que amb FoxO activat no hi hagués prou per a estimular l'expressió de Pepck, ja que com s'ha vist en mamífers, la regulació d'aquest gen no només dependria de FoxO, sinó també d'altres elements com l'AMP cíclic (O'Brien et al., 1990). Però els nivells d'expressió de Pepck no només no augmenten, sinó que són significativament menors en el cos gras de femelles tractades amb dsInR que en el de femelles control, suggerint que l'expressió de Pepck necessita que la via del InR estigui activa.

Els resultats encara són més sorprenents quan analitzem els nivells de mRNA de Pepck en cos gras de femelles dejunades. Al comparar les tractades amb dsInR i les control, si bé en aquestes s'observa l'augment d'expressió del gen respecte a les femelles control alimentades, tal com ja hem vist, aquest augment desapareix sota l'efecte del dsInR. En dejuni, el tractament amb dsInR esperàriem que tingués un efecte redundant, ja que la via del InR no hauria d'estar activa i, per tant, FoxO sí que ho estaria, però les dades de femelles dsInR dejunades confirmen el que ja intuïem per les dades de paneroles alimentades, que l'expressió de Pepck necessita que la via del InR estigui activa, o si més no que sigui funcional. El mecanisme pel qual la via del InR activa la transcripció de Pepck és desconegut, però el simple fet de l'existència d'aquest mecanisme ja suposa una novetat important en el metabolisme del nostre insecte model i, a un nivell evolutiu, suposa un repte per a l'estudi de la gluconeogènesi i la regulació dels nivells de sucres circulants.

Aquests resultats es mantenen quan la interferència del InR es realitza en femelles adultes i no en nimfes, indicant que no es deuen a desajustos en el desenvolupament de les paneroles. Convindria comprovar si la regulació de Pepck via InR és exclusiva de *B. germanica* o si es pot generalitzar a la resta d'insectes. Si es tracta del darrer cas, s'haurien d'estudiar els processos pels quals en mamífers s'ha perdut aquesta necessitat de tenir activada la via del InR. Caldria tenir en compte les diferències metabòliques entre mamífers i insectes per intentar trobar la raó d'aquests resultats, ja que idees consolidades des de la dècada dels 60 a partir d'estudis amb mamífers, com la inhibició de Pepck per part de la insulina (Shrago et al., 1963), no serien premisses vàlides, o almenys completament vàlides, per als insectes. En qualsevol cas, els estudis de Pepck en *B. germanica*, obren nous interrogants sobre la regulació de Pepck que caldrà resoldre en un futur.

Un altre motiu per estudiar l'expressió de Pepck era el seu paper en la gliceroneogènesi, via per la qual es poden arribar a biosintetitzar triacilglicèrids a partir de piruvat, lactat i alguns aminoàcids quan la situació nutricional ho requereix. Com hem vist al capítol anterior, les paneroles tractades amb dsInR presenten una major resistència al dejuni que les del grup control. Una possible causa d'aquesta diferència podria ser l'activació de la gliceroneogènesi durant l'etapa prèvia al dejuni en les femelles dsInR, assumint que el bloqueig de la via del InR faria augmentar l'expressió de Pepck i l'activitat de la via, fent que aquestes femelles tinguessin una major quantitat de triacilglicèrids acumulats que podrien utilitzar com a reserva un cop s'iniciés el dejuni, de forma similar al que s'observa en ratolins transgènics que sobreexpressen Pepck i incrementen l'acumulació de teixit adipós (Franckhauser et al., 2002). En canvi, els resultats mostrats en aquest capítol, demostren que Pepck s'expressa encara menys en el cos gras de les femelles dsInR que en les control. D'aquesta manera podem descartar que el major nivell de triacilglicèrids que presenten les femelles dsInR es degui a una major activitat de Pepck en la gliceroneogènesi i obre la possibilitat de que el major nivell de triacilglicèrids sigui degut a una reducció en els nivells de lipòlisi o a d'altres causes.

En conjunt, els resultats d'aquest capítol indiquen que, tot i que l'expressió de Pepck s'activa en dejuni, seria necessari que el InR sigui funcional per a l'activació màxima de l'expressió de Pepck.

8. CLONATGE I ESTUDI DE S6K

8.1 Antecedents

Com s'ha explicat a la introducció, la via de TOR és un regulador important del creixement cel·lular mitjançant el control que exerceix sobre la síntesi de proteïnes. Per tal d'incrementar els nivells de síntesi de proteïnes les cèl·lules poden augmentar l'eficiència dels ribosomes ja existents o poden incrementar la capacitat de traducció produint nous ribosomes, tot i que el més probable és que siguin totes dues alternatives alhora. TOR sembla ser un component clau en la regulació de tots dos processos com a resposta a diferents estímuls (Hay i Sonenberg, 2004). Els principals efectors d'aquesta regulació són 4EBP (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein*) i S6K (*Ribosomal S6 protein kinase; p70 S6K*). Mentre que la fosforilació per part de TOR del primer atura la traducció en absència de factors de creixement o nutrients, quan aquests hi són presents TOR fosforila S6K i aquesta fosforilació estimula la síntesi de proteïnes. A més, S6K també està implicat en la síntesi de RNA ribosomal (rRNA), pas clau per a la biogènesi de ribosomes (Hannan et al., 2003).

La quinasa S6K fosforila la proteïna ribosomal S6, entre d'altres. Alhora, la pròpia S6K està regulada per fosforilació, i regula diversos processos cel·lulars com la síntesi de proteïnes, el processament de mRNA, l'homeòstasi de la glucosa, la reestructuració del citoesquelet, el creixement cel·lular o el cicle cel·lular (Fenton i Gout, 2011). L'activació de S6K necessita d'una complexa sèrie de fosforilacions. El model més convencional, basat en el que es coneix en mamífers, divideix el procés en quatre passos (Fig. 8.1). En el primer, en un procés dependent del calci, es trenca la interacció entre els dominis C-terminal i N-terminal (Hannan et al., 2003). Això permet la fosforilació de quatre motius autoinhibitoris per part de TOR (Isotani et al., 1999). D'aquesta manera, en el tercer pas, TOR té accés al lloc crític de fosforilació (Treonina389 en S6K1 de ratolí) situat al motiu hidrofòbic de la proteïna (Saitoh et al., 2002). Finalment, PDK1 fosforila el lloc d'activació del domini catalític de S6K (Treonina229 en S6K1 de ratolí), estabilitzant la proteïna activa i conduint-la, presumiblement, a la seva màxima activació (Pullen et al., 1998; Pullen i Thomas, 1997).

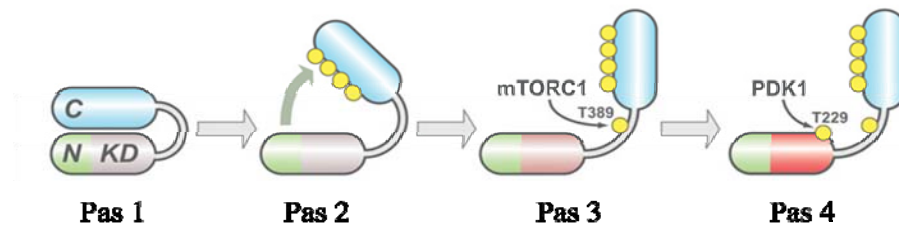


Figura 8.1 Activació per passos de S6K. Pas 1: Alliberació de la unió autoinhibidora dels extrems C-terminal (C) i N-terminal (N). Pas 2: Fosforilació del domini C-terminal. Pas 3: Fosforilació, per part de TOR, al motiu hidrofòbic. Pas 4: Fosforilació, per part de PDK1, del domini catalític (KD). Imatge adaptada de Magnuson et al.; 2012.

D'aquesta manera, S6K està regulada tant per la via de TOR, com per la via del InR, a través de PDK1. Quan els animals s'alimenten i augmenta la concentració d'aminoàcids i de factors de creixement circulants (insulina i IGF, en mamífers, o ILPs en insectes), totes dues vies s'activen, essent S6K un dels seus efectors finals.

Estudis recents apunten cap a un mecanisme d'activació de S6K alternatiu, en el que seria suficient l'estímul dels aminoàcids provinents de la dieta per tal d'activar S6K mitjançant l'activació de TOR, directament o a través d'alguna proteïna intermediària, com una PI3K de classe 3, diferent de la PI3K de la via del InR (Gulati i Thomas, 2007).

La primera en ser descoberta i la més ben estudiada diana de S6K va ser la proteïna ribosomal S6, la fosforilació de la qual produeix un augment de la síntesi de proteïnes i el consegüent augment de la mida de les cèl·lules (Ruvinsky i Meyuhas, 2006). Però des de llavors s'han descobert i estudiat moltes altres dianes de S6K, com eIF4B o eEF2K, que juntament amb S6, permeten a S6K controlar la biogènesi de ribosomes, alguns processos metabòlics, la síntesi de lípids, així com la supervivència cel·lular, la sensibilitat al dany al DNA i la plasticitat sinàptica, entre d'altres (Magnuson et al., 2012). També es va revelar l'acció inhibidora que S6K tenia sobre el IRS, creant una retroalimentació negativa que atura la senyalització nutricional quan aquesta perdura massa en el temps o com a conseqüència de mutacions (Shah et al., 2004).

En mamífers existeixen dues proteïnes S6 quinases similars, anomenades S6K1 i S6K2, codificades per dos gens diferents. Tots dos gens codifiquen per 2 isoformes diferents (p70S6K i p85S6K per S6K1; p60S6K i p54S6K per S6K2), resultat d'un *splicing* alternatiu i de diferents punts d'inici de la traducció (Grove et al., 1991; Lee-Fruman et al., 1999).

En ratolins mutants pels dos gens de S6K s'ha comprovat que, si bé són redundants en la fosforilació de la proteïna ribosomal S6, totes dues produeixen diferents fenotips. Mentre els ratolins mutants per S6K1 són significativament més petits que els control, veient-se afectat el creixement cel·lular i el metabolisme; els mutants per S6K2 no veuen afectada la mida de les seves cèl·lules ni la mida de l'animal. Els dobles mutants resulten en una elevada mortalitat perinatal (Pende et al., 2004). La manca de S6K1 en ratolins també els hi confereix resistència a la obesitat induïda per l'envelliment i la dieta. Mentre els ratolins control sotmesos a una dieta rica en greixos mostren nivells elevats de S6K, en contraposició amb els mutants, sense S6K, que bloquegen la via del InR inhibint el IRS, i provocant obesitat i resistència a la insulina. Els ratolins mutants, mantenen el nivell de glucosa estable degut a la seva hipersensibilitat a la insulina, causada per la manca d'inhibició del IRS per part de S6K (Um et al., 2004).

En insectes, totes les investigacions indiquen l'existència d'un únic gen que codifica per S6K. A *D. melanogaster* la pèrdua de S6K implica una reducció de la mida dels insectes com a conseqüència de la disminució de la mida de les cèl·lules, però no del nombre de cèl·lules. Presenten, a més, una viabilitat reduïda i un desenvolupament retardat (Montagne et al., 1999). La via de TOR també sembla jugar un paper important en l'augment de la longevitat degut a restriccions calòriques. Així, a *D. melanogaster*, l'expressió d'al·lels dominants negatius de S6K incrementa la longevitat en resposta a la restricció calòrica, efecte que es veu contrarestat per l'expressió constitutiva de S6K (Kapahi et al., 2004).

Al mosquit *A. aegypti* es va observar com els aminoàcids estimulen la fosforilació d'S6K en cos gras *in vitro*, sent aquesta revertida pel tractament amb l'inhibidor de TOR rapamicina (Hansen et al., 2005). A més, la interferència de S6K redueix la producció de vitelogenina *in vitro* i atura el desenvolupament dels ous *in*

vivo, demostrant la importància de S6K i de la via de TOR per a la regulació de la reproducció en relació a l'estat nutricional de les femelles de mosquits.

Estudis recents han proporcionat dades que indiquen la importància de diversos components de la via de TOR, entre ells la S6K, en el procés de diferenciació de castes d'*A. mellifera* (Kamakura, 2011).

L'objectiu del present capítol és estudiar a *B. germanica* la funció de S6K, així com comprovar els mecanismes reguladors de la seva fosforilació. També hem volgut estudiar la possibilitat d'utilitzar l'anàlisi de l'estat de fosforilació de S6K, en particular de la fosforilació per part de TOR, com a marcador de l'activació de la via de TOR, la via principal d'activació de S6K, i també de l'activació de la via del InR, per analitzar les possibles interaccions entre les dues vies.

8.2 Resultats

8.2.1 Clonatge de la seqüència de BgS6K

Per realitzar el clonatge de la seqüència de S6K en *B. germanica* es van dissenyar diversos encebadors degenerats basant-se en les regions més conservades de la proteïna. Per detectar aquestes regions es van alinear les seqüències d'aminoàcids de les S6K de *Homo sapiens*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, dues variants de *Apis mellifera*, *Artemia franciscana* i *Drosophila melanogaster*. Un cop determinades aquestes regions es van dissenyar encebadors degenerats amb els què, utilitzant combinacions de sèries d'amplificació per PCR, es va poder clonar un primer segment propi de la nostra espècie d'estudi, a partir de cDNA obtingut de cultius cel·lulars provinents de cèl·lules embrionàries de *Blattella* UM-BGE-1. Amb el nou segment es van dissenyar nous primers específics per acabar de clonar la seqüència de S6K mitjançant les tècniques del 5' i el 3' RACE.

Durant el procés de clonatge es va veure que en amplificar una determinada regió de la seqüència apareixien dues bandes de mida diferent. Es van clonar totes dues bandes i es va veure que hi havia 66 nucleòtids de diferència entre elles. A l'analitzar les dues seqüències es va comprovar que el fragment de 66 nucleòtids addicionals de la seqüència més llarga era molt similar als 66 nucleòtids següents de la seqüència, amb només 7 nucleòtids diferents. Al traduir-ho a aminoàcids, dels 22

que corresponen al fragment en qüestió, només 3 eren diferents entre les seqüències repetides (Fig.8.2B). Les seqüències d'aminoàcids totals mostraven una similitud del 83,0% la curta i del 81,6% la llarga amb la S6K de *D. melanogaster* i del 81,6% i 79,3% en comparació amb la S6K de *H. sapiens*.

A

B

S6K curta

SANLVFQ**GFTYVAPSVLEEMYKPPRI**VKARSPRK**TAY**

S6K llarga

SANLVFQ**GFSYVAPSVLEEMYKPPH**MVK**AGFTYVAPSVLEEMYKPPRI**VKARSPRK**TAY**

Figura 8.2 Seqüència de BgS6K. A; seqüència de nucleòtids i aminoàcids de BgS6K. La seqüència de la S6K més curta es correspon amb els nucleòtids en majúscules, mentre que per la seqüència més llarga cal afegir els 66 nucleòtids en minúscules, dins del requadre vermell. La seqüència aminoacídica es mostra a sota de la nucleotídica. B; detall de la seqüència d'aminoàcids de la versió curta (a dalt) i de la versió llarga (a baix) on s'aprecien els 3 aminoàcids que varien d'un fragment a l'altre (blau). En vermell el segment extra, i en verd el segment a partir del qual sembla que s'hagi duplicat l'anterior.

8.2.2 Anàlisi de les seqüències de BgS6K

Comparant les dues seqüències amb les existents en les bases de dades es va comprovar que totes dues comptaven amb un domini característic de les proteïnes quinases, encarregat de la transferència d'un grup fosfat a un aminoàcid de la proteïna substrat (Fig. 8.3A). Al alinear les seqüències de S6K de *B. germanica* amb d'altres de diverses espècies per ClustalX i fer un anàlisi filogenètic es va comprovar que totes dues seqüències es corresponen amb isoformes de S6K (Fig. 8.3B). Les posicions que no s'alineaven bé i les regions divergents van ser eliminades de l'anàlisi utilitzant Gblocks 0.91b, seleccionant 349 posicions, el 48% de les 715 posicions originals. L'anàlisi va mostrar com la seqüència duplicada contenia un lloc de fosforilació per TOR en l'aminoàcid treonina (T) 390 de la banda més curta. En la banda més llarga aquesta treonina es veia substituïda per una serina (S), desplaçant la T fins a la posició 412.

A



B

8.2.3 Estudi de l'expressió de BgS6K

A continuació, mitjançant PCR, es va analitzar la presència de totes dues isoformes de S6K en diferents teixits, observant patrons d'expressió lleugerament diferents segons el teixit (Fig. 8.4). Degut a la similitud entre les dues S6K no va ser possible dissenyar encebadors específics per a cada una de les isoformes per tal de quantificar les proporcions d'expressió tissular realitzant qPCR. En canvi, es van utilitzar encebadors que flanquegen la regió duplicada, que produïen bandes de 154 i 220 pb segons amplifiquessin la forma curta o la forma llarga, respectivament.

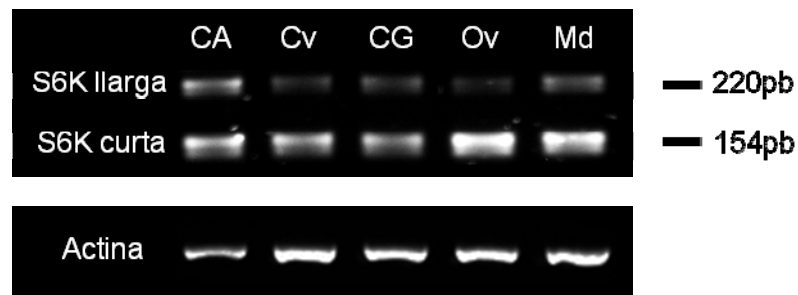


Figura 8.4 Diferències d'expressió de les dues isoformes de S6K en diferents teixits. Anàlisi per PCR semiquantitativa de les isoformes llarga i curta de S6K de *B. germanica* en diferents teixits (CA: corpora allata; Cv: cervell; CG: cos gras; Ov: ovaris; Md: mesodeu). Es va utilitzar l'actina com a referència.

Sembla que en tots els teixits la forma més abundant seria la curta, mentre que de la llarga, a on trobaríem una major proporció seria als CA.

Figura 8.3 Anàlisi de les seqüències de BgS6K. A; Estructura de les proteïnes S6K de *B. germanica*. Els aminoàcids marcats (T i S) indiquen els aminoàcids homòlegs a la Thr 389 de ratolí, punt clau de la regulació per fosforilació de TOR. B; Relacions filogenètiques de les seqüències de BgS6K. L'arbre es va construir utilitzant l'aproximació de la màxima versemblança. La longitud de les branques és proporcional a la divergència entre seqüències. La barra representa 0,1 substitucions per lloc. Les xifres representen els valors de *bootstrap* per un total de 100 interaccions. L'arbre està arrelat a la separació entre invertebrats i cordats. Per *B. germanica* es va utilitzar la forma llarga.

8.2.4 Efecte de la interferència de S6K

A partir de les seqüències de S6K es va dissenyar i sintetitzar un RNA de doble cadena contra una regió comuna de les dues isoformes per tal de reduir els nivells de mRNA de S6K mitjançant la seva interferència. Es van aplicar 2µg de l'RNA d'interferència en femelles recent emergides com a nimfes de cinquè estadi i es va repetir l'operació quan aquestes mudaven a la sisena i darrera fase nimfal. Les disseccions dels diferents teixits es van realitzar al cinquè dia de vida adulta.

Un dels primers efectes de la interferència de S6K que es van poder observar va ser un cert retràs en la darrera muda, quan les nimfes esdevenen femelles adultes. Mentre que en el cinquè estadi nimfal no s'observen diferències significatives, quan les nimfes dsS6K muden a adultes ho fan aproximadament un dia més tard que les femelles control. Així, mentre que en les femelles control la sisena i darrera fase nimfal dura 7,94 dies de mitjana, en les interferides per S6K s'allarga fins a 8,83 (Fig. 8.5).

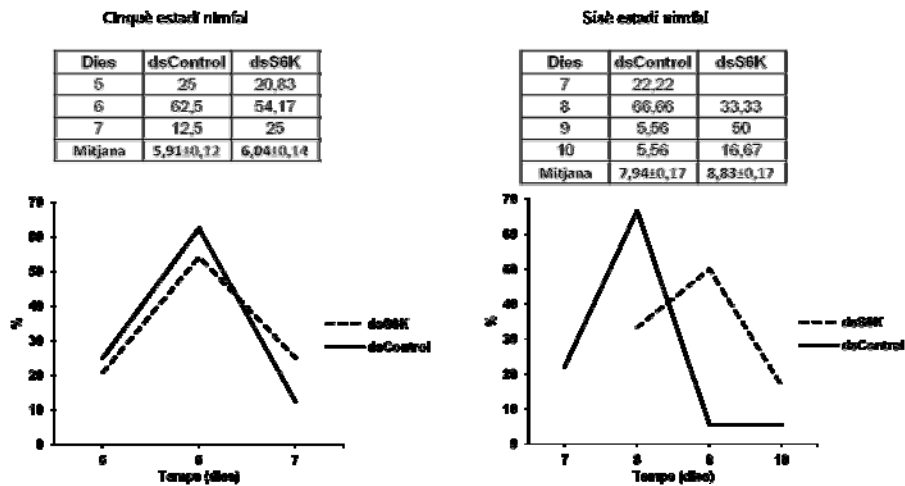


Figura 8.5 Durada dels darrers estadis nimfals. Les taules indiquen, en la seva primera columna, els dies en que es va produir la muda, en la segona i tercera columna s'indica el percentatge de nimfes dsControl i dsS6K que van mudar cada dia. Les figures són la representació gràfica de les dades de les respectives taules. n=24 per l'estadi cinquè i n=18 per l'estadi sisè (p<0,001 test t d'Student).

A continuació es van dissenyar encebadors comuns per les dues isoformes de S6K, ja que no era possible sintetitzar-ne d'específics degut a la similitud de les seqüències, per tal de quantificar l'expressió total de S6K utilitzant la qPCR. Així es va poder comprovar l'eficiència de la interferència en CA, mesurant els nivells de mRNA de S6K per qPCR. Els valors obtinguts indicaven una reducció significativa dels nivells de transcrit en un 90%, confirmant la correcta interferència de S6K. (Fig. 8.6).

En aquests CA es van quantificar els nivells d'expressió de tres enzims implicats en la biosíntesi d'HJ, constatant una disminució significativa de HMG-S1 i HMG-R, encara que no de HMG-S2 (Fig. 8.7).

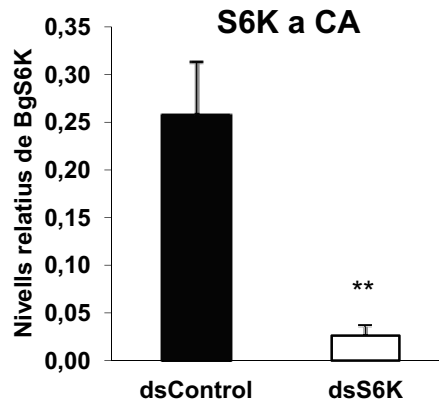


Figura 8.6 Efecte del dsS6K en els CA de *B. germanica*. Nivells de mRNA de BgS6K, mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA de S6K per còpia de mRNA d'actina 5C, en CA (n=6) de femelles tractades amb dsRNA de S6K (dsS6K) i amb dsRNA de polihedrina (dsControl). Els asteriscs representen diferències significatives (test *t* d'Student; **p<0,01).

Figura 8.8 Efecte del dsS6K en el cos gras de *B. germanica*. Nivells de mRNA de BgS6K, mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA de S6K per còpia de mRNA d'actina 5C, en cos gras (n=14) de femelles tractades amb dsRNA de S6K (dsS6K) i amb dsRNA de polihedrina (dsControl). Els asteriscs representen diferències significatives (test *t* d'Student; ***p<0,001).

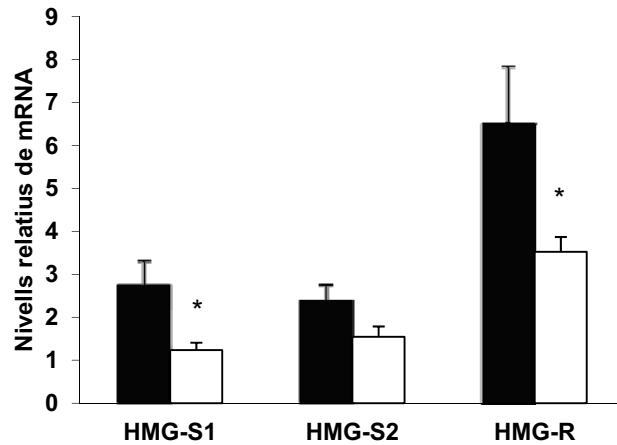
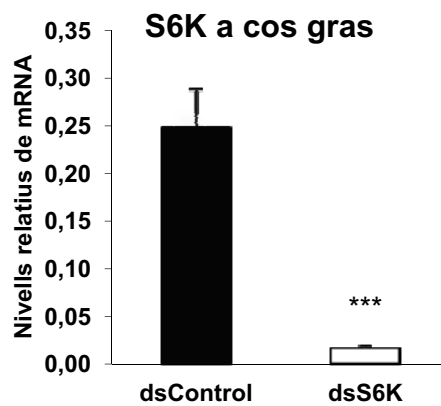


Figura 8.7 Efecte del dsS6K sobre els nivells d'expressió dels enzims de la via de biosíntesi de l'HJ. Nivells de mRNA mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA del gen d'estudi per còpia de mRNA d'actina 5C, a partir de cDNA de CA obtingut de femelles tractades amb dsControl (en negre) i dsInR (en blanc) (n=6). Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard i els asteriscs representen diferències significatives (test *t* d'Student, * $p < 0,05$).

Tot seguit es van analitzar els nivells de mRNA de S6K al cos gras per qPCR i d'aquesta manera es va confirmar l'eficiència de la interferència en aquest teixit, que arribava a un 94% de reducció del transcrit de S6K (Fig. 8.8).



Donat que en d'altres insectes s'havia observat una disminució de la producció de Vg en el cos gras quan s'interferia S6K, i que havíem observat una disminució dels enzims implicats en la biosíntesi d'HJ en els CA, es van mesurar els nivells de mRNA de Vg en el cos gras de femelles de *B. germanica* tractades amb dsS6K, observant una reducció significativa del 60% (Fig. 8.9). Aquests resultats concorden amb la longitud de l'òcit basal, significativament menor quan es tracta de femelles dsS6K respecte femelles control (Fig. 8.9).

A continuació es va mesurar l'expressió de Pepck en cos gras de femelles tractades amb dsS6K i dsControl, observant una davallada significativa de l'expressió de Pepck al cos gras de femelles dsS6K, reduint-se un 99% respecte a les control (Fig. 8.10).

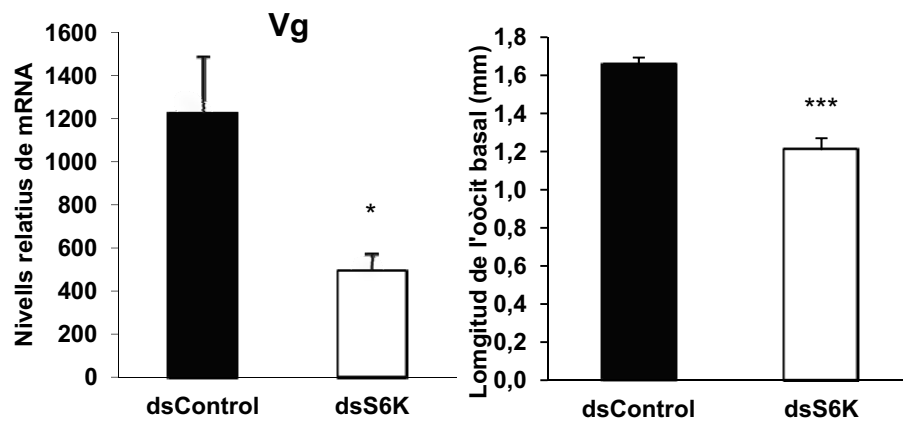


Figura 8.9 Efecte del dsS6K sobre els nivells d'expressió de la Vg i sobre la longitud de l'òcit basal. A l'esquerra, nivells de mRNA mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA de Vg per còpia de mRNA d'actina 5C, a partir de cDNA de cos gras obtingut de femelles tractades amb dsControl (en negre) o dsInR (en blanc) (n=10). A la dreta, longitud de l'òcit basal de femelles dsControl i femelles dsS6K (n=35). Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard. Els asteriscs representen diferències significatives (test *t* d'Student, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

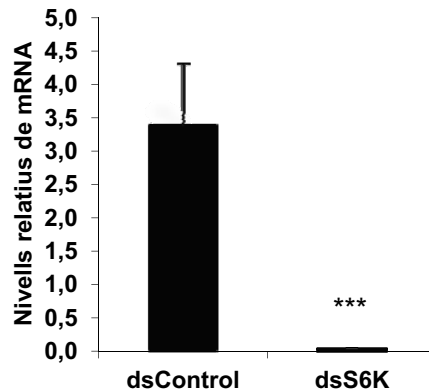


Figura 8.10 Efecte del dsS6K sobre els nivells d'expressió de Pepck al cos gras. Nivells de mRNA mesurats per qPCR expressats com a còpies de mRNA de Pepck per còpia de mRNA d'actina 5C, a partir de cDNA de CA obtingut de femelles tractades amb dsControl i dsS6K (n=10). Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard i els asteriscs representen diferències significatives (test *t* d'Student, *** p <0,001).

8.2.5 Anàlisi dels nivells de proteïna S6K

Per tal d'estudiar el nivell d'activació de S6K es va provar d'analitzar la fosforilació de la proteïna. Es va encarregar la síntesi un anticòs específic contra la regió que comprenia els 18 primers aminoàcids de la proteïna (MAGVFDIELLDADQVDQD) amb el que es va analitzar la presència de la proteïna en extractes proteics obtinguts a partir del cos gras de femelles control alimentades i dejunades. Per assegurar l'especificitat de l'anticòs es va incubar una alíquota de l'anticòs amb el fragment del pèptid contra el què es va dissenyar, abans d'exposar-lo a la membrana de nitrocel·lulosa amb les proteïnes de les mostres. Com a control negatiu es van utilitzar mostres de cos gras de femelles tractades amb dsS6K. Els resultats mostraven la manca de senyal deguda al bloqueig de l'anticòs per part del pèptid, que ens confirma l'especificitat de l'anticòs sintetitzat, així com que la interferència fa disminuir els nivells de proteïna fins a nivells no detectables per la tècnica de *western blot* (Fig. 8.11).

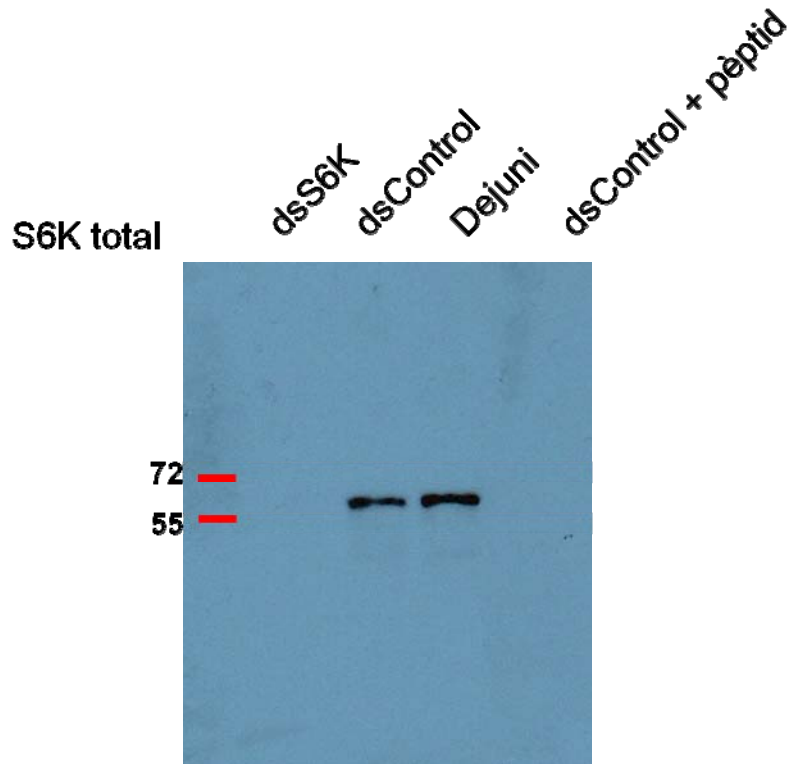


Figura 8.11. Detecció per Western blot dels nivells de proteïna S6K total en cos gras. La imatge mostra la banda corresponent a la proteïna S6K.

L'objectiu d'aquesta part de l'estudi era comparar els nivells totals de proteïna S6K, detectats amb l'anticòs que havíem fabricat, amb els nivells de S6K fosforilada en el aminoàcid homòleg a la T389 de mamífer, punt clau de la regulació de l'activitat de la proteïna. A la nostra espècie l'aminoàcid homòleg a aquest es correspon a la T390 de la forma curta i a la S390 i la T412 de la forma llarga. Aquesta possibilitat de tenir dos llocs de fosforilació per part de TOR afegeix interès a aquest estudi.

Tot i que en la bibliografia està descrita l'efectivitat de diversos anticossos comercials contra la forma fosforilada en la T389 de mamífers, o contra la S6K fosforilada de *Drosophila*, els resultats obtinguts amb mostres de cos gras de *B. germanica* i aquests anticossos no han estat satisfactoris. No obstant, estem treballant en fórmules alternatives per detectar l'activació de S6K a *B. germanica*.

8.3 Discussió

En aquest darrer capítol de resultats s'han mostrat els principals resultats obtinguts en referència a l'estudi de la proteïna S6K i la seva regulació. En primer terme es va clonar la seqüència de S6K, homòleg de la p70 S6K d'humans, a *B. germanica* i es van obtenir dues versions de la seqüència que difereixen en només 66 nucleòtids, corresponents a dues isoformes diferents. Aquests 66 nucleòtids codifiquen per a una regió de 22 aminoàcids sorgida per la duplicació del fragment adjacent, diferint en només 7 nucleòtids i 3 aminoàcids. D'aquesta manera, la isoforma més llarga hauria aparegut com a conseqüència de la duplicació del fragment de 66 nucleòtids.

Com que, llevat del fragment duplicat, les dues seqüències de BgS6K són idèntiques entre elles, ens vam centrar en aquest fragment, que conté un punt clau de regulació de la proteïna per fosforilació de TOR. Precisament, l'aminoàcid que fosforila TOR és un dels 3 aminoàcids que varien d'una isoforma a l'altra. Concretament es tracta de la treonina 390, anàloga a la treonina 389 de la S6K1 de mamífer, la fosforilació de la qual es considera crítica per a la funcionalitat de S6K (Pullen i Thomas, 1997). Tot i que en la isoforma llarga la treonina ha estat substituïda per una serina, i donat que TOR pot fosforilar tan residus de treonina com de serina, aquest podria seguir sent un punt clau de regulació per fosforilació de TOR. La duplicació del fragment, per tant, podria afegir un nou punt de regulació en la treonina 412 de la isoforma llarga, que podria ser fosforilable per TOR. Les implicacions funcionals d'aquesta duplicació hauran de ser estudiades amb més profunditat en futurs treballs. Observant la seqüència es pot comprovar que a *B. germanica* també es conserva un dels punts de fosforilació per TOR que eliminen l'efecte autoinhibidor (veure Fig. 8.1), en particular el lloc homòleg a la S411 de mamífer, que a *B. germanica* correspon a la S411 de la forma curta o S433 de la llarga. També està conservat el lloc de fosforilació per PDK1, la T229 de mamífer, que en el cas de *B. germanica* correspon a la T230. Per tant, els processos de regulació de l'activitat de S6K a *B. germanica* semblen similars als demostrats en mamífers.

Els resultats de contrastar les nostres seqüències amb les presents a les bases de dades utilitzant els programes BLAST i PFAM ens confirmen que totes dues isoformes de *B. germanica* conserven un domini catalític comú proteïna quinasa,

característic d'aquestes proteïnes. És aquest domini el que els permet dur a terme la fosforilació de les proteïnes diana. Davant del codó d'inici trobem un codó d'aturada, i el codó d'aturada final va seguit d'una seqüència poliA, suggerint que hem obtingut la longitud completa de la pauta oberta de lectura de la proteïna.

L'arbre filogenètic ens mostra com la seqüència de S6K de *B. germanica* queda agrupada dins del grup dels insectes, indicant que es tracta de l'homòleg de S6K de l'espècie. La topologia de l'arbre, arrelat en la divergència entre invertebrats i cordats, no difereix de la filogènia més acceptada per les espècies que s'hi mostren. La mida de les branques dels cordats, més curtes que les dels invertebrats, indiquen una elevada conservació de les seqüències. En canvi, la longitud de les branques de *C. elegans* i *A. pisum*, les més allargades juntament amb les de *T. castaneum*, assenyalen una ràpida taxa de divergència.

Tot i que degut a la similitud entre les seqüències de totes dues isoformes de S6K no va ser factible el disseny d'encebadors específics per a cadascuna una d'elles, es va poder analitzar la seva presència en diversos teixits per PCR semiquantitativa. Els resultats mostren com les dues bandes, corresponents a les mides de les dues formes de S6K presents en *B. germanica*, estan presents en tots els teixits analitzats, si bé mostren diferents patrons d'expressió segons el teixit. L'isoforma curta és predominant en tots els teixits, mentre que l'isoforma llarga té major presència en CA en comparació amb els altres teixits. Futurs estudis podran aprofundir en les diferències d'expressió de les dues formes de S6K segons el teixit i relacionar aquesta diferència amb les possibles diferents funcions que duguin a terme cadascuna d'elles.

A continuació, el disseny d'un RNA d'interferència contra S6K, va permetre reduir els nivells de mRNA total de S6K. L'eficiència de la interferència es va quantificar mesurant els nivells d'expressió de S6K en cos gras i CA, resultant en una reducció significativa del 94% i el 90% respectivament.

Ja que quan realitzem anàlisis per PCR quantitativa no podem diferenciar entre les dues formes de S6K, cal tenir en compte que quan parlem d'aquests resultats ens referim a nivells d'expressió de S6K total, englobant el de totes dues isoformes.

Un dels efectes de la interferència de S6K que es van poder observar era que la darrera fase ninfal s'allarga un dia més en les femelles dsS6K respecte a les

femelles control. Aquest efecte és similar al que hem pogut observar per la interferència del InR (veure capítol 5), si bé menys accentuat. Les mosques *D. melanogaster* mutants per S6K també mostren un important retràs en el desenvolupament, acompanyat per una important reducció de la mida corporal (Montagne et al., 1999). Aquesta reducció es deu a una disminució en la mida de les cèl·lules però no a una disminució del nombre de cèl·lules. En el nostre cas no vam mesurar la diferència de mida entre les femelles control i les dsS6K.

Tal com passa en les femelles interferides pel InR, els enzims de la via del mevalonat analitzats en CA, implicats en la biosíntesi de l'HJ, també veuen significativament reduïda la seva expressió, excepte la HMG-sintasa 2. La interferència de S6K a *B. germanica* també provoca una reducció en l'expressió de la Vg a cos gras que es correspon amb una menor mida de la longitud de l'oòcit basal. Aquesta disminució de la producció de Vg al cos gras podria ser conseqüència de la menor producció d'HJ al CA deguda a la interferència de S6K. Resultats similars es van observar al reduir els nivells de S6K per interferència en cossos grassos de femelles del mosquit *A. aegypti* cultivats *in vitro*, en els que la producció de Vg es veia dràsticament reduïda tot i la presència d'aminoàcids, que n'estimulen la síntesi, en el medi de cultiu. Aquest resultat indicaria que la manca de S6K podria afectar directament la producció de Vg al cos gras, independentment dels nivells d'HJ. També van trobar que la interferència afectava el desenvolupament dels ous, ponent-ne significativament menys aquelles femelles de mosquit interferides per S6K que les control (Hansen et al.; 2005). En la mosca *Bactrocera dorsalis*, el silenciament de S6K també disminueix significativament la producció de proteïna del vitel en el cos gras, alhora que causa un retard en el desenvolupament de les larves (Suganya et al.; 2011). Cal destacar que en els dípters l'hormona gonadotròfica és l'ecdisona, mentre que a molts altres insectes, entre ells les paneroles, aquesta funció corre a càrrec de l'HJ. Independentment d'això, l'expressió de la Vg estaria en part regulada en tots dos casos per S6K.

També es van constatar que la interferència de S6K redueix significativament els nivells de mRNA de Pepck al cos gras en un 99%, demostrant que l'expressió d'aquest enzim es troba sota la influència de S6K. Aquest resultat és particularment interessant quan s'estudia en conjunt amb els resultats del capítol dedicat a Pepck, ja que com s'explica allà, l'expressió de Pepck incrementa en

situacions de dejuni però la manca de InR com a conseqüència de la seva interferència evita aquest increment. Tot i que no s'han realitzat estudis en dejuni, el fet que la caiguda del transcrit de Pepck en el cas de la interferència de S6K sigui tan significativa, similar al observat al interferir el InR, indicaria que el InR i S6K juguen un paper rellevant en la regulació de la seva expressió, donant una prova més de la implicació de les vies de senyalització nutricional en la regulació gènica. Aquests resultats contrasten amb els resultats obtinguts fins ara en mamífers, ja que l'ús de rapamicina, inhibidor de TOR i per tant de l'activació de S6K a càrrec d'aquest, no pot revertir els efectes inhibidors de la insulina sobre l'expressió de Pepck (Sutherland et al.; 1995). Així doncs, sembla que la regulació de Pepck a *B. germanica* difereix notablement del que succeeix en models de mamífers.

Com hem explicat, la regulació de S6K és essencialment mitjançant la seva fosforilació. És per això que entre els objectius del present capítol es trobava la posada a punt de la tècnica del *western blot* per a la detecció de la proteïna S6K total, per a la que es va dissenyar un anticòs específic, i de la seva forma activada per fosforilació. Amb aquesta intenció es van emprar diversos anticossos comercials contra S6K i contra la seva forma fosforilada. Tot i que s'ha descrit l'eficiència d'aquests anticossos en diverses espècies d'insectes (Hansen et al., 2005; Suganya et al., 2011; Gu et al., 2012; Arsic i Guerin, 2008), els resultats obtinguts en *B. germanica* no han estat satisfactoris. Per aquesta raó es va sintetitzar un anticòs específic contra un fragment, corresponent als primers 18 aminoàcids de la seqüència del pèptid de S6K, que ens permet la detecció de la proteïna S6K. L'especificitat de l'anticòs per la S6K total es va verificar pel bloqueig amb el pèptid contra el que s'havia dissenyat. Degut a les dificultats tècniques que implica la producció d'un anticòs específic que permeti detectar la fosforilació d'un lloc concret d'una proteïna, es va descartar aquesta possibilitat, considerant optar per tècniques alternatives en futurs assajos. Tot i això, la detecció de S6K per *western blot* ens permet confirmar l'efectivitat del RNAi i verificar que amb el tractament es veuen afectats no només els nivells de mRNA sinó també els de proteïna detectats per *western blot*.

9. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts durant la realització de la present tesi i exposats en aquesta memòria es poden extreure les següents conclusions, totes elles referides a l'espècie *Blattella germanica*.

1. *B. germanica* posseeix gens ortòlegs al receptor d'insulina (BgInR), la quinasa de la proteïna ribosomal S6 (BgS6K), i l'enzim fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (BgPepck).
2. Els nivells de mRNA de BgInR al cos gras responen a la situació nutricional de l'animal de tal forma que l'expressió de BgInR al cos gras incrementa en dejuni.
3. BgInR és important per al correcte desenvolupament de les nimfes i l'ècdisi a adult. Controla l'expansió de les ales i les tegmines i el creixement de les paneroles.
4. BgInR controla l'activitat biosintètica d'hormona juvenil dels corpora allata durant la fase adulta, sent necessari per a l'expressió dels enzims 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa1 (BgHMG-S1), sintasa 2 (BgHMG-S2), reductasa (BgHMG-R) i la metil farnesoat epoxidasa, implicats en la síntesi de l'hormona juvenil en les femelles adultes.
5. BgInR és necessari per a la síntesi de vitel·logenina al cos gras, independentment de l'acció de l'hormona juvenil, i per a la correcta maduració dels oòcits.
6. BgInR té un efecte sobre la longevitat i la resistència al dejuni de les femelles de tal forma que el seu silenciament els hi confereix una major longevitat degut a la seva deficiència reproductiva i una major protecció al dejuni al acumular més TAG.
7. L'expressió de BgPepck depèn de la presència de BgInR i BgS6K funcionals. Els nivells de mRNA de BgPepck augmenten en situació de dejuni però es veuen reduïts al interferir el BgInR o BgS6K.
8. *B. germanica* presenta dues isoformes de la quinasa S6K, tenint una d'elles 22 aminoàcids més que l'altra, que poden contenir un nou punt de regulació per fosforilació de TOR.
9. BgS6K afecta l'expressió dels enzims BgHMG-S1 i BgHMG-R als corpora allata, així com la de vitel·logenina al cos gras.

10. BIBLIOGRAFIA

- Arsic, D. & Guerin, P.M. 2008, "Nutrient content of diet affects the signaling activity of the insulin/target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway in the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*", *Journal of insect physiology*, vol. 54, no. 8, pp. 1226-1235.
- Ashok, M., Turner, C. & Wilson, T.G. 1998, "Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 6, pp. 2761-2766.
- Aslam, A.F., Kiya, T., Mita, K. & Iwami, M. 2011, "Identification of novel bombyxin genes from the genome of the silkworm *Bombyx mori* and analysis of their expression", *Zoological Science*, vol. 28, no. 8, pp. 609-616.
- Attardo, G.M., Hansen, I.A. & Raikhel, A.S. 2005, "Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 35, no. 7, pp. 661-675.
- Badisco, L., Claeys, I., Van Hiel, M., Clynen, E., Huybrechts, J., Vandersmissen, T., Van Soest, S., Vanden Bosch, L., Simonet, G. & Vanden Broeck, J. 2008, "Purification and characterization of an insulin-related peptide in the desert locust, *Schistocerca gregaria*: immunolocalization, cDNA cloning, transcript profiling and interaction with neuroparsin", *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 40, no. 3, pp. 137-150.
- Badisco, L., Marchal, E., Van Wielendaele, P., Verlinden, H., Vleugels, R. & Vanden Broeck, J. 2011, "RNA interference of insulin-related peptide and neuroparsins affects vitellogenesis in the desert locust *Schistocerca gregaria*", *Peptides*, vol. 32, no. 3, pp. 573-580.
- Barbieri, M., Bonafe, M., Franceschi, C. & Paolisso, G. 2003, "Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans", *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 285, no. 5, pp. E1064-71.
- Barchuk, A.R., Cristino, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simoes, Z.L. & Maleszka, R. 2007, "Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*", *BMC developmental biology*, vol. 7, pp. 70.
- Beckstead, R.B., Lam, G. & Thummel, C.S. 2007, "Specific transcriptional responses to juvenile hormone and ecdysone in *Drosophila*", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 37, no. 6, pp. 570-578.
- Belles, X., Maestro, J.L., Piulachs, M.D., Johnsen, A.H., Duve, H. & Thorpe, A. 1994, "Allatostatic neuropeptides from the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Identification, immunolocalization and activity", *Regulatory peptides*, vol. 53, no. 3, pp. 237-247.

- Belles, X., Martin, D. & Piulachs, M.D. 2005, "The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects", *Annual Review of Entomology*, vol. 50, pp. 181-199.
- Belles, X., Piulachs, M. & Osorio, S. 1997, "Feeding and activation of corpora allata in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae)", *Journal of insect physiology*, vol. 44, no. 1, pp. 31-38.
- Berger, E.M. & Dubrovsky, E.B. 2005, "Juvenile hormone molecular actions and interactions during development of *Drosophila melanogaster*", *Vitamins and hormones*, vol. 73, pp. 175-215.
- Bluher, M., Kahn, B.B. & Kahn, C.R. 2003, "Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 299, no. 5606, pp. 572-574.
- Boyd, O., Weng, P., Sun, X., Alberico, T., Laslo, M., Obenland, D.M., Kern, B. & Zou, S. 2011, "Nectarine promotes longevity in *Drosophila melanogaster*", *Free radical biology & medicine*, vol. 50, no. 11, pp. 1669-1678.
- Bradford, M.M. 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254.
- Britton, J.S., Lockwood, W.K., Li, L., Cohen, S.M. & Edgar, B.A. 2002, "Drosophila's insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions", *Developmental cell*, vol. 2, no. 2, pp. 239-249.
- Broggiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R. & Hafen, E. 2001, "An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control", *Current biology : CB*, vol. 11, no. 4, pp. 213-221.
- Broughton, S.J., Piper, M.D., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Driege, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D.J., Leivers, S.J. & Partridge, L. 2005, "Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 8, pp. 3105-3110.
- Buesa, C., Martinez-Gonzalez, J., Casals, N., Haro, D., Piulachs, M.D., Belles, X. & Hegardt, F.G. 1994, "*Blattella germanica* has two HMG-CoA synthase genes. Both are regulated in the ovary during the gonadotrophic cycle", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 16, pp. 11707-11713.
- Caldwell, P.E., Walkiewicz, M. & Stern, M. 2005, "Ras activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release", *Current biology : CB*, vol. 15, no. 20, pp. 1785-1795.

- Castresana, J. 2000, "Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis", *Molecular biology and evolution*, vol. 17, no. 4, pp. 540-552.
- Chapman, A.D. 2009, *Number of Living Species in Australia and the World*, 2nd edn, Australian Biological Resources Study, Australia.
- Charles, J.P., Iwema, T., Epa, V.C., Takaki, K., Rynes, J. & Jindra, M. 2011, "Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 52, pp. 21128-21133.
- Chen, C., Jack, J. & Garofalo, R.S. 1996, "The Drosophila insulin receptor is required for normal growth", *Endocrinology*, vol. 137, no. 3, pp. 846-856.
- Cheng, Z. & White, M.F. 2011, "Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 14, no. 4, pp. 649-661.
- Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leevers, S.J. & Partridge, L. 2001, "Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 292, no. 5514, pp. 104-106.
- Colombani, J., Andersen, D.S. & Leopold, P. 2012, "Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 336, no. 6081, pp. 582-585.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carre, C., Noselli, S. & Leopold, P. 2005, "Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in Drosophila", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 310, no. 5748, pp. 667-670.
- Comas, D., Piulachs, M.D. & Belles, X. 2001, "Induction of vitellogenin gene transcription in vitro by juvenile hormone in *Blattella germanica*", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 183, no. 1-2, pp. 93-100.
- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A. & Robinson, G.E. 2007, "Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 17, pp. 7128-7133.
- Cruz, J., Mane-Padros, D., Belles, X. & Martin, D. 2006, "Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo", *Developmental biology*, vol. 297, no. 1, pp. 158-171.

- Cruz, J., Martin, D., Pascual, N., Maestro, J.L., Piulachs, M.D. & Belles, X. 2003, "Quantity does matter. Juvenile hormone and the onset of vitellogenesis in the German cockroach", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 33, no. 12, pp. 1219-1225.
- Cruz, J., Nieva, C., Mane-Padros, D., Martin, D. & Belles, X. 2008, "Nuclear receptor BgFTZ-F1 regulates molting and the timing of ecdysteroid production during nymphal development in the hemimetabolous insect *Blattella germanica*", *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, vol. 237, no. 11, pp. 3179-3191.
- Dabour, N., Bando, T., Nakamura, T., Miyawaki, K., Mito, T., Ohuchi, H. & Noji, S. 2011, "Cricket body size is altered by systemic RNAi against insulin signaling components and epidermal growth factor receptor", *Development, growth & differentiation*, vol. 53, no. 7, pp. 857-869.
- Dai, J.D. & 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", *Developmental biology*, vol. 144, no. 2, pp. 309-326.
- de Azevedo, S.V. & Hartfelder, K. 2008, "The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae", *Journal of insect physiology*, vol. 54, no. 6, pp. 1064-1071.
- Demontis, F. & Perrimon, N. 2009, "Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in *Drosophila*", *Development (Cambridge, England)*, vol. 136, no. 6, pp. 983-993.
- Dubrovsky, E.B. 2005, "Hormonal cross talk in insect development", *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, vol. 16, no. 1, pp. 6-11.
- Fenton, T.R. & Gout, I.T. 2011, "Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 43, no. 1, pp. 47-59.
- Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M. & Schlessinger, J. 1995, "The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential", *The EMBO journal*, vol. 14, no. 14, pp. 3373-3384.
- Franckhauser, S., Munoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B. & Bosch, F. 2002, "Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance", *Diabetes*, vol. 51, no. 3, pp. 624-630.

- Friedlander, T.P., Regier, J.C., Mitter, C. & Wagner, D.L. 1996, "A nuclear gene for higher level phylogenetics: phosphoenolpyruvate carboxykinase tracks mesozoic-age divergences within Lepidoptera (Insecta)", *Molecular biology and evolution*, vol. 13, no. 4, pp. 594-604.
- Friedman, J.E., Yun, J.S., Patel, Y.M., McGrane, M.M. & Hanson, R.W. 1993, "Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 17, pp. 12952-12957.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R. 1988, "Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 23, pp. 8998-9002.
- Garelli, A., Gontijo, A.M., Miguela, V., Caparros, E. & Dominguez, M. 2012, "Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 336, no. 6081, pp. 579-582.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Frenkel, M.J., Bentley, J.D., Lovrecz, G.O., Elleman, T.C., Cosgrove, L.J. & Ward, C.W. 1998, "Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor", *Nature*, vol. 394, no. 6691, pp. 395-399.
- Gershman, B., Puig, O., Hang, L., Peitzsch, R.M., Tatar, M. & Garofalo, R.S. 2007, "High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: a key role for dFOXO", *Physiological genomics*, vol. 29, no. 1, pp. 24-34.
- Gilbert, L.I., Granger, N.A. & Roe, R.M. 2000, "The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 30, no. 8-9, pp. 617-644.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. 1990, "Regulation of the mevalonate pathway", *Nature*, vol. 343, no. 6257, pp. 425-430.
- Gomez-Orte, E. & Belles, X. 2009, "MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 51, pp. 21678-21682.
- Gordon, D.G. (ed) 1996, *The Compleat Cockroach: A Comprehensive Guide to the Most Despised (And Least Understood) Creature on Earth*, Ten Speed Press.
- Gout, I., Minami, T., Hara, K., Tsujishita, Y., Filonenko, V., Waterfield, M.D. & Yonezawa, K. 1998, "Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 46, pp. 30061-30064.

- Graf, R., Neuenschwander, S., Brown, M.R. & Ackermann, U. 1997, "Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*", *Insect molecular biology*, vol. 6, no. 2, pp. 151-163.
- Grimaldi, D. & Engel, M.S. 2005, *Evolution of the Insects*, Cambridge University press, Cambridge, UK.
- Gronke, S., Clarke, D.F., Broughton, S., Andrews, T.D. & Partridge, L. 2010, "Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides", *PLoS genetics*, vol. 6, no. 2, pp. e1000857.
- Grove, J.R., Banerjee, P., Balasubramanyam, A., Coffey, P.J., Price, D.J., Avruch, J. & Woodgett, J.R. 1991, "Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini", *Molecular and cellular biology*, vol. 11, no. 11, pp. 5541-5550.
- Gu, S.H., Yeh, W.L., Young, S.C., Lin, P.L. & Li, S. 2012, "TOR signaling is involved in PTTH-stimulated ecdysteroidogenesis by prothoracic glands in the silkworm, *Bombyx mori*", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 42, no. 4, pp. 296-303.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003, "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood", *Systematic Biology*, vol. 52, no. 5, pp. 696-704.
- Gulati, P. & Thomas, G. 2007, "Nutrient sensing in the mTOR/S6K1 signalling pathway", *Biochemical Society transactions*, vol. 35, no. Pt 2, pp. 236-238.
- Gulia-Nuss, M., Robertson, A.E., Brown, M.R. & Strand, M.R. 2011, "Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*", *PloS one*, vol. 6, no. 5, pp. e20401.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B. & Hannan, R.D. 2003, "mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF", *Molecular and cellular biology*, vol. 23, no. 23, pp. 8862-8877.
- Hannan, K.M., Thomas, G. & Pearson, R.B. 2003, "Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex", *The Biochemical journal*, vol. 370, no. Pt 2, pp. 469-477.
- Hansen, I.A., Attardo, G.M., Park, J.H., Peng, Q. & Raikhel, A.S. 2004, "Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny",

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 29, pp. 10626-10631.
- Hanson, R.W. & Hakimi, P. 2008, "Born to run; the story of the PEPCK-Cmus mouse", *Biochimie*, vol. 90, no. 6, pp. 838-842.
- Harshman, L.G., Song, K.D., Casas, J., Schuurmans, A., Kuwano, E., Kachman, S.D., Riddiford, L.M. & Hammock, B.D. 2010, "Bioassays of compounds with potential juvenoid activity on *Drosophila melanogaster*: juvenile hormone III, bisepoxide juvenile hormone III and methyl farnesoates", *Journal of insect physiology*, vol. 56, no. 10, pp. 1465-1470.
- Haselton, A., Sharmin, E., Schrader, J., Sah, M., Poon, P. & Fridell, Y.W. 2010, "Partial ablation of adult *Drosophila* insulin-producing neurons modulates glucose homeostasis and extends life span without insulin resistance", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 9, no. 15, pp. 3063-3071.
- Hay, N. & Sonenberg, N. 2004, "Upstream and downstream of mTOR", *Genes & development*, vol. 18, no. 16, pp. 1926-1945.
- Iga, M. & Smagghe, G. 2011, "Relationship between larval-pupal metamorphosis and transcript expression of insulin-like peptide and insulin receptor in *Spodoptera littoralis*", *Peptides*, vol. 32, no. 3, pp. 531-538.
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K. & Hafen, E. 2002, "Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*", *Current biology : CB*, vol. 12, no. 15, pp. 1293-1300.
- Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J. & Yonezawa, K. 1999, "Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 48, pp. 34493-34498.
- Iwami, M. 2000, "Bombyxin: An Insect Brain Peptide that Belongs to the Insulin Family", *Zoological Science*, vol. 17, no. 8, pp. 1035-1044.
- Jastrzebski, K., Hannan, K.M., Tchoubrieva, E.B., Hannan, R.D. & Pearson, R.B. 2007, "Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function", *Growth factors (Chur, Switzerland)*, vol. 25, no. 4, pp. 209-226.
- Kamakura, M. 2011, "Royalactin induces queen differentiation in honeybees", *Nature*, vol. 473, no. 7348, pp. 478-483.
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V. & Benzer, S. 2004, "Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway", *Current biology : CB*, vol. 14, no. 10, pp. 885-890.

- Kenyon, C.J. 2010, "The genetics of ageing", *Nature*, vol. 464, no. 7288, pp. 504-512.
- Kondo, H., Ino, M., Suzuki, A., Ishizaki, H. & Iwami, M. 1996, "Multiple gene copies for bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*: structural signs for gene rearrangement and duplication responsible for generation of multiple molecular forms of bombyxin", *Journal of Molecular Biology*, vol. 259, no. 5, pp. 926-937.
- Lagueux, M., Lwoff, L., Meister, M., Goltzene, F. & Hoffmann, J.A. 1990, "cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 187, no. 1, pp. 249-254.
- Laplante, M. & Sabatini, D.M. 2012, "mTOR signaling in growth control and disease", *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274-293.
- Lee-Fruman, K.K., Kuo, C.J., Lippincott, J., Terada, N. & Blenis, J. 1999, "Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1", *Oncogene*, vol. 18, no. 36, pp. 5108-5114.
- Li, E. & Hristova, K. 2006, "Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies", *Biochemistry*, vol. 45, no. 20, pp. 6241-6251.
- Li, M., Mead, E.A. & Zhu, J. 2011, "Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 2, pp. 638-643.
- Liu, Y., Zhou, S., Ma, L., Tian, L., Wang, S., Sheng, Z., Jiang, R.J., Bendena, W.G. & Li, S. 2010, "Transcriptional regulation of the insulin signaling pathway genes by starvation and 20-hydroxyecdysone in the *Bombyx* fat body", *Journal of insect physiology*, vol. 56, no. 10, pp. 1436-1444.
- Lu, H.L. & Pietrantonio, P.V. 2011, "Insect insulin receptors: insights from sequence and caste expression analyses of two cloned hymenopteran insulin receptor cDNAs from the fire ant", *Insect molecular biology*, vol. 20, no. 5, pp. 637-649.
- Maestro, J.L., Cobo, J. & Belles, X. 2009, "Target of rapamycin (TOR) mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 9, pp. 5506-5513.
- Maestro, J.L., Pascual, N., Treiblmayr, K., Lozano, J. & Belles, X. 2010, "Juvenile hormone and allatostatins in the German cockroach embryo", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 40, no. 9, pp. 660-665.

- Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D.C. 2012, "Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks", *The Biochemical journal*, vol. 441, no. 1, pp. 1-21.
- Mane-Padros, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Pascual, N., Belles, X. & Martin, D. 2008, "The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect *Blattella germanica*", *Developmental biology*, vol. 315, no. 1, pp. 147-160.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. 2002, "The protein kinase complement of the human genome", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912-1934.
- Martinez-Gonzalez, J., Buesa, C., Piulachs, M.D., Belles, X. & Hegardt, F.G. 1993, "3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A synthase from *Blattella germanica*. Cloning, expression, developmental pattern and tissue expression", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 217, no. 2, pp. 691-699.
- Martinez-Gonzalez, J., Buesa, C., Piulachs, M.D., Belles, X. & Hegardt, F.G. 1993, "Molecular cloning, developmental pattern and tissue expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the cockroach *Blattella germanica*", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 213, no. 1, pp. 233-241.
- Masumura, M., Satake, S., Saegusa, H. & Mizoguchi, A. 2000, "Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*", *General and comparative endocrinology*, vol. 118, no. 3, pp. 393-399.
- Mirth, C., Truman, J.W. & Riddiford, L.M. 2005, "The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*", *Current biology : CB*, vol. 15, no. 20, pp. 1796-1807.
- Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C. & Thomas, G. 1999, "Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 285, no. 5436, pp. 2126-2129.
- Murillo-Maldonado, J.M., Sánchez-Chávez, G., Salgado, L.M., Salceda, R. & Riesgo-Escovar, J.R. 2011, "Drosophila Insulin Pathway Mutants Affect Visual Physiology and Brain Function Besides Growth, Lipid, and Carbohydrate Metabolism", *Diabetes*, vol. 60.
- Mutti, N.S., Dolezal, A.G., Wolschin, F., Mutti, J.S., Gill, K.S. & Amdam, G.V. 2011, "IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate", *The Journal of experimental biology*, vol. 214, no. Pt 23, pp. 3977-3984.
- Nilsen, K.A., Ihle, K.E., Frederick, K., Fondrk, M.K., Smedal, B., Hartfelder, K. & Amdam, G.V. 2011, "Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond

- differently to manipulation of social behavioral physiology", *The Journal of experimental biology*, vol. 214, no. Pt 9, pp. 1488-1497.
- O'Brien, R., Lucas, P., Forest, C., Magnuson, M. & Granner, D. 1990, "Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription", *Science*, vol. 249, no. 4968, pp. 533-537.
- Okada, Y., Miyazaki, S., Miyakawa, H., Ishikawa, A., Tsuji, K. & Miura, T. 2010, "Ovarian development and insulin-signaling pathways during reproductive differentiation in the queenless ponerine ant *Diacamma* sp", *Journal of insect physiology*, vol. 56, no. 3, pp. 288-295.
- Parthasarathy, R. & Palli, S.R. 2011, "Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 41, no. 5, pp. 294-305.
- Partridge, L., Alic, N., Bjedov, I. & Piper, M.D. 2011, "Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network", *Experimental gerontology*, vol. 46, no. 5, pp. 376-381.
- Partridge, L., Gems, D. & Withers, D.J. 2005, "Sex and death: what is the connection?", *Cell*, vol. 120, no. 4, pp. 461-472.
- Patel, A., Fondrk, M.K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K. & Amdam, G.V. 2007, "The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development", *PloS one*, vol. 2, no. 6, pp. e509.
- Pearson, W.R. & Lipman, D.J. 1988, "Improved tools for biological sequence comparison", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 8, pp. 2444-2448.
- Pende, M., Um, S.H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V.L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S.C. & Thomas, G. 2004, "S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway", *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 8, pp. 3112-3124.
- Perez-Hedo, M., Rivera-Perez, C. & Noriega, F.G. 2013, "The insulin/TOR signal transduction pathway is involved in the nutritional regulation of juvenile hormone synthesis in *Aedes aegypti*", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 43, no. 6, pp. 495-500.
- Piulachs, M.D. 1987, "Estudi morfològic i funcional dels corpora allata de *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae).", *Universitat de Barcelona*, .
- Plasterk, R.H. 2002, "RNA silencing: the genome's immune system", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 296, no. 5571, pp. 1263-1265.

- Pratt, G.E. & Tobe, S.S. 1974, "Juvenile hormones radiobiosynthesised by corpora allata of adult female locusts in vitro", *Life Sciences*, vol. 14, no. 3, pp. 575-586.
- Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L. & Tjian, R. 2003, "Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway", *Genes & development*, vol. 17, no. 16, pp. 2006-2020.
- Puig, O. & Tjian, R. 2006, "Nutrient availability and growth: regulation of insulin signaling by dFOXO/FOXO1", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 5, no. 5, pp. 503-505.
- Puig, O. & Tjian, R. 2005, "Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1", *Genes & development*, vol. 19, no. 20, pp. 2435-2446.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D. & Spiegelman, B.M. 2003, "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction", *Nature*, vol. 423, no. 6939, pp. 550-555.
- Pullen, N., Dennis, P.B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S.C., Hemmings, B.A. & Thomas, G. 1998, "Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 279, no. 5351, pp. 707-710.
- Pullen, N. & Thomas, G. 1997, "The modular phosphorylation and activation of p70s6k", *FEBS letters*, vol. 410, no. 1, pp. 78-82.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M. & Hanson, R.W. 2003, "Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 33, pp. 30413-30416.
- Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X. & Nelson, C.A. 2003, "Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 33, no. 12, pp. 1327-1338.
- Riehle, M.A. & Brown, M.R. 2002, "Insulin receptor expression during development and a reproductive cycle in the ovary of the mosquito *Aedes aegypti*", *Cell and tissue research*, vol. 308, no. 3, pp. 409-420.
- Riehle, M.A. & Brown, M.R. 1999, "Insulin stimulates ecdysteroid production through a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 29, no. 10, pp. 855-860.
- Riehle, M.A., Fan, Y., Cao, C. & Brown, M.R. 2006, "Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: expression, cellular localization, and phylogeny", *Peptides*, vol. 27, no. 11, pp. 2547-2560.

- Rintelen, F., Stocker, H., Thomas, G. & Hafen, E. 2001, "PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 26, pp. 15020-15025.
- Rion, S. & Kawecki, T.J. 2007, "Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*", *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 20, no. 5, pp. 1655-1664.
- Roy, S.G., Hansen, I.A. & Raikhel, A.S. 2007, "Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 37, no. 12, pp. 1317-1326.
- Roy, S.G. & Raikhel, A.S. 2011, "The small GTPase Rheb is a key component linking amino acid signaling and TOR in the nutritional pathway that controls mosquito egg development", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 41, no. 1, pp. 62-69.
- Ruvinsky, I. & Meyuhos, O. 2006, "Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size", *Trends in biochemical sciences*, vol. 31, no. 6, pp. 342-348.
- Saitoh, M., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P.B. & Thomas, G. 2002, "Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 22, pp. 20104-20112.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. 1989, "Molecular cloning. A laboratory manual. ", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, .
- Santos, A.C. & Lehmann, R. 2004, "Isoprenoids control germ cell migration downstream of HMGCoA reductase", *Developmental cell*, vol. 6, no. 2, pp. 283-293.
- Savraj S. Grewal 2009, "Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: A view from the fly world", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, , no. 41, pp. 1006-1010.
- Schutze, N. 2004, "siRNA technology", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 213, no. 2, pp. 115-119.
- Shah, O.J., Wang, Z. & Hunter, T. 2004, "Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies", *Current biology : CB*, vol. 14, no. 18, pp. 1650-1656.
- Shingleton, A.W. 2010, "The regulation of organ size in *Drosophila*: physiology, plasticity, patterning and physical force", *Organogenesis*, vol. 6, no. 2, pp. 76-87.

- Shingleton, A.W., Das, J., Vinicius, L. & Stern, D.L. 2005, "The temporal requirements for insulin signaling during development in *Drosophila*", *PLoS biology*, vol. 3, no. 9, pp. e289.
- Sim, C. & Denlinger, D.L. 2008, "Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 18, pp. 6777-6781.
- Skorstengaard, K., Jensen, M.S., Sahl, P., Petersen, T.E. & Magnusson, S. 1986, "Complete primary structure of bovine plasma fibronectin", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 161, no. 2, pp. 441-453.
- Suganya, R., Chen, S.L. & Lu, K.H. 2011, "cDNA cloning and characterization of S6 kinase and its effect on yolk protein gene expression in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel)", *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 78, no. 4, pp. 177-189.
- Sun, Y., Liu, S., Ferguson, S., Wang, L., Klepcyk, P., Yun, J.S. & Friedman, J.E. 2002, "Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 26, pp. 23301-23307.
- Suren-Castillo, S., Abrisqueta, M. & Maestro, J.L. 2012, "FoxO inhibits juvenile hormone biosynthesis and vitellogenin production in the German cockroach", *Insect biochemistry and molecular biology*, vol. 42, no. 7, pp. 491-498.
- Sutherland, C., O'Brien, R.M. & Granner, D.K. 1995, "Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression", *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 26, pp. 15501-15506.
- Tan, K.T., Luo, S.C., Ho, W.Z. & Lee, Y.H. 2011, "Insulin/IGF-1 receptor signaling enhances biosynthetic activity and fat mobilization in the initial phase of starvation in adult male *C. elegans*", *Cell metabolism*, vol. 14, no. 3, pp. 390-402.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M. & Garofalo, R.S. 2001, "A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 292, no. 5514, pp. 107-110.
- Tatar, M. & Yin, C. 2001, "Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms", *Experimental gerontology*, vol. 36, no. 4-6, pp. 723-738.

- Teleman, A.A. 2009, "Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*", *The Biochemical journal*, vol. 425, no. 1, pp. 13-26.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997, "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", *Nucleic acids research*, vol. 25, no. 24, pp. 4876-4882.
- Tobler, A. & Nijhout, H.F. 2010, "A switch in the control of growth of the wing imaginal disks of *Manduca sexta*", *PloS one*, vol. 5, no. 5, pp. e10723.
- Treiblmayr, K., Pascual, N., Piulachs, M.D., Keller, T. & Belles, X. 2006, "Juvenile hormone titer versus juvenile hormone synthesis in female nymphs and adults of the German cockroach, *Blattella germanica*", *Journal of insect science (Online)*, vol. 6, pp. 1-7.
- Truman, J.W. & Riddiford, L.M. 2002, "Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects", *Annual Review of Entomology*, vol. 47, pp. 467-500.
- Tu, M.P., Yin, C.M. & Tatar, M. 2005, "Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*", *General and comparative endocrinology*, vol. 142, no. 3, pp. 347-356.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J. & Thomas, G. 2004, "Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity", *Nature*, vol. 431, no. 7005, pp. 200-205.
- Van de Velde, S., Badisco, L., Claeys, I., Verleyen, P., Chen, X., Vanden Bosch, L., Vanden Broeck, J. & Smaghe, G. 2007, "Insulin-like peptides in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera): Detection, localization and identification", *General and comparative endocrinology*, vol. 153, no. 1-3, pp. 72-79.
- Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L. & Muller, F. 2003, "Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*", *Nature*, vol. 426, no. 6967, pp. 620.
- Walsh, A.L. & Smith, W.A. 2011, "Nutritional sensitivity of fifth instar prothoracic glands in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*", *Journal of insect physiology*, vol. 57, no. 6, pp. 809-818.
- Wheeler, D.E., Buck, N. & Evans, J.D. 2006, "Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*", *Insect molecular biology*, vol. 15, no. 5, pp. 597-602.
- Wilson, T.G. & Ashok, M. 1998, "Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 24, pp. 14040-14044.

- Wilson, T.G. & Fabian, J. 1986, "A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone", *Developmental biology*, vol. 118, no. 1, pp. 190-201.
- Wolschin, F., Mutti, N.S. & Amdam, G.V. 2011, "Insulin receptor substrate influences female caste development in honeybees", *Biology letters*, vol. 7, no. 1, pp. 112-115.
- Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N. 2006, "TOR signaling in growth and metabolism", *Cell*, vol. 124, no. 3, pp. 471-484.
- Yamamoto, R. & Tatar, M. 2011, "Insulin receptor substrate chico acts with the transcription factor FOXO to extend *Drosophila* lifespan", *Aging cell*, vol. 10, no. 4, pp. 729-732.
- Yang, J., Kalhan, S.C. & Hanson, R.W. 2009, "What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase?", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 40, pp. 27025-27029.
- Yang, J., Reshef, L., Cassuto, H., Aleman, G. & Hanson, R.W. 2009, "Aspects of the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 40, pp. 27031-27035.
- Zhou, S., Zhou, Q., Liu, Y., Wang, S., Wen, D., He, Q., Wang, W., Bendena, W.G. & Li, S. 2010, "Two Tor genes in the silkworm *Bombyx mori*", *Insect molecular biology*, vol. 19, no. 6, pp. 727-735.
- Zhou, X. & 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 (Cambridge, England)*, vol. 129, no. 9, pp. 2259-2269.
- Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L.C., Tetzlaff, M.T. & Pankratz, M.J. 1999, "Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system", *Development (Cambridge, England)*, vol. 126, no. 23, pp. 5275-5284.
- Zinke, I., Schutz, C.S., Katzenberger, J.D., Bauer, M. & Pankratz, M.J. 2002, "Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response", *The EMBO journal*, vol. 21, no. 22, pp. 6162-6173.
- Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D.M. 2011, "mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 12, no. 1, pp. 21-35.