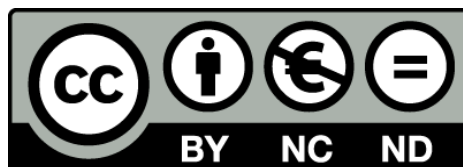


Regulació de la metamorfosi en insectes hemimetàbols i holometàbols

Caracterització funcional del gen E93 i del de sumoiliació

Enric Ureña Sala



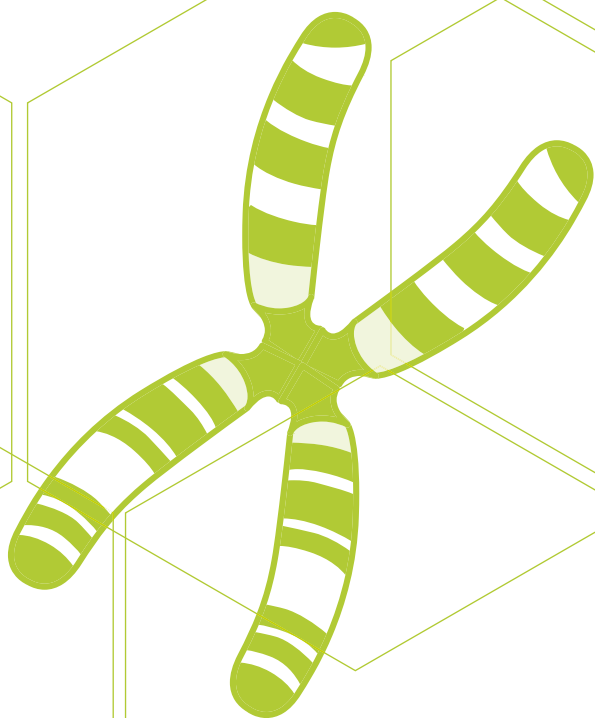
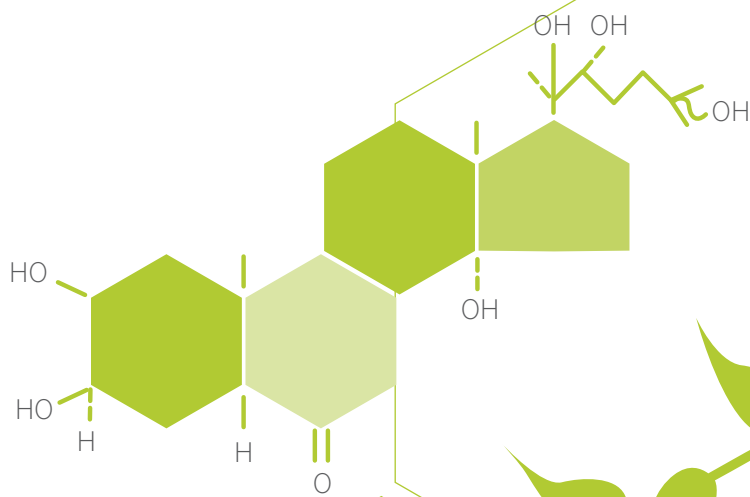
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

Regulació de la **metamorfosi** en insectes **hemimetàbols** i **holometàbols**

Caracterització funcional del **gen E93**
i del procés de **sumoilació**



**REGULACIÓ DE LA METAMORFOSI EN INSECTES
HEMIMETÀBOLS I HOLOMETÀBOLS**
Caracterització del gen *E93* i del procés de sumoilació

Enric Ureña Sala

2013



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA
PROGRAMA DE FISIOLOGIA

Treball realitzat a la Unitat de Genòmica Funcional i Evolució de
l'Institut de Biologia Evolutiva (IBE, CSIC-UPF) sota la direcció del
Dr. David Martín Casacuberta

**REGULACIÓ DE LA METAMORFOSI EN INSECTES HEMIMETÀBOLS I
HOLOMETÀBOLS. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DEL GEN *E93* I DEL
PROCÉS DE SUMOILACIÓ**

Enric Ureña Sala
Doctorand

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

Dra. Encarnación Capilla Campos
Investigadora Ramón i Cajal
Tutora de la tesi

CONTINGUTS

LLISTA D'ABREVIATURES	IX
1.INTRODUCCIÓ	1
1.1 LA METAMORFOSI	3
1.1.1 Breu història de l'estudi de la metamorfosi	3
1.1.2 Classificació dels insectes segons la seva estratègia metamòrfica	5
1.1.3 L'evolució de la metamorfosi	6
1.1.3.1 Teoria de l'equivalència larva-nimfa	7
1.1.3.2 La teoria de la "desembrionització"	7
1.1.3.3 La teoria de la pronimfa. Visió endocrina de l'evolució de la metamorfosi	9
1.2 LA 20-HIDROXIECDISONA: L'HORMONA DE LA MUDA	10
1.2.1 La PTTH, hormona inductora de l'ecdisteroidogènesi	11
1.2.2 Biosíntesi de l'ecdisona	13
1.2.3 Mecanisme d'acció de la 20-hidroxiectdisona: el model d'Ashburner	15
1.2.4 El gen primerenc <i>E93</i>	16
1.3 L'HORMONA JUVENIL	17
1.3.1 Biosíntesi de l'hormona juvenil	17
1.3.2 Funció de l'hormona juvenil en la metamorfosi	19
1.3.3 Mecanisme d'acció de l'hormona juvenil	20
1.3.3.1 <i>Methoprene-tolerant</i> , el receptor de l'hormona juvenil	20
1.3.3.2 <i>Krüppel homolog 1</i> , transductor del senyal antimetamòrfic	21
1.3.3.3 <i>Broad</i> , l'especificador pupal	22
1.4 <i>Blattella germanica</i> COM A MODEL DE METAMORFOSI HEMIMETÀBOLA	23

1.4.1 Cicle de vida	23
1.4.2 La metamorfosi de <i>Blattella germanica</i>	24
1.4.3 Control hormonal del desenvolupament de <i>Blattella germanica</i>	26
1.5 <i>Tribolium castaneum</i> COM A MODEL DE METAMORFOSI HOLOMETÀBOLA BASAL	27
1.5.1 Fisiologia, cicle de vida i metamorfosi	28
1.5.2 Control hormonal de la metamorfosi de <i>Tribolium castaneum</i>	29
1.6 <i>Drosophila melanogaster</i> COM A MODEL HOLOMETÀBOL MOLT MODIFICAT	31
1.6.1 Desenvolupament de <i>Drosophila melanogaster</i>	31
1.6.2 Control hormonal del desenvolupament de <i>Drosophila melanogaster</i>	33
1.7 LA SUMOILACIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT	34
1.7.1 Característiques i mecanisme de conjugació de SUMO	35
1.7.2 Dominis de sumoilació i el domini SIM	36
1.7.3 La sumoilació en insectes	37
2. OBJECTIUS	39
3. MATERIAL I MÈTODES	43
3.1 INSECTES	45
3.1.1 <i>Blattella germanica</i>	45
3.1.2 <i>Tribolium castaneum</i>	45
3.1.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	45
3.2 TÈCNiques QUIRÚRGiques EN <i>Blattella germanica</i>	46
3.2.1 Dissecció dels ovaris, medició de la superfície de l'òcit basal i comptatge del número de cèl·lules fol·liculars	46
3.2.2 Dissecció del cos gras i el tub digestiu	47
3.2.3 Dissecció de l'epidermis	47
3.2.4 Dissecció dels <i>corpora allata</i> (CA)	47

3.2.5 Dissecció de la glàndula protoràtica	47
3.2.6 Dissecció de les ales	47
3.2.7 Extracció de l'hemolimfa	48
3.3 EXTRACCIÓ D'ÀCIDS RIBONUCLEICS (RNA)	48
3.4 CLONATGE DEL cDNA DE <i>BgUbc9</i> I <i>BgE93</i>	48
3.4.1 PCR amb oligonucleòtids degenerats	48
3.4.2 Amplificació ràpida dels extrems 5' i 3' dels cDNAs	49
3.5 ELECTROFORESI DE DNA	50
3.6 L·LIGACIÓ D'INSERTS EN PLÀSMIDS	50
3.7. PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS	50
3.8 SEQÜENCIACIÓ DEL DNA	51
3.9 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA	51
3.9.1 Tractament amb DNAsa	51
3.9.2 Retrotranscripció	51
3.9.3 PCR	52
3.10 PCR QUANTITATIVA	53
3.11 OBTENCIÓ DE LES CONSTRUCCIONS PER A L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ I PER A LA SOBREEXPRESSIÓ <i>IN VIVO</i> EN <i>D. melanogaster</i>	55
3.11.1 Construccions RFP-BgSumo1 i RFP-BgSumo3	55
3.11.2 Construccions UAS-BgSumo1 i UAS-BgSumo3	55
3.12 RNA D'INTERFERÈNCIA <i>IN VIVO</i>	56
3.12.1 Clonatge del fragment diana	56
3.12.2 Linearització del DNA plasmídic	56
3.12.3 Síntesi de les cadenes <i>ssRNA</i> i obtenció del <i>dsRNA</i>	57
3.13 INJECCIÓ DEL <i>dsRNA</i> A <i>Blattella germanica</i>	57
3.14 INJECCIÓ DEL <i>dsRNA</i> A <i>Tribolium castaneum</i>	58
3.15 TRACTAMENTS AMB METOPRÈ <i>IN VIVO</i>	58

3.16 MESURA DELS NIVELLS D'HORMONA JUVENIL	58
3.17 TINCIÓ AMB FALOIDINA-TRITC I DAPI	59
3.18 MARCATGE AMB BrdU	59
3.19 IMMUNOCITOQUÍMICA D'HISTONA H3 FOSFORILADA	61
3.20 TRANSFECCIONS CEL·LULARS	61
3.21 OBSERVACIONS MICROSCÒPIQUES EN CAMP CLAR I FLUORESCÈNCIA	62
3.22 MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG	62
3.23 CONSTRUCCIÓ DE L'ÀRBRE FILOGENÈTIC	62
3.24 ANÀLISI DE SUMOILACIÓ <i>IN VITRO</i>	63
4. RESULTATS	65
CAPÍTOL 4.I: ESTUDI DE LA SUMOILACIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT POSTEMBRIONARI DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL <i>Blattella germanica</i>	67
4.I.1 ESTUDI DE LES SEQÜÈNCIES <i>Sumo</i> DE <i>Blattella germanica</i>	69
4.I.1.1 Anàlisi de dues seqüències <i>Sumo</i> de <i>Blattella germanica</i>	69
4.I.1.2 Anàlisi filogenètic de les seqüències <i>Sumo</i> d'insectes	72
4.I.2 CARACTERITZACIÓ DELS SUMO DE <i>Blattella germanica</i>	72
4.I.2.1 Patrons d'expressió dels mRNA de <i>BgSumo1</i> i <i>BgSumo3</i> durant el desenvolupament nimfal	72
4.I.2.2 Localització subcel·lular de <i>BgSumo1</i> i <i>BgSumo3</i>	75
4.I.3 ANÀLISI FUNCIONAL DE LA SUMOILACIÓ DURANT EL DESENVOLUPAMENT NIMFAL DE <i>Blattella germanica</i>	76
4.I.3.1 Efecte del silenciament simultani de <i>BgSumo1</i> i <i>BgSumo3</i> durant el desenvolupament nimfal	76
4.I.3.2 Estudi funcional de l'enzim conjugador Ubc9	80
4.I.3.3 Estudi funcional de cadascun dels paràlegs <i>BgSumo1</i> i <i>BgSumo3</i> durant el desenvolupament nimfal	85
4.I.3.3.1 Anàlisi del retard en la muda a causa de l'absència de <i>BgSumo1</i>	86

4.1.3.3.2 Anàlisi del fenotip adult resultant del tractament amb <i>dsBgSumo1</i>	88
4.1.4 ESTUDI DE LA SUMOILACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS DE <i>Blattella germanica</i>	90
4.1.5 ANÀLISI FUNCIONAL DE <i>BgSumo1</i> I <i>BgSumo3</i> EN <i>Drosophila melanogaster</i>	93
CAPÍTOL 4.II: ESTUDI DEL PAPER D'E93 EN LA METAMORFOSI DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL <i>Blattella germanica</i>	97
4.II.1 CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DE L'EXPRESSION DEL GEN <i>E93</i> DE <i>Blattella germanica</i>	99
4.II.1.1 Clonatge d'un fragment del gen <i>E93</i> de <i>Blattella germanica</i>	99
4.II.1.2 Caracterització de l'expressió del gen <i>E93</i> de <i>Blattella germanica</i>	100
4.II.2 ANÀLISI FUNCIONAL DE <i>BgE93</i> DURANT LA TRANSICIÓ A L'ESTADI ADULT	102
4.II.2.1 Efecte de la interferència en els nivells de <i>BgE93</i>	103
4.II.2.2 Efecte fenotípic del silenciament de <i>BgE93</i>	103
4.II.2.3 Anàlisi de les característiques nimfals dels individus <i>BgE93i</i>	104
4.II.3 ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE <i>BgE93</i> I LA VIA DE L'HORMONA JUVENIL	107
4.II.3.1 Efecte de l'hormona juvenil sobre l'activació transcripcional de <i>BgE93</i>	108
4.II.3.2 Efecte de la interferència de <i>BgE93</i> sobre la caiguda dels nivells d'hormona juvenil i <i>BgKr-h1</i>	109
CAPÍTOL 4.III: ESTUDI DEL PAPER D'E93 EN LA METAMORFOSI DELS INSECTES HOLOMETÀBOLS <i>Tribolium castaneum</i> I <i>Drosophila melanogaster</i>	113
4.III.1 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'E93 DURANT LA METAMORFOSI DE <i>Tribolium castaneum</i>	115
4.III.1.1 Característiques del gen <i>E93</i> en <i>Tribolium castaneum</i>	115
4.III.1.2 Efecte del silenciament de <i>TcE93</i>	117
4.II.1.2.1 Estudi de les larves supernumeràries obtingudes per l'absència de <i>TcE93</i>	119
4.II.1.2.2 Estudi de les pupes obtingudes pel tractament amb <i>dsTcE93</i>	119

4.II.1.2.3 Anàlisi funcional de TcE93 durant l'estadi pupal	124
4.III.2 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'E93 DURANT LA METAMORFOSI DE <i>Drosophila melanogaster</i>	126
4.III.2.1 Característiques del gen <i>E93</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	126
4.III.2.2 Efecte del silenciament de <i>DE93</i>	126
CAPÍTOL 4.IV: L'APARICIÓ DE LA METAMORFOSI COMPLETA: ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE E93, Kr-h1 I Br EN L'HOLOMETÀBOL <i>Tribolium castaneum</i>	131
4.IV.1 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE TcKr-h1 DURANT EL PERÍODE PREPUPAL DE <i>Tribolium castaneum</i>	133
4.IV.1.1 Estudi funcional de TcKr-h1 durant la formació de la pupa	133
4.IV.1.2 Funció de TcE93 en la diferenciació adulta prematura dels individus TcKr-h1i	137
4.IV.2 CARACTERITZACIÓ DE LA FUNCIO DE TcBr EN LA DIFERENCIACIÓ ADULTA	140
5. DISCUSSIÓ	147
5.I LA SUMOILACIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL <i>Blattella germanica</i>	149
5.I.1 Els insectes més modificats han perdut un paràleg <i>Sumo</i> al llarg de l'evolució	149
5.I.2 <i>BgSumo1</i> i <i>BgSumo3</i> s'expressen en tots els teixits i es localitzen principalment en el nucli	150
5.I.3 La sumoilació és essencial durant el desenvolupament postembrionari de <i>Blattella germanica</i>	151
5.I.4 La sumoilació és necessària per la muda imaginal de <i>Blattella germanica</i>	152
5.I.5 El paràleg <i>BgSumo1</i> controla la cascada de resposta a la 20E durant la metamorfosi de <i>Blattella germanica</i>	153
5.I.6 El paràleg <i>BgSumo1</i> controla la proliferació de les cèl·lules fol·liculars	154
5.I.7 L'evolució de la funcionalitat de les proteïnes Sumo en insectes	156

5.II E93 ACTUA COM A ESPECIFICADOR ADULT EN ELS INSECTES HEMIMETÀBOLS I HOLOMETÀBOLS	159
5.II.1 E93 és un factor de transcripció de la família Pipsqueak	159
5.II.2 <i>E93</i> s'expressa durant el període metamòrfic en insectes hemimetàbols i holometàbols	159
5.II.3 E93 és l'especificador adult en els insectes hemimetàbols i holometàbols	160
5.II.4 E93 i l'hormona juvenil actuen de manera coordinada durant l'inici de la metamorfosi	162
5.II.5 E93 reprimeix l'expressió de <i>Kr-h1</i> i <i>Br</i> durant la metamorfosi hemimetàbola i holometàbola	165
5.II.6 TcE93 i TcBr controlen la correcta formació de la pupa i la diferenciació adulta en <i>Tribolium castaneum</i>	166
5.II.7 La reinducció de <i>Kr-h1</i> durant el període prepupal és essencial per a la metamorfosi holometàbola	168
5.II.8 L'evolució de la metamorfosi	169
6. CONCLUSIONS	175
7. BIBLIOGRAFIA	181

LLISTA D'ABREVIATURES

Br: Broad

BrdU: Bromodeoxiuridina

CA: *Corpora allata*

CC: *Corpora cardiaca*

cDNA: DNA complementari

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

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Àcid desoxiribonucleic)

dsRNA: *Double-stranded RNA* (RNA de doble cadena)

ESM: Error estàndard de la mitjana

EcR: *Ecdysone receptor* (Receptor d'eccisona)

Gce: *Germ-cell expressed*

HJ: Hormona juvenil

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

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

JHAMT: *Juvenile hormone acid O-methyltransferase* (Metiltransferasa de l'HJ)

JHRE: Juvenile hormone response element (Element de resposta a l'HJ)

Kr-h1: Krüppel homolog 1

LCoR: *Ligand-dependent corepressor* (Correpressor dependent de lligand)

Met: *Methoprene-tolerant* (Tolerant a metoprè)

mRNA: RNA missatger

NGS: *Normal goat serum* (Sèrum normal de cabra)

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacció en cadena de la polimerasa)

PBS: *Phosphate buffer saline* (Tampó fosfat salí)

PH3: *Phospho-histone H3* (Histona H3 fosforilada)

PTTH: *Prothoracicotropic hormone* (Hormona protoracicotròpica)

qRT-PCR: PCR quantitativa

RACE: *Rapid amplification of cDNA ends* (Amplificació ràpida d'extrems de cDNA)

RNA: *Ribonucleic acid* (Àcid ribonucleic)

RNAi: RNA d'interferència

RT-PCR: PCR semiquantitativa

SIM: *SUMO-interacting motif* (Motiu d'interacció amb SUMO)

ssRNA: *single-stranded RNA* (RNA de cadena simple)

SUMO: *Small ubiquitin-related modifier*

Tai: Taiman

USP: *Ultraspiracle*

20E: 20-hidroxiecdisona

1. INTRODUCCIÓ

Durant els darrers anys el disseny de noves tecnologies de seqüenciació, juntament amb l'acumulació de dades morfològiques, paleontològiques i moleculars, han permès obtenir gran quantitat d'informació per conèixer més en detall la filogènia dels insectes (figura 1.1) (Trautwein et al., 2012). El grup dels insectes és el més nombrós i divers dins el regne animal, ja que se n'han descrit gairebé un milió d'espècies (el 80 % del total de les espècies animals) i es creu que encara n'hi podria haver fins a 10 milions per identificar (Grimaldi and Engel, 2005). Per tant, conèixer com s'ha generat tanta diversitat durant l'evolució de la classe Insecta és clau per entendre l'evolució de la vida a la terra. En aquest sentit el factor fonamental que ha fet que els insectes assolissin un gran èxit evolutiu ha estat l'aparició de la metamorfosi, que els ha permès colonitzar tots els medis, aprofitar aliments diferents i aconseguir una elevada capacitat reproductora.

1.1 LA METAMORFOSI

La metamorfosi se sol definir com el conjunt de canvis morfològics i fisiològics que experimenten determinats animals des que surten de l'ou fins que assoleixen l'estadi adult. En els insectes la metamorfosi requereix de la coordinació dels diversos processos de mort cel·lular de teixits juvenils amb el creixement i morfogènesi de les estructures que han de formar l'individu adult.

1.1.1 Breu història de l'estudi de la metamorfosi

El filòsof grec Aristòtil (384 aC – 322 aC), en el llibre *Historia Animalium* (343 aC), va ser el primer en descriure la metamorfosi d'una manera objectiva, a través d'observacions directes. Més tard, durant els segles de domini de l'Imperi Romà Plini el Vell va analitzar aquest procés dins el cicle de vida de les abelles, en el seu *Naturalis Historia*. Després d'un període sense cap avenç remarcable en l'estudi del medi natural, durant el Renaixement es tornà a recuperar l'interès per aquesta transformació. Així aparegué el primer treball dedicat a la metamorfosi dels insectes, *Metamorphosis Naturalis* (1662), del pintor i naturalista Jan Goedart, que va ser el primer en utilitzar el terme metamorfosi. Durant la mateixa època Jan Swammerdam també va contribuir a ampliar aquests coneixements gràcies a l'*Historia Insectorum Generalis* (1669) i la seva obra pòstuma *Biblia Naturae* (1737-1738). En els seus treballs Swammerdam descrivia el que avui es coneix com a metamorfosi completa, després d'observar que molts insectes desenvolupaven les ales sota la cutícula larvària, mentre creixien, i que tenien una fase quiescent abans de passar a la fase adulta. També destacable fou l'aportació de Maria Sibylla Merian, amb l'obra *Metamorphosis Insectorum Surinamiensis* (1705), o la de René-Antoine Ferchault de Réaumur, que en les *Mémoires pour servir à l'histoire des insectes* (1734 - 1742) va descriure el comportament i el cicle de vida de molts insectes. Més tard, durant el segle XIX aparegueren diversos manuals d'entomologia que contribuïren a augmentar els coneixements sobre la metamorfosi dels insectes, entre els quals destaquen *An Introduction to Entomology* (William Kirby i William Spence, 1815), *Manual of Entomology* (Hermann Burmeister, 1836), *An Introduction to the Modern Classification of Insects* (John O. Westwood, 1939) i *Les*

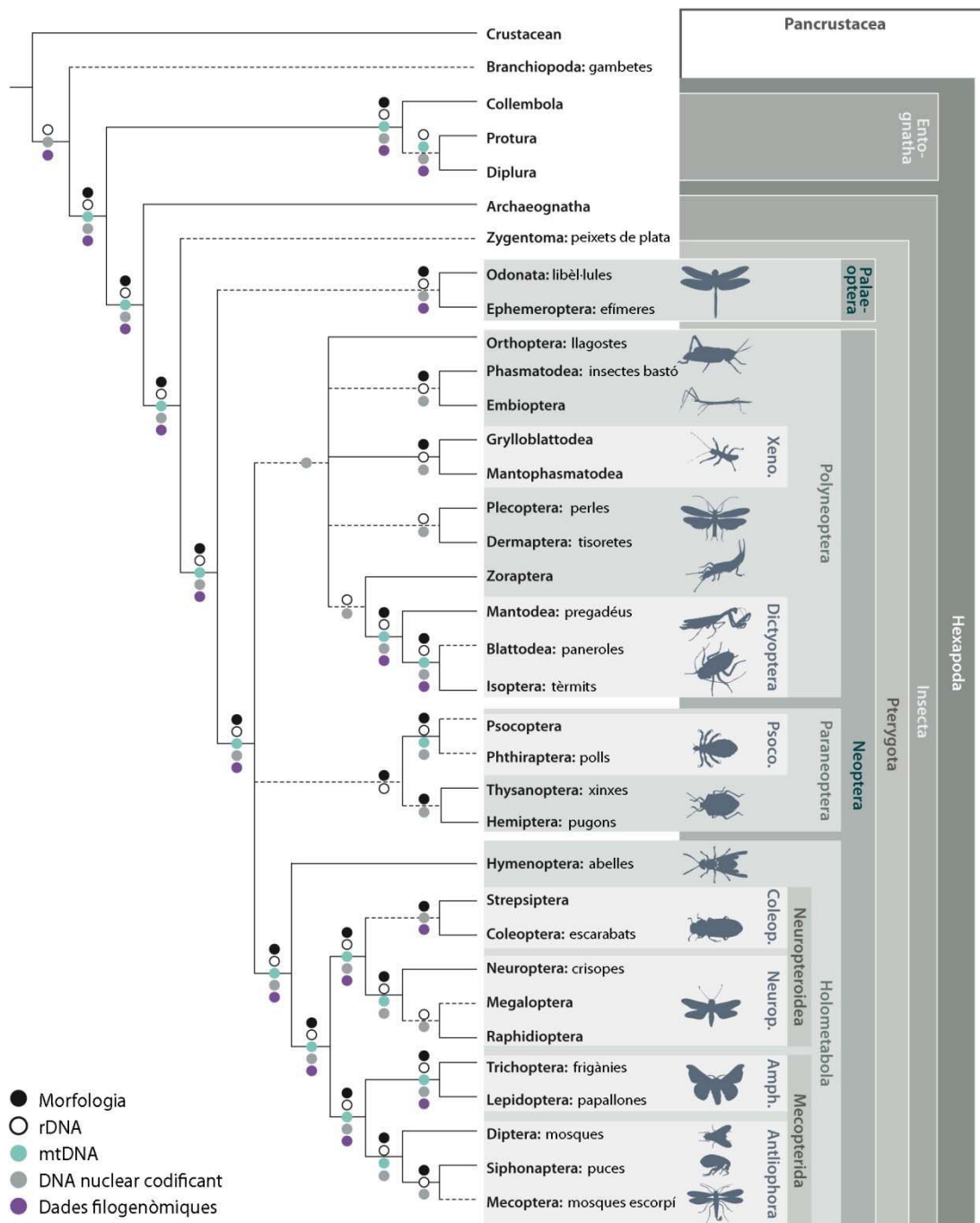


Figura 1.1. Filogènia de la classe Insecta. Arbre que representa la relació entre les diferents espècies d'insectes. Les línies puntejades indiquen relacions basades en proves menys sòlides. Abreviacions: rDNA, DNA ribosomal; mtDNA, DNA mitocondrial; Amph., Amphiesmenoptera; Coleop., Coleopterida; Neurop., Neuropterida; Psoco., Psocodea; Xen., Xenonomia. Adaptat de Trautwein *et al.* (2012).

métamorphoses des insectes (Maurice Girard, 1866). Al segle XIX, John Lubbock publicà l'obra *On the Origin and Metamorphoses of Insects* (1874), on per primera vegada s'anализava l'origen i l'evolució de la metamorfosi dels insectes, i es plantejaven grans interrogants sobre l'encaix d'aquesta transformació en el marc de la teoria de l'evolució de Charles Darwin. Finalment,

durant el segle XX el coneixement de la metamorfosi dels insectes va fer un gran salt endavant gràcies al descobriment de l'hormona antimetamòrfica per part de Vincent B. Wigglesworth (1930), al descobriment de l'hormona de la muda per part de Karl Butenandt i Peter Karlson (1954), i als treballs de James W. Truman i Lynn M. Riddiford, descrits detalladament en pròxims apartats.

1.1.2 Classificació dels insectes segons la seva estratègia metamòrfica

Els insectes es classifiquen, segons la seva estratègia metamòrfica, en tres grans grups: ametàbols, hemimetàbols i holometàbols. Els primers insectes que van aparèixer a la terra, fa almenys 400 milions d'anys, eren ametàbols (metamorfose simple). Actualment només dos ordres representen aquest grup: Archaeognatha i Zygentomea (peixets de plata) (figura 1.1) (Grimaldi and Engel, 2005). Els insectes ametàbols es caracteritzen pel fet que els individus que eclosionen de l'ou són morfològicament iguals als adults i van creixent al llarg de les diferents mudes. Un cop assolida la maduresa sexual segueixen mudant i augmentant de mida, i no presenten ales en cap dels estadis del seu desenvolupament (figura 1.2).

Els fòssils més antics que s'han trobat dels primers insectes alats daten de fa uns 350 milions d'anys (Paleozoic) i pertanyen a individus que seguien una estratègia hemimetàbola (metamorfose incompleta) (Grimaldi and Engel, 2005). Aquesta es caracteritza pel fet que les formes juvenils, anomenades nimfes, són morfològicament molt semblants als adults, igual que en el cas dels ametàbols. Les nimfes hemimetàboles, però, creixen només fins a arribar a l'etapa adulta, moment en el qual deixen de mudar. Els adults difereixen de les nimfes per la presència de genitèlia i ales funcionals (figura 1.2). Les ales es desenvolupen progressivament durant els successius estadis nimfals dins una mena d'estoigs anomenats *wing pads*. Paneroles, grills i xinxes són alguns dels insectes més comuns que segueixen aquesta estratègia metamòrfica. També s'agrupen dins els hemimetàbols algunes espècies que inclouen en el seu desenvolupament entre un i tres estadis quiescents, com és el cas d'alguns tisanòpters (Thysanoptera). A aquest tipus de desenvolupament se l'ha anomenat neometàbol, i s'ha especulat amb la possibilitat que fos un pas intermediari entre hemimetàbols i holometàbols (figura 1.2) (Minakuchi et al., 2011; Sehnal et al., 1996). Un altre subgrup dins dels hemimetàbols és el dels prometàbols, que inclou l'ordre Ephemeroptera i que es caracteritza pel fet que les nimfes de darrer estadi nimfal ja tenen ales funcionals, tot i que no són capaces de reproduir-se fins que té lloc la muda adulta (figura 1.2) (Sehnal et al., 1996).

La gran majoria de les espècies d'insectes (aproximadament el 80 %) presenten, però, una metamorfosi completa: són els holometàbols. Aquests formen un grup monofilètic que va aparèixer a partir d'ancestres hemimetàbols fa uns 300 milions d'anys (Kristensen, 1999; Wheeler, 2001). Es caracteritzen per tenir unes formes juvenils, les larves, que són morfològicament molt diferents dels adults. Durant l'estadi larvari té lloc el creixement i, un cop completat, es forma l'adult a partir d'un estadi quiescent anomenat pupa, on té lloc la metamorfosi (figura 1.2). Els ordres més destacats que presenten aquesta estratègia metamòrfica són: Hymenoptera (formigues, abelles i vespes), Coleoptera (escarabats), Lepidoptera (papallones) i Diptera (mosques i mosquits).

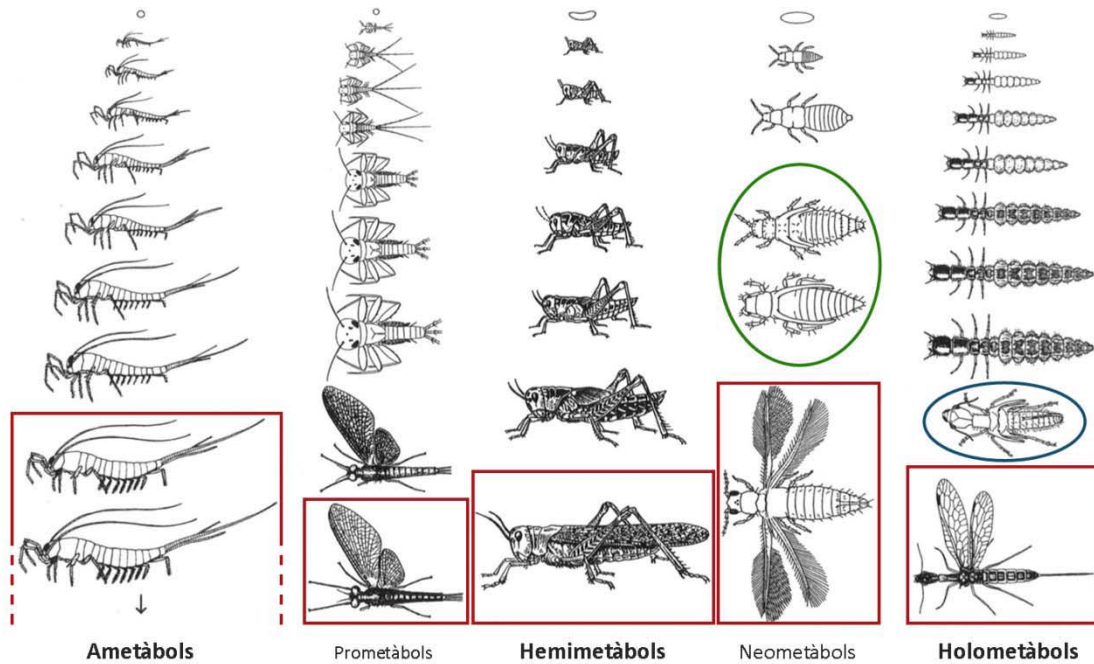


Figura 1.2. Estratègies metamòrfiques dels insectes. Principals tipus de metamorfosi en els insectes: ametàbol, hemimetàbol (amb els subtipus prometàbol i neometàbol) i holometàbol. Els requadres vermells emmarquen l'estadi adult. En els ametàbols, el requadre obert indica que segueixen mudant durant l'estadi adult. L'el·lipse verda assenyalava els estadis quiescents dels neometàbols. L'el·lipse blava encercla la pupa holometàbola. Adaptat de Sehna *et al.* (1996).

1.1.3 L'evolució de la metamorfosi

L'aparició de la metamorfosi completa ha permès la gran diversificació i èxit adaptatiu de la classe Insecta. El primer pas cap a aquest tipus de metamorfosi es va donar amb l'aparició de les ales i la consegüent habilitat de volar, que permetia als insectes una major dispersió, escapar dels depredadors i trobar nous aliments. Però les formes juvenils i adultes d'aquests primers insectes alats (hemimetàbols) seguien compartint el mateix hàbitat i els mateixos recursos alimentaris. En canvi l'aparició de la metamorfosi completa, amb formes larvàries morfològicament molt diferents de les adultes, va permetre que explotessin recursos diferents, evitant així la competència entre els períodes de creixement i reproducció. La manera com es va passar dels dos estadis del desenvolupament hemimetàbol (nimfa i adult) als tres estadis de l'holometàbol (larva, pupa i adult) ha estat objecte de controvèrsia des de l'inici de l'estudi de l'evolució de la metamorfosi. Les teories que s'han proposat per donar explicació a aquesta incògnita s'agrupen bàsicament en dos tipus de pensaments: d'una banda, els que consideren les fases larvàries dels holometàbols com estadis equivalents a les fases ninfals dels hemimetàbols i, de l'altra, els que consideren les larves holometàboles com el producte d'una "desembrionització" prematura.

1.1.3.1 Teoria de l'equivalència larva-nimfa

La teoria que intenta explicar l'aparició de la metamorfosi completa equiparant les fases larvàries dels insectes holometàbols amb les fases nimfals dels hemimetàbols va ser inicialment formulada per Éraсте Poyarkoff (Poyarkoff, 1914) i posteriorment desenvolupada per Howard Hinton (Hinton, 1963). Segons aquesta teoria, la separació de nínxols entre les formes immadures i les reproductores d'una mateixa espècie hauria portat a una diferenciació morfològica entre aquests dos estadis, fet que hauria provocat l'aparició de la pupa com a fase intermèdia. Segons Poyarkoff, la pupa s'hauria originat a partir del desdoblament de l'estadi adult en dues fases, mentre que Hinton proposava que s'hauria format a partir de la modificació progressiva del darrer estadi nimfal (figura 1.3). Aquest, estudiant la musculatura de les pseudo-potes presents en moltes larves holometàboles, va concloure que eren estructures secundàries producte de l'adaptació d'aquestes larves al medi, i que havien aparegut almenys 27 vegades en l'ordre dels Dípters i 8 en el dels Lepidòpters. Això contradeia un dels indicis en els que es recolzava la teoria de la "desembrionització" de Berlese-Imms, que defensava que aquestes pseudo-potes eren apèndixs retinguts per la larva després d'eclosionar de l'ou (veure apartat 1.1.3.2).

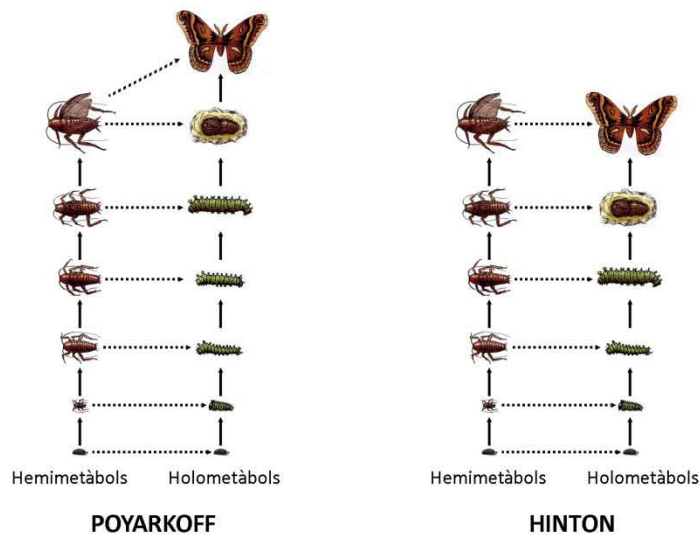
La teoria que considera les larves dels insectes holometàbols i les nimfes dels hemimetàbols com estadis equivalents té encara avui dia molts seguidors. Recentment, Xavier Bellés ha proposat una nova variant d'aquesta teoria, a la qual ha anomenat "hipòtesi del *Grand Tour*" (Bellés, 2013). Segons Bellés, la gran innovació dels insectes holometàbols hauria estat l'augment de la capacitat d'evolució de la nimfa, fet que hauria permès que adquirís formes molt diferents a l'adult i es transformés finalment en una larva holometàbola capaç d'adaptar-se a nous medis. Aquesta, però, necessitaria tornar a una morfologia adultoide que li permetés arribar a l'estadi adult, fet que s'hauria resolt amb l'aparició de l'estadi pupal. Aquesta teoria implica que en el pas de l'hemimetabolia a l'holometabolia s'haurien hagut de donar dues innovacions: la interiorització dels primordis de les estructures adultes durant les fases juvenils, i l'exteriorització d'aquestes en la fase pre-adulta (pupa).

1.1.3.2 La teoria de la "desembrionització"

El primer en proposar que l'aparició de la metamorfosi completa es podria haver donat per l'eclosió precoç de l'embrió va ser William Harvey, al 1651. John Lubbock, al 1883, va desenvolupar aquesta teoria en el seu llibre *On the Origin and Metamorphosis of Insects*, on afirmava que l'embrió dels insectes hemimetàbols passa per totes les fases del seu desenvolupament morfogènètic dins l'ou, mentre que en els insectes holometàbols l'eclosió es produeix abans de completar-se el desenvolupament embrionari. A principis del segle XX, Antonio Berlese (1913) i, posteriorment, Augustus Daniel Imms (1925) van refer la hipòtesi de Lubbock (Berlese, 1913; Imms, 1937). Segons Berlese, el desenvolupament embrionari transcorreria a través de tres estadis: el protòpode, on es distingeix la formació del cap i els apèndix toràcics però l'abdomen està poc diferenciat; el polípode, quan ja s'ha donat la segmentació abdominal i els apèndix estan perfectament diferenciats; i l'oligòpode, amb els apèndix abdominals secundaris reduïts. Així, l'embrió dels insectes hemimetàbols eclosionaria

després de finalitzar el període oligòpode, mentre que els embrions dels insectes holometàbols eclosionarien durant l'estadi protòpode (per exemple en alguns himenòpters endoparàsits) o oligòpode (per exemple en coleòpters i neuròpters), i completarien la seva morfogènesi durant el període pupal. Segons aquesta teoria, doncs, l'estadi larvari dels insectes holometàbols seria equivalent al període embrionari dels hemimetàbols, però fora de l'ou, i la fase pupal seria l'equivalent holometàbol a les fases nimfals hemimetàboles (figura 1.3).

Teories basades en l'equivalència larva-nimfa



Teories basades en la "desembrionització"

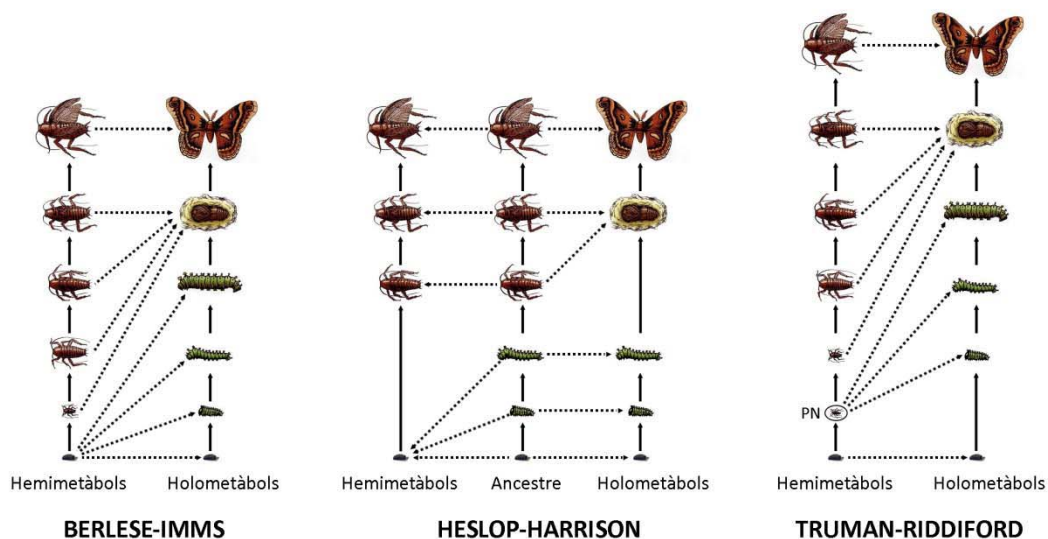


Figura 1.3. Teories sobre l'evolució de la metamorfosi . Representacions esquemàtiques de l'homologia entre els diferents estadis del desenvolupament dels insectes hemimetàbols i holometàbols, segons les teories de l'equivalència larva-pupa (Poyarkoff i Hinton) i les teories de la "desembrionització" (Berlese-Imms, Heslop-Harrison i Truman-Riddiford). Abreviacions: PN, pronimfa.

Posteriorment es van proposar algunes variacions d'aquesta teoria, com per exemple l'elaborada el 1940 per H. Henson, que a través dels seus estudis de la metamorfosi del tub digestiu va considerar la fase pupal com una repetició del desenvolupament embrionari, en comptes de ser-ne la continuació (Henson, 1946). També G. Heslop-Harrison (1958) va proposar una modificació de la teoria de Berlese i Imms al considerar que hi havia un insecte ancestral que naixia com a larva polípoda i després passava a nimfa oligòpoda (Heslop-Harrison, 1958). Segons Heslop-Harrison els insectes hemimetàbols haurien aparegut a partir de la mobilització de les fases larvàries polípodes d'aquest ancestre al procés d'embriogènesi ("embrionització"), mentre que els holometàbols haurien sorgit per la compressió dels estadis nimfals en un únic estadi (pupa) (figura 1.3). Més recentment, James W. Truman i Lynn M. Riddiford han proposat, basant-se en la teoria de la "desembrionització" de Berlese i Imms, una nova hipòtesi sobre l'evolució de la metamorfosi a partir de la combinació de les dades morfològiques i paleontològiques conegudes amb els estudis endocrins i moleculars més recents (Truman and Riddiford, 1999; Truman and Riddiford, 2002).

1.1.3.3 La teoria de la pronimfa. Visió endocrina de l'evolució de la metamorfosi

La teoria que proposen Truman i Riddiford es fonamenta, principalment, en l'existència d'un estadi durant el desenvolupament embrionari dels insectes hemimetàbols que no s'havia descrit fins al moment, i que aquests autors van anomenar pronimfa. La pronimfa és un estadi molt especialitzat que s'inicia just en el moment del tancament dorsal de l'embrió, i que precedeix el primer estadi nimfal. En diversos insectes hemimetàbols l'estadi de pronimfa transcorre completament dins l'ou, i en el moment de l'eclosió la primera fase nimfal es desfà del còrion de l'ou i de la cutícula pronimfal alhora (per exemple en les paneroles). Alguns hemimetàbols, però, tenen una pronimfa més modificada i adaptada a l'exterior, que emergeix de l'ou i passa algun temps a l'exterior abans de mudar al primer estadi nimfal, com és el cas de les llagostes. Truman i Riddiford van hipotetitzar que la larva dels insectes holometàbols s'hauria format a partir de la pronimfa hemimetàbola, considerant aquestes dues fases com a equivalents. Aquest pas s'hauria donat a partir d'un allargament del període pronimfal, que hauria adquirit a la vegada la capacitat d'alimentar-se en un hàbitat no explotat per les fases adultes de la seva espècie, fet que li conferiria un avantatge evolutiu enfront dels estadis nimfals, que sí competeixen amb les formes adultes. Això hauria provocat que la formació de l'adult es concentrés al final del darrer estadi pronimfal/larvari, donant lloc a la pupa (equivalent als estadis nimfals hemimetàbols) (figura 1.3). L'existència de la pronimfa ha estat, però, qüestionada per alguns estudis posteriors, que a partir d'observacions de la ultraestructura dels embrions de diverses espècies hemimetàboles i holometàboles han vist que tant en un cas com en l'altre se sintetitzen tres cutícules durant l'embriogènesi, excepte en els dípters més modificats, on se'n sintetitzen només dues (Konopová and Zrzavý, 2005). Aquest fet, tot i no invalidar l'existència de la pronimfa, ha fet trontollar la hipòtesi de Truman i Riddiford.

A més de la introducció del concepte de pronimfa, la teoria de Truman i Riddiford ha estat molt innovadora pel fet de donar una explicació endocrina a l'evolució de la metamorfosi. Bàsicament dues hormones, la 20-hidroxicdisona (20E) i l'hormona juvenil (HJ), controlen la

majoria de processos que tenen lloc durant el desenvolupament dels insectes, entre ells la muda i la metamorfosi (Dubrovsky, 2005) (veure apartats 1.3 i 1.4). La 20E indueix totes les transicions entre els diversos estadis del desenvolupament, mentre que l'HJ regula el caràcter d'aquestes transicions. Així, tant en les nimfes hemimetàboles com en les larves holometàboles, en presència d'HJ les transicions donen com a resultat un nou estadi amb les mateixes característiques morfològiques que l'anterior. En els insectes hemimetàbols, l'absència d'HJ durant el darrer estadi nimfal permet que es doni la metamorfosi i el pas a l'estadi adult. De la mateixa manera, en l'última fase larvària dels holometàbols es produeix una caiguda d'HJ que possibilita la morfogènesi i formació de la pupa, és a dir, l'inici de la metamorfosi. Aquestes hormones controlen també el desenvolupament embrionari. En els embrions dels insectes hemimetàbols l'HJ apareix un cop formada la pronimfa, mentre que en els holometàbols apareix proporcionalment molt abans (figura 1.4). Així, Truman i Riddiford van postular que l'avançament de l'aparició de l'HJ durant l'embriogènesi podria haver estat clau en la transformació de la pronimfa en larva. Segons aquests autors la presència d'HJ en el moment de la formació de la pronimfa interferiria en la formació del patró morfològic adult i forçaria la diferenciació d'estructures basades en un patró incomplet, donant lloc a la larva holometàbola.

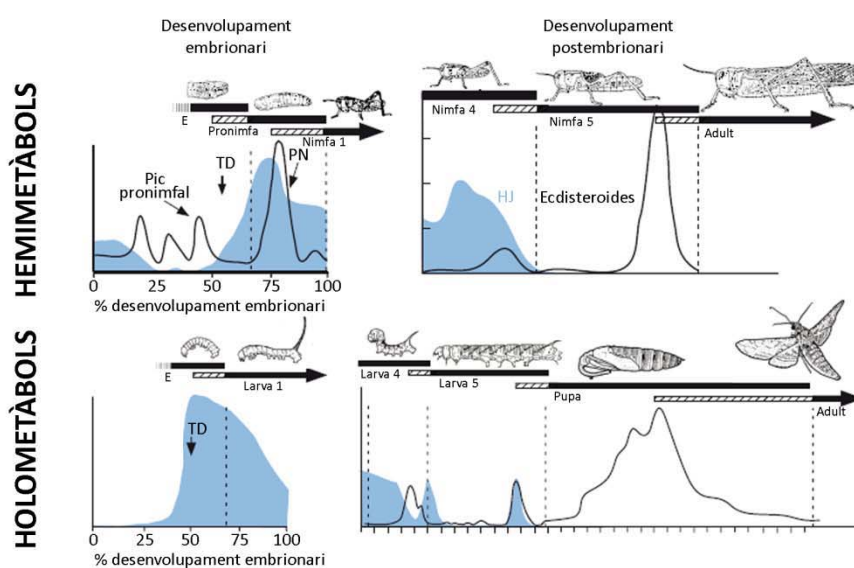


Figura 1.4. Nivells hormonals durant el desenvolupament hemimetàbol i holometàbol. Nivells d'ecdisteroides i d'hormona juvenil (HJ) durant el període embrionari (esquerra) i postembrionari (dreta) d'un insecte hemimetàbol (*Schistocerca gregaria*, part superior) i d'un holometàbol (*Manduca sexta*, part inferior). Les variacions d'ecdisteroides es representen amb una línia negra, mentre que les d'HJ es mostren en blau. Abreviacions: E, estadi embrionari; PN, pronimfa; TD, tancament dorsal. Adaptat de Truman i Riddiford (1999).

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

Tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior, la 20E és una de les hormones que controlen el desenvolupament dels insectes. Forma part de la família dels ecdisteroides, nom amb el que

s'agrupen els esterols polihidroxilats derivats del colesterol, i va ser aïllada per primera vegada per Adolf F. J. Butenandt i Peter Karlson el 1954. Des de llavors s'han anat ampliant els coneixements sobre el funcionament d'aquesta hormona i s'ha vist que no només controla els processos de muda i metamorfosi sinó que també té un paper important en el creixement, la morfogènesi i la reproducció dels insectes (Nijhout, 1994). El precursor de la 20E, l'ecdisona, se sintetitza principalment a la glàndula protoràtica, òrgan endocrí situat en el protòrax dels insectes, tot i que s'ha vist que també es pot produir en altres teixits com l'epidermis, els oenòcits i, sobretot, les gònades. Precisament els òrgans sexuals són els encarregats de la síntesi d'ecdisona durant l'etapa adulta, per tal de controlar processos relacionats amb la reproducció com la síntesi de feromones sexuals, l'oogènesi i la vitel·logènesi (Lafont et al., 2005). La producció d'ecdisona en la glàndula protoràtica està principalment regulada per una hormona peptídica, l'hormona protoracicotròpica (PTTH).

1.2.1 La PTTH, hormona inductora de l'ecdisteroidogènesi

La PTTH és un neuropèptid que s'expressa en dues neurones localitzades a les regions laterals dels dos hemisferis del cervell, les neurones protoracicotròpiques (Siegmond and Korge, 2001). Tot i que es coneix la seva existència des de l'any 1922, quan Stefan Kopec va demostrar que el cervell produïa un factor necessari per induir la metamorfosi de l'arna *Lymantria dispar* (lepidòpter), no ha estat fins fa poques dècades que s'ha aconseguit aïllar, en el cuc de seda *Bombyx mori* (Kataoka et al., 1991; Kawakami et al., 1990). La PTTH se sintetitza en forma de polipèptid precursor que és processat i transportat al llarg dels axons de les neurones productores (Gilbert and Warren, 2005). La proteïna madura resultant adquireix una estructura terciària a partir de tres ponts disulfur que li permet formar homodímers a través d'un enllaç cisteïna-cisteïna (Marchal et al., 2010; Zhang and Denlinger, 2011). En els lepidòpters la PTTH s'emmagatzema al complex format pels *Corpora cardiaca* (CC) i *Corpora allata* (CA), des d'on s'allibera en determinats moments del desenvolupament per induir la síntesi i secreció d'ecdisona en la glàndula protoràtica de larves i pupes. L'ecdisona, per la seva banda, serà finalment transformada en 20E en els teixits perifèrics, tal i com s'explica més endavant. En el dípter *Drosophila melanogaster* la PTTH també se sintetitza en un parell de neurones cerebrals que, a diferència dels lepidòpters, innerven directament la glàndula protoràtica (McBrayer et al., 2007). Tot i que la PTTH és un element clau per la metamorfosi de *D. melanogaster*, l'eliminació d'aquestes neurones no impedeix que es doni aquest procés, sinó que tan sols provoca un retràs considerable en l'inici de la pupació degut a una menor producció d'ecdisteroides (McBrayer et al., 2007). Arran d'aquests resultats s'ha especulat que la PTTH podria tenir alguna funció en la transmissió del senyal del pes crític (pes mínim que ha d'haver assolit una larva per iniciar la metamorfosi), juntament amb altres vies com la de la insulina/IGF (Mirth and Riddiford, 2007; Mirth and Shingleton, 2012). En insectes hemimetàbols gairebé no se sap res sobre l'existència/funció de la PTTH, i només s'ha pogut comprovar la seva presència en determinades neurones cerebrals de l'hemípter *Rhodnius prolixus* (Vafopoulou et al., 2007). D'altra banda, s'ha demostrat que diversos factors afecten la síntesi i la secreció de la PTTH, com el fotoperíode, a través del neuropèptid PDF (de l'anglès *pigment dispersion factor*) (McBrayer et al., 2007; Renn et al., 1999), l'HJ, que es considera un repressor de la síntesi de PTTH (Rountree and

Bollenbacher, 1986), i el dany en teixits imaginals, que s'ha vist que envia un senyal (DILP8) a les neurones protoracicotròpiques que afecta els nivells de PTTH (figura 1.5) (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012; Halme et al., 2010).

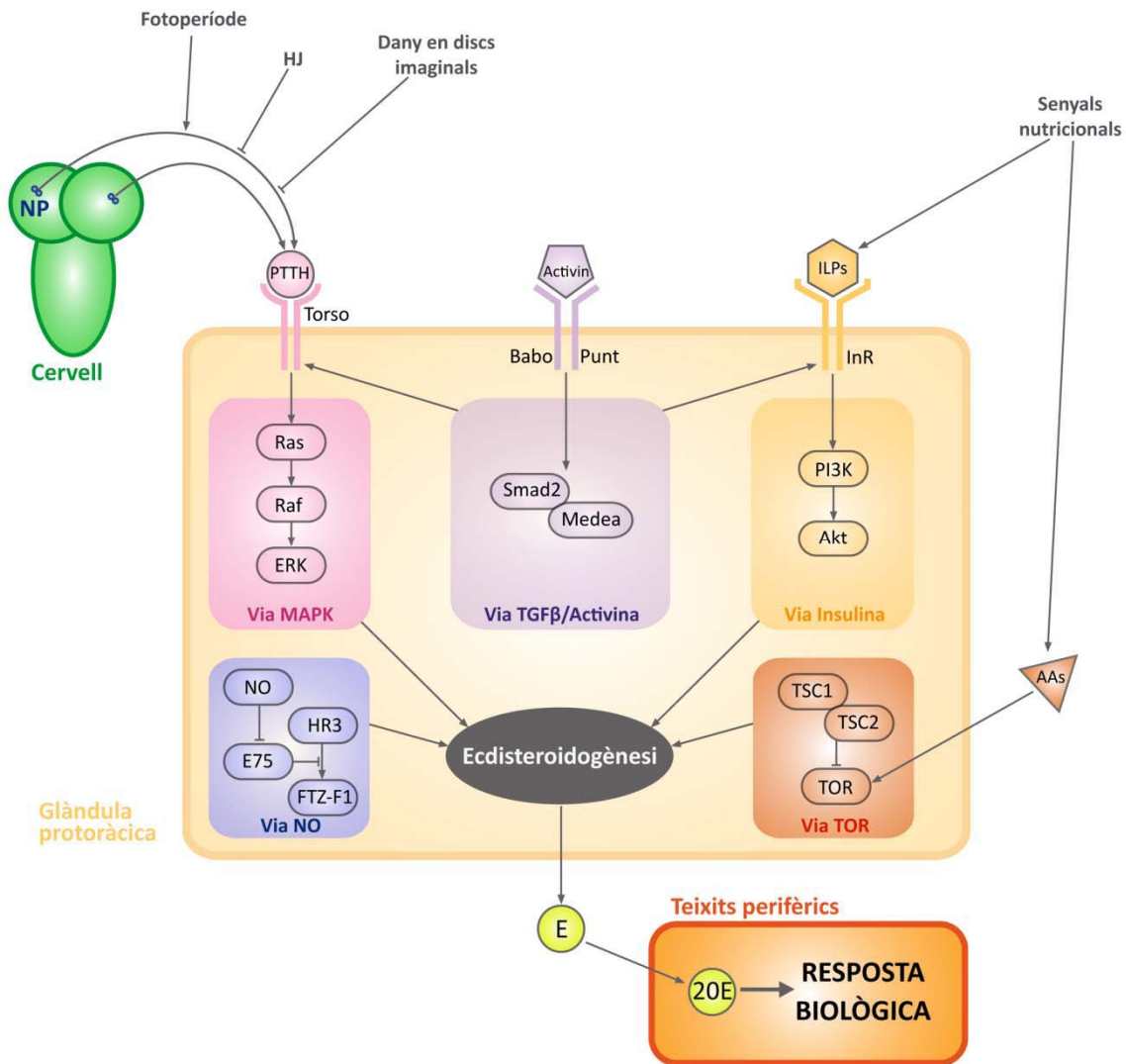


Figura 1.5. Control de la síntesi d'ecdisona en la glàndula protoràtica de *Drosophila melanogaster*. Diferents factors i vies de senyalització que regulen l'ecdisteroidogènesi en la glàndula protoràtica de *D. melanogaster*. Abreviacions: HJ, hormona juvenil; NP, neurones protoracicotròpiques; PTTH, hormona protoracicotròpica; ILPs, *insulin-like peptides*; InR, receptor d'insulina; AAs, aminoàcids; NO, òxid nítric; E, ecdisona; 20E, 20-hidroxiecdisona.

Un cop secretada, la PTTH s'uneix a un receptor quinasa de tirosines situat a la membrana de les cèl·lules de la glàndula protoràtica, anomenat Torso (Rewitz et al., 2009). Aquesta unió desencadena una cascada de fosforilacions de diverses MAP-quinases (MAPK), entre elles Ras, Raf i ERK, que finalment desemboca en la regulació transcripcional, traduccional i

postraduccional de diversos dels enzims encarregats de la síntesi de l'ecdisona (figura 1.5) (Marchal et al., 2010; McBrayer et al., 2007; Yamanaka et al., 2007).

Tot i que el sistema de la PTH es considera el principal regulador del desenvolupament en *D. melanogaster*, altres factors també afecten la producció d'ecdisona durant la metamorfosi, com per exemple les vies metabòliques de la insulina/IGF i de TOR (*target of rapamycin*), que transmeten el senyal de l'estat nutricional a la glàndula protoràcica, la via de TGF β /Activina o la senyalització per òxid nítric (figura 1.5) (Cáceres et al., 2011; Gibbens et al., 2011; Layalle et al., 2008; Mirth and Riddiford, 2007; Mirth and Shingleton, 2012).

1.2.2 Biosíntesi de l'ecdisona

El substrat inicial de l'ecdisteroidogènesi és el colesterol, que els insectes necessiten incorporar a partir de la dieta ja que no són capaços de sintetitzar-lo *de novo*. Abans d'iniciar-se la biosíntesi d'ecdisona cal, doncs, la introducció del colesterol a les cèl·lules de la glàndula protoràcica, que es produeix a través de transportadors de colesterol, principalment membres de la família de receptors Scavenger classe B tipus I (SR-BI) (Herboso et al., 2011). Un cop incorporat, el colesterol és transformat a 7-dehidrocolesterol mitjançant un enzim amb activitat 7,8-deshidrogenasa, codificat pel gen *neverland* (figura 1.6) (Yoshiyama et al., 2006). Tot seguit es donen un sèrie de reaccions enzimàtiques destinades a convertir el 7-dehidrocolesterol a Δ^4 -diketol. El nombre de reaccions i els enzims responsables d'aquestes transformacions es desconeixen i conformen l'anomenada "caixa negra" de l'ecdisteroidogènesi. Un component potencial d'aquesta "caixa negra" són els paràlegs *spook* i *spookier*, que codifiquen per citocroms P450 hidroxilases pertanyents a la família dels gens "*Halloween*". *spook* s'expressa en l'embrió i les cèl·lules fol·liculars de l'ovari de *D. melanogaster* i la seva absència impedeix la progressió de l'embrió. *spookier*, en canvi, s'expressa en la glàndula protoràcica de la larva (Namiki et al., 2005; Ono et al., 2006). Tot i que es creu que ambdós realitzen la mateixa funció en diferents moment del desenvolupament de moment no es coneix quina reacció concreta catalitzen (figura 1.6). Un altre possible component de la "caixa negra" és l'enzim codificat pel gen *non-molting glossy (nm-g)/shroud (sro)*, que pertany a la família de les proteïnes deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR), i que és imprescindible perquè tingui lloc la transformació de 7-dehidrocolesterol a 5 β -ketodiol (figura 1.6) (Niwa et al., 2010). Les tres darreres reaccions de l'ecdisteroidogènesi que es donen a la glàndula protoràcica, i que són les responsables de la transformació del 5 β -ketodiol en ecdisona, estan catalitzades per citocroms P450 codificats per gens pertanyents a la família dels "*Halloween*". La primera d'aquestes reaccions està controlada per *phantom* i transforma el 5 β -ketodiol en 5 β -ketotriol (Niwa et al., 2004; Warren et al., 2004). Tot seguit, aquest és transformat a 2-deoxiecdisona per una 22-hidroxilasa codificada pel gen *disembodied* (Chávez et al., 2000; Warren et al., 2002), que finalment passa a ecdisona per l'acció de *shadow* (Warren et al., 2002). L'ecdisona s'alliberarà a l'hemolimfa i gràcies a l'acció d'un altre citocrom P450, *shade*, serà transformada en els teixits diana a 20-hidroiecdisona (20E), la forma més activa dels ecdisteroides (Petryk et al., 2003; Rewitz et al., 2006).

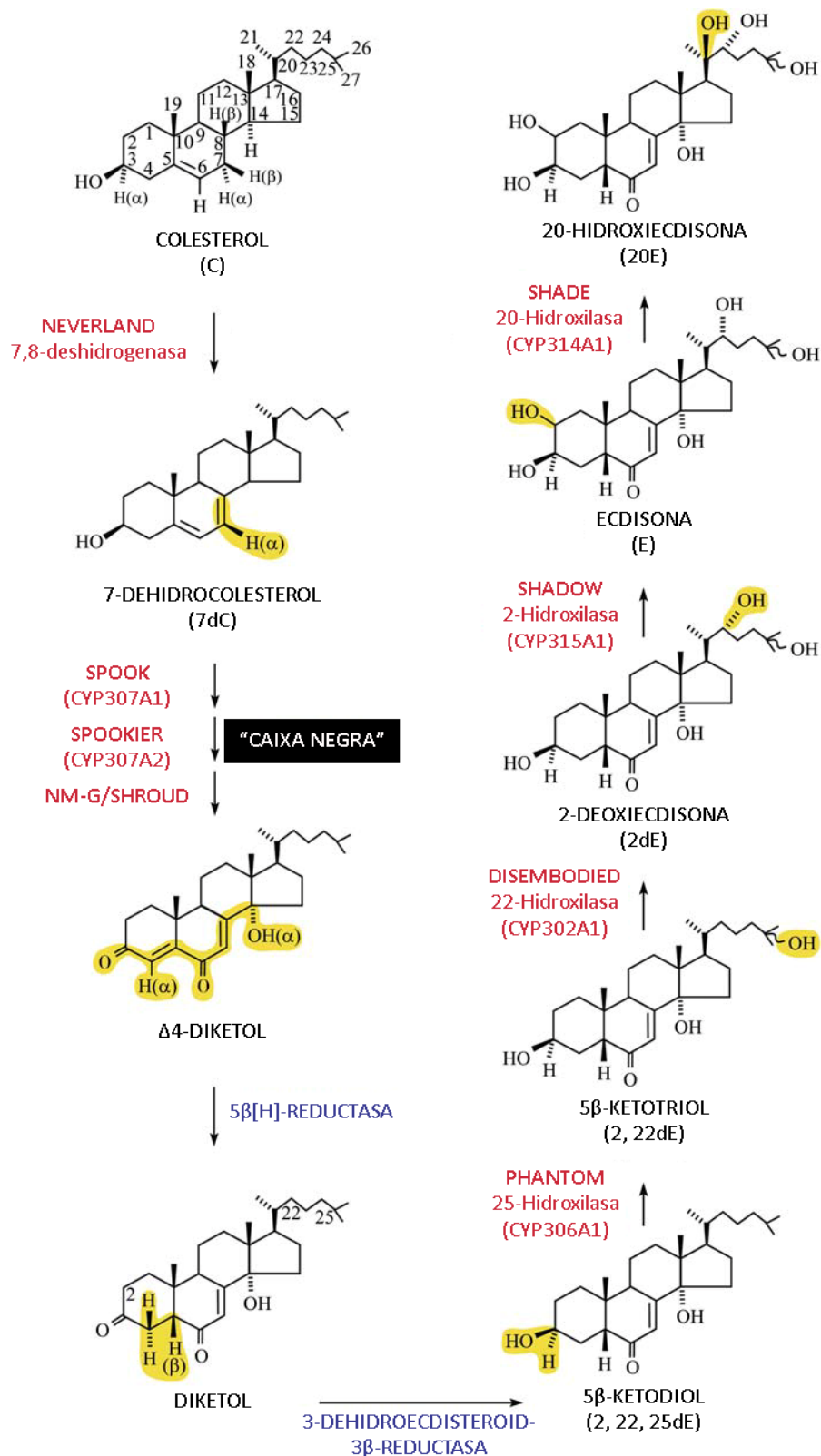


Figura 1.6. Via de síntesi de la 20-hidroiecdisona en els insectes. Conjunt de molècules intermediàries, reaccions i enzims que transformen el colesterol en 20E en els insectes. En vermell es representen els enzims que intervenen en el procés i en blau les reaccions de les que no es coneix l'enzim que les catalitza. En groc es remarca la part de la molècula modificada en cada reacció. Adaptat de Gilbert i Warren (2005).

D'altra banda, alguns estudis han comprovat que no només la síntesi de les hormones esteroidals és important per al correcte desenvolupament dels insectes sinó que també ho és la seva inactivació. Així, s'ha vist que el gen *Cyp18a1*, que codifica per una 26-hidroxisilasa que inactiva la 20E, s'indueix per la mateixa 20E i és essencial per a la correcta progressió de la metamorfosi (Guittard et al., 2011; Rewitz et al., 2010).

1.2.3 Mecanisme d'acció de la 20-hidroxiecdisona: el model d'Ashburner

El mecanisme pel qual la 20E és capaç d'induir la muda i tots els efectes biològics que es deriven de la seva presència va ser descrit per primera vegada per Michael Ashburner l'any 1973. Mitjançant una sèrie d'experiments amb incubacions de cromosomes politènics de *D. melanogaster* Ashburner va proposar un model d'acció de la 20E basat en l'existència d'una jerarquia de factors de transcripció, que amb els anys s'ha anomenat "model d'Ashburner" (Ashburner, 1973; Ashburner et al., 1974). D'acord amb aquest model, la unió de la 20E al seu receptor activa en primer lloc l'expressió ràpida i directa d'una sèrie de gens, anomenats primerencs. Les proteïnes codificades per aquests gens, alhora que reprimeixen la seva pròpia expressió, activen un nombre major de gens, anomenats tardans, que són els encarregats de dur a terme la funció biològica (figura 1.7).

Aquest model va ser confirmat anys després gràcies als treballs desenvolupats pels laboratoris de David Hogness i Ronald Evans. Utilitzant *D. melanogaster* com a model experimental, aquests investigadors van demostrar que el receptor funcional de la 20E és l'heterodímer format pel receptor d'ecdisona (EcR), que s'encarrega d'unir l'hormona, i ultraespiracle (USP), que modula la capacitat transcripcional d'EcR (Koelle et al., 1991; Oro et al., 1990). Ambdues proteïnes pertanyen a la família dels receptors nuclears, una família de factors de transcripció dependents de lligand. L'heterodímer EcR-USP, un cop unida la 20E, indueix l'expressió d'un cert nombre de gens primerencs, entre ells *Broad (Br)*, *E74*, *Eip93 (E93)* i els receptors nuclears *E75*, *HR3*, *HR4*, *HR39*, *E78* i *Ftz-F1* (Thummel, 1996). Són aquests factors de transcripció els que activen l'expressió dels gens tardans que s'encarregaran de dur a terme, directa o indirectament, la resposta biològica (figura 1.7).

Tal i com s'ha descrit, tant els dos components del receptor de la 20E com la majoria de gens primerencs pertanyen a una família de factors de transcripció que s'anomenen receptors nuclears. Aquests es caracteritzen per tenir un domini d'unió a DNA (DBD) i un domini d'unió a lligand (LBD) que els permet unir determinades molècules que regulen la seva capacitat de control de la transcripció (Glass and Rosenfeld, 2000). A més, s'han identificat una sèrie de cofactors que interactuen i cooperen amb aquests receptors nuclears, actuant com a coactivadors o corepressors. Aquests cofactors formen complexos amb els receptors nuclears i poden ser xaperones (DEK), remodeladors de cromatina (NURF) o modificadors d'histones (TRR, SMRTER), entre d'altres (Badenhorst et al., 2005; Sawatsubashi et al., 2010; Sedkov et al., 2003; Tsai et al., 1999).

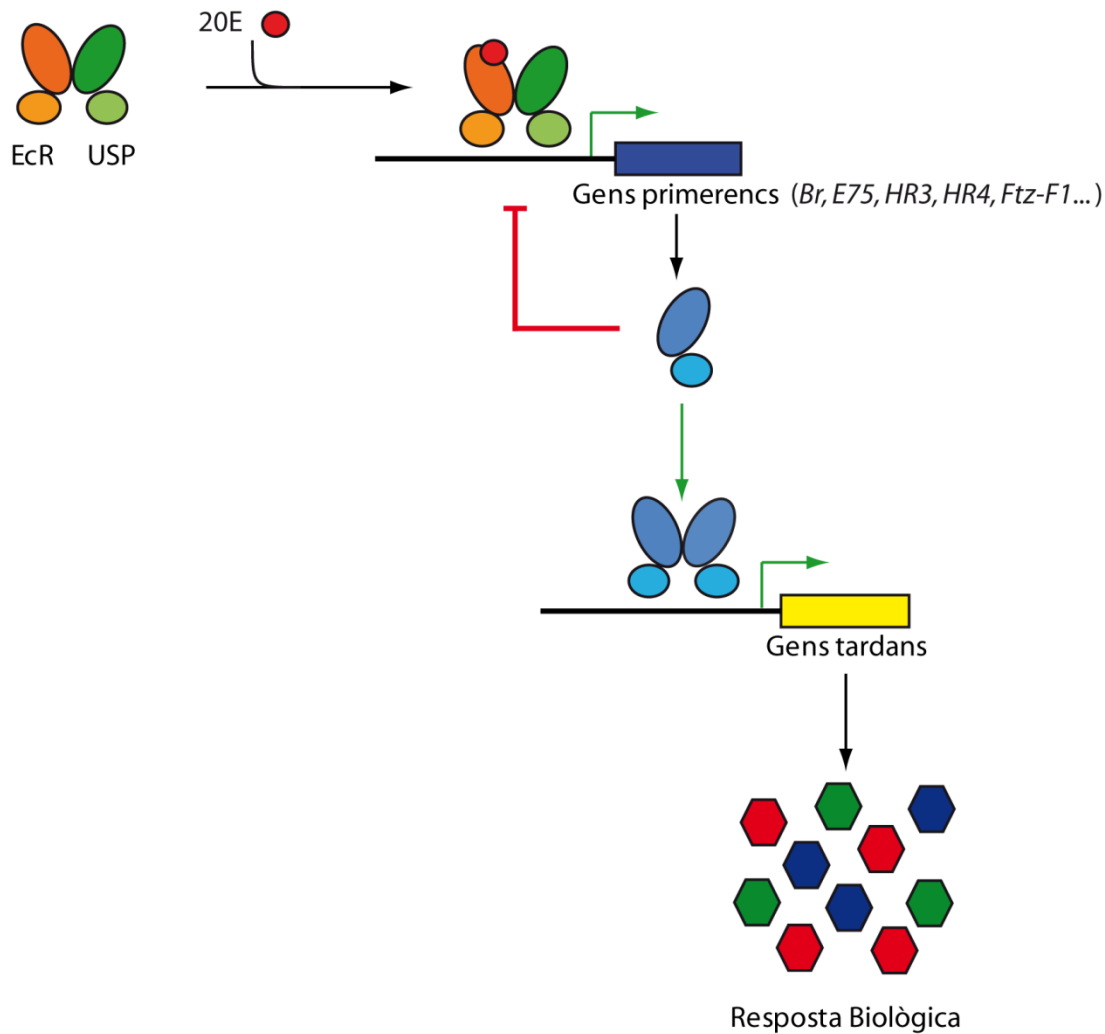


Figura 1.7. Model d'Ashburner. Representació gràfica de la cascada de factors de transcripció que s'activa en resposta a la 20E i que culmina amb una resposta biològica concreta que varia depenent del teixit i del període del desenvolupament en el que es dona. Modificat de Borràs-Castells (2011).

1.2.4 El gen primerenc *E93*

Entre els gens primerencs activats per la 20E en *D. melanogaster* hi trobem *E93*, objecte d'estudi en aquesta tesis. Les proteïnes *E93* pertanyen a la família Pipsqueak i es caracteritzen per tenir un domini pipsqueak d'unió a DNA molt conservat de tipus HTH (de l'anglès *Helix-Turn-Helix*), compost per 54 aminoàcids (Siegmund and Lehmann, 2002). El gen que codifica per *E93* en *D. melanogaster*, situat en el puff 93F del cromosoma 3, s'indueix de manera directa per la 20E en diversos teixits, com la glàndula salival i el tracte digestiu (Baehrecke and Thummel, 1995; Lee et al., 2000). Inicialment es va descriure en aquest dípter com un factor proapoptòtic responsable de la transmissió del senyal de la 20E en el procés de degeneració de la glàndula salival, promovent l'expressió de gens inductors de mort com *reaper* i *head involution defective* (*hid*), i de caspases com *dronc* (Baehrecke and Thummel, 1995; Lee et al., 2000). També s'ha descrit un ortòleg d'*E93* en l'abella de la mel, *Apis mellifera*, anomenat *Mushroom body-like 1* (*Mblk-1*), que s'expressa en les cèl·lules Kenyon del cervell d'aquest himenòpter (Takeuchi et al.,

2001), i en el nematode *Caenorhabditis elegans*, on se l'ha anomenat *Mblk-1-related factor* (*MBR-1*) i s'ha vist que controla l'eliminació de l'excés de neurites per tal de permetre la remodelació dels circuits neuronals durant el desenvolupament larvari (Kage et al., 2005).

Recentment, però, s'ha descrit E93 com un factor que controla l'especificitat gènica durant la metamorfosi de *D. melanogaster* en un sentit més ampli (Mou et al., 2012). Així, s'ha vist que E93 no només controla la degeneració de la glàndula salival sinó que també és necessari pel correcte desenvolupament del patró adult de la mosca. Centrant-se en la formació d'una estructura adulta, les bràctees de les potes, s'ha descrit E93 com el factor que determina la identitat d'aquestes cèl·lules durant la metamorfosi, permetent l'activació del gen *Distal-less* (*Dll*, encarregat de l'especificació de les cèl·lules de la bràctea) per part de la via de senyalització EGFR (Mou et al., 2012).

1.3 L'HORMONA JUVENIL

Juntament amb la 20E, l'altra hormona encarregada de la regulació del desenvolupament dels insectes és l'HJ, que té dues funcions bàsiques: mantenir els teixits en estat premetamòrfic durant el desenvolupament postembrionari i regular els principals processos associats a la reproducció durant l'edat adulta, com la vitel·logènesi i el desenvolupament dels ovaris. A més, també controla altres aspectes del desenvolupament dels insectes com ara el polifenisme i la diferenciació de castes, el comportament sexual i la producció de feromones (Nijhout, 1994; Raikhel et al., 2005).

L'HJ és una molècula d'origen sesquiterpènic que se sintetitza en els CA, un parell de glàndules neuroendocrines situades a la part posterior del cervell. És exclusiva dels insectes, tot i que el seu precursor, el metilfarnesoat (MF), també s'ha trobat en alguns crustacis on controla la reproducció (Nagaraju, 2011). La seva forma més comuna és l'HJ III, que es troba en tots els ordres d'insectes, des dels ametàbols més primitius fins als dípters més evolucionats, excepte en els hemípters, on els CA secreten una forma modificada de l'HJ III anomenada S-bisepòxid (HJSB₃) (Kotaki et al., 2009). En els dípters superiors (mosques), a més d'HJ III els CA també poden secretar HJ bisepòxid (HJB₃) en certs moments del desenvolupament, i en les larves de *D. melanogaster* fins i tot es pot alliberar MF (Bendena et al., 2011; Goodman and Cusson, 2012). D'altra banda, els lepidòpters no secreten HJ III durant el període larvari, sinó HJ I i HJ II. L'adult, en canvi, també secreta HJ III (Goodman and Cusson, 2012). A la figura 1.8 es mostren les diferències moleculars entre les diverses formes d'HJ, i també s'hi pot veure l'estructura d'un anàleg sintètic d'aquesta hormona, el metoprè, utilitzat freqüentment en l'estudi d'aquesta via degut a la seva major estabilitat davant l'acció de les esterases de l'HJ (Henrick, 2007).

1.3.1 Biosíntesi de l'hormona juvenil

El procés de síntesi de l'HJ es pot dividir en dues parts. La primera, la via del mevalonat, és comuna per a la síntesi de diferents compostos isoprenoides en tots els éssers vius i es dona en tots els teixits. La segona, en canvi, es dona exclusivament en els CA dels insectes i consisteix

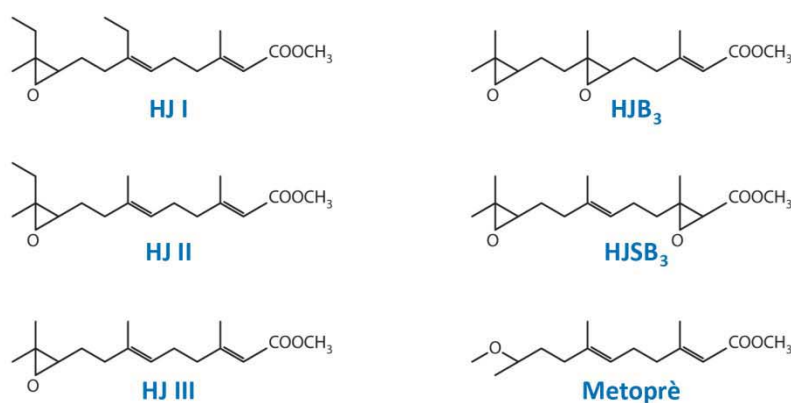


Figura 1.8. Estructura química de les diferents hormones juvenils presents en els insectes. Estructura de les principals hormones juvenils (HJs) presents en els insectes, així com del metoprè, anàleg sintètic d'aquesta hormona. Abreviacions: HJB₃, HJ bisepòxid; HJSB₃, HJ S-bisepòxid. Adaptat de Jindra *et al.* (2013).

en la síntesi d'HJ a partir del farnesil difosfat produït en la via del mevalonat (figura 1.9). El substrat inicial de la via del mevalonat és l'acetil-CoA, que es condensa en 3-hidroximetil-3-glutaril-CoA (HMG-CoA). Aquesta molècula es redueix per formar mevalonat, que posteriorment és fosforilat i convertit en isopentenil difosfat (IPP). Finalment, el farnesil difosfat es produeix per la condensació de tres molècules isoprenoides (figura 1.9). Aquesta via metabòlica està present en animals i plantes, i és necessària per a la síntesi de diversos compostos isoprenoides, entre ells el colesterol. Els insectes, però, no són capaços de sintetitzar colesterol, ja que no tenen dos dels enzims necessaris per a dur-ho a terme, l'escualè sintasa i la lanosterol sintasa (Clark and Bloch, 1959), i utilitzen el farnesil difosfat per a la síntesi d'HJ i d'altres compostos isoprenoides, com el dolicol i l'ubiquinona. La segona part de la biosíntesi de l'HJ s'inicia amb la conversió del farnesil difosfat en farnesol, que pateix dues oxidacions seqüencials i genera l'àcid farnesoic (AF). A partir d'aquest punt es produeix una reacció d'epoxidació i la incorporació d'un grup metil que donarà lloc a l'HJ III, tot i que l'ordre en el que es donen aquestes dues darreres reaccions varia segons el tipus d'insecte. En ortòpters i dictiòpters, per exemple, l'àcid farnesoic es converteix en metil farnesoat, i aquest s'epoxida per formar l'HJ III. En lepidòpters, en canvi, es produeix primer l'epoxidació, formant-se l'àcid epoxifarnesoic (forma àcida de l'HJ), i després es dona la metilació per formar l'HJ III (figura 1.9). L'HJ I i l'HJ II s'obtenen a partir de la incorporació de diferents grups metil (Goodman and Cusson, 2012).

La regulació de la biosíntesi de l'HJ en els CA és un procés molt complex en el que intervenen diversos factors, com ara: neuropèptids inhibidors (al·latostatines) i estimuladors (al·latotropines), neurotransmissors, la 20E o la mateixa HJ (Goodman and Granger, 2005). Recentment també s'ha vist que tant el receptor d'insulina (InR) com la via morfogenètica de TGFβ/Dpp són necessaris per l'expressió en els CA de l'hidroximetil-3-glutaril-CoA reductasa (HMG-R) i la metiltransferasa de l'HJ (JHAMT), respectivament (Belgacem and Martin, 2007; Huang *et al.*, 2011a). Malgrat això, els mecanismes responsables de la coordinació de la síntesi de l'HJ amb el creixement i l'assoliment del pes mínim necessari per l'inici de la metamorfosi es desconeixen.

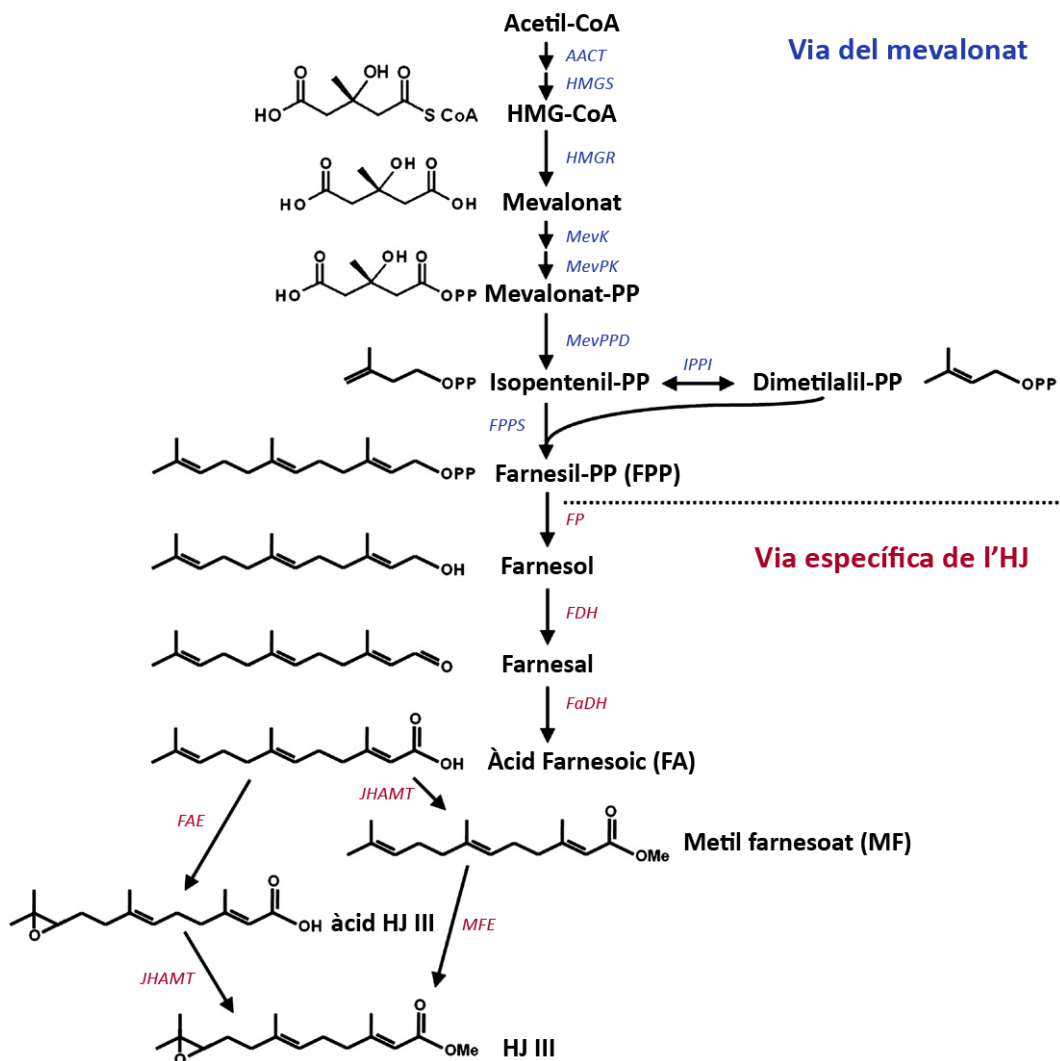


Figura 1.9. Via de síntesi de l'hormona juvenil. Representació esquemàtica de les diferents reaccions de la biosíntesi de l'hormona juvenil (HJ) on es representen el nom i l'estructura de les molècules intermèdiàries, així com els enzims que catalitzen les diferents reaccions. Els enzims que es representen en blau formen part de la via del mevalonat, mentre que els que es representen en vermell formen part de la via de síntesi específica de l'HJ. Abreviacions: AACT, acetil-CoA tiolasa; HMGS, hidroximetil-glutaril-CoA sintasa; HMGR, hidroximetil-glutaril-CoA reductasa; MevK, mevalonat quinasa; MevPK, fosfomevalonat quinasa; MevPPD, difosfomevalonat decarboxilasa; IPPI, isopentenil difosfat isomerasa; FPPS, farnesil difosfat sintasa; FP, farnesil fosfatasa; FDH, farnesol deshidrogenasa; FaDH, farnesal deshidrogenasa; JHAMT, metiltransferasa de l'àcid-HJ; FAE, epoxidasa de l'àcid farnesoic; i MFE, metilfarnesoat epoxidasa. Modificat de Goodman & Cusson (2012).

1.3.2 Funció de l'hormona juvenil en la metamorfosi

El primer en descriure l'efecte de l'HJ va ser Vincent B. Wigglesworth a la dècada del 1930, gràcies als seus experiments de *parabiosi*. Wigglesworth, buscant factors hormonals reguladors de la metamorfosi, va connectar mitjançant un capil·lar una nimfa d'última fase de la xinxa *Rhodnius prolixus* amb una nimfa d'una fase més jove, i va veure que la nimfa d'última fase mudava a adult retenint nombrosos caràcters nimfals. Aquest fet suggeria l'existència d'un

factor, transportat per l'hemolimfa de la nimfa jove, que impedia que es completés la metamorfosi de l'altra nimfa, i que Wigglesworth va anomenar hormona juvenil (Wigglesworth, 1940). Més tard, el mateix autor va veure que aquesta HJ es secretava en els CA (Wigglesworth, 1947). La seva estructura molecular, però, no es va caracteritzar fins al 1967, gràcies als treballs de Herbert Röller amb el lepidòpter *Hyalophora cecropia* (Röller and Dahm, 1968).

Actualment l'HJ està descrita com l'encarregada de determinar la naturalesa de les mudes que indueix la 20E. Així, la presència d'HJ fa que la muda es produeixi a un nou estadi immadur (nimfal en els hemimetàbols i larvari en els holometàbols). Per contra, durant el darrer estadi nimfal/larvari dels insectes l'absència d'HJ permet que la 20E indueixi la metamorfosi (figura 1.4) (Nijhout, 1994; Riddiford, 2012). Aquesta disminució dels nivells d'HJ es produeix per un doble motiu: es deixa de sintetitzar l'hormona i, alhora, es dona un augment del catabolisme de l'HJ, promogut per l'acció de diverses esterases en l'hemolimfa i d'epoxihidrolases en els teixits (Goodman and Cusson, 2012; Roe and Venkatesh, 1990). Excepte en els dípters superiors, el tractament amb HJ (o algun dels seus anàlegs) durant el darrer estadi nimfal/larvari provoca la formació d'una nimfa/larva supernumerària (Konopova et al., 2011; Parthasarathy and Palli, 2009). D'altra banda, l'eliminació de l'HJ durant un estadi larvari previ al darrer indueix l'inici de la metamorfosi de manera prematura (Minakuchi et al., 2008b; Tan et al., 2005). En holometàbols, a més, l'aplicació d'HJ durant la pupa resulta en una repetició de l'estadi pupal. Aquest efecte es coneix com l'acció "status quo" de l'HJ (Jindra et al., 2013). En els dípters com *D. melanogaster*, en canvi, l'efecte de l'HJ ectòpica és menys dràstic, ja que no impedeix la formació de la pupa, però inhibeix alguns processos metamòrfics que tenen lloc durant l'estadi pupal, com la diferenciació dels histoblasts abdominals (Minakuchi et al., 2008a). En els insectes holometàbols l'HJ també té una funció durant la formació de la pupa, al final del darrer estadi nimfal (període conegut com prepupa), on s'encarrega de prevenir la diferenciació prematura dels teixits imaginals (Riddiford et al., 2010; Williams, 1961).

1.3.3 Mecanisme d'acció de l'hormona juvenil

A diferència de la via de senyalització de la 20E, el mecanisme d'acció a través del qual l'HJ impedeix la metamorfosi no es coneix en profunditat. Malgrat això, en els darrers anys nombroses investigacions han permès caracteritzar alguns dels components d'aquesta via reguladora.

1.3.3.1 Methoprene-tolerant, el receptor de l'hormona juvenil

Methoprene-tolerant (Met) és una proteïna de la família *basic-helix-loop-helix (bHLH)/Per-Arnt-Sim (PAS)* (Ashok et al., 1998) que va rebre aquest nom (tolerant a metoprè) perquè el mutant nul del gen que codifica per aquesta proteïna conferia resistència a metoprè, producte letal durant el desenvolupament pupal i adult de *D. melanogaster* (Wilson and Fabian, 1986). Aquests mutants, però, es desenvolupaven normalment, fet que no encaixava amb el que s'esperava en absència del receptor de l'HJ. Més tard s'ha pogut comprovar que el llinatge

drosofilid conté un paràleg de *Met*, anomenat *germ-cell expressed (gce)*, i que l'absència simultània d'ambdós gens provoca letalitat durant la prepupa (Abdou et al., 2011; Baumann et al., 2010). Tot i això, en els mutants dobles de *Met* i *gce* de *D. melanogaster* no s'observa el fenotip característic d'absència d'HJ, és a dir, un avançament en l'inici de la metamorfosi.

Per aquest motiu, no ha estat fins als darrers anys que s'ha aconseguit confirmar *Met* com el receptor de l'HJ. Utilitzant aproximacions bioquímiques, s'ha vist que *Met* és capaç d'unir HJ III i els seus diferents anàlegs, i s'han pogut descriure els aminoàcids essencials per a aquesta unió (Charles et al., 2011; Miura et al., 2005). D'altra banda, a partir d'anàlisis funcionals s'ha comprovat que en l'holometàbol *T. castaneum* i en l'hemimetàbol *Pyrrhocoris apterus*, insectes que no tenen el paràleg *gce*, l'absència de *Met* provoca l'inici prematur de la metamorfosi abans d'arribar al darrer estadi larvari/nimfal (Konopova and Jindra, 2007; Konopova et al., 2011), fenotips molt semblants als obtinguts quan s'elimina la síntesi d'HJ en aquest mateix moment del desenvolupament (Minakuchi et al., 2008b; Tan et al., 2005; Wigglesworth, 1947). A més, s'ha comprovat que *Met* és necessari per induir la formació d'un segon estadi pupal quan s'aplica HJ o algun dels seus anàlegs durant la pupa de *T. castaneum* (Konopova and Jindra, 2007; Minakuchi et al., 2009).

Tot i que són moltes les incògnites sobre el funcionament de *Met* en la transducció del senyal de l'HJ, els descobriments recents han permès elaborar un model que explica com es dona l'activació d'aquesta via (figura 1.10). Segons aquest model, en presència d'HJ *Met* heterodimeritza amb una altra proteïna de la família bHLH/PAS, anomenada Taiman (Tai). L'ortòleg de Tai rep el nom de FISC (coactivador del receptor Ftz-F1) en el mosquit *Aedes aegypti* i de SRC (per la seva homologia amb SRC-1, coactivador del receptor d'esteroides de vertebrats) en *T. castaneum* (Li et al., 2011; Zhang et al., 2011). El complex format per HJ-Met-Tai s'uneix a un element de resposta a HJ (JHRE) present en el promotor d'alguns gens de la via de senyalització de l'HJ, com *early trypsin (ET)* i *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*, promovent-ne la transcripció (figura 1.10) (Kayukawa et al., 2012; Li et al., 2011; Zhang et al., 2011). En absència d'HJ, en canvi, *Met* forma homodímers (Met-Met), o heterodimeritza amb el seu paràleg *Gce* (Met-Gce) en *D. melanogaster*, i no activa la transcripció dels gens de la via de transducció de l'HJ (Godlewski et al., 2006). D'altra banda, s'ha vist que en *D. melanogaster* *Met* també pot interaccionar amb EcR, USP i Ftz-F1 (Bernardo and Dubrovsky, 2012; Bitra and Palli, 2009). Tot i que no es coneixen les conseqüències funcionals d'aquestes interaccions, podrien representar un dels mecanismes mitjançant els quals l'HJ modula la resposta dels teixits a la 20E durant la muda i la metamorfosi (figura 1.10).

1.3.3.2 *Krüppel homolog 1*, transductor del senyal antimetamòrfic

Kr-h1 és un factor de transcripció de particular interès en l'estudi del mecanisme d'acció de l'HJ. Té un domini d'unió a DNA amb vuit dits de zinc C_2H_2 , i la seva expressió s'indueix per HJ tant en insectes holometàbols com hemimetàbols (Konopova et al., 2011; Lozano and Belles, 2011; Minakuchi et al., 2008a; Minakuchi et al., 2009; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2011). Recentment s'ha demostrat que aquesta inducció depèn de la unió del complex HJ-Met-SRC a un

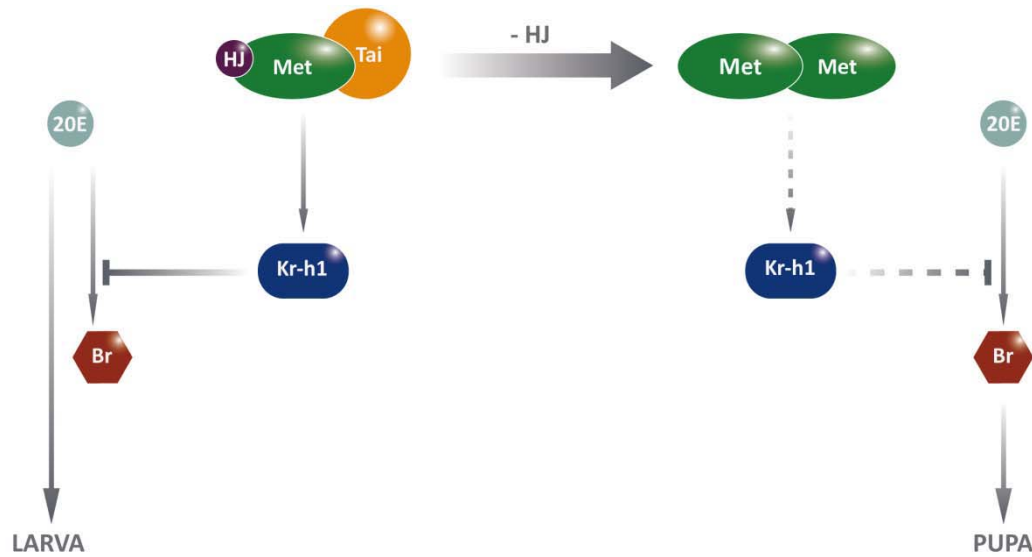


Figura 1.10. Model sobre el mecanisme d'acció de l'hormona juvenil. Durant els estadis larvaris previs al darrer, Met uneix l'hormona juvenil (HJ) i heterodimeritza amb Taiman (Tai), conformant el receptor funcional de l'HJ. Això permet l'activació de gens de resposta a aquesta hormona com *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*), que impedeix l'activació de *Broad* (*Br*) i permet el pas a un nou estadi larvari. En absència d'HJ, durant la darrera fase larvària, Met forma homodímers incapaçs d'induir l'expressió de *Kr-h1*. Això fa que la 20E pugui activar *Br* i s'iniciï la metamorfosi.

element de resposta (JHRE) del promotor de *Kr-h1* de *Bombyx mori*. Aquest JHRE conté una seqüència E-box canònica (GGCCTCCACGTG) on s'uneix HJ-Met-SRC (Kayukawa et al., 2012; Zhang et al., 2011). En els insectes holometàbols, *Kr-h1* s'expressa contínuament fins a l'inici de la darrera fase larvària, moment en el qual els seus nivells disminueixen considerablement. Durant la prepupa, l'expressió de *Kr-h1* es reindueix de forma paral·lela a l'increment d'HJ, per tornar a caure un cop formada la pupa (Minakuchi et al., 2009). En *T. castaneum* s'ha demostrat que *Kr-h1* és el responsable de transmetre el senyal antimetamòrfic de l'HJ durant els estadis larvaris, i de la formació d'un segon estadi pupal quan es tracta la pupa amb HJ ectòpica (Minakuchi et al., 2009). En els insectes hemimetàbols *P. apterus* i *B. germanica* l'acció antimetamòrfica de l'HJ també es transmet a través de *Kr-h1*, ja que: a) *Kr-h1* s'expressa durant tots els estadis nimfals excepte l'últim, coincidint amb la caiguda de l'HJ; b) el tractament amb HJ ectòpica durant el darrer estadi nimfal provoca una repetició dels caràcters nimfals degut a la reinducció de *Kr-h1*; i c) l'absència de *Kr-h1* en el penúltim estadi nimfal permet el pas a adult de manera prematura (Konopova et al., 2011; Lozano and Belles, 2011). Així doncs, *Kr-h1* s'ha identificat com el factor que s'encarrega de transmetre el senyal antimetamòrfic de l'HJ en els insectes hemimetàbols i holometàbols.

1.3.3.3 *Broad*, l'especificador pupal

Broad (*Br*), també conegut en *D. melanogaster* com *Broad-complex*, és un factor de transcripció que forma part de la família *Bric-à-brac-Tramtrack-Broad* (*BTB*)/*Pox virus and Zinc finger* (*POZ*). Té un domini N-terminal capaç d'interaccionar amb altres factors *BTB/POZ*, i un

parell de dits de zinc que s'uneixen a DNA (Bayer et al., 1997). En els insectes holometàbols, Br es considera l'especificador pupal, ja que la seva absència impedeix la correcta formació de la pupa en *T. castaneum* i *D. melanogaster* (Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy et al., 2008; Suzuki et al., 2008). En aquests insectes Br s'activa durant el període de prepupa, al final de la darrera fase larvària, induït per un pic de 20E en absència d'HJ, i retorna als nivells basals durant l'estadi pupal (Hiruma and Riddiford, 2010; Konopova and Jindra, 2008; Suzuki et al., 2008). Aquesta expressió depèn de l'absència d'HJ i de Kr-h1, que s'encarreguen d'impedir l'activació de Br abans d'assolir la darrera fase larvària (figura 1.10) (Riddiford et al., 2003; Zhou et al., 1998). D'altra banda, el tractament amb HJ durant la pupa impedeix la caiguda dels nivells de Br durant aquest estadi, i provoca la formació d'una segona cutícula pupal en *T. castaneum*, *Manduca sexta* i *D. melanogaster* (Konopova and Jindra, 2008; Zhou and Riddiford, 2002). En els insectes hemimetàbols Br s'expressa des de l'embriogènesi fins a l'entrada al darrer estadi ninfal, moment en el que els seus nivells disminueixen. En *Oncopeltus fasciatus* i *B. germanica* s'ha vist que Br és necessari per al correcte desenvolupament de l'embrió (Erezyilmaz et al., 2009; Piulachs et al., 2010). Durant el desenvolupament ninfal, en canvi, la seva absència només afecta el creixement i morfogènesi de les ales, sense afectar la resta de processos metamòrfics (Erezyilmaz et al., 2006; Huang et al., 2013). Per tot això, es considera que Br ha estat reclutat pels insectes holometàbols, durant l'evolució cap a la metamorfosi completa, per desenvolupar la funció d'especificador pupal (Jindra et al., 2013).

1.4 *Blattella germanica* COM A MODEL DE METAMORFOSI HEMIMETÀBOLA

Segons els registres fòssils, les paneroles habiten la Terra des de fa més de 300 milions d'anys, conformant el grup d'insectes alats més primitiu que existeix en l'actualitat. Pertanyen a l'ordre Blattodea, que juntament amb els ordres Mantodea (pregadéus) i Isoptera (tèrmits) conformen el superordre Dictyoptera (figura 1.1). Actualment existeixen unes 4000 espècies de paneroles, entre elles les tres espècies responsables de la majoria de plagues urbanes en el nostre país, la panerola americana *Periplaneta americana*, la panerola oriental *Blatta orientalis* i la panerola alemanya *B. germanica*. Aquesta darrera és una de les espècies de panerola més utilitzades en laboratoris d'investigació, degut a la seva mida reduïda i ràpid cicle vital. No obstant, presenta dos inconvenients importants: no s'ha aconseguit modificar genèticament i encara no se n'ha seqüenciat el genoma. Malgrat això, l'adaptació de la tècnica de l'RNA d'interferència *in vivo*, que funciona amb molta efectivitat i reproductibilitat en aquest insecte, ha proporcionat una eina molt valuosa per a dur-hi a terme estudis funcionals (Martín et al., 2006), convertint-lo en un bon model per a l'estudi de la metamorfosi hemimetàbola.

1.4.1 Cicle de vida

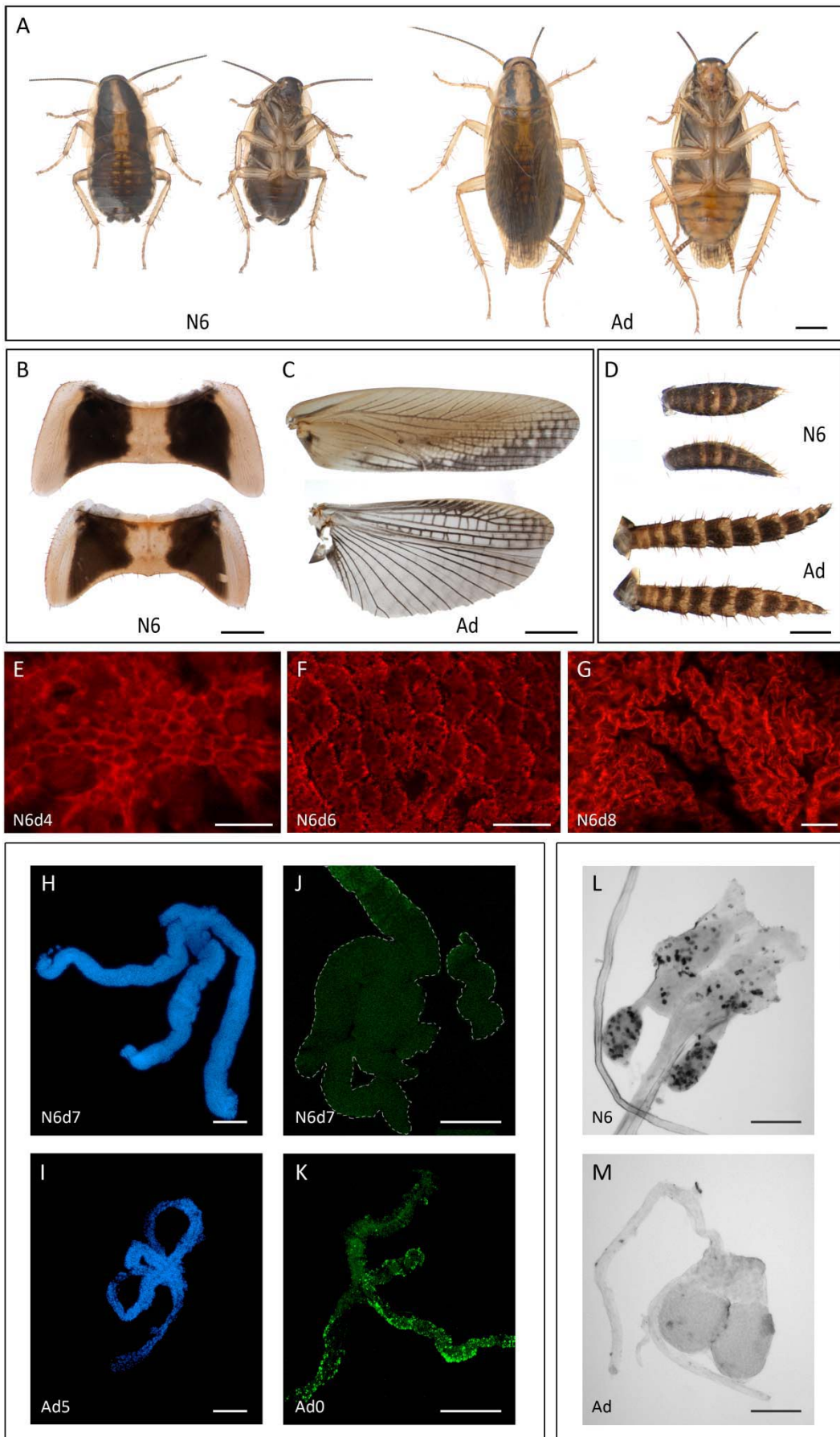
B. germanica és una espècie fotòfoba, anautògena (necessita ingerir nutrients per pondre els ous), omnívora i carronyaire, que generalment s'alimenta de residus generats per les persones. En condicions de cria de 30°C, 75% d'humitat i foscor completa, l'embriogènesi de la

panerola dura 17 dies. Els ous es desenvolupen dins un estoig, l'ooteca, que la femella transporta a la part posterior de l'abdomen fins al moment de l'eclosió de la nimfa. El desenvolupament nimfal es produeix a través de 6 estadis separats per les diferents mudes. El primer estadi nimfal dura aproximadament dos dies i els següents es van allargant progressivament. El penúltim dura 6 dies i el darrer 8. És en aquest últim estadi nimfal en el que tenen lloc les transformacions metamòrfiques que donaran lloc a l'individu adult. Durant els primers dies de l'etapa adulta es produeix la maduració dels òrgans necessaris per la reproducció. En els mascles aquesta dura aproximadament 10 dies, durant els quals maduren les glàndules conglobades, les glàndules accessòries i els testicles. Per la seva part, les femelles inicien el cicle gonadotròfic, que dura 7 dies en els que tenen lloc la vitel·logènesi i la maduració dels oòcits basals i de les glàndules colaterals. Al final del cicle gonadotròfic es dona l'ovulació i la formació de l'ooteca. Si la femella ha estat fertilitzada durant aquest període, a l'interior de l'ooteca es desenvolupen entre 45 i 50 embrions que són transportats per la mare durant els 17 dies que dura l'embriogènesi, fins que aquesta diposita l'ooteca, i comença immediatament un nou cicle gonadotròfic.

1.4.2 La metamorfosi de *Blattella germanica*

En els insectes hemimetàbols les transformacions metamòrfiques que permeten el pas a l'estadi adult tenen lloc durant la darrera fase nimfal i consisteixen, principalment, en la formació de dues estructures, la genitèlia i les ales. L'aparició dels òrgans genitals és un procés que es dona en tots els insectes amb metamorfosi incompleta i és essencial per a l'adquisició de la capacitat reproductora. L'aparició de les ales també es produeix després de la muda imaginal tot i que alguns grups d'hemimetàbols, com els polls (ordre Phthaptera), les han perdut al llarg de l'evolució. En *B. germanica* les estructures alars creixen al llarg dels diferents estadis ninfals a l'interior d'uns estoigs cuticulars anomenats *wing pads*, situats en la zona dorsal del mesotòrax i el metatòrax. Les ales mesotoràciques reben el nom de tegmines i, un cop completada la muda

Figura 1.11. Canvis metamòrfics en la panerola *Blattella germanica*. (A) Visió dorsal i ventral d'una nimfa d'últim estadi (N6) i d'un adult (Ad) acabat de mudar. (B-C) Estructures alars durant el darrer estadi nimfal (B) i l'adult (C). A N6 les tegmines i les ales es troben dins els *wing pads* toràcics, i en els adults surten d'aquests estoigs i es despleguen, ocupant tota la part dorsal de l'abdomen de la panerola. (D) Cercs ninfals i adults. (E-G) Immunodetecció d'actina en ales 4, 6 i 8 dies després de la muda a l'últim estadi nimfal. S'observen els canvis morfològics de les cèl·lules alars, que permetran l'increment significatiu de la superfície alar després de la muda imaginal. Aquestes cèl·lules passen de ser hexagonals (E), a una morfologia escamosa (F) i, finalment, estrellada (G). (H-K) Degeneració de la glàndula protoràcica. Tinció DAPI de la glàndula d'un individu N6 (H) i d'un adult de 5 dies després de la muda imaginal (I). (J-K) Marcatge TUNEL (que revela els nuclis de les cèl·lules que s'estan morint) en ninfes de dia 7 (N6d7), abans de l'inici de la degeneració de la glàndula protoràcica (J), i en adults acabats de mudar (Ad0), just en el moment de la degeneració (K). A la glàndula de (J) se li ha resseguit el contorn amb una línia puntejada per facilitar la interpretació. (L-M) Proliferació de les cèl·lules dels CA, que es divideixen activament durant el darrer estadi nimfal (L) i paren de dividir-se després de la muda imaginal (M). Escales: 2 mm en A i C; 1 mm en B; 0.5 mm en D; 100 µm en H, I, J, K, L i M; 10 µm en E, F i G.



imaginal, s'endureixen, es pigmenten i ocupen tota la superfície dorsal de l'abdomen. La seva funció és protegir les ales metatoràciques, membranoses i amb funció locomotora, que també augmenten considerablement la seva superfície després de la muda imaginal (figura 1.11 B-C). Això és possible perquè durant la darrera fase nimfal les cèl·lules que donaran lloc a aquestes estructures passen per un període d'activa proliferació i reestructuració cel·lular. Així, durant els primers dies de l'últim estadi nimfal les cèl·lules de tegmines i ales tenen un aspecte hexagonal, que a partir del quart dia canvia a una morfologia escamosa per acabar, just abans de la muda imaginal, presentant una conformació estrellada (figura 1.11 E-G).

La panerola *B. germanica* presenta altres modificacions metamòrfiques característiques de la seva espècie. La més evident és la pigmentació de la cutícula, que durant els estadis ninfals és negra i en els individus adults passa a ser de color marró (figura 1.11 A). A més, les dues franges amples de color negre en la zona del pronot de les nimfes es redueixen considerablement en els adults. També els cercs, estructures sensorials situades a la part posterior de l'abdomen, presenten un canvi de morfologia, passant de ser curts i fonamentalment negres a ser molt més allargats, de coloració més clara i amb una segmentació més acusada (figura 1.11 D). Un altre dels canvis metamòrfics presents a *B. germanica* és la degeneració de la glàndula protoràcica, encarregada de la síntesi dels ecdisteroides durant les diferents fases ninfals. Com a resposta al pic de 20E present al final del darrer estadi nimfal la glàndula protoràcica inicia un procés de mort cel·lular programada que fa que quedi reduïda a un simple feix muscular uns dies després de la muda imaginal (figura 1.11 H-K) (Mané-Padrós et al., 2010). Finalment, les cèl·lules dels CA també canvien el seu programa genètic i deixen de proliferar activament un cop assolit l'estadi adult per començar a produir i secretar grans quantitats d'HJ necessària per a la reproducció (figura 1.11 L-M).

1.4.3 Control hormonal del desenvolupament de *Blattella germanica*

En *B. germanica* els nivells de 20E i HJ han estat caracteritzats tant en l'embriogènesi com durant els dos últims estadis ninfals i el primer cicle gonadotròfic. Durant el desenvolupament embrionari es produeixen dos pics marcats de 20E, un de petit a dia 6 en absència d'HJ i un de major a dia 13, que es dona en presència d'alts nivells d'HJ (Cruz, 2005). D'altra banda, al final de cadascun dels dos últims estadis ninfals també es produeix un pic accentuat de 20E. En el cinquè estadi aquest pic es dona en presència d'HJ i indueix el pas al darrer estadi nimfal, on el pic de 20E en absència total d'HJ permet l'inici de la metamorfosi i la muda imaginal (figura 1.12) (Cruz et al., 2003; Treiblmayr et al., 2006). Finalment, durant l'estadi adult la 20E presenta uns nivells molt baixos, que augmenten lleugerament al llarg del cicle gonadotròfic degut a la producció que es dona als ovaris. Els nivells d'HJ, en canvi, augmenten dràsticament, arribant a ser quatre vegades més alts que els presents durant el cinquè estadi nimfal (Cruz et al., 2003; Treiblmayr et al., 2006).

Els receptors nuclears que conformen la cascada de resposta a la 20E que indueix la transició adulta en la panerola *B. germanica* s'han caracteritzat durant els darrers anys, tant a nivell funcional com a nivell d'expressió i regulació. Així, s'ha comprovat que els dos components de l'heterodímer receptor de la 20E, BgEcR i BgRXR, són necessaris per la muda imaginal i per

l'activació dels gens primerencs (Cruz et al., 2006; Maestro et al., 2005; Martín et al., 2006). D'entre aquests, les diferents isoformes de *BgE75*, *BgHR3* i *BgHR4* conformen un complex entramat d'induccions i repressions destinades a regular correctament l'activació de *BgFtz-F1*, essencial per la muda imaginal (Cruz et al., 2007; Cruz et al., 2008; Mané-Padrós et al., 2008; Mané-Padrós et al., 2012). D'altra banda, també s'ha caracteritzat un altre dels gens primerencs, *BgE74*, que no pertany a la família dels receptors nuclears (Borràs-Castells, 2011). Tots aquests treballs han permès identificar la majoria de les funcions que la 20E exerceix durant la transició a l'estadi adult.

Menys explorada ha estat la via de transducció de l'HJ de *B. germanica*, malgrat que recentment s'han caracteritzat dos dels factors de transcripció que en formen part i que són importants per a la correcta regulació de la metamorfosi: *BgKr-h1* i *BgBr*. *BgKr-h1*, tal i com s'ha descrit en apartats anteriors, s'indueix per HJ i s'expressa constantment durant el període nimfal, fins que els seus nivells cauen a l'inici de l'última fase nimfal (figura 1.12). L'estudi funcional de *BgKr-h1* ha demostrat que la seva absència provoca la metamorfosi prematura durant el penúltim estadi nimfal (Lozano and Belles, 2011). D'altra banda, les 6 isoformes descrites de *BgBr* (*BgBr Z1-Z6*) també s'expressen constantment fins a l'entrada a la darrera fase nimfal, però la seva absència només afecta lleugerament el desenvolupament de les tegmines i les ales (Huang et al., 2013). Malgrat aquests avenços, encara no s'ha pogut comprovar com les vies de la 20E i l'HJ interaccionen en aquest insecte hemimetàbol per tal de regular la metamorfosi.

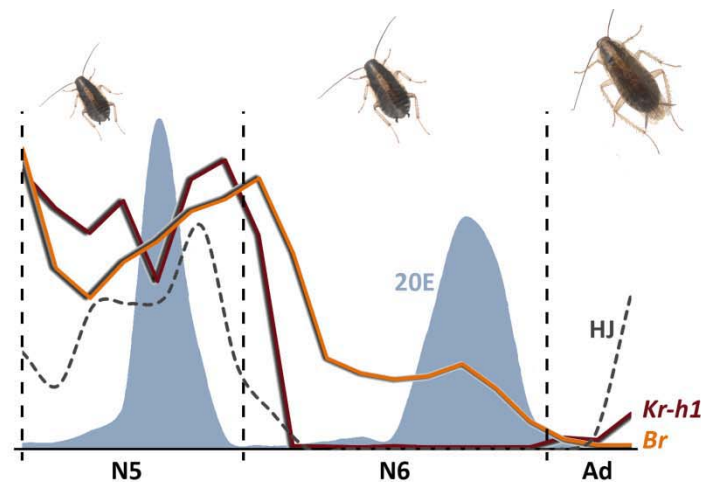


Figura 1.12. Variacions hormonals durant el desenvolupament postembrionari de *Blattella germanica*. Nivells de 20-hidroxiecdisona (20E) (en blau) i d'hormona juvenil (HJ) (línia discontinua) durant el penúltim (N5) i l'últim (N6) estadi nimfal, i els primers dies de l'estadi adult (Ad). També es mostren les variacions en l'expressió de *BgKr-h1* (en vermell) i *BgBr* (en groc).

1.5 *Tribolium castaneum* COM A MODEL DE METAMORFOSI HOLOMETÀBOLA BASAL

Popularment conegut com l'escarabat de la farina, *T. castaneum* pertany a la família Tenebrionidae, de l'ordre Coleoptera. Com el seu nom indica, se solen trobar en la farina i el gra

de diversos tipus de cereals, però no es coneix quin era el seu nínxol ecològic abans de la introducció de l'agricultura. Pel fet de presentar un model de desenvolupament holometàbol basal (poc modificat) se la considera una espècie molt representativa de la classe Insecta, i per tant ideal per l'estudi de l'evolució del desenvolupament (*evo-devo*), de la metamorfosi completa i del pas de l'estratègia hemimetàbola a l'holometàbola. A més, aquest escarabat presenta una facilitat de cultiu i eficàcia reproductora que afavoreixen el seu ús en el laboratori. A tot això s'hi ha de sumar el fet que el seu genoma està seqüenciat, i que es pot manipular genèticament, tant de manera permanent (generació de mutants, utilització del sistema *Gal4-UAS*) com transitòria (RNA d'interferència sistèmic), característiques que fan de *T. castaneum* un model invertebrat molt adient per a estudis genètics i moleculars (Lorenzen et al., 2003; Tomoyasu and Denell, 2004).

1.5.1 Fisiologia, cicle de vida i metamorfosi

A diferència de la resta d'insectes holometàbols, els coleòpters (excepte algunes espècies) presenten un desenvolupament embrionari amb banda germinal curta, característica ancestral que presenten també els insectes hemimetàbols. Aquest tipus de desenvolupament embrionari es caracteritza per la formació d'una banda germinal on inicialment només estan especificats els segments cefàlics i toràcics, mentre que els segments abdominals es van formant progressivament, d'anterior a posterior, a partir d'una zona de proliferació situada a l'extrem posterior de la banda (Schröder et al., 2008). La resta d'insectes holometàbols, en canvi, tenen un desenvolupament embrionari caracteritzat per la formació d'una banda germinal llarga que ocupa la major part del volum de l'ou, i en la que tots els segments del cos s'especifiquen de manera simultània. El desenvolupament embrionari de *T. castaneum*, en unes condicions de temperatura de 30°C i una humitat del 40%, dura entre 3 i 4 dies. Durant aquest període es formen també els apèndix larvaris (antenes, peces bucals i potes) a partir de l'evaginació, en el segment corresponent, d'una monocapa epitelial (Schröder et al., 2008). Un cop la larva eclosiona de l'ou s'inicia el període de creixement, que s'allarga durant tot el desenvolupament larvari, format per entre set i vuit estadis. Durant l'última fase larvària es produeix un canvi en el programa genètic que permet l'inici de la metamorfosi. Aquesta comença amb el període conegut com a prepupa, que comprèn els darrers tres dies de l'últim estadi larvari, i es completa durant la pupa, que té una durada de 5 dies.

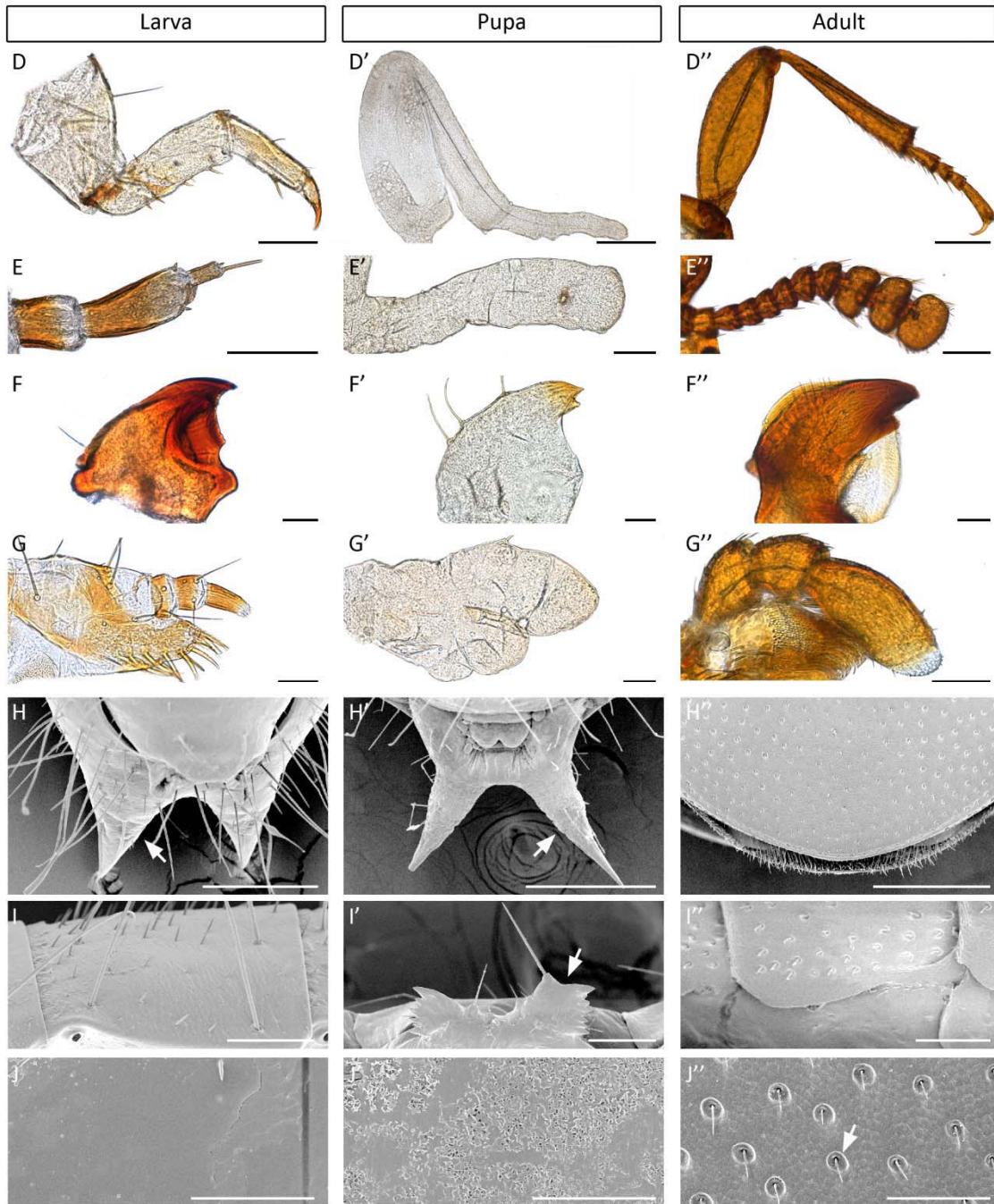
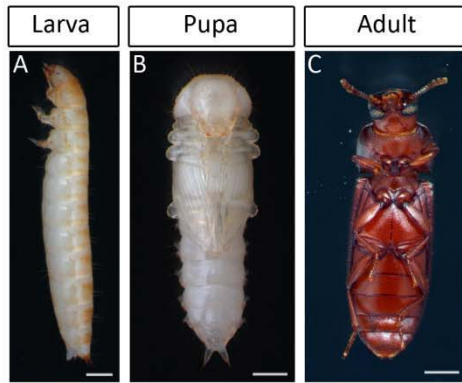
Com s'ha dit anteriorment, *T. castaneum* és un holometàbol basal en el que la majoria dels teixits imaginals es formen a partir de primordis, que durant els estadis larvaris contribueixen a la formació de les estructures larvàries. Un cop iniciada la prepupa aquests primordis proliferen i canvien la seva conformació cel·lular, formant les estructures pupals. Aquestes, al seu torn, s'acabaran de diferenciar durant l'estadi de pupa per donar lloc a l'individu adult. Un exemple d'aquest procés és la remodelació del tracte digestiu de *T. castaneum*, que consisteix en la formació de l'estructura adulta a partir de grups de cèl·lules progenitores (AMP, *adult midgut progenitors*) al mateix temps que es dona la degeneració dels enteròcits larvaris (Zeng and Hou, 2012). Tots aquests canvis fan que les estructures que formen part de cadascun dels tres estadis (larva, pupa i adult) tinguin morfologies diferents. Així, els

apèndix larvaris presenten un grau de pigmentació i segmentació particular, i l'abdomen es caracteritza per tenir la superfície ventral totalment llisa i uns *urogomphis* curts i amples en la zona posterior, amb funció sensorial (figura 1.13). Les estructures de la pupa, per la seva banda, tenen una manca total de segmentació i pigmentació. El seu abdomen presenta unes estructures de defensa exclusives d'aquest estadi, els *gin traps*, en la part lateral de cadascun dels segments. A més, l'abdomen pupal també té *urogomphis*, més allargats que en les larves, i una superfície ventral d'aspecte rugós (figura 1.13). Contràriament a la pupa, l'adult té els apèndixs totalment segmentats i la cutícula amb el color marró característic d'aquesta fase. El seu abdomen no té ni *urogomphis* ni *gin traps*, però presenta una microescultura cuticular particular, amb solcs hexagonals i pilositats sensibles (figura 1.13).

1.5.2 Control hormonal de la metamorfosi de *Tribolium castaneum*

T. castaneum és un model holometàbol molt utilitzat en els últims anys per l'estudi de la metamorfosi, i això ha fet que se'n caracteritzessin els nivells de 20E durant el darrer període larvari i la pupa (Parthasarathy et al., 2008). Durant l'últim estadi larvari, aquesta hormona presenta dos pics: un de menor a la meitat de la fase i un de més acusat al final, durant la prepupa. Després de l'inici de l'estadi pupal els nivells de 20E tornen a augmentar, per caure tot seguit i permetre la muda imaginal (figura 1.14). D'altra banda, estudis funcionals dels receptors nuclears encarregats de transduir el senyal hormonal de la 20E han permès comprovar que els ortòlegs de *EcR*, *USP*, *E75*, *HR3*, *HR4* i *Ftz-F1* en *T. castaneum* són imprescindibles per la formació de la pupa (Tan and Palli, 2008).

Tot i que els nivells d'HJ no s'han caracteritzat en aquest insecte, la seva funció en el control de la metamorfosi s'ha estudiat a bastament. Així, s'ha pogut confirmar que l'HJ és la responsable de mantenir les larves de *T. castaneum* en estat premetamòrfic, ja que el tractament amb anàlegs d'aquesta hormona durant el darrer estadi larvari provoca la muda a una larva supernumerària (Parthasarathy and Palli, 2009; Suzuki et al., 2008). A més, l'absència durant el desenvolupament larvari de l'enzim JHAMT (metiltransferasa de l'HJ), que catalitza una de les últimes reaccions de la via de síntesi de l'HJ, provoca l'inici de la metamorfosi entre un i dos estadis abans del normal (Minakuchi et al., 2008b). Tal i com s'ha descrit en apartats anteriors, aquest coleòpter també ha permès la caracterització funcional del receptor de l'HJ (Met) i de Kr-h1. Així, ha estat el primer insecte en el que s'ha pogut comprovar que Met transfereix el senyal antimetamòrfic de l'HJ (Konopova and Jindra, 2007). Això ha contribuït de manera molt important en la seva confirmació com a receptor de l'HJ, juntament amb el fet que no té el paràleg *gce*, a diferència de *D. melanogaster*. A més, estudis bioquímics i moleculars de la proteïna Met de *T. castaneum* han confirmat que uneix HJ de manera específica, facilitant la formació del complex HJ-Met-SRC (Charles et al., 2011; Zhang et al., 2011). Els estudis realitzats en aquesta espècie també han permès descriure Kr-h1 com un dels factors que transmet el senyal antimetamòrfic de l'HJ, impeding la metamorfosi prematura durant els últims estadis larvaris (Minakuchi et al., 2009). D'altra banda, en aquest model també s'ha descrit TcBr com el factor responsable de l'especificació pupal (Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy et al., 2008; Suzuki et al., 2008).



Així, els estudis realitzats durant els darrers anys al voltant de la metamorfosi de *T. castaneum* han permès aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars que regulen aquest procés holometàbol, ajudant alhora a intentar resoldre l'enigma de com l'evolució ha portat a la metamorfosi completa a partir de la metamorfosi incompleta.

1.6 *Drosophila melanogaster* COM A MODEL HOLOMETÀBOL MOLT MODIFICAT

D. melanogaster, també coneguda com la mosca de la fruita o la mosca del vinagre, és una espècie holometàbola que pertany a l'ordre dels dípters (figura 1.1). És un organisme especialment adequat per a l'estudi del desenvolupament animal ja que és fàcil de criar en el laboratori, presenta un cicle de vida curt i dóna lloc a una abundant progènie. A més, el seu exosquelet té nombrosos marcadors que permeten seguir fàcilment els canvis genètics que s'hi produeixen. Tot això fa que sigui un dels organismes pluricel·lulars més utilitzats pels genetistes i, com a conseqüència, que s'hagin desenvolupat multitud de tècniques que permeten la seva manipulació genètica: expressió localitzada d'un gen en un teixit i/o moment en el que no es troba normalment, silenciament de gens, etc. Malgrat tots aquests avantatges, *D. melanogaster* és un organisme que presenta un desenvolupament i una metamorfosi no gaire representatius de la classe Insecta en general, ni tampoc de la metamorfosi holometàbola en particular, pel que sovint els resultats obtinguts del seu estudi són difícilment generalitzables.

1.6.1 Desenvolupament de *Drosophila melanogaster*

El cicle de vida de la mosca del vinagre dura aproximadament 10 dies a 25°C, tot i que el temps de desenvolupament augmenta a temperatures més baixes. En un dia, una femella de *D. melanogaster* pot dipositar fins a 100 ous, que després de 24 hores d'embriogènesi es transformen en larves de vida lliure. Els dípters, igual que la majoria d'insectes holometàbols, presenten una embriogènesi amb banda germinal llarga. Un cop fora de l'ou, les larves es dediquen principalment a alimentar-se i durant els 4 dies que dura aquest període passen per tres fases larvàries, augmentant considerablement de mida (figura 1.15 A). Al final del darrer estadi larvari l'individu deixa de menjar, busca un lloc sec i esdevé immòbil: comença la metamorfosi. En aquest moment la cutícula externa de la larva s'endureix i es torna més fosca, convertint-se en el pupari. Dins el pupari es forma la pupa, que es desenvolupa durant 4 dies.

Figura 1.13. Canvis metamòrfics en l'insecte holometàbol *Tribolium castaneum*. (A-C) Representació de cadascun dels tres estadis del desenvolupament postembrionari de *T. castaneum*: larva de darrer estadi L7 (A), pupa (B) i adult (C). (D-J'') Detall de la morfologia, pigmentació i segmentació de les diferents estructures larvàries, pupals i adultes. Visió en camp clar de potes (D-D''), antenes (E-E''), mandíbules (F-F'') i maxil·les (G-G''). Visió en microscopia electrònica de rastreig de: *urogomphis* (H-H''), *gin traps* (I-I'') i cutícula ventral de l'abdomen (J-J''). Les fletxes blanques assenyalen els *urogomphis* (en H i H''), els *gin traps* (en I') i els pèls sensitius de l'abdomen adult (en J''). Escales: 0.5 mm en A, B i C; 300 µm en H'; 200 µm en D', D'', H i H''; 100 µm en D, E-E'' i I-I''; 50 µm en F-F'', G-G'' i J-J''.

Durant la metamorfosi la majoria de teixits de la larva es descomponen, alhora que es formen les estructures adultes a partir dels teixits imaginals. Un cop completada la metamorfosi la mosca adulta emergeix del pupari, i a les poques hores de vida ja és fèrtil i el cicle vital pot tornar a començar (figura 1.15 A).

A diferència del que succeeix en les espècies d'insectes descrites en apartats anteriors, la mosca adulta no es forma com a resultat del creixement i maduració continuus de les estructures embrionàries (*B. germanica* i la resta d'insectes hemimetàbols), ni a partir de primordis que contribueixen a la formació de les estructures larvàries i que es desenvolupen al final del darrer estadi de larva (*T. castaneum* i altres holometàbols basals). Gran part de les estructures adultes de *D. melanogaster* deriven dels discs imaginals, teixits d'origen ectodèrmic en forma de sac que invaginen durant l'embriogènesi i que comencen a proliferar quan s'inicia el període larvari (Madhavan and Schneiderman, 1977). Les cèl·lules dels discs imaginals són diferents de la resta de cèl·lules de la larva: són més petites, d'aspecte indiferenciat, proliferen molt ràpidament i són diploides (Shearn and Garen, 1974). Inicialment cada disc imaginal consta d'entre 10 i 40 cèl·lules, que es divideixen intensament durant el desenvolupament larvari fins a arribar a un nombre aproximadament 1000 vegades superior (Bate and Arias, 1991). La larva de *D. melanogaster* té nou parells de discs imaginals i un disc genital. Quan s'inicia la metamorfosi aquests discs everteixen i formen les estructures cuticulars de la pupa i l'adult que componen el cap (ulls, antenes, parts bucals i labials), el tòrax (potes, ales i halteris) i la genitèlia (figura 1.15 B). En canvi, l'abdomen i els òrgans interns de l'adult, com l'intestí, es desenvolupen a partir de nius de cèl·lules anomenats histoblasts. Els histoblasts, a diferència dels discs imaginals, formen part de l'epidermis de la larva, i no proliferen fins el període prepupal, al final de la darrera fase

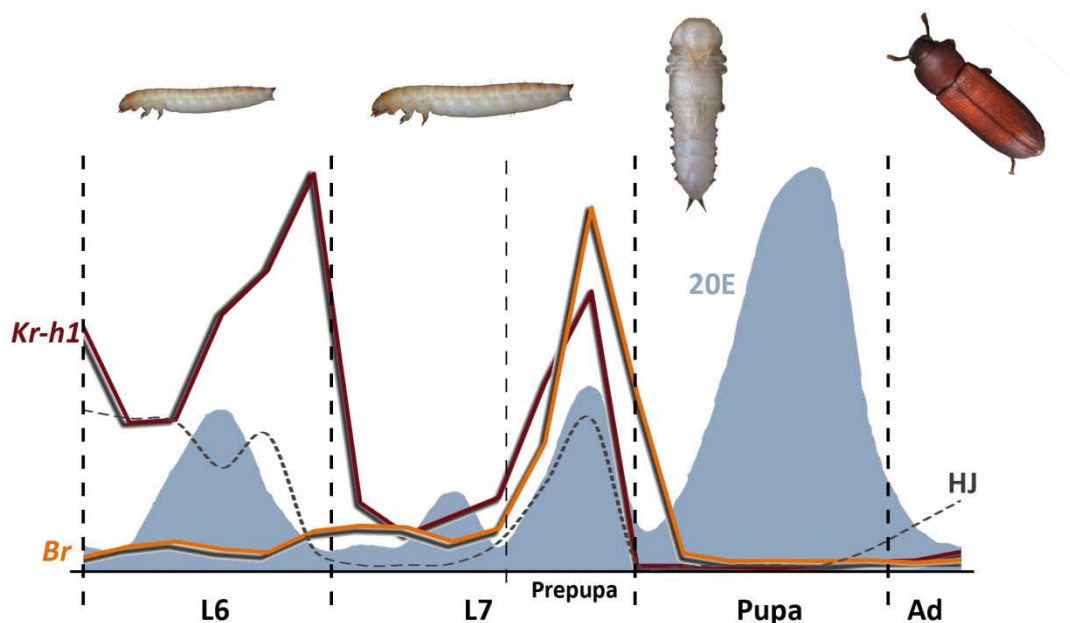


Figura 1.14. Variacions hormonals durant el desenvolupament postembrionari de *Tribolium castaneum*. Nivells de 20-hidroxicdisona (20E) (en blau) i d'hormona juvenil (HJ) (línia discontinua) durant la penúltima (L6) i l'última (L7) fase larvària, la pupa i els primers dies de l'estadi adult (Ad). També es mostren les variacions de l'expressió de *TcKr-h1* (en vermell) i *TcBr* (en groc) durant aquests períodes. Els nivells d'HJ, que no s'han caracteritzat en *T. castaneum*, corresponen al lepidòpter *M. sexta*, però se suposen molt semblants en aquest coleòpter.

larvària (Garcia-Bellido and Merriam, 1971; Madhavan and Schneiderman, 1977). D'altra banda, les cèl·lules d'aquests teixits i òrgans que no formen part dels histoblasts pateixen un procés de mort cel·lular programada durant la metamorfosi (Jiang et al., 1997; Ninov et al., 2007).

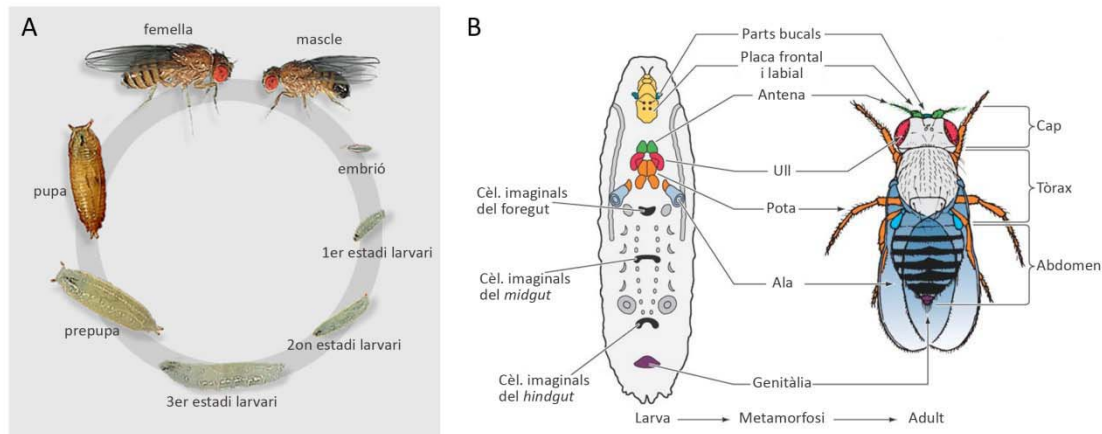


Figura 1.15. Desenvolupament de *Drosophila melanogaster*. (A) Cicle de vida de la mosca del vinagre, format per l'embrió, tres fases larvàries, la prepupa, la pupa i l'adult. (B) Correspondència entre els discs i primordis imaginals de la larva i les estructures adultes formades a partir d'aquests.

1.6.2 Control hormonal del desenvolupament de *Drosophila melanogaster*

Malgrat no ser un model representatiu de la classe Insecta, la mosca del vinagre és l'organisme més utilitzat en l'estudi del control que la 20E exerceix sobre el desenvolupament i la metamorfosi dels insectes. Durant les dues primeres fases larvàries en *D. melanogaster* es produeixen dos pics successius de 20E en presència d'HJ, que determinen que es doni la muda a un nou estadi larvari (figura 1.16). Durant la darrera fase larvària, en canvi, l'HJ desapareix i petits polsos de 20E activen l'expressió de diversos gens importants per a l'inici del període prepupal, com *Br* o els *glue genes* (*Sgs1-8*) (Thummel, 2001). Tot seguit, al final d'aquest estadi es produeix un increment notable dels nivells de 20E, acompanyats d'una reinducció de l'HJ, que indueix l'eversió dels discs imaginals i l'inici de la metamorfosi (Bender et al., 1997; Riddiford, 1993). A més, durant el període prepupal es dona l'activació de l'expressió de *βFtz-F1*, que actua de factor de competència per permetre l'activació selectiva de gens induïts pel següent pic de 20E (Woodard et al., 1994). Aquest pic es dona 12 hores després de la prepupa i marca l'inici de l'estadi pupal, controlant entre d'altres processos l'eversió del cap, la deposició de la cutícula pupal i la degeneració de la glàndula salival (Ward et al., 2003). Finalment, nivells molt elevats de 20E en absència d'HJ durant la pupa controlen la diferenciació adulta final de les estructures imaginals (figura 1.16) (Thummel, 2001).

La diferència més significativa entre els dípters i la resta d'insectes, pel que fa referència al control hormonal del seu desenvolupament, és la resposta a l'HJ. Malgrat que els patrons d'aquesta hormona en *D. melanogaster* segueixen el perfil característic dels insectes

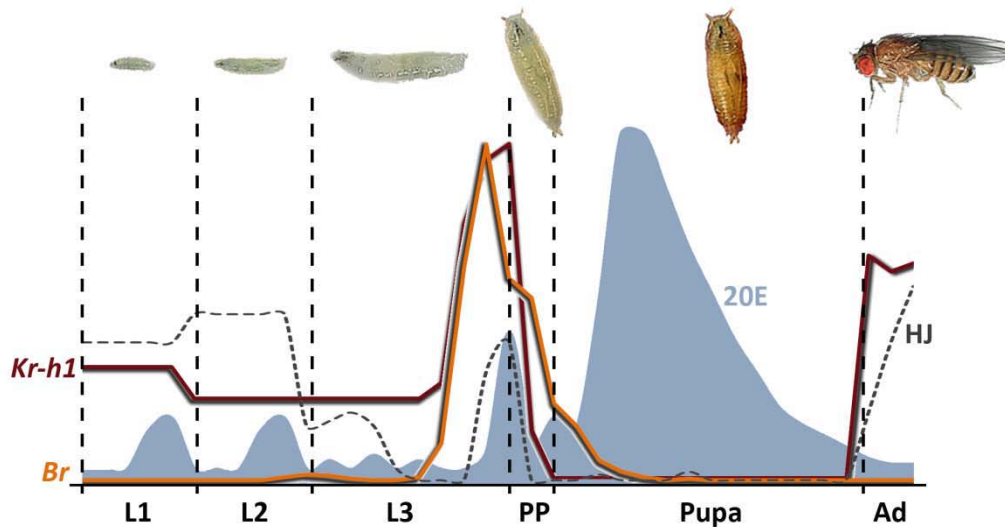


Figura 1.16. Nivells hormonals durant el desenvolupament postembrionari de *Drosophila melanogaster*. Nivells de 20-hidroxiecdisona (20E) (en blau) i d'hormona juvenil (HJ) (línia discontinua) durant les tres fases larvàries (L1, L2 i L3), la prepupa (PP), la pupa i les primeres hores de l'adult (Ad). També es mostren les variacions d'expressió de *DKr-h1* (en vermell) i *DBr* (en groc) durant aquests períodes.

holometàbols (figura 1.16), el tractament amb anàlegs de l'HJ durant l'últim estadi larvari no provoca l'aparició de fases larvàries extremes. En comptes d'això, la pupació es dona de manera normal i tan sols s'observa un retard en l'aparició de Br a l'epidermis abdominal (Riddiford et al., 2003). D'altra banda, el tractament amb HJ durant la prepupa impedeix la disminució dels nivells de Br en l'epiteli abdominal que es dona durant l'estadi pupal i provoca la formació d'una segona cutícula pupal en comptes de la cutícula adulta (Zhou and Riddiford, 2002). Curiosament, però, l'HJ no afecta el desenvolupament correcte de les estructures que es formen a partir de discs imaginals, ni durant el període larvari ni el pupal, que són totalment refractaris a les variacions d'aquesta hormona. D'altra banda, en *D. melanogaster* la funció de receptor de l'HJ, com s'ha dit anteriorment, es dona a través de dos paràlegs, Met i Gce. Aquests són funcionalment redundants i l'absència d'ambdós provoca la mort durant la transició larva-pupa degut a l'activació precoç de mecanismes de mort cel·lular en diferents teixits, com ara el cos gras (Abdou et al., 2011; Baumann et al., 2010). A més, Met i Gce són imprescindibles per l'expressió de *Kr-h1*, necessari durant la formació de la pupa (Pecasse et al., 2000). D'altra banda, Br, l'expressió del qual s'indueix per acció de la 20E en absència d'HJ durant la darrera fase larvària, és necessari en *D. melanogaster* per l'eversió dels discs imaginals i l'especificació de la pupa (Kiss et al., 1988; Zhou and Riddiford, 2002).

1.7 LA SUMOILACIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT

La sumoilació és una modificació posttraduccional reversible que actua principalment sobre proteïnes nuclears, però també en proteïnes de la membrana plasmàtica i el citoplasma. Consisteix en la unió d'una petita proteïna, anomenada SUMO (de l'anglès *Small Ubiquitin-related MOdifier*), a una proteïna diana. Aquesta interacció pot comportar la modificació de la

proteïna diana de diverses formes: bloquejant un lloc d'unió, creant-ne un de nou o canviant-ne la conformació. Des del seu descobriment en la dècada dels 90 nombrosos estudis han demostrat que la sumoilació és important pel correcte funcionament de diversos processos cel·lulars com la transcripció gènica, la localització subcel·lular, la interacció proteïna-proteïna, la reparació i replicació del DNA, la regulació del cicle cel·lular, l'apoptosi i la dinàmica dels cromosomes, entre d'altres (Wang and Dasso, 2009).

1.7.1 Característiques i mecanisme de conjugació de SUMO

Les proteïnes SUMO tenen un pes d'aproximadament 10 kD i la seva estructura tridimensional és semblant a la de la ubiquitina (Bayer et al., 1998; Bernier-Villamor et al., 2002). Es troben en el genoma de tots els organismes eucariotes però no s'han observat en procariotes. Inicialment es van identificar en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, que té un sol gen *sumo* (*SMT3*) (Meluh and Koshland, 1995). Altres organismes com el nemàtode *Caenorhabditis elegans* i *D. melanogaster* també tenen un sol SUMO, mentre que les plantes i els vertebrats en tenen diversos (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). En humans se n'han identificat quatre paràlegs (SUMO1-4). D'aquests, SUMO2 i SUMO3, que comparteixen el 97% dels seus aminoàcids, conformen la subfamília SUMO2/3 i, juntament amb SUMO1, s'expressen de manera ubíqua. Tot i que s'han observat diferències en la seva distribució subcel·lular i capacitat de conjugació a algunes proteïnes, es desconeix si les funcions d'aquests tres SUMO són úniques, redundants o antagonístiques (Citro and Chiocca, 2013). D'altra banda, SUMO4 només s'expressa al ronyó, als nòduls limfàtics i a la melsa, i no s'ha pogut comprovar la seva capacitat d'unió a proteïnes *in vivo* (Owerbach et al., 2005).

Les proteïnes SUMO de tots els organismes, igual que la ubiquitina, es tradueixen en forma de precursor immadur que posteriorment és processat per unes proteases específiques (isopeptidases específiques de SUMO, SENPs) que el transformen en la proteïna madura (figura 1.17). Aquestes proteases actuen eliminant l'extrem C-terminal de SUMO fins a deixar lliure un motiu di-glicina, que es troba conservat en totes les espècies estudiades. A continuació, la forma madura de SUMO és activada mitjançant l'acció de l'heterodímer AOS1/UBA2 (enzim E1), que adenila la doble glicina C-terminal. Tot seguit, el SUMO adenilat forma un enllaç tioéster amb una cisteïna de l'enzim E1, que el transfereix a l'enzim conjugador UBC9 (enzim E2), formant el complex SUMO-UBC9 (figura 1.17). Finalment, UBC9 transfereix SUMO a la proteïna diana mitjançant la formació d'un enllaç isopeptídic entre el grup carboxil de la glicina C-terminal de SUMO i el grup amino d'un residu lisina de la proteïna diana (figura 1.17). Tot i que UBC9 és capaç d'interaccionar per si mateix amb la proteïna substrat per unir-hi SUMO, sovint poden intervenir en aquest procés algunes lligases (E3), catalitzant la transferència de SUMO de UBC9 a la proteïna diana o formant un complex amb SUMO-UBC9 i el substrat, que augmenta l'especificitat de la interacció (figura 1.17) (Citro and Chiocca, 2013; Gareau and Lima, 2010; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Alguns exemples de lligases E3 de SUMO són la família de proteïnes inhibidores de STAT (PIAS), que tenen un domini SP-RING que interacciona amb el substrat i amb el complex SUMO-UBC9 alhora, facilitant la transferència de SUMO a la proteïna diana (Palvimo, 2007). També la proteïna nuclear RanBP2, la histona deacetilasa HDAC4 i el

membre del grup Polcomb PC2, entre d'altres, actuen de lligases de SUMO (Kagey et al., 2003; Pichler et al., 2004; Zhao et al., 2005). Tal i com s'ha mencionat abans, la sumoilació és un procés reversible i l'enllaç isopeptídic que uneix SUMO amb el seu substrat es pot trencar. D'això se n'encarreguen les proteases SENP, que tenen alhora activitat isopeptidasa per dur a terme aquesta funció i activitat hidrolasa C-terminal per catalitzar la maduració de la proteïna SUMO (Shin et al., 2012).

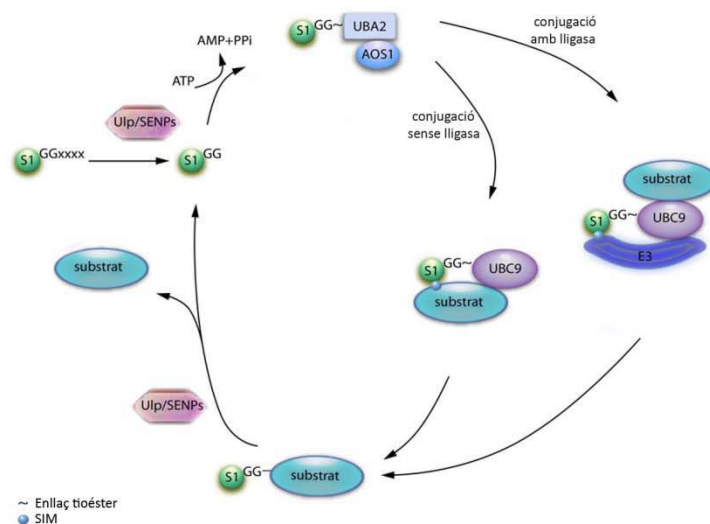


Figura 1.17. Procés de conjugació de SUMO a la proteïna diana. Representació esquemàtica del conjunt de molècules i reaccions que componen el procés pel qual SUMO s'uneix a la proteïna diana (substrat). Modificat de Citro & Chiocca (2013). Abreviatures: S1, SUMO1; E3, lligasa.

1.7.2 Dominis de sumoilació i el domini SIM

Moltes de les proteïnes modificades per SUMO contenen un motiu consens (Ψ KX(D/E)) anomenat domini de sumoilació. Aquest domini està format per un residu hidrofòbic llarg (Ψ), seguit d'una lisina (K) que formarà l'enllaç isopeptídic amb SUMO, un aminoàcid qualsevol (X) i un àcid aspàrtic (D) o glutàmic (E) (Rodríguez et al., 2001). Tot i que la identificació d'aquest domini és útil com a aproximació inicial, no és un indicador definitiu de la sumoilació d'una proteïna, ja que SUMO es pot unir a residus lisina fora d'aquest motiu i no tots els dominis Ψ KX(D/E) es poden sumoilar. En alguns substrats s'han identificat seqüències més llargues que contenen el motiu consens juntament amb altres elements addicionals. Aquests inclouen els dominis SUMO dependents de fosforilació (PSDMs) i els dependents de càrrega negativa (NSDMs). Els primers contenen un domini de fosforilació adjacent al motiu SUMO consens (Ψ KX(D/E)XXSP) que incrementa els nivells de sumoilació (Hietakangas et al., 2003). Per la seva banda, els dominis NSDM contenen residus carregats negativament a C-terminal del motiu consens (Ψ KX(D/E)EEEE), amb la mateixa funció que els PSDMs (Gareau and Lima, 2010).

En els últims anys s'ha vist que existeix un altre tipus de domini, el SIM (de l'anglès *SUMO-interacting motif*), que permet la interacció no covalent entre SUMO i les proteïnes que

contenen aquest domini. Els dominis SIMs estan formats per una cadena curta d'aminoàcids hidrofòbics ((V/I)X(V/I)(V/I)) flanquejada per residus àcids, que forma una làmina β que es pot unir a una zona hidrofòbica de la superfície de SUMO (Kerscher, 2007). Aquests dominis s'han trobat en enzims de la via de conjugació de SUMO, en proteïnes diana de SUMO i en altres tipus de proteïnes, provocant canvis en la seva activitat i/o localització. En les lligases E3 de SUMO aquests dominis SIM permeten que la interacció amb el complex UBC9-SUMO sigui més eficaç, facilitant la conjugació de SUMO a la proteïna diana (Gareau and Lima, 2010). També la seva presència en l'enzim UBC9 facilita la interacció d'aquest enzim amb SUMO, i en algunes proteïnes fins i tot promou la formació de cadenes (Knipscheer et al., 2007). En determinats substrats de SUMO la presència de SIMs confereix especificitat per sumoilar-se amb un paràleg determinat (Meulmeester et al., 2008), mentre que algunes proteïnes que no se sumoilen els utilitzen per reconèixer substrats sumoïlats i poder interaccionar amb ells (Song et al., 2004).

1.7.3 La sumoïlació en insectes

Malgrat que aquest procés s'ha estudiat majoritàriament en vertebrats també s'ha avançat en la caracterització de les seves funcions en altres organismes. En el cas dels insectes s'ha utilitzat com model, de manera gairebé exclusiva, el dípter *D. melanogaster*. En aquest organisme, que té un sol gen *sumo* (*smt3*), s'ha demostrat que la sumoïlació és necessària per a la proliferació i la correcta progressió del cicle cel·lular (Kanakousaki and Gibson, 2012; Nie et al., 2009), el transport intracel·lular (Epps and Tanda, 1998; Smith et al., 2004), la capacitat de regulació transcripcional de diversos factors de transcripció (Liu and Ma, 2012; Savare et al., 2005; Takanaka and Courey, 2005) i la regulació de la cromatina durant la profase meiótica (Apionishev et al., 2001). Això fa que aquesta modificació posttraduccional sigui essencial en diversos processos durant el desenvolupament de *D. melanogaster*, com per exemple en l'embriogènesi (Abed et al., 2011; Epps and Tanda, 1998), la morfogènesi de l'ala (Sánchez et al., 2010; Smith et al., 2011; Takanaka and Courey, 2005), el desenvolupament del sistema nerviós (Savare et al., 2005), la resposta immune (Bhaskar et al., 2002), l'apoptosi (Mauri et al., 2008) o la metamorfosi (Huang et al., 2011b; Talamillo et al., 2008). En el procés metamòrfic s'ha vist que dSmt3 és necessari en la glàndula protoràcica per la síntesi del pic d'ecdisona que senyalitza el començament de la transició larva-pupa (Talamillo et al., 2008). Aquesta funció depèn d'una doble acció de dSmt3 sobre el receptor nuclear Ftz-F1: d'una banda, és necessari per l'activació de la transcripció de *Ftz-F1* i, de l'altra, sumoïla Ftz-F1, reduint la seva capacitat per activar transcripcionalment *Snmp1*, receptor scavenger involucrat en l'entrada del colesterol necessari per a la síntesi de l'ecdisona a la glàndula protoràcica (Talamillo et al., 2013).

2. OBJECTIUS

Donada la importància de la metamorfosi en l'èxit evolutiu dels insectes, la present tesi doctoral pretén, d'una banda, ampliar els coneixements sobre els mecanismes que regulen aquest procés i, de l'altra, entendre millor com va aparèixer la metamorfosi completa a partir d'ancestres hemimetàbols fa aproximadament 300 milions d'anys (Kristensen, 1999; Sehnal et al., 1996). Per tal d'assolir aquests objectius s'utilitzen tres insectes model amb característiques metamòrfiques diferents: l'hemimetàbol *Blattella germanica*, l'holometàbol basal *Tribolium castaneum* i l'holometàbol modificat *Drosophila melanogaster*.

La primera part de la tesi se centra en l'estudi de la modificació posttraduccional coneguda amb el nom de sumoilació. En els insectes, aquest procés ha estat caracteritzat de manera exclusiva en la mosca *D. melanogaster*, on entre d'altres funcions juga un paper essencial en l'inici de la metamorfosi (Talamillo et al., 2008). *D. melanogaster* conté un sol gen *Sumo*, mentre que l'insecte model utilitzat en aquesta part del treball, *B. germanica*, en té dos. Aquest fet permet estudiar l'evolució funcional de la sumoilació en els insectes, amb els següents objectius inicials:

1. Caracteritzar, mitjançant la tècnica de l'RNA d'interferència *in vivo*, les funcions de la sumoilació durant el desenvolupament postembrionari de *B. germanica*, tot comparant-les amb les que exerceix en *D. Melanogaster*.
2. Analitzar les diferents funcions dels dos paràlegs *Sumo* de *B. germanica* i estudiar, des d'un punt de vista evolutiu, la seva capacitat funcional en *D. Melanogaster*.

En la segona part de la tesi es pretén estudiar el paper del gen *E93*. Descrit prèviament com a responsable de la mort cel·lular programada de teixits larvaris durant la metamorfosi de *D. melanogaster* (Lee et al., 2000), aquest factor de transcripció és un bon candidat per a l'estudi de la regulació de les transformacions metamòrfiques. Alhora, presenta una bona oportunitat per comparar els mecanismes que controlen aquestes transformacions en espècies amb diferents estratègies metamòrfiques. Per tot això, els objectius d'aquesta part del treball són:

3. Caracteritzar, mitjançant la tècnica de l'RNA d'interferència *in vivo*, la funció del factor de transcripció *E93* durant la metamorfosi d'un insecte hemimetàbol (*B. germanica*), un holometàbol basal (*T. castaneum*) i un holometàbol molt modificat (*D. melanogaster*).
4. Analitzar la interacció entre *E93* i la via de l'HJ en l'hemimetàbol *B. germanica*.
5. Establir els mecanismes reguladors entre els factors de transcripció *E93*, *Kr-h1* i *Br* en un model representatiu de la metamorfosi holometàbola, *T. Castaneum*.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 INSECTES

3.1.1 *Blattella germanica*

Per dur a terme els diferents assajos en *B. germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) es van utilitzar femelles provinents d'una colònia mantinguda en foscor i condicions constants de temperatura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) i humitat relativa (70-75 %). L'alimentació que se'ls subministrava consistia en pinso especial per gossos PANLAB 125 i aigua *ad libitum* (Piulachs, 1987). Les nimfes acabades de mudar es detectaven gràcies a la manca de pigmentació de la cutícula, mentre que la seva mida indicava si pertanyien al cinquè o al sisè estadi nimfal.

3.1.2 *Tribolium castaneum*

Per als experiments amb l'escarabat *T. castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) es van utilitzar dues soques diferents, la soca salvatge San Bernardino i la línia transgènica *pu11*, ambdues cedides pel Dr. Yoshinori Tomoyasu (Miami University, Oxford, Ohio). Els escarabats *pu11* pertanyen a una línia *enhancer trap* (Lorenzen et al., 2003) en la qual la proteïna fluorescent EGFP s'expressa:

- en el sistema nerviós durant el primer estadi larvari
- en ulls, èlitres i ales en desenvolupament durant l'últim estadi larvari
- en els ulls, èlitres i ales de la pupa
- en els ulls adults

Les dues línies d'escarabats es mantenien en foscor a una temperatura constant de 29°C , en tubs de plàstic de 100 ml omplerts a un quart del seu volum amb farina de blat ecològica i el 5 % de llevat (Bucher, 2009). En aquestes condicions, les larves pupaven al cap de set estadis larvaris. Les larves recent mudades als diferents estadis es distingien per la manca de pigmentació de la cutícula.

3.1.3 *Drosophila melanogaster*

Les diferents soques de la mosca *D. melanogaster* utilitzades en aquest treball es van mantenir en condicions constants de temperatura (25°C) i humitat (50-55 %). Els experiments d'expressió ectòpica es van dur a terme mitjançant el sistema Gal4-UAS (Brand and Perrimon, 1993). La línia *act-Gal4* es va utilitzar per a l'expressió ubíqua a tots els teixits de l'animal. Les línies *SalEPv-Gal4* (Barrio and de Celis, 2004) i *phm-Gal4* (Mirth et al., 2005) es van utilitzar per dirigir l'expressió a l'ala i la glàndula protoràcica, respectivament. Per a sobreexpressar *BgSumo1* i *BgSumo3* es van utilitzar les construccions UAS-*BgSumo1* i UAS-*BgSumo3*, respectivament, elaborades tal i com es descriu en l'apartat 3.11. Les línies transgèniques utilitzades per aquesta sobreexpressió es van generar en el laboratori de la Dra. Rosa Barrio (CIC bioGUNE, Bizkaia) mitjançant procediments de transformació estàndard (Spradling and Rubin, 1982). Com a control de la sobreexpressió *in vivo* es va utilitzar la línia UAS-*GFP* (Ito et al., 1997). Per al silenciament de l'expressió de dSmt3 es va utilitzar la línia UAS-smt3i (Talamillo et al., 2008). Per a la

interferència de DE93i es van utilitzar les línies UAS-DE93i (KK108140) i UAS-DE93i (GD4449) obtingudes del *Vienna Drosophila RNAi Center* (VDRRC). Per incrementar l'efectivitat de la interferència es va utilitzar la línia UAS-Dicer2 (Dietzl et al., 2007). Es pot trobar informació addicional sobre totes aquestes línies a la pàgina web FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu>).

3.2 TÈCNiques QUIRÚRGiques EN *Blattella germanica*

Les disseccions dels insectes es van realitzar sota una lupa binocular Meiji, prèvia anestèsia amb CO₂. Per a la manipulació i l'extracció dels diferents teixits s'utilitzaven pinces INOX 5 Super Wit i microtissores Diener. Durant la dissecció els teixits es mantenien submergits en un solució salina Ringer.

Composició de la solució salina Ringer:

NaCl	9 g/l
KCl	0.2 g/l
NaHCO ₃	0.2 g/l
CaCl ₂	0.2 g/l

3.2.1 Dissecció dels ovaris, medició de la superfície de l'oòcit basal i comptatge del número de cèl·lules fol·liculars

Per a l'extracció dels ovaris es realitzava una obertura longitudinal en la part ventral de l'abdomen, des del segment genital fins al tòrax. Tot seguit, se separaven les esternites abdominals i, un cop apartat el cos gras, quedaven al descobert ambdós ovaris, un a cada costat del tub digestiu.

La medició de la superfície dels oòcits basals es va realitzar després d'una tinció DAPI (veure apartat 3.17) i la posterior captació de la imatge mitjançant microscopia de fluorescència (veure apartat 3.21). Tot seguit, utilitzant el programa AdobePhotoshop (Adobe Systems Incorporated) es mesurava la longitud (L) i l'amplada (A) de l'oòcit i s'obtenia la superfície a través de la fórmula:

$$\text{Superfície oòcit} = 4\pi \cdot L/2 \cdot A/2$$

Per determinar el nombre de cèl·lules fol·liculars per oòcit basal (N) es feia el comptatge dels nuclis (n) presents dins un requadre de superfície determinada, i s'obtenia el número total de cèl·lules (N) mitjançant la fórmula:

$$N = (\text{Superfície oòcit} \cdot n) / \text{superfície requadre}$$

Per cada oòcit basal es feia un mínim de tres comptatges.

3.2.2 Dissecció del cos gras i el tub digestiu

Per a l'obtenció del tub digestiu i el cos gras s'obria l'insecte per la zona ventral, de la mateixa manera que per la dissecció dels ovaris. Un cop obert, es descartaven els ovaris i les glàndules col·laterals i se separaven amb cura el tub digestiu per una banda i el cos gras per l'altra.

3.2.3 Dissecció de l'epidermis

Per la dissecció de l'epidermis es realitzaven dues obertures longitudinals al llarg de la línia en la que conflueixen les cutícules dorsal i ventral, des de l'últim segment abdominal fins al tòrax. A continuació es descartaven les esternites abdominals i es retirava el tub digestiu, els ovaris i el cos gras. Finalment, se separava el tòrax i l'últim segment abdominal amb les glàndules col·laterals i s'utilitzava la cutícula dorsal, on es trobava adherida l'epidermis. La dissecció del cos gras unit a cutícula es feia de la mateixa manera però sense retirar-ne el cos gras adherit.

3.2.4 Dissecció dels *corpora allata* (CA)

Les disseccions de CA es van dur a terme practicant una obertura a la coberta quitinosa del cap, a nivell de la zona occipital. Un cop realitzada l'obertura s'inclinava el cap endavant i es retirava el teixit muscular i el cos gras, que es troben just sota l'orifici occipital, quedant exposat el complex retrocerebral format pels *corpora cardiaca* (CC) i els CA. Aquest complex es troba situat per sobre l'esòfag i el gangli subesofàgic, entre dues tràquees dorsals disposades longitudinalment. Degut a la seva mida reduïda els CA s'extreien juntament amb els CC, que se separaven posteriorment seccionant-los a nivell de la zona on parteixen els *nervi corporis allati*.

3.2.5 Dissecció de la glàndula protoràtica

Per la dissecció de la glàndula protoràtica l'insecte s'immobilitzava amb l'ajuda d'agulles entomològiques de manera que la regió ventral del coll quedés completament visible. Tot seguit s'enretirava la cutícula de la zona i les tràquees ventrals, deixant exposat el gangli protoràtic i els corresponents nervis connectius. A continuació, es seccionaven els nervis i es retirava el gangli protoràtic, deixant al descobert la glàndula protoràtica sobre el tub digestiu. Finalment, es tallaven les quatre branques de la glàndula per la zona més distal.

3.2.6 Dissecció de les ales

L'extracció de les tegmines i les ales de les nimfes es realitzava col·locant l'insecte en posició dorsal. Tot seguit, amb l'ajuda de les tisores, se seccionava la part distal de la cutícula del

wing pad dels segments mesotoràctic i metatoràctic, que contenien les tegmines i les ales respectivament.

3.2.7 Extracció de l'hemolimfa

Per a l'obtenció de l'hemolimfa se seccionava el fèmur d'una de les potes posteriors i s'aplicava sobre el tall una micropipeta aforada de cristall de 5 µl que permetia la recollida de l'hemolimfa per capilaritat.

3.3 EXTRACCIÓ D'ÀCIDS RIBONUCLEICS (RNA)

Les extraccions d'RNA dels diferents insectes es van dur a terme utilitzant el kit de Sigma *GenElute Mammalian Total RNA* d'acord amb les instruccions del fabricant. Per a les extraccions d'RNA total del cos gras, epidermis, ovari, tub digestiu i ales, els teixits prèviament congelats en nitrògen líquid es van triturar amb l'ajuda d'un homogeneïtzador mecànic. En el cas dels CA, la glàndula protoràctica i el cervell, les mostres es van congelar amb el tampó de lisi i se'n va extreure l'RNA directament. Al final del procés d'extracció l'RNA es quantificava mitjançant l'espectrofotòmetre Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop).

3.4 CLONATGE DEL cDNA DE *BgUbc9* I *BgE93*

Les seqüències específiques dels gens *Ubc9* i *E93* de *B. germanica*, *BgUbc9* i *BgE93*, es van obtenir mitjançant les tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i l'ús d'oligonucleòtids degenerats, ja que de moment no s'ha seqüenciat el genoma complet d'aquesta panerola. Un cop obtingut un primer fragment, la utilització de les tècniques de 5'- i 3'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) van permetre ampliar la seqüència coneguda.

La PCR és una tècnica que permet l'amplificació exponencial de petites quantitats de DNA *in vitro* utilitzant dos oligonucleòtids flanquejant la regió que es vol amplificar i que hibriden en les cadenes oposades d'aquesta regió de DNA. Per a la reacció d'amplificació s'utilitza una DNA polimerasa termostable que permet realitzar un procés cíclic de desnaturalització, hibridació i extensió dels oligonucleòtids (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988).

3.4.1 PCR amb oligonucleòtids degenerats

Per clonar un primer fragment de *BgUbc9* es va realitzar un alineament de la seqüència *Ubc9* completa de diversos insectes que va permetre el disseny d'oligonucleòtids degenerats en les zones més conservades. En el cas de *BgE93*, per a l'alineament es van utilitzar les seqüències del domini Pipsqueak de diferents ortòlegs *E93* d'insectes. Com a motlle per a ambdues PCRs es va utilitzar un cDNA obtingut a partir de la glàndula protoràctica d'una nimfa d'última fase. Les reaccions es van realitzar amb GoTaq polimerasa (Promega), seguint les especificacions del

fabricant, excepte per a la concentració dels oligonucleòtids. Aquests, al ser degenerats, es posaven a una concentració cinc vegades superior a la indicada.

Els oligonucleòtids degenerats utilitzats van ser:

cDNA	Oligonucleòtid	Seqüència	Fragment amplificat
BgUbc9	BgUbc9 deg F	5'-TGGMGNAARGANCAAYCC-3'	398 pb
	BgUbc9 deg R	5'-ACNCKYTTNTCRTAYTC-3'	
BgE93	BgE93 deg F	5'-CCVAARMGDGGMAARTAYMG-3'	109 pb
	BgE93 deg R	5'-TGHCKYTCYTTVACYTTGTA-3'	

Els protocols per a les condicions de PCR foren:

BgUbc9		94 °C	2 min	BgE93		94 °C	2 min	
	4x	⤴	94 °C		30 seg	⤴	94 °C	30 seg
			48 °C		30 seg		50 °C	30 seg
			74 °C		40 seg		74 °C	40 seg
	34x	⤴	94 °C		30 seg	⤴	94 °C	30 seg
			53 °C		30 seg		55 °C	30 seg
			74 °C		4 seg		74 °C	4 seg
74 °C			5 min	74 °C	5 min			

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

Les seqüències obtingudes es van ampliar mitjançant les tècniques de 5'- i 3'-RACE. Aquestes tècniques, que van ser descrites inicialment per Frohman *et al.* (1988), es van dur a terme seguint les instruccions del "5'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends", Versió 2.0 (Invitrogen), o bé les del "3'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends", Versió 2.0 (Invitrogen), a partir d'RNA total obtingut de glàndula protoràtica d'última fase nimfal de *B. germanica*. Els oligonucleòtids específics que es van utilitzar en aquestes tècniques es van dissenyar sobre els fragments de seqüència de *BgUbc9* i *BgE93* obtingudes anteriorment.


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

Els oligonucleòtids específics utilitzats van ser:


cDNA	Oligonucleòtid	Seqüència	Tècnica utilitzada
BgUbc9	BgUbc9 R1	5'-CCTCCTCCCATGGAGTAGA-3'	5'-RACE
	BgUbc9 F1	5'-TCCATCAGGTACAGTATGTTTGTC-3'	3'-RACE
BgE93	BgE93 R1	5'- TTGAACCGCTCTCACAGCTTCTAT-3'	5'-RACE
	BgE93 R2	5'- GCAACCAATGGTGGGGTGAACCT -3'	


Les condicions per a cada PCR foren:

BgUbc9

5'-RACE	39x		94 °C	2 min
			94 °C	30 seg
			57 °C	30 seg
			74 °C	1 min
			74 °C	5 min

BgE93

5'-RACE	39x		94 °C	2 min
			94 °C	30 seg
			55 °C	30 seg
			74 °C	2 min
			74 °C	5 min

3'-RACE	39x		94 °C	2 min
			94 °C	30 seg
			60 °C	30 seg
			74 °C	1 min
			74 °C	5 min

3.5 ELECTROFORESI DE DNA

Les electroforesis de DNA es van realitzar en gels d'agarosa d'entre 0.7-1.5 % (p/v), depenent de la mida del DNA, preparats en tampó TBE 0.5x. Abans de solidificar-se el gel s'hi afegia el 0.005 % (v/v) de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). En cada carril es carregava la quantitat adequada de DNA dissolt en tampó de carrega (Sambrook et al., 1989). Les electroforesis es van dur a terme a un voltatge d'entre 120 i 190 V. La visualització del DNA es realitzava mitjançant un transil·luminador de llum ultraviolada.

El tampó d'electroforesi TBE 0.5x tenia la següent composició:

Tris base	44.5 mM
Àcid bòric	44.5 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

3.6 LLIGACIÓ D'INSERTS EN PLÀSMIDS

Les lligacions dels fragments de DNA generats per PCR es van dur a terme en el vector pSTBlue-1 seguint les instruccions del *pAcceptor Vector Kit* (Novagen). Les transformacions del DNA plasmídic es van fer en cèl·lules *E. coli* competents *Novablue* (Novagen) seguint el procediment descrit per Sambrook et al. (1989).

3.7. PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS

L'obtenció del DNA plasmídic es va realitzar seguint les instruccions del *GenElute Plasmid Miniprep KIT* (Sigma), a partir de cultius líquids de 4 ml de medi LB incubats tota la nit a 37°C en agitació constant (250 rpm). Composició del medi LB líquid:

Triptona	10 g/l
Extracte de llevat	5 g/l
NaCl	10 g/l

3.8 SEQÜENCIACIÓ DEL DNA

Les seqüenciacions de DNA es van dur a terme mitjançant el mètode de terminació de la cadena per dideoxinucleòtids, utilitzant el kit *BigDye Terminator v3.1* (Invitrogen). La PCR i la posterior precipitació de les cadenes de DNA amplificades es van fer segons les indicacions del fabricant. Un cop precipitades, les mostres es duïen al servei de genòmica de la Universitat Pompeu Fabra (UPF), al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB), on se seqüenciaven utilitzant l'analitzador de DNA ABI3730xl.

3.9 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

Per a la determinació de les quantitats relatives dels mRNA d'interès en alguns casos es va utilitzar la tècnica de la RT-PCR semiquantitativa. Aquesta tècnica es basa en l'obtenció de cDNA a partir de la transcripció reversa de l'mRNA. A continuació, utilitzant aquest cDNA de motlle, es realitza una PCR amb oligonucleòtids específics per tal de determinar la presència o l'abundància relativa de cada transcrit.

3.9.1 Tractament amb DNAsa

Abans de la transcripció reversa s'eliminava el DNA genòmic de la mostra, ja que en l'extracció d'RNA sempre existeix una petita contaminació de DNA. Això es feia mitjançant un tractament amb DNAsa, seguint el següent procediment:

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

3.9.2 Retrotranscripció

Procediment:

1. Afegir els següents reactius:
 - 4 µl de First Strand Buffer 5x (Invitrogen)
 - 0.5 µl de Random Primers (0.5 mg/ml) (Promega)
 - 0.5 µl de dNTP Master Mix 100 mM (Ecogen)
 - 2 µl de DTT 0.1 M (Invitrogen)
 - 1 µl d'RNAsin Ribonuclease Inhibitor 40u/µl (Promega)
2. Equilibrar la reacció durant 10 min a temperatura ambient

3. Afegir 1 µl de SuperScript™ II RNase H⁺ Reverse Transcriptase (200 u/µl) (Invitrogen)
4. Equilibrar la reacció 10 min a temperatura ambient
5. Incubar 50 min a 42 °C per fer la transcripció reversa
6. Incubar durant 10 min a 75 °C per aturar la reacció
7. Equilibrar 10 min a temperatura ambient
8. Afegir 20 µl de TE pH 8.0

3.9.3 PCR

Les condicions de PCR eren dins la zona d'amplificació lineal per cadascun dels diferents transcrits. Per a la reacció de PCR s'afegien en un tub de PCR de 0.2 ml (Eppendorf) els següents reactius (volum final de 25 µl):

- 1x GoTaq Buffer (Promega)
- 800 µM dNTP Master Mix (Ecogen)
- 200 nM oligonucleòtid directe
- 200 nM oligonucleòtid revers
- 1 µl cDNA
- 1u GoTaq DNA Polimerasa (Promega)

Oligonucleòtids utilitzats:

cDNA	Oligonucleòtid	Seqüència	Fragment amplificat
BgSumo1	BgSumo1 F1	5'- GGCTTTTGAATGATGTTGCGTGAA-3'	206 pb
	BgSumo1 R1	5'-TGCAATGTGCCATAATTTCAATCC-3'	
BgSumo3	BgSumo3 F1	5'- AGATTTTCGATTTGATGGTCAACCA-3'	178 pb
	BgSumo3 R1	5'-GGTTTGACGCGTTTTAGTTCATAG-3'	
BgActina-5C	BgActina F1	5'-TCGTTTCGTGACATCAAGGAGAAGCT-3'	312 pb
	BgActina R1	5'-TGTCGGCAATTCCAGGGTACATGGT-3'	
BgUbc9	BgUbc9 F1	5'-CGGATTTGTAGCACGTCCAGTTAA-3'	331 pb
	BgE93Ubc9 R1	5'-TTCAGCTTGAGCGGGATCCTTAAT-3'	
BgEcR-A	BgEcRA F2	5'-TCGCATCAGACAGTGCCATTGGT-3'	420 pb
	BgEcRA R2	5'-GACGGTGAAGACAACCAGTCATC-3'	
BgRXR	BgRXR F1	5'-ATAATTGACAAGAGGCAGAGGAA-3'	400 pb
	BgRXR R1	5'-TGGTCACTAAGAGGCAAGGTAGT-3'	
BgE75A	BgE75A F1	5'-TTAGTGCTAGTGCAATGTGCTATTGA-3'	324 pb
	BgE75com R	5'-ATGGAGCACTGTTGGTCTTGGA-3'	
BgE75C	BgE75C F1	5'-TTCAGGATTCCGACGTCGGTGAT-3'	364 pb
	BgE75com R	5'-ATGGAGCACTGTTGGTCTTGGA-3'	
BgHR3A	BgHR3A F1	5'-GGCGCACAAAAGTGGATTAATTGA-3'	301 pb
	BgHR3A R1	5'-TACTGGCATCGGTTCTGTTGAC-3'	
BgFtz-F1	BgFtz F1	5'-TTCGAACTCTGCAGAACCAGAC-3'	100 pb
	BgFtz R1	5'-CAGTCGACCTGAGAGAACAAATTC-3'	

3.10 PCR QUANTITATIVA

La tècnica de la PCR quantitativa (qPCR), també anomenada PCR en temps real, permet quantificar l'expressió d'un gen concret. Aquesta tècnica es basa en la unió, durant l'amplificació, de l'àcid nucleic del fluorocrom SYBRGreen present en la barreja de la PCR i la monitorització del seguiment al llarg del temps de la fluorescència emesa per aquest compost. La fluorescència detectada descriu una corba sigmoïdal. En els cicles inicials de la qPCR el senyal és molt flux i indistingible del soroll de fons. A mesura que el producte s'acumula, la identificació del senyal creix exponencialment fins assolir la fase de saturació. En la part lineal de la fase exponencial (en una corba representada en eixos logarítmics) la fluorescència és proporcional a la quantitat de DNA amplificat i aquest, al seu torn, al número de còpies de cDNA inicial de la mostra. Per tal de quantificar les molècules presents en la mostra inicial del gen d'estudi cal determinar el número de cicles a partir del qual el senyal és superior al soroll de fons, indicat com a Ct (*Cycle threshold*). Per a conèixer el número de còpies present en una mostra s'utilitza la fórmula següent:

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

N: número de còpies

N_0 : número de còpies inicial

E: eficiència de la reacció

Ct: *Cycle threshold*

Les qPCRs es van fer en plaques de 96 pouets. Cada placa contenia triplicats per cada mostra del gen d'estudi, el gen control, un control negatiu sense cDNA i un control negatiu de la retrotranscripció. A cada pouet es van col·locar 2 µl de la dilució adient del cDNA i es van afegir 18 µl de la següent mescla:

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

100 nM oligonucleòtid directe

100 nM oligonucleòtid revers

La condicions de la reacció de PCR per a tots els trànscrips foren les següents:

	95 °C	3 min
44x	95 °C	10 seg
	60 °C	1 min

Al final de la PCR es va aplicar un gradient creixent de temperatures (de 55 a 95 °C) per monitoritzar la cinètica de dissociació dels fragments amplificats i comprovar l'especificitat de l'amplicó. Tot el procés es va dur a terme en l'aparell Bio-Rad MyiQ™ cyclyer (Bio-Rad) i els resultats es van analitzar mitjançant el software Bio-Rad iQ5. En aquest treball els resultats obtinguts en qPCR no es representen en valors absoluts (número de còpies), sinó en valors

relatius respecte el valor més baix (en el cas dels cicles d'expressió) o respecte el valor dels individus control en la resta d'experiments.

Els oligonucleòtids utilitzats en els experiments de qPCR han estat els següents:

cDNA	Oligonucleòtid	Seqüència	Fragment amplificat
BgSumo1	BgSumo1 F2	5'-GGCTTTTGAATGATGTTGCGTGAA-3'	115 pb
	BgSumo1 R2	5'-TACAGCATTGGTATTAAGATGGG-3'	
BgSumo3	BgSumo3 F2	5'-AGATTTTCGATTTGATGGTCAACCA-3'	129 pb
	BgSumo3 R2	5'-TCAGCATGTTATATATGGTCCTCTAC-3'	
BgActina-5C	BgActina F2	5'-AGCTTCCTGATGGTCAGGTGA-3'	203 pb
	BgActina R1	5'-TGTCGGCAATTCCAGGGTACATGGT-3'	
BgUbc9	BgUbc9 F3	5'-TCCATCAGGTACAGTATGTTTGTC-3'	107 pb
	BgE93Ubc9 R3	5'-GGTTCGTTGAGGAGGTCTTGTATC-3'	
BgE93	BgE93 F3	5'-CAAGCGGGGCAAATATCGCAATTA-3'	135 pb
	BgE93 R3	5'-TGACCTTGACTCGAGTGTGG-3'	
BgHMG-CoA sintasa	BgHMGsint F1	5'-CTTCGCTTACGGAGGTTTGGTC-3'	195 pb
	BgHMGsint R1	5'-GCTGCGGCTTGATGTGCGAGAG-3'	
BgHMG-CoA reductasa	BgHMGred F1	5'-TTGTAGCTGATGGAATGACTCGT-3'	200 pb
	BgHMGred R1	5'-AGCAATGAAGCGTATAAAACAAATG-3'	
BgKr-h1	BgKr-h1 F1	5'-ACAAATGTGGTGTATGCGCCAAGA-3'	143 pb
	BgKr-h1 R1	5'-GGTATGCACCTTGAGTTGTTTGA-3'	
BgBr	BgBr F1	5'-CTTAAAGCTCATAGAGTGGTGTG-3'	152 pb
	BgBr R1	5'-CACTTCACCATGGTATATGAATTC-3'	
TcE93	TcE93 F2	5'-CTCTCGAAAACCTCGGTTCTAAACA-3'	129 pb
	TcE93 R2	5'-TTTGGGTTTGGGTGCTGCCGAATT-3'	
TcRpL32	TcRpL32 F	5'-CAGGCACCAGTCTGACCGTTATG-3'	199 pb
	TcRpL32 R	5'-CATGTGCTTCGTTTTGGCATTGGA-3'	
TcCPR27	TcCPR27 F	5'-AGGTTACGGCCATCATCACTTGA-3'	106 pb
	TcCPR27 R	5'-ATTGGTGGTGAAGTCATGGGTGT-3'	
TcKr-h1	TcKr-h1 F2	5'-AAGAAGAGCATGGAAGCACACATT-3'	158 pb
	TcKr-h1 R2	5'-GAATCGTAGCTAAGAGGGTCTTGA-3'	
TcBr	TcBr F2	5'-TCGTTTCTCAAGACGGCTGAAGTG-3'	157 pb
	TcBr R2	5'-CTCCACTAACTTCTCGGTGAAGCT-3'	
DE93A	DE93A F1	5'-CACATCAGCAGCTATGAAATA-3'	140 pb
	DE93com R1	5'-AACCGGCTATTGCTATGGGCTGTT-3'	
DE93B	DE93B F1	5'-TCCACAGATATGCTGCATATTGTG-3'	142 pb
	DE93com R1	5'-AACCGGCTATTGCTATGGGCTGTT-3'	
DRpL32	DRpL32 F	5'-CAAGAAGTTCCTGGTGCACAA-3'	61 pb
	DRpL32 R	5'-AAACGCGGTTCTGCATGAG-3'	
DEdg78E	DEdg78E F	5'-CCAATCCCATCATGTACAAA-3'	156 pb
	DEdg78E R	5'-ATTGCTGGTCTCGTAGGCGTACT-3'	
DAcp65A	DAcp65A F	5'-CCGACAACGAATCCATATCCATTC-3'	165 pb
	DAcp65A R	5'-GGTATTTACAGGATCTCCTCGAAA-3'	
DKr-h1	DKr-h1 F	5'-AAAGTATTACGAACGCAGCACCCA-3'	119 pb
	DKr-h1 R	5'-GTCGCACTTGAATTGCGGTTTGCT-3'	
DBr	DBr F	5'-CATCTGGCTCAGATACAGAACCT-3'	199 pb
	DBr R	5'-CTTCAGCAGCTGGTTGTTGATGT-3'	

3.11 OBTENCIÓ DE LES CONSTRUCCIONS PER A L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ I PER A LA SOBREEXPRESSIÓ *IN VIVO* EN *D. melanogaster*

3.11.1 Construccions RFP-BgSumo1 i RFP-BgSumo3

En l'elaboració de les construccions per a l'expressió de proteïnes de fusió es van amplificar les seqüències codificants de *BgSumo1* i *BgSumo3* amb la Taq polimerasa Phusion Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific), seguint les especificacions del fabricant. Els oligonucleòtids utilitzats van ser:

Construcció	Oligonucleòtid	Seqüència
RFP-BgSumo1	XhoI-Sumo1	5'-CTCGAGATATGTCCGATAATCAGGAACAGAAG-3'
	Sumo1-HindIII	5'-AAGCTTTCAAAGCCACCCGTTTGTCTTG-3'
RFP-BgSumo3	XhoI-Sumo3	5'-CTCGAGATATGTCTGATGATAAAAAGGGCTCA-3'
	Sumo3-HindIII	5'-AAGCTTTCAGCATGTTATATATGGTCCTCT-3'

Tot seguit es van clonar els diferents fragments amplificats en un vector pRFPm (cedit per la Dra. Elena Casacuberta) que contenia la proteïna fluorescent RFP (de l'anglès "*Red Fluorescent Protein*") sota el control del promotor del gen *armadillo* (pArm). *BgSumo1* i *BgSumo3* es van clonar a 3' de RFP, conservant la pauta de lectura per permetre la formació de les proteïnes de fusió RFP-BgSumo1 i RFP-BgSumo3. La digestió dels fragments amplificats i del vector es van dur a terme mitjançant l'activitat dels enzims de restricció XhoI i HindIII (Fermentas), seguint les instruccions del fabricant. Per a la lligació es va utilitzar la lligasa T4 DNA Ligase (Fermentas).

3.11.2 Construccions UAS-BgSumo1 i UAS-BgSumo3

Igual que en el cas anterior, per l'elaboració de les construccions per expressar ectòpicament *BgSumo1* i *BgSumo3* es van amplificar les seqüències codificants de tots dos gens utilitzant la Taq polimerasa Phusion Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific). Els oligonucleòtids utilitzats en aquest cas foren:

Construcció	Oligonucleòtid	Seqüència
pUASTattB-BgSumo1	EcoRI-Sumo1	5'-GAATTCTAGGCCACCATGTCCGATAATCAGGAACAGAAG-3'
	Sumo1-XhoI	5'-CTCGAGTCAAAGCCACCCGTTTGTCTTG-3'
pUASTattB-BgSumo3	EcoRI-Sumo3	5'-GAATTCTAGGCCACCATGTCTGATGATAAAAAGGGCTCA-3'
	Sumo3-XhoI	5'-CTCGAGTCAGCATGTTATATATGGTCCTCT-3'

Seguidament es van clonar les seqüències amplificades en el vector pUASTattB (proporcionat per la Dra. Rosa Barrio), específic per a la transformació de *D. melanogaster* i l'obtenció de mosques transgèniques (Bischof et al., 2007). Aquest vector permet que la inserció del transgen es doni en zones intergèniques predeterminades, millorant d'aquesta manera l'eficiència de la transformació. Per a les digestions es van utilitzar els enzims de restricció EcoRI i XhoI (Fermentas). La lligació es va dur a terme mitjançant la lligasa T4 DNA Ligase (Fermentas).

3.12 RNA D'INTERFERÈNCIA *IN VIVO*

Una aproximació actual per a l'estudi funcional de proteïnes en organismes que no es poden modificar genèticament de forma estable, com és el cas de *B. germanica*, consisteix en el silenciament transitori dels transcrits que les codifiquen. Aquest procediment es basa en el tractament amb una doble cadena d'RNA (*dsRNA*) idèntica a un fragment del missatger que es pretén silenciar. Aquest *dsRNA*, en penetrar dins les cèl·lules, es processa en fragments de 21-23 nucleòtids que desencadenen la degradació del missatger endogen diana (Meister and Tuschl, 2004; Mello and Conte, 2004). A continuació es detalla la metodologia utilitzada per a d'obtenció dels diferents *dsRNA*.

3.12.1 Clonatge del fragment diana

En primer lloc s'amplificava i es clonava un fragment del cDNA corresponent al gen que es volia silenciar. Les zones utilitzades per al silenciament de cada mRNA s'indiquen a l'apartat de Resultats. Com a control negatiu per als experiments d'interferència es va utilitzar una seqüència de 307 pb del gen de la polihedrina del nucleopolihedrovirus *Autographa californica* (*dsMock*). L'amplificació d'aquests fragments es realitzava utilitzant una GoTaq DNA polimerasa (Promega), seguint les instruccions de l'apartat 3.9.3. Els fragments amplificats es lligaven entre els promotors T7 i SP6 del vector pSTBlue-1.

Els oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació de cadascun dels transcrits van ser:

cDNA	Oligonucleòtid	Seqüència	Fragment amplificat
BgSumo1	BgSumo1 F3	5'-GTGGCGCGTGTGGATAAAATG-3'	430 pb
	BgSumo1 R3	5'-TACAGCATTGGTATTAAGATGGG-3'	
BgSumo3	BgSumo3 F3	5'-CTGATTTCTGAAAGGCGCGGGAC-3'	337 pb
	BgSumo3 R3	5'-TCAGCATGTTATATATGGTCTCTAC-3'	
BgUbc9	BgUbc9 F4	5'-CGGATTTGTAGCACGTCCAGTTA-3'	303 pb
	BgE93Ubc9 R4	5'-GGTTCGTTGAGGAGGTCTTGTATC-3'	
BgE93 (1)	BgE93 F4	5'-GAAACAGAACCTCCTTTCAAAAAGG-3'	318 pb
	BgE93 R4	5'-AAAGTGTGAACCTGCCGATGAA-3'	
BgE93 (2)	BgE93 F5	5'-CACAGTGCCCTAGGACCTTATGTT-3'	345 pb
	BgE93 R5	5'-CTGTGGATCCACTGCTAGAAG-3'	
TcE93	TcE93 F	5'-AAATAACGGTGATACAGTGTCAAG-3'	345 pb
	TcE93 R	5'-TTGTAGTCCATCTCGGAGATGGAA-3'	
TcKr-h1	TcKr-h1 F1	5'-AATCCTCCTGCTCATCCAGCACTA-3'	445 pb
	TcKr-h1 R1	5'-CAGGATTCGAACTAGGAGGTGTTA-3'	
TcBr	TcBr F1	5'-CAATTACCAAAGCAGCATCACATC-3'	359 pb
	TcBr R1	5'-GGCTTTGTA CTGCGCCAACTGTT-3'	

3.12.2 Linearització del DNA plasmídic

Per a l'obtenció dels diferents *dsRNA* calia sintetitzar dues cadenes simples d'RNA (*ssRNA*) complementàries. Cadascuna d'aquestes cadenes es transcrivía a partir d'un fragment lineal de DNA que contenia el fragment diana flanquejat per un promotor RNA polimerasa (SP6 o

T7) i per un extrem 5' protuberant. Per això, un cop clonat el fragment diana en el vector pSTBlue-1 es digerien 20 µg d'aquesta construcció amb els enzims de restricció adequats per a cada *ssRNA*. La digestió es realitzava a 37 °C durant 3-4 hores. Un cop digerits, els fragments de DNA resultants es purificaven amb una mescla de fenol-cloroform-cohol isoamílic (25:24:1) i es precipitaven amb EtOH (Sambrook et al., 1989). El precipitat es resuspenia en 23.5 µl d'H₂O dpec.

3.12.3 Síntesi de les cadenes *ssRNA* i obtenció del *dsRNA*

Les reaccions de síntesi de les *ssRNA* es realitzaven de manera independent, segons el següent procediment:

1. Preparar cadascuna de les reaccions en un volum final de 50 µl:
 - 23.5 µl fragment lineal de DNA
 - 10 µl Transcription Promega Buffer 5x (Promega)
 - 4 µl DTT 100 mM (Promega)
 - 1 µl RNAsin Ribonuclease Inhibitor 40 u/µl (Promega)
 - 10 µl rNTPs 10 mM cadascun (Amersham)
 - 1.5 µl SP6 RNA polymerase (17 u/µl) o T7 RNA polymerase (18 u/µl) (Promega)
2. Incubar 4h a 37 °C
3. Verificar el correcte funcionament de cadascuna de les reaccions mitjançant electroforesi en gel d'agarosa
4. Ajuntar les dues reaccions d'*ssRNA*
5. Incubar 10 min a 95 °C en un bany
6. Deixar disminuir la temperatura del bany fins a temperatura ambient (6 hores aproximadament) per permetre la correcta hibridació de les cadenes
7. Purificar el *dsRNA* format mitjançant fenol-cloroform-cohol isoamílic (25:24:1)
8. Precipitar amb EtOH i resuspendre en 39.5 µl d'H₂O dpec
9. Eliminar el DNA plasmídic i l'*ssRNA* que no hagi quedat hibridat correctament mitjançant tractament amb DNAsa i RNAsa, afegint:
 - 5 µl Buffer DNAsa 10x (Promega)
 - 5 µl DNase/RNase free 1 u/µl (Promega)
 - 0.5 µl RNase A Solution 10 µg/µl (Sigma)
10. Incubar 15 min a 37 °C
11. Purificar de nou mitjançant fenol-cloroform-cohol isoamílic
12. Precipitar amb EtOH i resuspendre amb H₂O dpec
13. Mesurar la concentració del *dsRNA* mitjançant Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop)

3.13 INJECCIÓ DEL *dsRNA* A *Blattella germanica*

El *dsRNA* per *B. germanica* es diluïa en Ringer filtrat amb un filtre millex de 0,22 µm, fins obtenir la concentració desitjada per poder injectar un volum d'1 µl a femelles de cinquena o

sisena fase ninfal, prèviament anestesiades amb CO₂. El *dsRNA* s'injectava a la part ventral de l'insecte, entre els segments abdominals, utilitzant una xeringa Microlitter de 5 µl (Hamilton).

3.14 INJECCIÓ DEL *dsRNA* A *Tribolium castaneum*

El *dsRNA* per *T. castaneum* es diluïa en H₂O estèril fins a la concentració desitjada, afegint-hi tampó d'injecció 10x amb la següent composició:

10 mM tampó fosfat sòdic pH 7.6 (8.5 ml de 1 M Na₂HPO₄ + 1.5 ml de 1 M NaH₂PO₄)
50 mM KCl
10% (v/v) colorant alimentari

Les larves s'anestesiaven amb èter etílic durant 3-4 min i es col·locaven en un portaobjectes amb goma d'enganxar TACK-IT Over&Over (Aleene's), de tal manera que quedés accessible la part dorsal de l'animal. L'agulla amb la qual s'injectaven es fabricava a partir d'una pipeta Pasteur de vidre llarga. Aquesta se subjectava amb un micromanipulador Narishige M-152 sota una lupa binocular Leica M80. El *dsRNA* s'injectava a la part dorsal, al primer o segon segment abdominal de la larva, mitjançant la pressió aplicada amb una xeringa de plàstic. El volum injectat a cada larva no es podia calcular amb exactitud. Tot i això, el canvi de color a l'interior d'aquestes degut al colorant alimentari afegit al tampó d'injecció indicava la incorporació del *dsRNA* a l'hemolimfa.

Per la seva banda, les pupes es col·locaven sense anestesiar en un portaobjectes amb goma d'enganxar amb la part ventral accessible. La injecció es realitzava mitjançant el mateix procediment que en el cas de les larves però entre els últims segments ventrals de l'abdomen.

3.15 TRACTAMENTS AMB METOPRÈ *IN VIVO*

Per als tractaments amb anàlegs de l'HJ es va utilitzar el metoprè (isopropil (E,E)-(RS)-11-metoxi-3,7,11-trimetildodeca-2,4-dienoat), que es diluïa amb acetona fins a la concentració desitjada. Tot seguit s'aplicava 1 µl de la dilució a nimfes de *B. germanica* prèviament anestesiades amb CO₂. L'aplicació del tractament es feia amb una xeringa Microlitter de 5 µl (Hamilton), dipositant la gota a la part dorsal de l'abdomen per tal que penetrés a l'interior de l'animal i s'escampés a través de l'hemolimfa.

3.16 MESURA DELS NIVELLS D'HORMONA JUVENIL

La quantificació dels nivells d'HJ en l'hemolimfa de nimfes de *B. germanica* va ser duta a terme per la Unitat de Molècules Bioactives del Departament de Química Biomèdica, a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (iQAC, CSIC).

El protocol utilitzat per a aquesta mesura fou:

1. Extreure 70-80 µl d'hemolimfa i dipositar-los en 300 µl de metanol-isooctà 1:1 (v/v)
2. Vortejar 20 seg i deixar 20 min a temperatura ambient
3. Centrifugar a 10.000 x g durant 20 min a 6 °C
4. Transferir ambdues fases del sobrenedant a un nou vial de vidre mitjançant una pipeta Pasteur de vidre i guardar a -80 °C
5. Evaporar la fase d'isooctà utilitzant una centrífuga de buit
6. Centrifugar a 1000 x g durant 10 min i recollir el sobrenedant en un nou vial de vidre
7. Mesurar la quantitat d'HJ mitjançant cromatografia líquida – espectrometria de masses (LC-MS) segons el mètode desenvolupat per Westerlund i Hoffman (2004) i modificat per Oostra *et al.* (2010).

3.17 TINCIÓ AMB FALOIDINA-TRITC I DAPI

La fal·loïdina és una toxina produïda pel fong *Amanita phalloides* i actua unint-se a l'actina i impedit la seva despolimerització. Aquesta propietat ha estat aprofitada en biologia cel·lular per investigar la distribució dels filaments d'actina-F mitjançant la unió de la faloidina a molècules fluorescents, com el tetrametil rodamina iso-tiocianat (TRITC). Aquest colorant emet en vermell intens. Per la seva banda, el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrat) és un colorant fluorescent que s'uneix fortament al DNA. Emet en blau i és adequat per combinar-lo amb altres colorants fluorescents, com el TRITC.

El protocol utilitzat per a la tinció de mostres amb aquests dos components fou el següent:

1. Fixar el teixit incubant-lo durant 30 min en paraformaldehid 4%
2. Rentar dues vegades durant 10 min amb PBS 0.2 N, pH 6.8
3. Permeabilitzar el teixit incubant-lo durant 10 min en una solució de Tritó X-100 al 0.1 % en PBS 0.2N, pH 6.8 (PBST)
4. Rentar amb PBS 0.2 N, pH 6.8
5. Incubar durant 20 min amb fal·loïdina-TRITC diluïda amb PBS 0.2N, pH 6.8, a 300 ng/ml
6. Rentar dues vegades durant 5 min amb PBS 0.2 N, pH 6.8
7. Incubar durant 10 min amb una solució d'1 µg de DAPI (Sigma)/ml PBST
8. Eliminar l'excés de marcatge mitjançant dos rentats de 5 min amb PBS 0.2N
9. Muntar les diferents preparacions en medi de muntatge Mowiol 4-88 (Calbiochem)

En els casos en què només es feia la tinció DAPI s'ometien els passos 4, 5 i 6.

3.18 MARCATGE AMB BrdU

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

Procediment:

1. Injectar a la cavitat abdominal de l'insecte 1 µl de solució BrdU
2. Dissectar el teixit al cap de 24 h
3. Fixar amb Carnoy's Fixative 30 min
4. Rentar dos vegades amb PBS 0.2 M
5. Incubar amb 70 % metanol (MeOH) en Ringer 10 min
6. Inactivar les peroxidases incubant amb MeOH 30% H₂O₂ 45 min
7. Incubar amb 70% MeOH en Ringer 10 min
8. Rentar dues vegades amb PBS 0.2 M
9. Incubar amb PBST-BSA 1 h
10. Permeabilitzar el nucli amb HCl 0.2M 30 min
11. Rentar tres vegades amb PBS 0.2 M 10 min
12. Rentar dues vegades amb PBST-BSA 10 min
13. Bloquejar amb PBST-BSA-NSG 30 min
14. Incubar amb l'anticòs primari (anti-BrdU) en PBS-BSA-NSG 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4 °C (dilució 1:1000)
15. Rentar tres vegades amb PBST-BSA 10 min
16. Bloquejar amb PBST-BSA-NSG 30 min
17. Incubar amb l'anticòs secundari en PBS-BSA-NSG 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4 °C (dilució 1:100)
18. Rentar tres vegades amb PBS 20 min
19. Incubar amb la solució de revelat, en fosc, fins a observar el marcatge
20. Rentar tres vegades amb PBS per aturar la reacció
21. Muntar en medi de muntatge Mowiol 4-88 (Calbiochem)

Composició de les solucions:

Carnoy's fixative:

EtOH	60 %
Àcid acètic	20 %
H ₂ O	20 %

Tampó fosfat salí (PBS) 0.2M, pH 6.8:

NaCl	130 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
Ajustar el pH a 6.8	

Solució de revelat:

PBS 0.2 M	5 ml
Diaminobenzidina	100 µl
NiCl ₂ 8 %	80 µl
H ₂ O ₂ 30 %	2 µl

PBST:

PBS 0.2 M	1x
Tween	0.3 %

PBST-BSA:

PBST	1x
BSA	0.2 %

PBST-BSA-NGS:

PBST-BSA	1x
NGS	5 %

3.19 IMMUNOCITOQUÍMICA D'HISTONA H3 FOSFORILADA

Per detectar les cèl·lules en divisió en els oòcits de *B. germanica* es va dur a terme una detecció immunocitoquímica de la histona H3 fosforilada, utilitzant l'anticòs Phospho-Histone H3 (Ser10) Antibody (Cell Signaling Technology).

El protocol utilitzat per aquesta immunocitoquímica fou el següent:

1. Fixar els oòcits incubant-los 20 min amb paraformaldehid 4 %
2. Rentar dues vegades amb PBS 0.2 M
3. Permeabilitzar el teixit mitjançant 3 incubacions de 10 min amb PBS-Tritó 0.1 % (PBS-T)
4. Incubar 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4 °C amb l'anticòs Phospho-Histone H3 (Ser10) Antibody (1:100 en PBS-T 0.1 %)
5. Rentar tres vegades amb PBS-T 0.1 %
6. Incubar 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4 °C, en condicions d'obscuritat, amb un anticòs secundari anti-conill unit a un fluoròfor que emet en vermell (1:200 en PBS-T 0.1 %)
7. Rentar tres vegades amb PBS-T 0.1 %
8. Incubar durant 10 min amb una solució d'1 µg de DAPI (Sigma)/ml en PBS-T 0.1 %, en fosc
9. Rentar amb PBS-T 0.1 %
10. Muntar amb el medi de muntatge per fluorescència Vectashield Mounting Medium for Fluorescence H-1000 (Vector Laboratories)

3.20 TRANSFECCIONS CEL·LULARS

Les transfeccions cel·lulars que permetien estudiar la localització subcel·lular de BgSumo1 i BgSumo3 es van dur a terme en cèl·lules S2 de *D. melanogaster* mitjançant la tècnica de transfecció per precipitats de fosfat càlcic. Aquesta metodologia, descrita per Graham i van der Eb (1973), consisteix en la formació de precipitats de DNA amb fosfat càlcic, fet que permet la unió del DNA a la superfície de la cèl·lula i la seva posterior entrada per endocitosi.

El protocol utilitzat per a la transfecció fou la següent:

1. Plaquejar 3×10^6 cèl·lules en una placa de petri de 35 mm, en un volum de 5 ml
2. Deixar les cèl·lules 24 h creixent
3. Preparar la mescla de DNA en un volum final de 125 µl (per 2.5 rèpliques). Per cada placa es transfecten un total de 10 µg de DNA, dels quals 3 µg són de la construcció que permetrà l'expressió del gen d'interès. Els 7 µg restants corresponen a un plàsmid buit (pSTBlue-1 en aquest cas)
4. Afegir 1 ml de CaCl₂ 0.25 M a la barreja de DNA
5. En un tub Falcon amb 1 ml de medi HeBS 2x afegir la barreja de DNA + CaCl₂ gota a gota, amb agitació lleugera però constant per tal que es formin els precipitats
6. Deixar floccular els precipitats 35 min a 25 °C

7. Resuspendre els precipitats i incorporar-ne 850 µl a cada duplicat de placa
8. Deixar 48 h a 25 °C

HeBS 2x:

NaCl	16 g
KCl	0.7 g
Na ₂ HPO ₄	0.4 g
Glucosa	2 g
Hepes	10 g
Ajustar pH a 7.1	

Un cop transcorregudes 48 hores des de la transfecció es processaven les cèl·lules segons el següent protocol:

1. Rentar dues vegades amb PBS 0.2 M
2. Fixar 25 min amb paraformaldehid 4 %
3. Rentar 5 min amb PBS 0.2 M
4. Permeabilitzar 10 min amb PBS-Tritó 0.1 %
5. Incubar 10 min amb una solució d'1 µg de DAPI (Sigma)/ml en PBS-T 0.1 %
6. Rentar 5 min amb PBS 0.2 M
7. Muntar en Mowiol 4-88 (Calbiochem)

3.21 OBSERVACIONS MICROSCÒPIQUES EN CAMP CLAR I FLUORESCÈNCIA

Les diferents preparacions microscòpiques es van examinar utilitzant un microscopi Zeiss Imager Z1. Les imatges es van capturar mitjançant la càmera AxioCam MRc5 en les observacions en camp clar i la càmera AxioCam MRM per a les preparacions fluorescents, ambdues acoblades al microscopi. El software utilitzat en ambdós casos fou l'AxioVision Release 4.8. Les imatges es van processar utilitzant el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated).

3.22 MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG

Les mostres de *T. castaneum* utilitzades per a l'observació amb microscopi electrònic de rastreig (SEM) es van fixar amb etanol 80 %. Tot seguit es deshidrataven amb una sèrie de rentats amb concentracions creixents d'etanol (90 %, 95 % i 100 %), 15 min amb cada solució. Per acabar la deshidratació, les mostres s'assecaven utilitzant la tècnica del punt crític amb CO₂. Finalment es recobrien amb or-pal·ladi per a la seva observació en el microscopi electrònic de rastreig Hitachi S-3500N.

3.23 CONSTRUCCIÓ DE L'ÀRBRE FILOGENÈTIC

Per a l'elaboració de l'arbre filogenètic es van utilitzar les seqüències aminoacídiques de tots els Sumo d'insectes disponibles a la base de dades: *Camponotus floridanus* (EFN73536) i

(EFN69023); *Apis mellifera* (XP392826) i (XP623227); *Harpegnathos saltator* (EFN89741) i (EFN79624); *Acromyrmex echinator* (EGI67360) i (EGI63783); *Bombus terrestris* (XP003394722) i (XP003396975); *Nasonia vitripennis* (EFN73536) i (XP001599647); *Pediculus humanus* (XP002430190) i (EEB18751); *Acyrtosiphon pisum* (XP003244725), (XP001945430), (XP001945879), (XP003245740), (XP001119632), (XP003243705), (XP003242691) i (XP003244070); *Drosophila melanogaster* Smt3 (NP477411); *Glossina morsitans* (ADD19913); *Mayetiola destructor* (ABG81495); *Helicoverpa armigera* (ADF30256); *Antheraea yamamai* (BAD66842); *Bombyx mori* (NP001037410); *Danaus plexippus* (EHJ74563); *Anopheles gambiae* (XP316822) i (XP321390); *Aedes aegypti* (XP001650445) i (XP001663977); *Culex quinquefasciatus* (XP001861568); *Tribolium castaneum* (XP970781); *Dendroctonus ponderosae* (AEE62713). També es van utilitzar les seqüències SUMO dels vertebrats *Homo sapiens* i *Mus musculus*: *H. sapiens* SUMO1A (NP003343), SUMO1B (NP001005782), SUMO2A (P61956), SUMO2B (NP001005849), SUMO3 (NP008867), SUMO4 (Q6EEV6); *M. musculus* SUMO1 (NP0033486), SUMO2 (NP579932), SUMO3 (Q9Z172). Totes aquestes seqüències es van alinear utilitzant el programa ClustalX (Thompson et al., 1997). Tot seguit s'eliminaren les regions d'alineament ambigu, donant com a resultat un alineament final de 99 posicions que es va analitzar mitjançant el programa PHYML basat en el principi de màxima verosimilitud (Guindon and Gascuel, 2003). Es van realitzar 100 iteracions "bootstrap".

3.24 ANÀLISI DE SUMOILACIÓ *IN VITRO*

Els motius de sumoilació potencials en BgEcR-A, BgRXR-L, BgE75A, BgHR3-A, BgHR3-B₂ i BgFtz-F1 es van identificar mitjançant el software SUMOplot (Abgent, <http://www.abgent.com/tools>), la base de dades de modificacions posttraduccionals Phosida (<http://www.phosida.com>) i el programa SUMOsp 2.0.

Els assaigs de sumoilació *in vitro* van ser duts a terme pel laboratori de la Dra. Rosa Barrio, en la Unitat de Genòmica Funcional del CIC bioGUNE (Bizkaia). En primer lloc, es tradueixen els cDNA d'interès en condicions *in vitro* mitjançant TNT-T7 (Promega), afegint-hi metionina marcada radioactivament (³⁵S-Metionina, Amersham Biosciences). Les proteïnes resultants s'incubaven amb el SUMO1 humà, Ubc9 i l'enzim activador E1 (Biomol), a 30 °C durant dues hores. Tot seguit s'analitzava la unió mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

4. RESULTATS

CAPÍTOL 4.1

ESTUDI DE LA SUMOILACIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT POSTEMBRIONARI DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL *Blattella germanica*

En els insectes el procés de sumoilació s'ha estudiat, de manera gairebé exclusiva, en l'holometàbol *D. melanogaster*. El present capítol se centra en l'estudi de la funció d'aquest procés durant el desenvolupament de l'insecte hemimetàbol *B. germanica*, que té dos gens *Sumo*. Donat que *D. melanogaster* en té un de sol, aquest estudi ha de permetre comparar com han variat les funcions de la sumoilació durant l'evolució de la classe Insecta, així com la distribució d'aquestes funcions entre els diferents *Sumo* de *B. germanica*. D'altra banda, el fet que encara no s'hagi aconseguit clarificar del tot si els diferents paràlegs *SUMO* de vertebrats poden tenir funcions exclusives, redundants i/o antagòniques, fa que *B. germanica* sigui un bon model per a aprofundir en aquesta incògnita.

Per tot això es va dur a terme, en primer lloc, una aproximació filogenètica per tal de saber en quin moment de l'evolució de la classe Insecta s'havia passat de dos gens *Sumo* a un de sol. També es va caracteritzar la funció de les dues proteïnes *Sumo* de *B. germanica* durant el desenvolupament nimfal i la transició a l'estadi adult, parant especial atenció en els paral·lelismes que s'observaven amb les funcions descrites en la mosca *D. melanogaster*. Per últim, i per tal d'aprofundir en el sentit evolutiu de la pèrdua d'un gen *Sumo* en insectes evolucionats, es va estudiar el comportament dels *Sumo* de *B. germanica* en *D. melanogaster*, gràcies a l'ampli ventall de tècniques de manipulació genètica que es poden dur a terme en aquest model experimental.

4.1.1 ESTUDI DE LES SEQÜÈNCIES *Sumo* DE *Blattella germanica*

4.1.1.1 Anàlisi de dues seqüències *Sumo* de *Blattella germanica*

Les seqüències que codifiquen per les dues proteïnes *Sumo* de *B. germanica* es van obtenir a partir d'una llibreria de DNA complementari (cDNA) sintetitzat a partir d'RNA missatger (mRNA) provinent de cèl·lules embrionàries de *B. germanica* (UM-BGE-1). A través de la seqüenciació de multitud de clons d'aquesta llibreria i el posterior anàlisi de similitud amb les seqüències disponibles a la base de dades es va veure que dues de les seqüències obtingudes, de 668 pb i 456 pb, presentaven un alt grau de similitud a diferents seqüències *Sumo1* i *Sumo3*, respectivament. Per aquest motiu se les va anomenar *BgSumo1* i *BgSumo3*. Tal i com s'observa a la figura 4.1.1 les dues seqüències cobreixen tota la regió codificant de la proteïna, formada per 97 aminoàcids en el cas de *BgSumo1* i 95 aminoàcids en el cas de *BgSumo3*. En totes dues seqüències s'hi observen dues glicines, prop de l'extrem carboxi terminal, a 3' de les quals es produirà la proteòlisi essencial per la maduració de la proteïna que permetrà la posterior unió d'aquests *Sumo* a la proteïna diana.

L'alineament de les seqüències proteiques de *BgSumo1* i *BgSumo3* amb les seqüències *Sumo* de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *D. melanogaster* i *Homo sapiens* reflexa l'alt grau de conservació entre els diferents *SUMO* (figura 4.1.2). Així, *BgSumo1* comparteix el 71% dels seus aminoàcids amb *Smo-1* de *C. elegans*, i el 63% amb el *SUMO1A* d'*H. sapiens*. Per altra banda, *BgSumo3* té el 82% dels seus aminoàcids idèntics als de *Smt3* de *D. melanogaster*, i comparteix el 64% i el 60% d'aminoàcids amb el *SUMO2A* i el *SUMO3* d'*H. Sapiens*, respectivament (taula 4.1.1). En aquest alineament també es pot observar l'estructura

A BgSumo1

```

TAGTGGCGCGTGTGGATAAAatgtccgataatcaggaacagaagcccgatgccggtcca 60
      M S D N Q E Q K P D A G P 13

ggggacgcaaattctgaatatatcaaactcaaagtagttggaaatgattcaaatgaaatt 120
G D A N S E Y I K L K V V G N D S N E I 33

cacttccgagtaaagatgaccactcaaatgggaaagctgaagaaatcatacagcgagcgt 180
H F R V K M T T Q M G K L K K S Y S E R 53

gttggcgtcccgggtgacatcgcttaggtttttatgttgatgggacggataaatgatgat 240
V G V P V T S L R F L F D G R R I N D D 73

gagacacctaaacagctggagatggagaacgacgatgtgattgaggtgtaccaagaacaa 300
E T P K Q L E M E N D D V I E V Y Q E Q 93

acgggtggccttttgaATGATGTTGCGTGAAAAAGTGAAAACGTGATCAGTTTTTTAAATTT 360
T G G F * 97
CACCGAGTCAAACATCAGAAAGACTAAATTTAGGAACTGTGAACTGCCCCATCTTAATA 420
CCAATGCTGTAAAGAATATTCACATTCCTCATTAACTATGTACAACAATTTTTTTTTTCT 480
TACATTTTGGATTGAAATATGGCACATTGCAAATCACATATTTTCTTTTGAGTTTTGT 540
TTCTTGTAGCTTGAACATATAGCAAATCCTTGTCTATCTAAAGCAAATTTGTCAAAGCTTT 600
CAACTTTATCTTCAGAAAATTGCTTATCGAGATTTAGTTTTATAAAATCACATGTTCTGC 660
CCAAGAAA 668

```

B BgSumo3

```

AAGAATAAGGTTTCAGCCAGCTTTTCTTGATAGGAACTGATTTCTGAAAGGCGCGGGACTA 60
TTATTGAGAAATTTAAAACGCAAAAatgtctgatgataaaaagggctcagagacagaacac 120
      M S D D K K G S E T E H 12

atcaacctcaaggtacttggacaagacaatgccatcgcttcagttcaagataaaaaaacat 180
I N L K V L G Q D N A I V Q F K I K K H 32

acacctctgaggaaattgatgaatgcatattgtgatagagtgggtatcgcaatggcaaca 240
T P L R K L M N A Y C D R V G I A M A T 52

atgagatttcgatttgatgggtcaaccaatcaatgaaacggatacaccgataagtttgag 300
M R F R F D G Q P I N E T D T P I S L E 72

atggaggaaggagatacaattgaagtgtaccaacaacaactgggggttagaggaccatat 360
M E E G D T I E V Y Q Q Q T G G R G P Y 92

ataacatgctgaAACAAAAGACTGCATTTCTAACGGTCTATGAACTAAAACGCGTCAAAC 420
I T C * 95
CAAGAGAATGAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 456

```

Figura 4.I.1. Seqüències nucleotídica i aminoàcida de BgSumo1 i BgSumo3 de Blattella germanica. (A) Fragment de 668 pb de la seqüència de BgSumo1. (B) Fragment de 456 pb de la seqüència de BgSumo3. En la línia superior es mostra la seqüència de nucleòtids i a sota la seqüència proteica corresponent a la seva traducció. Els nucleòtids que formen part de la regió codificant es mostren en lletra minúscula, mentre que els que pertanyen a les regions 5' i 3' UTR es troben en majúscula. Les dues glicines que indiquen el punt de tall de la proteïna immadura s'emmarquen dins un requadre.

secundària descrita per la proteïna SUMO1 humana, formada per cinc làmines- β i dues hèlix- α (Bayer et al., 1998), així com els aminoàcids d'aquesta proteïna que han estat descrits com a responsables de la interacció no covalent amb l'enzim conjugador UBC9 (Knipscheer et al., 2007).

Taula 4.I.1. Percentatges d'identitat de les proteïnes BgSumo1 i BgSumo3 amb les proteïnes SUMO de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* i *Homo sapiens*. Les seqüències es van alinear amb el programa Clustal X, i els percentatges d'identitat es van obtenir amb el programa GeneDoc. Les identitats amb un percentatge igual o major de 60% estan ressaltades en vermell.

	BgSumo1	BgSumo3
<i>S. cerevisiae</i> Smt3	44	39
<i>C. elegans</i> Smo-1	71	46
<i>D. melanogaster</i> Smt3	43	82
<i>H. sapiens</i> SUMO1A	63	46
<i>H. sapiens</i> SUMO2A	44	64
<i>H. sapiens</i> SUMO3	42	60

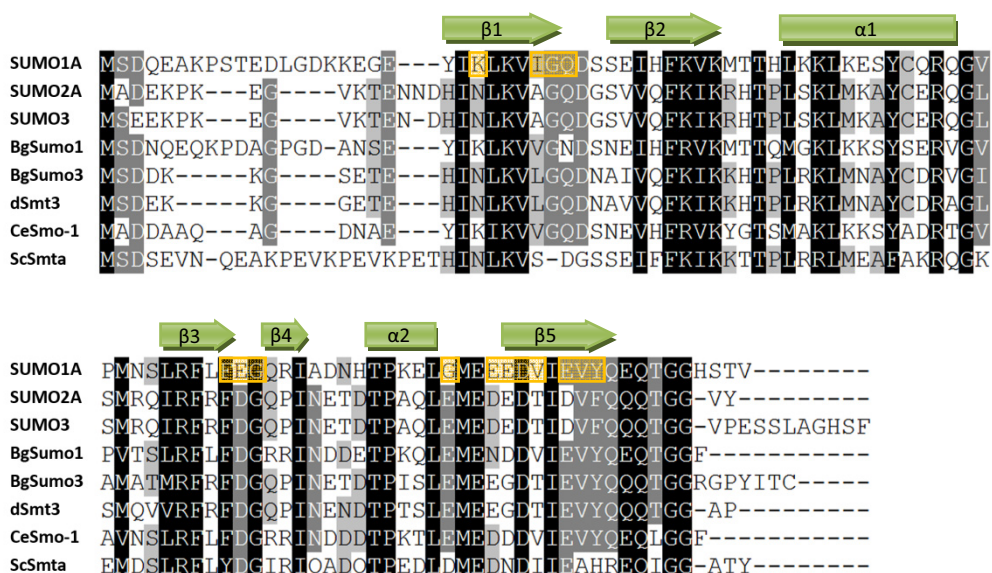


Figura 4.I.2. Estructura secundària de les proteïnes SUMO. Alineament de les seqüències proteiques *BgSumo1*, *BgSumo3*, *dSmt3*, *CeSmo-1*, *ScSmt3* i les d'humans *SUMO1A*, *SUMO2A* i *SUMO3*. S'indica la situació de les dues hèlix- α (α 1 i α 2) i les cinc làmines- β (β 1- β 5) del SUMO1A humà (Bayer et al., 1998). Dins un requadre groc es marquen els aminoàcids que intervenen en la interacció no covalent de SUMO1A amb UBC9 (Knipscheer et al., 2007).

4.1.1.2 Anàlisi filogenètic de les seqüències *Sumo* d'insectes

Per esbrinar com van evolucionar les seqüències del gen *Sumo* en la classe Insecta es va dur a terme un anàlisi filogenètic utilitzant totes les seqüències *Sumo* d'insectes disponibles en la base de dades. Es van incloure també les seqüències humanes i les de ratolí, ja que aquestes espècies tenen tant SUMO1 com SUMO3, a més de SUMO2 i, en el cas dels humans, també SUMO4 (Citro and Chiocca, 2013). L'arbre filogenètic resultant mostrava dos grups de seqüències ben diferenciats, corresponents a *Sumo1* i *Sumo3*, amb un valor de "bootstrap" de 100 % (per un total de 100 iteracions), fet que indicava que s'hauria produït una duplicació gènica en algun moment anterior a la separació d'insectes i vertebrats. En conseqüència, l'arrel de l'arbre es va col·locar de tal manera que separés aquests dos grups de seqüències. Així, en la branca superior s'hi agrupaven les seqüències de la família SUMO1 de vertebrats (en color groc) juntament amb seqüències de tots els himenòpters (verd) i hemimetàbols (blau) presents en l'estudi, inclosa la seqüència *Sumo1* de *B. germanica*. D'altra banda, en la branca inferior s'hi agrupaven les seqüències de la família SUMO2/3 de vertebrats, a més de totes les de dípters i lepidòpters (en vermell) i també coleòpters (lila). També s'hi agrupaven seqüències de totes les espècies d'himenòpters i hemimetàbols presents a l'estudi, entre elles *BgSumo3*. Aquest arbre filogenètic mostrava, doncs, que mentre les espècies pertanyents als ordres de dípters, lepidòpters i coleòpters contenen un sol gen *Sumo* en el seu genoma, pertanyent a la família de *Sumo3*, les espècies d'himenòpters i d'insectes hemimetàbols de les quals es disposa del genoma tenen dos gens *Sumo*, un de la família *Sumo1* i l'altre de la família *Sumo3*. Aquest distribució de les seqüències en l'arbre filogenètic suggereix la possibilitat que en algun moment de l'evolució posterior a la divergència de l'ordre dels himenòpters, però abans de la divergència dels dípters, lepidòpters i coleòpters, es podria haver donat la pèrdua del gen *Sumo1* (segons la relació filogenètica acceptada actualment, veure Introducció figura 1.1 (Trautwein et al., 2012)). L'arbre mostrava, però, alguna incongruència en la seva topologia interna, com el fet que en la branca de la família *Sumo3* els himenòpters se separessin abans de la resta d'insectes que els hemimetàbols. Aquestes irregularitats són degudes, possiblement, al fet que la longitud de l'alineament (99 posicions) és molt curta per permetre una major resolució.

4.1.2 CARACTERITZACIÓ DELS SUMO DE *Blattella germanica*

4.1.2.1 Patrons d'expressió dels mRNA de *BgSumo1* i *BgSumo3* durant el desenvolupament ninfal

Per tal de caracteritzar els dos gens *Sumo* de *B. germanica* es va començar estudiant la seva expressió en diversos teixits mitjançant RT-PCR. En primer lloc es van dissenyar oligonucleòtids específics per amplificar cadascun dels dos paràlegs. Els teixits utilitzats per dur a terme aquest anàlisi van ser el cos gras unit a l'epidermis (CG/Ep), la glàndula protoràcica (GP), el cervell, els *Corpora allata* (CA), el tub digestiu i l'ovari de nimfes de darrera fase ninfal (N6), període en el que es produeixen els canvis metamòrfics en aquest insecte. Com es pot observar a la figura 4.1.4 (apartat A), tant *BgSumo1* com *BgSumo3* s'expressaven en tots els teixits estudiats.

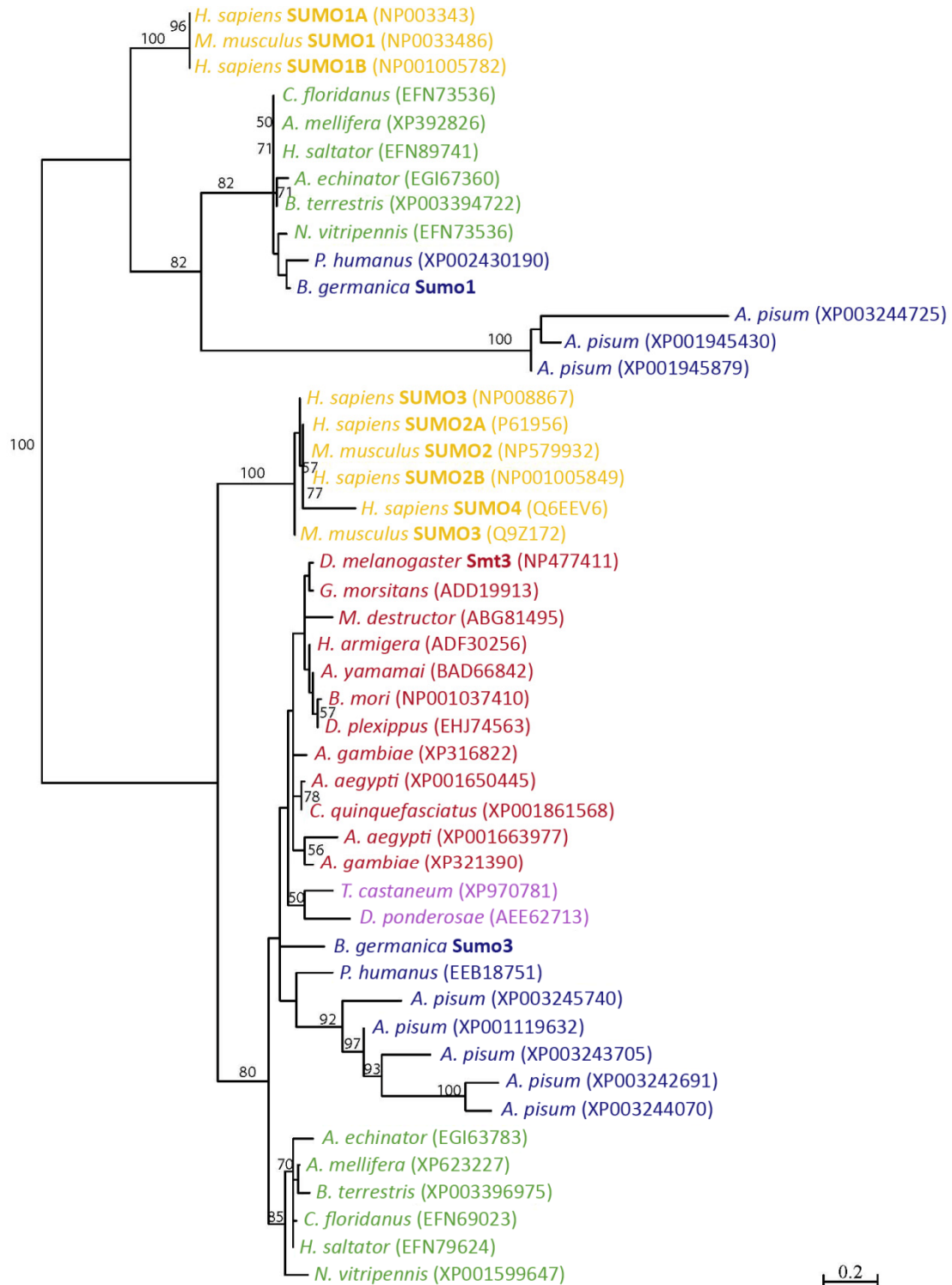


Figura 4.I.3. Representació filogenètica dels diferents SUMO d'insectes. L'arbre filogenètic es va elaborar utilitzant el mètode de màxima versemblança, utilitzant la seqüència proteica dels SUMO de totes les espècies d'insectes presents a les bases de dades, a més de les seqüències dels vertebrats *Homo sapiens* i *Mus musculus*. Es van eliminar les regions d'alineament ambigu, donant com a resultat un alineament final de 99 posicions. La longitud de les branques és proporcional a la divergència de les seqüències i la barra representa 0.2 substitucions per posició. Només es mostren els valors de "bootstrap" $\geq 50\%$, per un total de 100 repeticions. Els diferents grups estan representats per colors: els vertebrats en groc; dípters i lepidòpters en vermell; coleòpters en lila; himenòpters en verd; i els insectes hemimetàbols en blau. En parèntesi es mostra el número d'accés de cadascuna de les seqüències en la base de dades de GenBank.

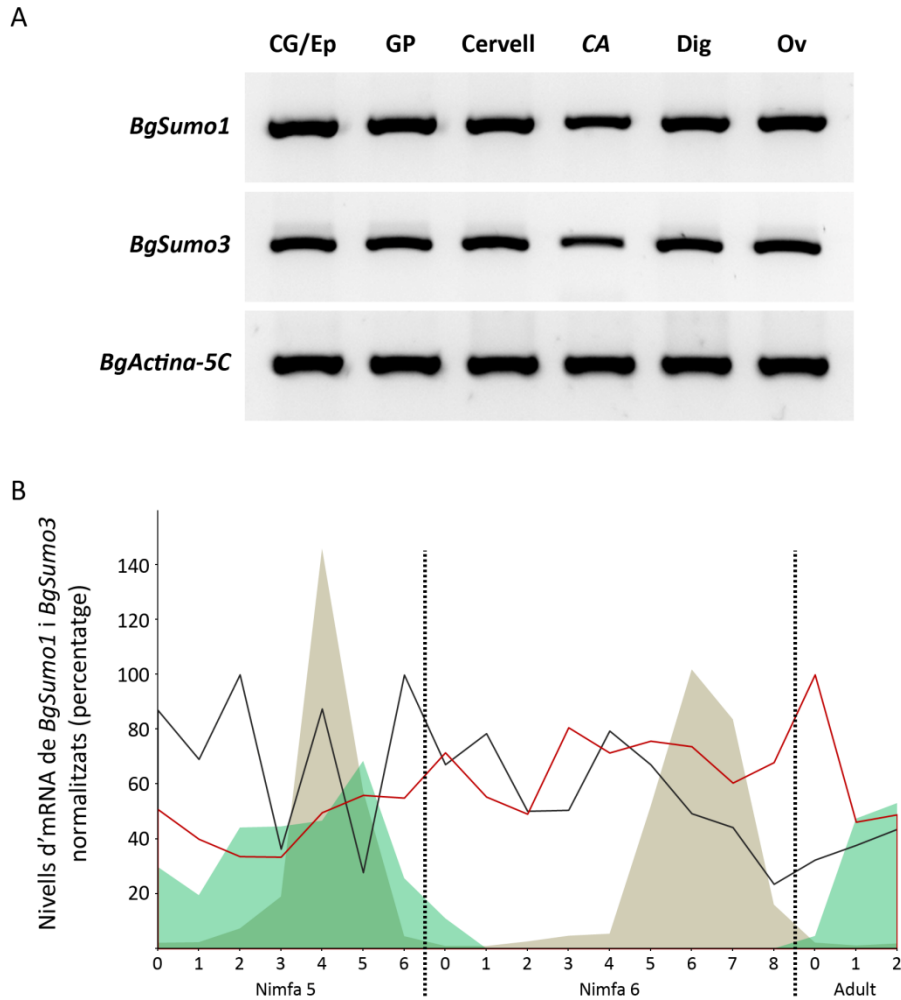


Figura 4.1.4. Nivells d'expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3* durant el desenvolupament nimfal de *Blattella germanica*. (A) Expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3* analitzada mitjançant RT-PCR en diferents teixits de *B. germanica*. Totes les mostres es van recollir quatre dies després de la muda al darrer estadi nimfal. Els teixits analitzats van ser: cos gras amb epidermis (CG/Ep), glàndula protoràcica (GP), cervell, *corpora allata* (CA), tub digestiu (Dig) i ovaris (Ov). Com a referència es va utilitzar l'expressió de *BgActina-5C*. Els resultats són representatius de quatre rèpliques. (B) Anàlisi de l'expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3* en glàndula protoràcica durant les dues darreres fases nimfals i els primers dies de l'estadi adult. Els nivells es van mesurar mitjançant qRT-PCR, utilitzant mRNA obtingut a partir de la mateixa quantitat de teixit (3 glàndules protoràciques per punt) d'individus de les edats assenyalades. L'expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3* es va normalitzar amb els nivells de *BgActina-5C*. Els resultats es mostren com a percentatge d'expressió respecte al valor d'expressió més elevat (segon dia de nimfa 5 en el cas de *BgSumo1* i adult de dia 0 en el cas de *BgSumo3*). La línia contínua negra correspon als nivells d'expressió de *BgSumo1* i la línia contínua vermella als de *BgSumo3*. L'àrea gris indica les variacions en els nivells de 20E (Cruz et al., 2003), mentre que l'àrea verda indica els nivells d'HJ (Treiblmayr et al., 2006). Els resultats són representatius de tres rèpliques.

A continuació es va analitzar l'expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3* durant la penúltima i l'última fase nimfal, i els primers dies de l'estadi adult. El teixit escollit per aquest anàlisi va ser la glàndula protoràcica, que és l'encarregada de la síntesi dels ecdisteroides durant el desenvolupament nimfal (Hoffmann et al., 1975; Warren et al., 1988). En aquest sentit cal recordar que en *D. melanogaster* la presència de dSmt3 en aquesta glàndula és essencial al final

de l'estadi larvari perquè s'iniciï la metamorfosi (Talamillo et al., 2008a). Tal i com es veu en la figura 4.1.4 (apartat B), tant *BgSumo1* com *BgSumo3* s'expressen durant les dues darreres fases ninfals en la glàndula protoràcica, amb un patró que no suggereix una regulació transcripcional per cap de les dues hormones que controlen el desenvolupament dels insectes, la 20E i l'HJ.

4.1.2.2 Localització subcel·lular de *BgSumo1* i *BgSumo3*

Tot seguit es va procedir a estudiar la localització cel·lular de les dues proteïnes Sumo de *B. germanica*. Amb aquesta finalitat es van amplificar les seqüències codificants de *BgSumo1* i *BgSumo3* i es van clonar en pauta de lectura amb la seqüència de la proteïna fluorescent RFP (de l'anglès "*Red Fluorescent Protein*") sota el control del promotor del gen *armadillo* (pArm), ideal per a la sobreexpressió en cèl·lules d'insecte (Klug et al., 2002) (figura 4.1.5 A). Tot seguit es van transfectar cèl·lules S2 de *D. melanogaster* amb aquestes construccions, per tal que expressessin les proteïnes de fusió corresponents. Tal i com es pot veure en la figura 4.1.5, tant *BgSumo1* com *BgSumo3* es localitzaven sobretot en el nucli, tot i que també estaven presents en el citoplasma, però en menor quantitat. En el cas de *BgSumo3*, la quantitat de proteïna nuclear respecte de la citoplasmàtica era major que en el cas de *BgSumo1*.

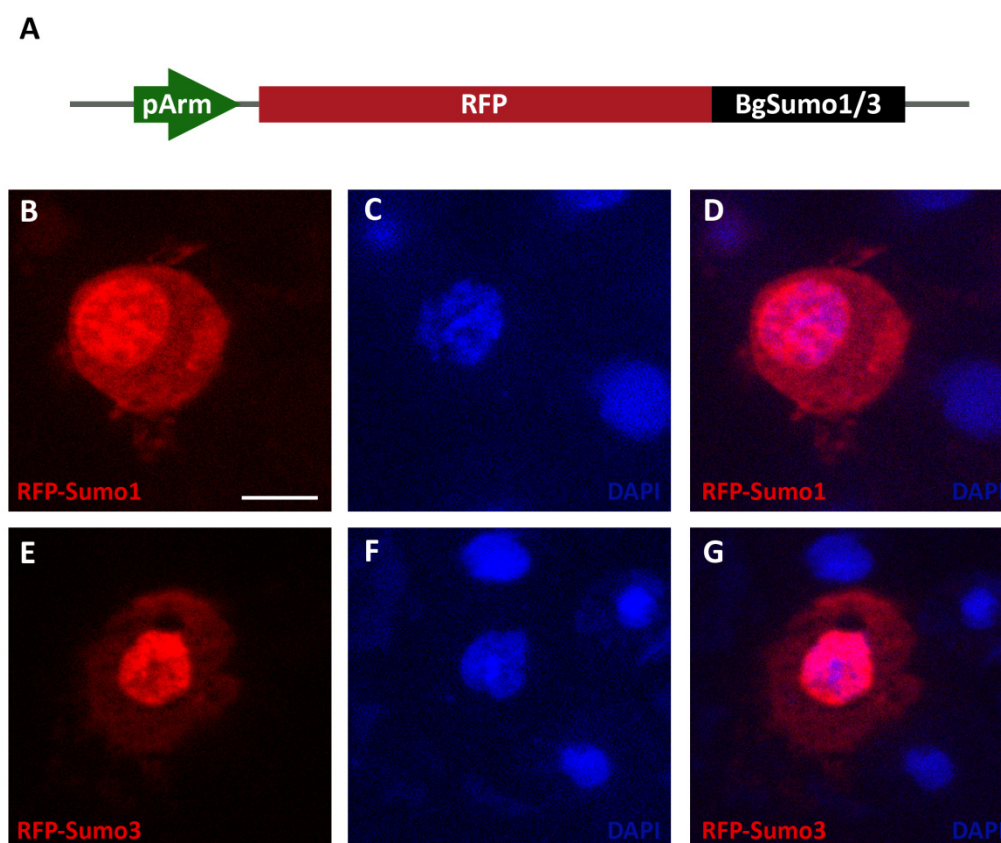


Figura 4.1.5. Localització subcel·lular de *BgSumo1* i *BgSumo3*. (A) Estructura de la construcció que permet expressar les proteïnes de fusió formades per una proteïna fluorescent vermella (RFP) i *BgSumo1* o *BgSumo3*, sota el control del promotor del gen *armadillo* (pArm). (B, E) Localització de *BgSumo1* (B) i *BgSumo3* (E) fusionades a la proteïna fluorescent RFP. (C, F) Marcatge DAPI dels nuclis cel·lulars. (D, G) Superposició de la localització de *BgSumo1* (D) i *BgSumo3* (G) amb el marcatge del nucli per DAPI.

4.1.3 ANÀLISI FUNCIONAL DE LA SUMOILACIÓ DURANT EL DESENVOLUPAMENT NIMFAL DE *Blattella germanica*

4.1.3.1 Efecte del silenciament simultani de *BgSumo1* i *BgSumo3* durant el desenvolupament nimfal

Seguidament es va procedir a l'estudi funcional de la sumoilació durant el desenvolupament nimfal, mitjançant la tècnica de l'RNA d'interferència (RNAi) *in vivo*. Aquesta tècnica fa anys que es va posar apunt en *B. germanica* (Martín et al., 2006) i s'ha mostrat molt eficaç per a l'estudi funcional de diverses proteïnes, la majoria d'elles factors de transcripció de la família dels receptors nuclears involucrats en la metamorfosi d'aquesta panerola (Cruz et al., 2006; Cruz et al., 2007; Mané-Padrós et al., 2008; Mané-Padrós et al., 2012). Per silenciar *BgSumo1* i *BgSumo3* es van utilitzar fragments d'RNA de doble cadena (*dsRNA*) de 429 pb i 338 pb, respectivament, corresponents a una part de la seqüència d'mRNA d'aquests dos gens (figura 4.1.6 A). Com a control negatiu (animals Control) es va utilitzar una seqüència de 307 pb del gen de la polihedrina del nucleopolihedrovirus *Autographa californica* (*dsMock*). En primer

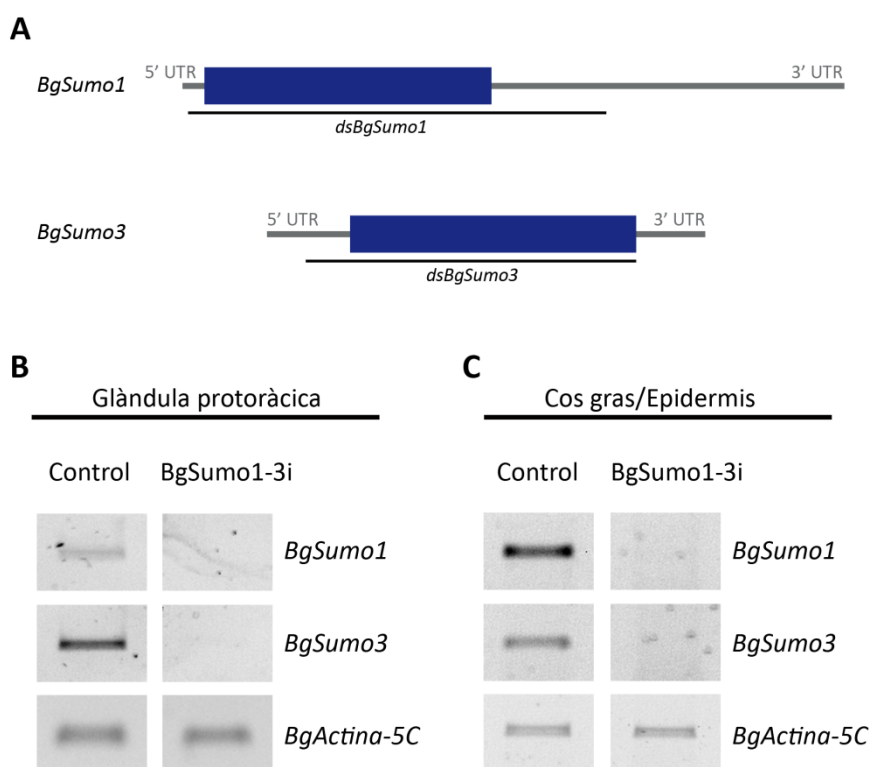


Figura 4.1.6. Silenciament de *BgSumo1* i *BgSumo3*. (A) Estructura esquemàtica de la seqüència de *BgSumo1* i *BgSumo3*, on s'hi representen les zones utilitzades per a la interferència: *dsBgSumo1* i *dsBgSumo3*. La barra blava indica la regió codificant de l'mRNA, mentre que les línies grises indiquen les regions no codificants (5'UTR i 3'UTR). (B, C) Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 4 µg de *dsMock* (animals Control) o 2 µg de *dsBgSumo1* i 2 µg de *dsBgSumo3* (animals *BgSumo1-3i*), i es van mesurar els nivells d'expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3*, mitjançant RT-PCR, en glàndula protoràcica (B) i cos gras amb epidermis (C). Tots els mRNA utilitzats es van obtenir a partir de la mateixa quantitat de teixit. L'expressió de *BgActina-5C* es va utilitzar com a referència. Els resultats són representatius de cinc rèpliques.

lloc es van silenciar tots dos gens simultàniament injectant 2 µg de cadascun dels *dsRNA* en l'abdomen de femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal (animals BgSumo1-3i). Dos dies després de la muda d'aquestes femelles al darrer estadi nimfal se'ls va extreure el cos gras (amb epidermis) i la glàndula protoràcica, i es van mesurar els nivells d'mRNA de *BgSumo1* i *BgSumo3* per tal de comprovar l'eficàcia de la interferència. Els resultats obtinguts mostraven que els nivells dels dos trànscrips eren clarament inferiors en els individus BgSumo1-3i (figura 4.1.6, B i C). D'altra banda, els nivells de *BgActina-5C*, utilitzats com a referència, no es veien afectats.

A continuació es van analitzar els efectes fenotípics d'aquest silenciament. Així, es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 2 µg de *dsBgSumo1* i 2 µg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo1-3i), o amb 4 µg de *dsMock* (animals Control), i es va comprovar que en ambdós casos les femelles mudaven al darrer estadi nimfal sense que s'apreciés cap efecte fenotípic. No obstant, el 100 % (n=18) de les femelles BgSumo1-3i morien entre el tercer i el setè dia d'aquesta N6. Per contra, tots els individus Control (n=20) mudaven a adult vuit dies després sense cap problema. Aquest fet demostrava que la sumoilació és un procés essencial durant el desenvolupament nimfal de *B. germanica*.

Per tal de veure l'efecte del silenciament simultani de *BgSumo1* i *BgSumo3* sobre la muda imaginal es van injectar 2 µg de *dsBgSumo1* i 2 µg de *dsBgSumo3*, o 4 µg de *dsMock*, en femelles recent emergides al darrer estadi nimfal. D'aquesta manera es va observar que el 81% dels individus BgSumo1-3i mudaven a l'estadi adult (figura 4.1.7 i taula 4.1.2), tot i que ho feien amb diverses anomalies, tal i com es descriu més endavant. A més, de la mateixa manera que quan s'aplicava el tractament a N5, aquests animals acabaven morint entre un i quatre dies després de completar l'ècdisi imaginal. D'altra banda, el 6% dels individus tractats no aconseguien completar el procés de muda, tot i començar els moviments previs a l'ècdisi, i morien al cap de 1-2 dies. Finalment, el 13% dels individus interferits ni tan sols iniciaven la muda i morien entre nou i dotze dies després d'haver entrat a la darrera fase nimfal.

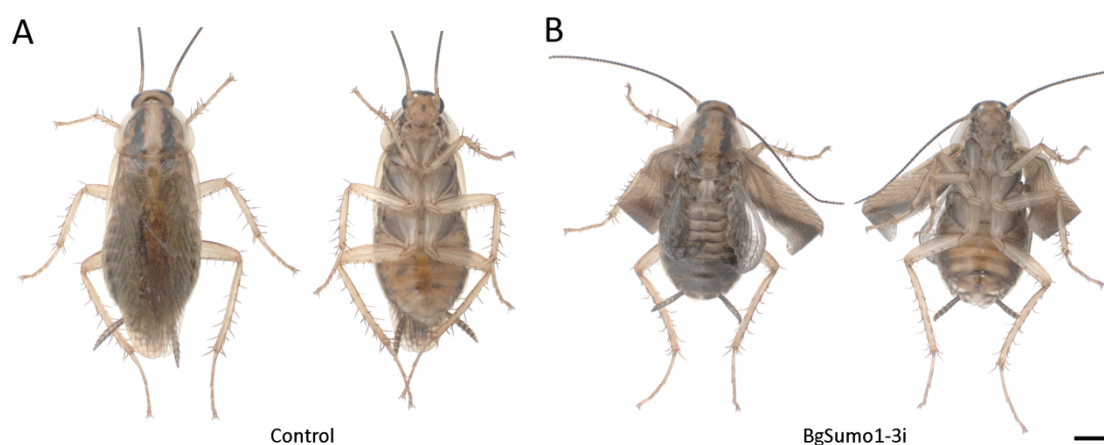


Figura 4.1.7. Efecte del silenciament simultani de *BgSumo1* i *BgSumo3* sobre la muda imaginal de *Blattella germanica*. Es van tractar femelles recent emergides a l'últim estadi nimfal amb 4 µg de *dsMock* (animals Control) o 2 µg de *dsBgSumo1* i 2 µg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo1-3i) i es va analitzar el fenotip resultant. (A) Visió dorsal (esquerra) i ventral (dreta) d'una femella Control, mostrant l'aspecte normal d'un adult. (B) Visió dorsal i ventral d'una femella BgSumo1-3i mudada a adult amb evidents defectes de muda. Escala: 2 mm.

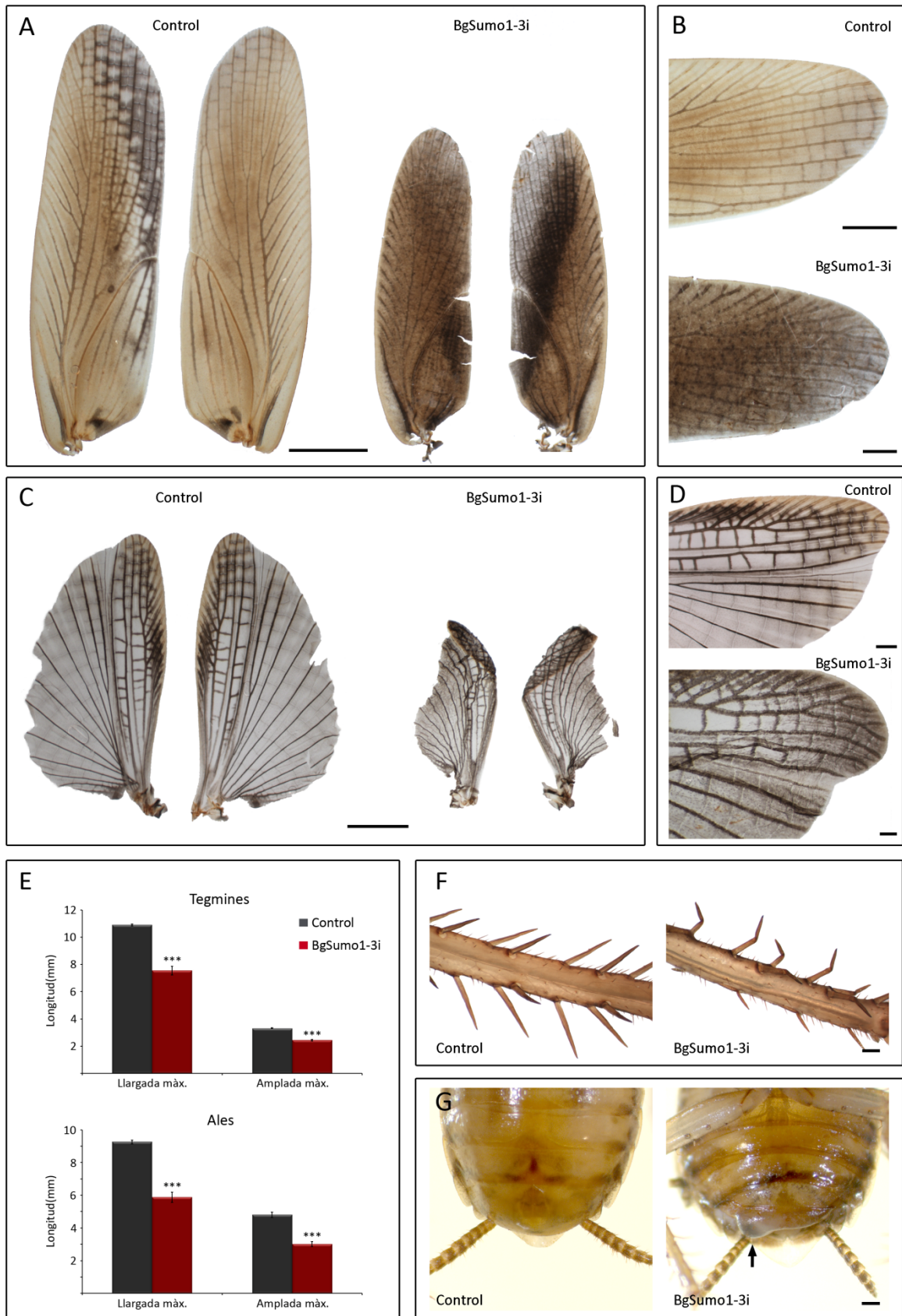
Taula 4.1.2 Efecte de la doble interferència de *BgSumo1* i *BgSumo3* en la muda imaginal de *Blattella germanica*.

Tractament	n	Muda completa	Arrestats	No muda
Control	25	100%	-	-
BgSumo1-3i	32	81%	6%	13%

A continuació es va dur a terme un anàlisi fenotípic detallat dels individus BgSumo1-3i que aconseguen mudar a l'estadi adult, ja que mostraven diverses alteracions morfològiques. En primer lloc, en tots ells s'observava un desplegament incorrecte de les tegmines i les ales, que a més eren remarcablement petites. Així, les tegmines dels animals BgSumo1-3i presentaven un 31% de reducció de la llargada i un 26% de reducció de l'amplada respecte a les d'individus Control. Per la seva banda, les ales eren un 36% més curtes i un 37% més estretes (figura 4.1.8 E). Aquests animals també presentaven les quetes de les potes torçades i febles, en contraposició a les dels Control, que eren rectes i turgents (figura 4.1.8 F). Per últim, presentaven un creixement anormal en el teixit del darrer segment abdominal que provocava que la cutícula d'aquest segment es doblegués cap enfora (figura 4.1.8 G).

D'altra banda, tenint en compte que s'ha descrit la funció de la sumoilació en la proliferació cel·lular de *D. melanogaster* (Nie et al., 2009) es va decidir estudiar si aquesta funció es donava també en *B. germanica*, utilitzant com a model de teixit proliferatiu l'epiteli fol·licular que envolta l'oòcit basal. Les cèl·lules d'aquest teixit es divideixen activament durant la darrera fase nimfal, passant de 500 en l'inici de la fase a unes 3500-4000 just després de la muda imaginal de la panerola (Mané-Padrós et al., 2008). Per això es van utilitzar novament individus Control i BgSumo1-3i tractats des de l'inici del darrer estadi nimfal, se'ls van extreure els oòcits basals just després de la muda imaginal i es van tenyir aquest oòcits amb DAPI per tal de quantificar el nombre de cèl·lules fol·liculars. Tal i com s'observa en la figura 4.1.9, els oòcits dels animals BgSumo1-3i presentaven un reducció significativa del número de cèl·lules fol·liculars (4071 ± 216 en Controls i 1275 ± 110 en BgSumo1-3i; $p \leq 0.0005$, t-test). A més, en correlació amb aquesta reducció, els oòcits eren significativament més petits ($p \leq 0.005$, t-test) (figura 4.1.9 C, D). Així doncs, aquests resultats demostraven que la sumoilació controla la proliferació de l'epiteli fol·licular de l'oòcit basal de *B. germanica*.

Figura 4.1.8. Alteracions fenotípiques provocades pel silenciament de *BgSumo1* i *BgSumo3* a *Blattella germanica*. Es van injectar femelles recent emergides a l'últim estadi nimfal amb $4 \mu\text{g}$ de *dsMock* (animals Control) o $2 \mu\text{g}$ de *dsBgSumo1* i $2 \mu\text{g}$ de *dsBgSumo3* (animals BgSumo1-3i), i es van analitzar els individus un dia després de la muda imaginal. (A) Tegmines d'individus Control i BgSumo1-3i. (B) Detall de les tegmines, on no s'observa formació de venes ectòpiques. (C) Ales d'individus Control (esquerra) i BgSumo1-3i (dreta). (D) Detall de les ales, on s'observa una lleugera afectació en la delimitació de la zona vena-intervena en els individus BgSumo1-3i. (E) Mesures de la llargada i l'amplada de tegmines i ales en individus Control i BgSumo1-3i. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives ($p \leq 0.0005$, t-test). (F) Detall de les quetes de les potes en individus Control i BgSumo1-3i. (G) Detall de la part final de l'abdomen, on s'observa un creixement anormal en la zona genital dels animals BgSumo1-3i (fletxa negra). Escales: 2 mm en A i C; 1 mm en B superior; 0.5 mm en B inferior i D superior; 0.2 mm en D inferior i E.



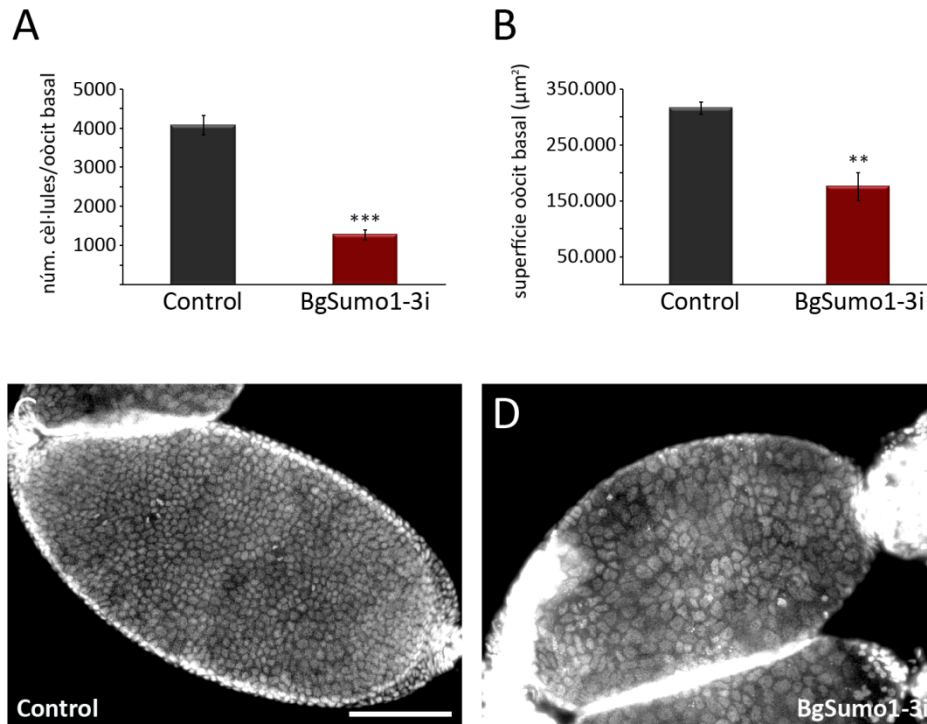


Figura 4.1.9. Efecte del silenciament simultani de *BgSumo1* i *BgSumo3* en la proliferació de l'epiteli fol·licular de l'òcít basal de *Blattella germanica*. Es van injectar femelles recent emergides a l'últim estadi nimfal amb 4 μg de *dsMock* (animals Control) o 2 μg de *dsBgSumo1* i 2 μg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo1-3i) i se'ls van extreure els òcits just després de la muda imagnal. (A) Número de cèl·lules fol·liculars de l'òcít basal en individus Control i BgSumo1-3i. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.0005$ (t-test). (B) Superfície mitjana, en μm^2 , dels òcits basals d'individus Control i BgSumo1-3i. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.005$ (t-test). (C, D) Tinció DAPI d'un òcít Control (C) i d'un òcít BgSumo1-3i (D) de femelles adultes acabades de mudar. Escala: 5 μm per C i D.

4.1.3.2 Estudi funcional de l'enzim conjugador Ubc9

Per tal de comprovar que els fenotips observats en els individus BgSumo1-3i eren deguts a una afectació en el procés de sumoïlació es va decidir caracteritzar el gen *Ubc9* de *B. germanica*. *Ubc9*, lesswright en *D. melanogaster* (Talamillo et al., 2008b), és l'enzim encarregat de catalitzar el segon pas del procés de sumoïlació, que consisteix en la conjugació de SUMO a la proteïna diana, i el fet de ser l'únic capaç de dur a terme aquesta funció fa que sigui essencial per la sumoïlació (Desterro et al., 1997; Johnson and Blobel, 1997; Lee et al., 1998; Saitoh et al., 1998). Abans d'iniciar l'estudi funcional de BgUbc9, però, va ser necessari el clonatge de la seva seqüència específica en *B. germanica*, ja que no es disposa del genoma d'aquesta panerola. A partir d'un alineament entre les diverses seqüències *Ubc9* d'insectes disponibles es van dissenyar encebadors degenerats en zones conservades en totes elles. D'aquesta manera es va obtenir un fragment de 398 pb que mostrava una elevada similitud amb les seqüències reportades, i que es va anomenar *BgUbc9*. Tot seguit, mitjançant tècniques de 5'- i 3'-RACE (veure Material i mètodes, apartat 3.4) es va aconseguir augmentar aquest fragment fins a 654

A

```

ACACGCTTTGTGATTATTTCAATGAACAAACGGCAACTGAAGAAATAATTTAACTTTTTT 60
TGGTGGGAAATCCTACGTCAAAGGAGGGTGTGTAAAatgtctgggatagcaattgcaaga 120
      M S G I A I A R 8
ttggcagaagaaaggaagcttggaggaaagaccatcccttcggattttagcagctcca 180
L A E E R K A W R K D H P F G F V A R P 28
gtaagaatgctgatggaagtttgaatctgatgagttgggagtggtgcaattcctggcaaa 240
V K N A D G S L N L M S W E C A I P G K 48
aatctactccatgggaaggaggccagtacaagctgcgcatgatttttaagatgattac 300
K S T P W E G G Q Y K L R M I F K D D Y 68
ccatcaagtcctccaaagtgtaaatttgaaccacctctgttccatccgaatgtgtatcca 360
P S S P P K C K F E P P L F H P N V Y P 88
tcaggtacagtatgtttgtccttgttggatgaagagaaggactggcgccagctataacc 420
S G T V C L S L L D E E K D W R P A I T 108
attaagcagattcttctggggataacaagacctcctcaacgaaccgaatattaaggatccc 480
I K Q I L L G I Q D L L N E P N I K D P 128
gctcaagctgaagcttataactatttattgccaaaaccgtctggagatgaaaagagagtt 540
A Q A E A Y T I Y C Q N R L E Y E K R V 148
cgagctcaagcgcggtgccatggctcctcaagagtaaATTAAATTGGTGCCGTATCTTCTT 600
R A Q A R A M A P Q E * 159
GTCGTGGAAGTGAGACTGAAACAATTAAGTAAATGAACAATCAGATGGTGTCA 654
    
```

B



Figura 4.I.10. Seqüències nucleotídica i aminoacídica de l'enzim conjugador Ubc9 de *Blattella germanica*. (A) Fragment de 654 pb corresponent a la seqüència Ubc9 de *B. germanica*. La línia superior mostra la seqüència de nucleòtids i a sota d'aquesta els aminoàcids corresponents. Els nucleòtids que corresponen a la regió codificant es mostren en minúscula, mentre que els que pertanyen a les regions 5' i 3' UTR es troben en majúscula. (B) Alineament de les seqüències proteiques d'Ubc9 de diferents espècies d'insecte. Aa: *Aedes aegypti*; Ag: *Anopheles gambiae*; Am: *Apis mellifera*; Ap: *Acyrtosiphon pisum*; Bg: *Blattella germanica*; Bm: *Bombyx mori*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Nv: *Nasonia vitripennis*; Tc: *Tribolium castaneum*. En verd es mostren les estructures secundàries (Bernier-Villamor et al., 2002).

parells de bases, que contenen la totalitat de la seqüència codificant de *BgUbc9*, formada per 159 aminoàcids (figura 4.I.10).

Un cop obtinguda la seqüència es va procedir a la caracterització de *BgUbc9*. En primer lloc es va estudiar la seva expressió en la glàndula protoràcica durant les dues darreres fases ninfals i l'inici de l'estadi adult. Tal i com succeïa amb *BgSumo1* i *BgSumo3*, *BgUbc9* s'expressava contínuament durant la darrera part del desenvolupament ninfal en aquest teixit (figura 4.I.11).

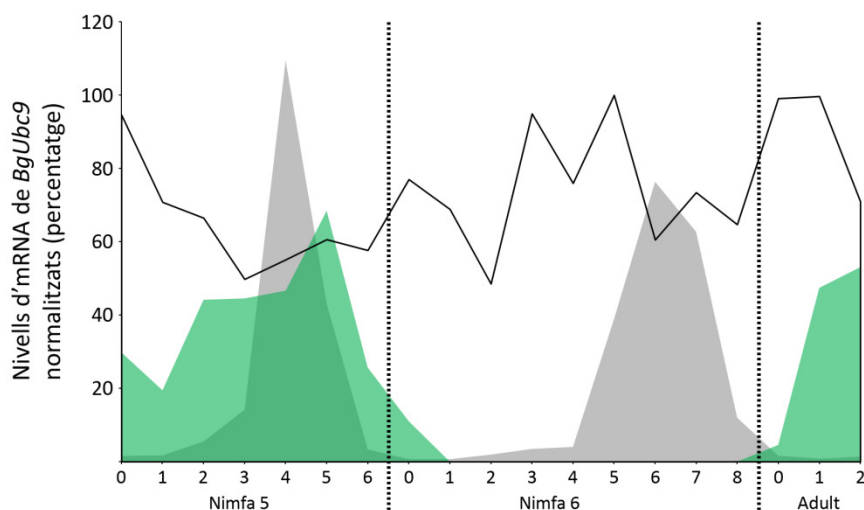


Figura 4.I.11. Nivells d'expressió de *BgUbc9* en glàndula protoràcica de *Blattella germanica*. Anàlisi de l'expressió de *BgUbc9* en glàndula protoràcica, durant les dues darreres fases del desenvolupament ninfal i els primers dies de l'adult de *B. germanica*. Els nivells es van mesurar mitjançant qRT-PCR, utilitzant mRNA obtingut a partir de la mateixa quantitat de teixit (3 glàndules protoràciques per punt) d'individus de les edats assenyalades. L'expressió de *BgUbc9* es va normalitzar amb els nivells de *BgActina-5C*. Els resultats es mostren com a percentatge respecte al valor d'expressió més elevat (cinquè dia de N6). La línia contínua negra correspon als nivells d'expressió de *BgUbc9*. L'àrea gris indica les variacions en els nivells de 20E (Cruz et al., 2003), mentre que l'àrea verda indica els nivells d'HJ (Treiblmayr et al., 2006). La gràfica és representativa de tres rèpliques.

Tot seguit es va procedir a l'estudi funcional de *BgUbc9* mitjançant RNAi *in vivo*. Per això, es van injectar 4 µg de *dsBgUbc9* (animals *BgUbc9i*), corresponent a un fragment de 303 pb de la seqüència de *BgUbc9* (figura 4.I.12 A), a l'abdomen de femelles acabades d'eclosionar al darrer estadi ninfal, i sis dies després se'ls va extreure la glàndula protoràcica per comprovar l'eficàcia de la interferència. Tal i com es pot veure a la figura 4.I.12 B, els nivells d'mRNA de *BgUbc9* eren clarament inferiors en els individus *BgUbc9i*. Per altra banda, els nivells de *BgActina-5C*, utilitzats com a referència, demostraven que la interferència no afectava globalment a tots els transcrits. A continuació es van analitzar els efectes fenotípics d'aquest silenciament en la muda imaginal. En primer lloc, es va observar que tant els individus *BgUbc9i* (n=25) com els Control (n=10) aconseguen completar la muda a l'estadi adult (figura 4.I.13). Malgrat això, els animals *BgUbc9i* morien entre 1 i 13 dies després de la muda imaginal, repetint-se l'efecte letal que s'observava en els individus *BgSumo1-3i*, i presentaven les mateixes afectacions fenotípiques que aquests:

no desplegaven correctament les tegmines i les ales, que a més eren remarcablement petites, i presentaven problemes en les quetes de les potes, que estaven torçades (figures 4.I.13 i 4.I.14).

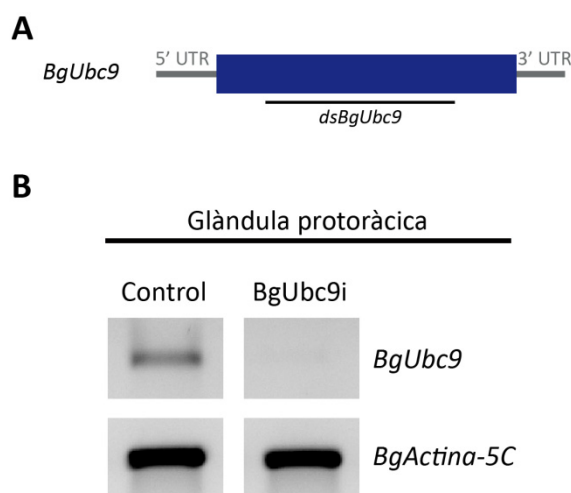


Figura 4.I.12. Silenciament de *BgUbc9*. (A) Esquema de la seqüència de *BgUbc9*. El requadre blau correspon a la seqüència codificant i les línies grises marquen les regions 5' UTR i 3' UTR. La línia negra indica la zona utilitzada per al silenciament. (B) Es van tractar femelles recent emergides a l'últim estadi nimfal amb 4 µg de *dsMock* (animals Control) o 4 µg de *dsBgUbc9* (animals BgUbc9i) i se'ls va extreure la glàndula protoràcica sis dies després del tractament. Els nivells de *BgUbc9* es van mesurar mitjançant RT-PCR. L'expressió de *BgActina-5C* es va utilitzar com a referència. Els nivells mostrats són representatius de cinc rèpliques.

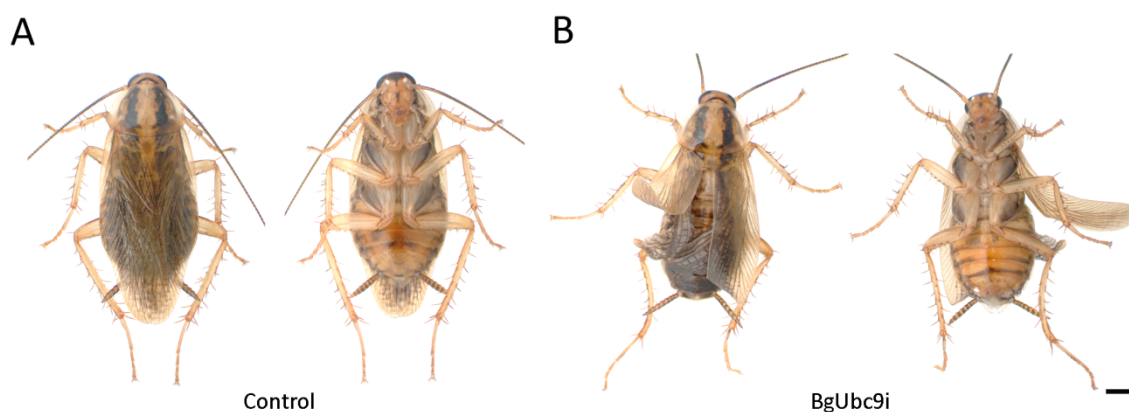


Figura 4.I.13. Efecte del silenciament de *BgUbc9* sobre la muda imagnal de *Blattella germanica*. Es van tractar femelles recent emergides a l'últim estadi nimfal amb 4 µg de *dsMock* (animals Control) o 4 µg de *dsBgUbc9* (animals BgUbc9i), i es va analitzar el fenotip resultant. (A) Visió dorsal (esquerra) i ventral (dreta) d'una femella tractada amb Control recent mudada a l'estadi adult. (B) Visió dorsal i ventral d'una femella tractada amb *dsBgUbc9* (BgUbc9i), mudada a adult però amb alguns defectes de muda. Escala: 2 mm.

Finalment es va analitzar com el tractament amb *dsBgUbc9* afectava la proliferació de l'epiteli fol·licular. Igual que en el cas anterior, es van agafar oòcits basals d'individus Control i d'individus BgUbc9i, just després de mudar a l'estadi adult, i es van tenyir amb DAPI per tal de visualitzar els nuclis de les cèl·lules fol·liculars. El recompte d'aquests nuclis mostrava que els animals Control tenien una mitjana de 4178 ± 201 cèl·lules fol·liculars per oòcit, mentre que els BgUbc9i només tenien 1061 ± 90 cèl·lules fol·liculars per oòcit basal, nombre remarcablement inferior (figura 4.I.15 A, $p \leq 0.00001$, t-test). A més, la superfície d'aquests oòcits també era

significativament menor (figura 4.I.15 B, $p \leq 0.005$, t-test). Així doncs, l'absència de BgUbc9 afectava la proliferació cel·lular de l'epiteli fol·licular de l'òcit basal.

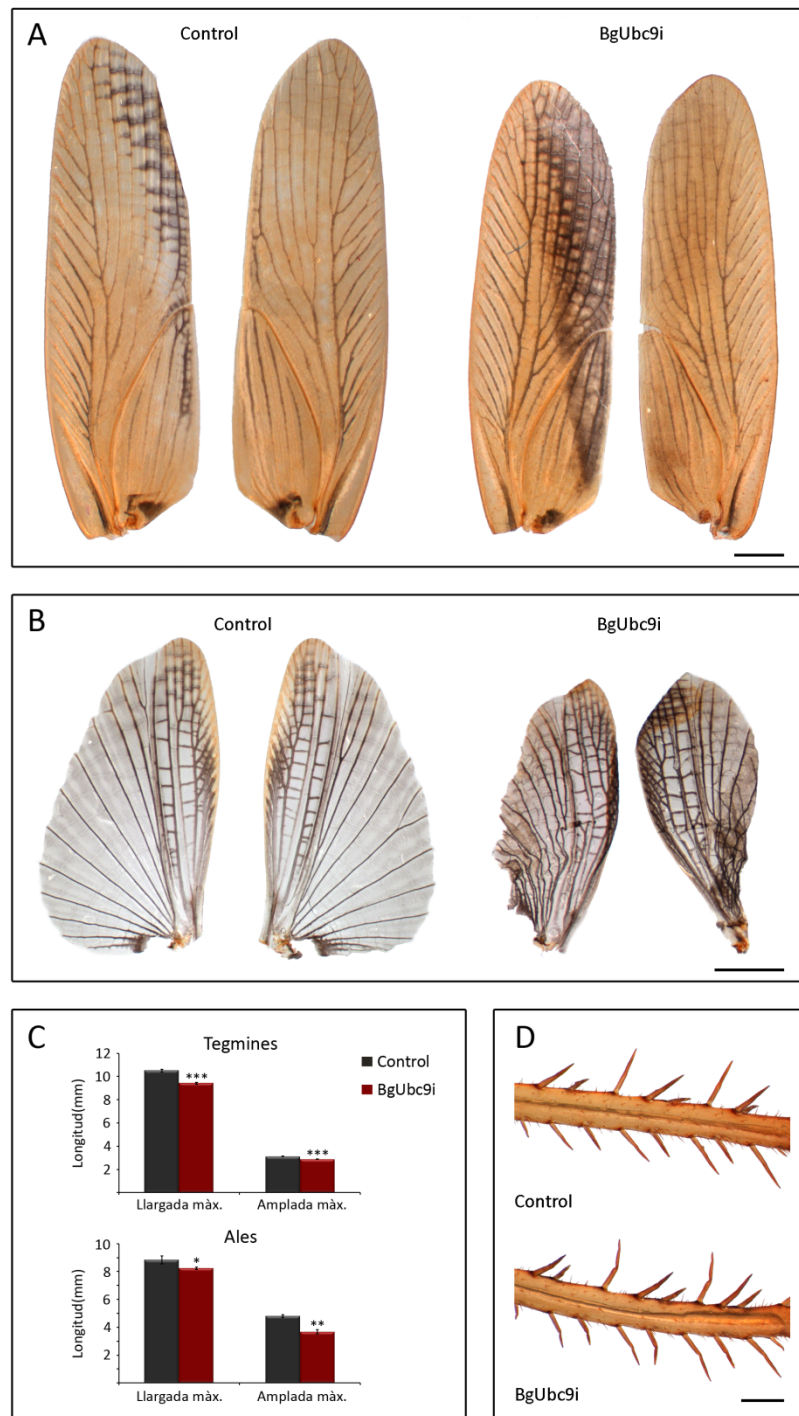


Figura 4.I.14. Defectes en la muda provocats pel silenciament de *BgUbc9*. Es van tractar femelles recent emergides a l'últim estadi nimfal amb 4 μ g de *dsMock* (animals Control) o 4 μ g de *dsBgUbc9* (animals BgUbc9i), i es van analitzar els individus un dia després de la muda imaginal. (A) Tegmines d'animals Control i BgUbc9i. (B) Ales d'adults Control i BgUbc9i. (C) Longitud i amplada de les tegmines i les ales d'individus Control i BgUbc9i. Les barres d'error representen l'ESM (n=6). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.001$ (**); $p \leq 0.0005$ (***) (t-test). (D) Detall de les quetes de les potes d'animals Control i BgUbc9i. Escales: 1 mm en A; 2 mm en B; i 0.5 mm en D.

En conjunt, els resultats obtinguts en l'estudi funcional de BgUbc9 mostraven una gran coincidència amb els fenotips obtinguts després del silenciament simultani de *BgSumo1* i *BgSumo3*, confirmant que el procés de sumoïlació és vital per al correcte desenvolupament nimfal de *B. germanica*.

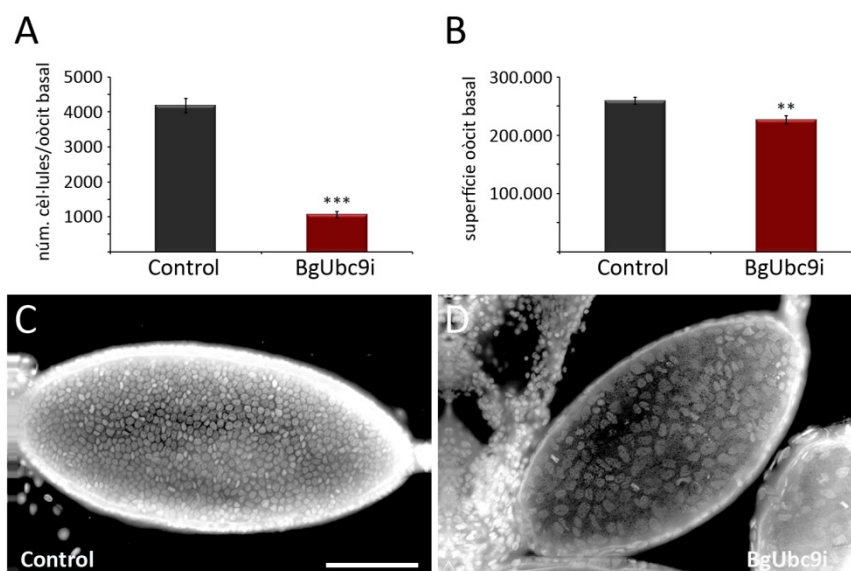


Figura 4.1.15. Efecte del silenciament de *BgUbc9* en la proliferació de l'epiteli fol·licular de l'òcit basal de *Blattella germanica*. Es van tractar femelles recent emergides a l'últim estadi nimfal amb 4 µg de *dsMock* (animals Control) o 4 µg de *dsBgUbc9* (animals BgUbc9i), i se'ls van extreure els ovaris just després de la muda imagnal. (A) Número de cèl·lules fol·liculars de l'òcit basal en individus Control i BgUbc9i. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.00001$ (t-test). (B) Superfície mitjana, en μm^2 , dels òcits basals d'individus Control i BgUbc9i. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.005$ (t-test). (C, D) Tinció DAPI d'un òcit Control (C) i d'un òcit BgUbc9i (D) de femelles adultes acabades de mudar. Escala: 5 µm per C i D.

4.1.3.3 Estudi funcional de cadascun dels paràlegs *BgSumo1* i *BgSumo3* durant el desenvolupament nimfal

Un cop caracteritzada la funció global de la sumoïlació durant el desenvolupament nimfal de *B. germanica* es va procedir a l'estudi de la funció específica de cadascuna de les proteïnes Sumo de *B. germanica*, BgSumo1 i BgSumo3. En primer lloc, per tal de va comprovar l'eficàcia i l'especificitat dels *dsRNA* utilitzats (figura 4.1.6 A), es van injectar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 4 µg de *dsBgSumo1* (animals BgSumo1i) o 4 µg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo3i). S'injectaren també femelles Control amb 4 µg de *dsMock*. Entre cinc i sis dies després del tractament, tant els individus Control com els BgSumo1i i els BgSumo3i van mudar al darrer estadi nimfal amb un aspecte aparentment normal. En aquest punt es van reinjectar amb 4 µg de *dsRNA* més per tal de potenciar l'efecte de la interferència. Sis dies després se'ls va extreure la glàndula protoràctica i es van mesurar els nivells de *BgSumo1* i *BgSumo3*. Tal i com s'observa a la figura 4.1.16, els individus BgSumo1i presentaven una expressió de *BgSumo1* molt més baixa que els Control, mentre que l'expressió de *BgSumo3* era normal. Alhora, en els individus BgSumo3i s'observava una clara reducció del transcrit

corresponent a *BgSumo3*, mentre que *BgSumo1* presentava una expressió similar a la dels individus Control. Aquests resultats indicaven un silenciament eficaç i específic de l'expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3*, alhora que demostraven que no existeix cap relació de regulació transcripcional entre *BgSumo1* i *BgSumo3*.

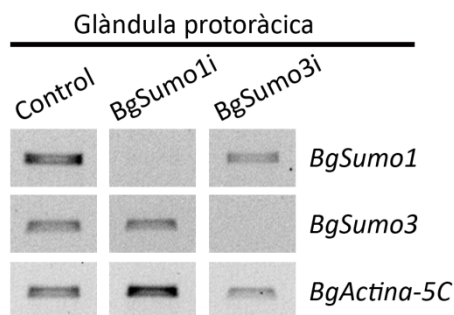


Figura 4.1.16. Eficàcia i especificitat del tractament amb *dsBgSumo1* o *dsBgSumo3*. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 4 µg de *dsMock* (animals Control), 4 µg de *dsBgSumo1* (animals BgSumo1i) o 4 µg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo3i). Un cop mudades al darrer estadi nimfal, es va reinjectar amb 4 µg del *dsRNA* corresponent, per tal d'incrementar l'efecte de la interferència. Sis dies després d'aquesta muda se'ls va extreure la glàndula protoràcica i es va mesurar l'expressió, mitjançant RT-PCR, de *BgSumo1* i *BgSumo3*. L'expressió de *BgActina-5C* es va utilitzar com a referència. Els nivells són representatius de cinc individus de cada tractament.

A continuació es va estudiar el comportament d'aquests individus durant la muda imaginal, observant que tant els individus Control com els BgSumo3i mudaven a adult sense cap problema aparent, després de vuit dies en el darrer estadi nimfal (mitjana de 8.1 ± 0.1 dies pels Control i 7.8 ± 0.14 dies pels BgSumo3i). Els animals BgSumo1i, en canvi, mudaven significativament més tard (10.46 ± 0.46 dies de mitjana; $p < 0.0005$, test d'hipòtesis Log-Rank) i presentaven diverses alteracions fenotípiques, tal i com es detalla més endavant. A més, algunes de les nimfes BgSumo1i no iniciaven mai el procés de muda imaginal (19.1 %), i una minoria (6.4%) iniciaven els moviments previs a l'ècdisi però no aconseguien mudar (taula 4.1.3 i figura 4.1.17).

Taula 4.1.3. Efecte de la interferència de cadascun dels paràlegs Sumo de *Blattella germanica*, *BgSumo1* i *BgSumo3*, en la transició a l'estadi adult.

	n	Muda completa	Arrestats	No muda
Control	30	100 %	-	-
BgSumo1i	47	74.5 %	6.4 %	19.1 %
BgSumo3i	20	100 %	-	-

4.1.3.3.1 Anàlisi del retard en la muda a causa de l'absència de *BgSumo1*

El fet que el tractament amb *dsBgSumo1* provoqués un retard en la muda imaginal en un 75 % dels casos suggeria que el pic de 20E que es dona al final del darrer estadi nimfal, i que s'encarrega de senyalitzar la transició a l'estadi adult, podia estar alterat. En el grup del Dr. David Martín durant els darrers anys s'han caracteritzat la majoria dels receptors nuclears que

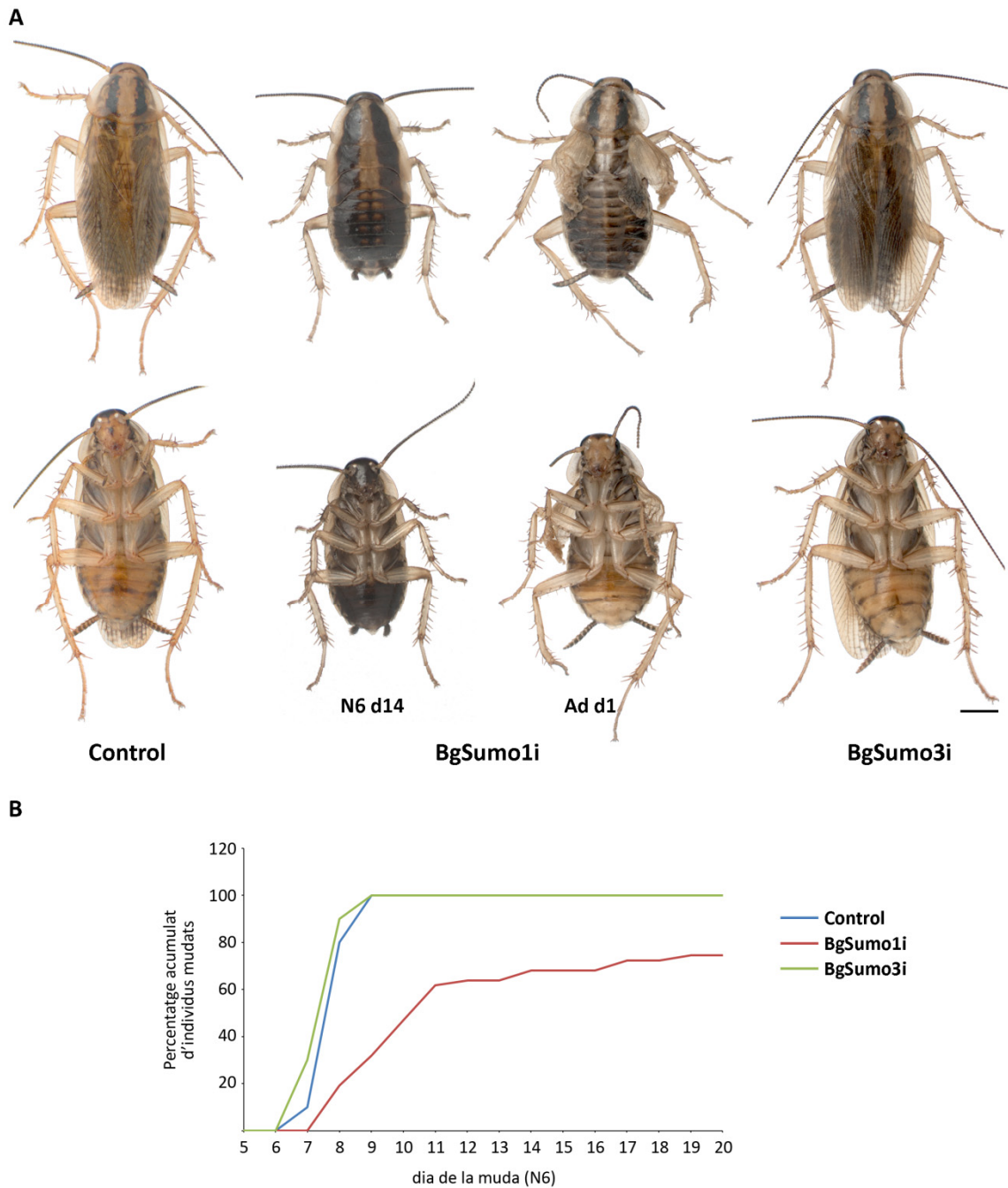


Figura 4.1.17. Efecte del silenciament de *BgSumo1* i *BgSumo3* en la transició a l'estadi adult de *Blattella germanica*. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 4 μg de *dsMock* (animals Control), 4 μg de *dsBgSumo1* (animals BgSumo1i) o 4 μg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo3i). Un cop mudades al darrer estadi nimfal, es van reinjectar amb 4 μg del *dsRNA* corresponent. Posteriorment es va analitzar l'afectació provocada per tractament en la muda imaginal. (A) Visió dorsal i ventral de femelles Control, BgSumo1i i BgSumo3i un dia després de la muda a l'estadi adult. En el cas dels animals BgSumo1i es mostra també un dels individus que al cap 14 dies d'haver entrat a la darrera fase nimfal no havien mudat a l'estadi adult (N6d14). (B) Representació gràfica del moment de la muda a l'estadi adult en individus Control, BgSumo1i i BgSumo3i. La mitjana de dies que resten en el darrer estadi nimfal són: 8.1 ± 0.1 dies els Control; 10.46 ± 0.46 dies els BgSumo1i; i 7.8 ± 0.14 dies els BgSumo3i. Escala: 2 mm.

conformen la cascada de resposta a la 20E en *B. germanica*. Aquests, que són els encarregats de transduir el senyal hormonal per tal d'aconseguir l'efecte biològic final, s'expressen de manera seqüencial en resposta a les variacions dels nivells de 20E (Cruz et al., 2006; Cruz et al., 2007; Cruz et al., 2008; Maestro et al., 2005; Mané-Padrós et al., 2008; Mané-Padrós et al., 2012; Martín et al., 2006). Aquest fet, doncs, permet utilitzar l'anàlisi dels seus nivells d'expressió com a aproximació per saber si el pic de 20E s'està donant correctament.

La cascada de resposta a la 20E s'inicia a partir de la unió de l'hormona al seu receptor heterodimèric, format per BgEcR i BgRXR, que permet l'activació d'una sèrie de gens primerencs, entre ells *BgE75*, *BgHR3* i *BgHR4*. El primer en activar-se és *BgE75*, que té cinc isoformes que es regulen finament entre si per tal d'impedir, en un primer moment, la inducció de *BgHR3* i *BgHR4* per part de la 20E. Així, quan comencen a augmentar els nivells de 20E s'indueix l'expressió de *BgE75A*, que reprimeix *BgE75C*, expressat just abans del pic de 20E. Seguidament s'activen *BgE75B* i *BgE75E*, i la seva acció repressora sobre *BgE75A* permet finalment la inducció de *BgHR3* i *BgHR4* per part de la 20E. Aquests, per la seva banda, s'encarregaran de l'activació del darrer receptor nuclear d'aquesta cascada, *BgFtz-F1*, just abans de cada muda (figura 4.I.18 A i B).

Per tal d'estudiar l'expressió dels receptors nuclears esmentats es van tractar nimfes de penúltim estadi amb 4 µg de *dsMock* (Control), *dsBgSumo1* (BgSumo1i) o *dsBgSumo3* (BgSumo3i), i un cop mudades al darrer estadi nimfal es van reinjectar amb 4 µg més del *dsRNA* corresponent. Al cap de sis i set dies es va extreure la glàndula protoràcica d'aquests individus i es va mesurar l'expressió dels receptors nuclears citats anteriorment. En primer lloc es va analitzar l'expressió de *BgEcR-A* i *BgRXR*, que en condicions normals és constant al llarg de les dues darreres fases nimfals i no es veu afectada per les variacions en els nivells de 20E (Cruz et al., 2006; Maestro et al., 2005). Tal i com es mostra en la figura 4.I.18 C, aquesta expressió no es veia alterada ni per l'absència de *BgSumo1* ni per la de *BgSumo3*. En segon lloc es va analitzar l'expressió de dues de les isoformes del gen *BgE75*: *BgE75C* i *BgE75A*. Mentre que en els individus Control i en els BgSumo3i no s'observava la presència de *BgE75C*, i es detectaven nivells molt baixos de *BgE75A* a dia 6, en els individus tractats amb BgSumo1i s'observava el contrari, és a dir, nivells molt alts de *BgE75C* acompanyats de nivells inexistents de *BgE75A*, fet que en una situació normal es dona quan els nivells de 20E són molt baixos. També es va analitzar l'expressió de *BgHR3-A* i *BgFtz-F1*, que s'expressen seqüencialment després de *BgE75A*, coincidint amb els màxims nivells de 20E (Cruz et al., 2007; Cruz et al., 2008). Així, es va observar que tant *BgHR3-A* com *BgFtz-F1* s'activaven de manera normal en els individus Control i en els BgSumo3i, mentre que en els individus BgSumo1i aquesta expressió no es donava (figura 4.I.18 C). Tots aquests resultats suggerien, doncs, que l'absència de BgSumo1 provoca una afectació en la producció de 20E.

4.I.3.3.2 Anàlisi del fenotip adult resultant del tractament amb *dsBgSumo1*

Tot i que amb un retard notable, la majoria dels individus BgSumo1i aconseguen mudar a adult (74.5%, figura 4.I.16 B). Aquests, però, presentaven un aspecte morfològic diferent al dels individus Control, pel que es va decidir estudiar més en detall els defectes fenotípics

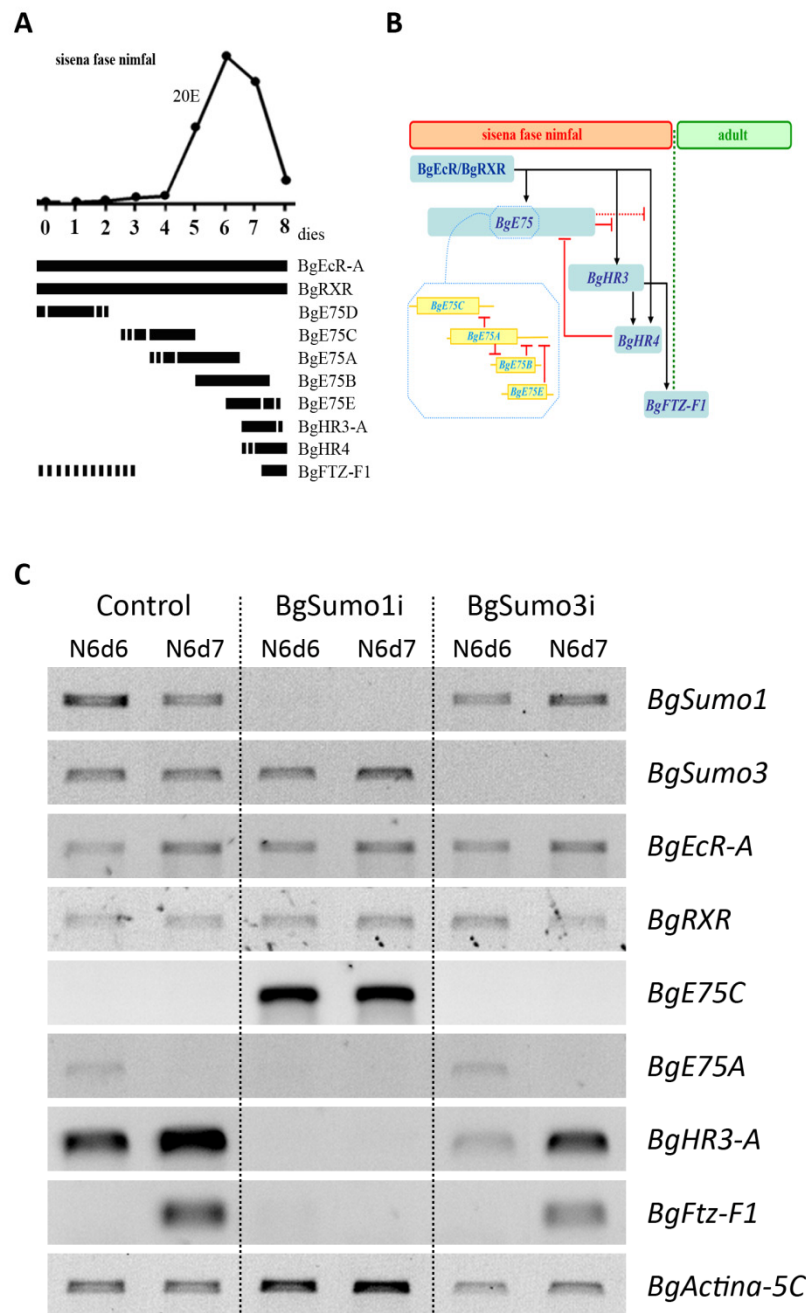


Figura 4.I.18. Efecte del silenciament de *BgSumo1* i *BgSumo3* en els nivells d'expressió de diversos receptors nuclears involucrats en la cascada de resposta a la 20-hidroxiectidisona en *Blattella germanica*.

(A) Representació gràfica, modificada de Mané-Padrós et al. (2012), dels nivells circulants de 20-hidroxiectidisona i dels patrons d'expressió dels receptors nuclears que conformen la cascada de transducció de la 20E durant el darrer estadi nimfal de *B. germanica*. (B) Esquema de les diferents interaccions que es donen entre aquests receptors nuclears durant el darrer estadi nimfal. Adaptat de Martín (2010). (C) Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 4 µg de *dsMock* (animals Control), 4 µg de *dsBgSumo1* (animals BgSumo1i) o 4 µg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo3i). Un cop mudades al darrer estadi nimfal, es van reinjectar amb 4 µg del *dsRNA* corresponent. Sis o set dies després d'aquesta muda se'ls va extreure la glàndula protoràcica i, mitjançant RT-PCR, es va mesurar l'expressió de: *BgSumo1*, *BgSumo3*, *BgEcR-A*, *BgRXR*, *BgE75C*, *BgE75A*, *BgHR3-A* i *BgFtz-F1*. L'expressió de *BgActina-5C* es va utilitzar de referència. Els nivells mostrats són representatius de cinc rèpliques.

resultants d'aquest tractament. En primer lloc, els adults BgSumo1i mostraven problemes en el desplegament de les tegmines i les ales, que a més eren marcadament més petites (reducció d'un 46 % de la llargada i un 29 % de l'amplada en el cas de les tegmines, i d'un 37 % de la llargada i un 45 % de l'amplada en el cas de les ales) (figura 4.I.19 A, B i C). Per contra, els adults BgSumo3i desplegaven les tegmines i les ales de manera correcta i amb una mida similar a la dels individus Control. D'altra banda, la interferència de *BgSumo1* també provocava problemes en les quetes de les potes, que es mostraven febles i torçades (figura 4.I.19 D). Aquestes alteracions eren molt semblants a les observades anteriorment tant en els animals BgSumo1-3i com en els BgUbc9i.

A continuació es va estudiar la funció de BgSumo1 en la proliferació cel·lular, utilitzant de nou com a model l'epiteli fol·licular de l'òcit basal. Per això es van agafar oòcits d'individus Control i BgSumo1i set dies després de la muda al darrer estadi nimfal i es va fer una immunodetecció d'histona 3 fosforilada (PH3), que marca els nuclis que es troben en el període de metafase, durant la mitosi. Tal i com s'observa en la figura 4.I.20 (A-D), en els oòcits Control es marcaven diversos nuclis en procés de divisió cel·lular, mentre que en els BgSumo1i no s'observava marcatge per PH3. Per tal de confirmar aquest resultat es va fer un recompte de les cèl·lules fol·liculars dels oòcits basals just després de la muda imaginal. Tal i com es mostra a la figura 4.I.20, els individus Control presentaven una mitjana de 3682 ± 176 cèl·lules fol·liculars per oòcit, mentre que els BgSumo1i tenien 990 ± 68 cèl·lules per oòcit, valor remarcablement inferior ($p \leq 0.0001$, t-test). A més, aquests oòcits eren significativament més petits ($p \leq 0.01$, t-test) (figura 4.I.20). De nou, aquesta afectació en la proliferació coincidia amb la detectada quan es bloquejava tot el procés de sumoilació.

En conjunt, els resultats obtinguts en l'estudi funcional de BgSumo1 i BgSumo3 mostraven que la major part dels fenotips observats pel bloqueig global del procés de sumoilació en la panerola *B. germanica* passen per l'absència de BgSumo1, mentre que BgSumo3 no presenta cap funció que no sigui redundant.

4.I.4 ESTUDI DE LA SUMOILACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS DE *Blattella germanica*

Diversos estudis en vertebrats han demostrat que alguns receptors nuclears necessiten unir-se a SUMO per al seu correcte funcionament, com ara LXR α i LXR β (Ghisletti et al., 2007), ROR α (Hwang et al., 2009) i SF-1 (Chen et al., 2004), entre d'altres. Recentment, en *D. melanogaster* també s'ha comprovat la sumoilació d'Ecr (Seliga et al., 2013; Watanabe et al., 2010) i de Usp (Bielska et al., 2012), homòleg de BgRXR. Per tot això, es va decidir estudiar la sumoilació d'alguns dels receptors nuclears de *B. germanica* descrits fins al moment. En primer lloc es va analitzar la seqüència proteica d'aquests factors, utilitzant el suport informàtic *on line* SUMOplot (Abgent, <http://www.abgent.com/tools>), la base de dades de modificacions posttraduccionals Phosida (<http://www.phosida.com>) i el programa SUMOsp 2.0. Aquestes plataformes utilitzen els motius de sumoilació consens descrits per cercar, en una seqüència determinada, potencials dominis d'unió a Sumo. A més, el software SUMOsp 2.0 també utilitza

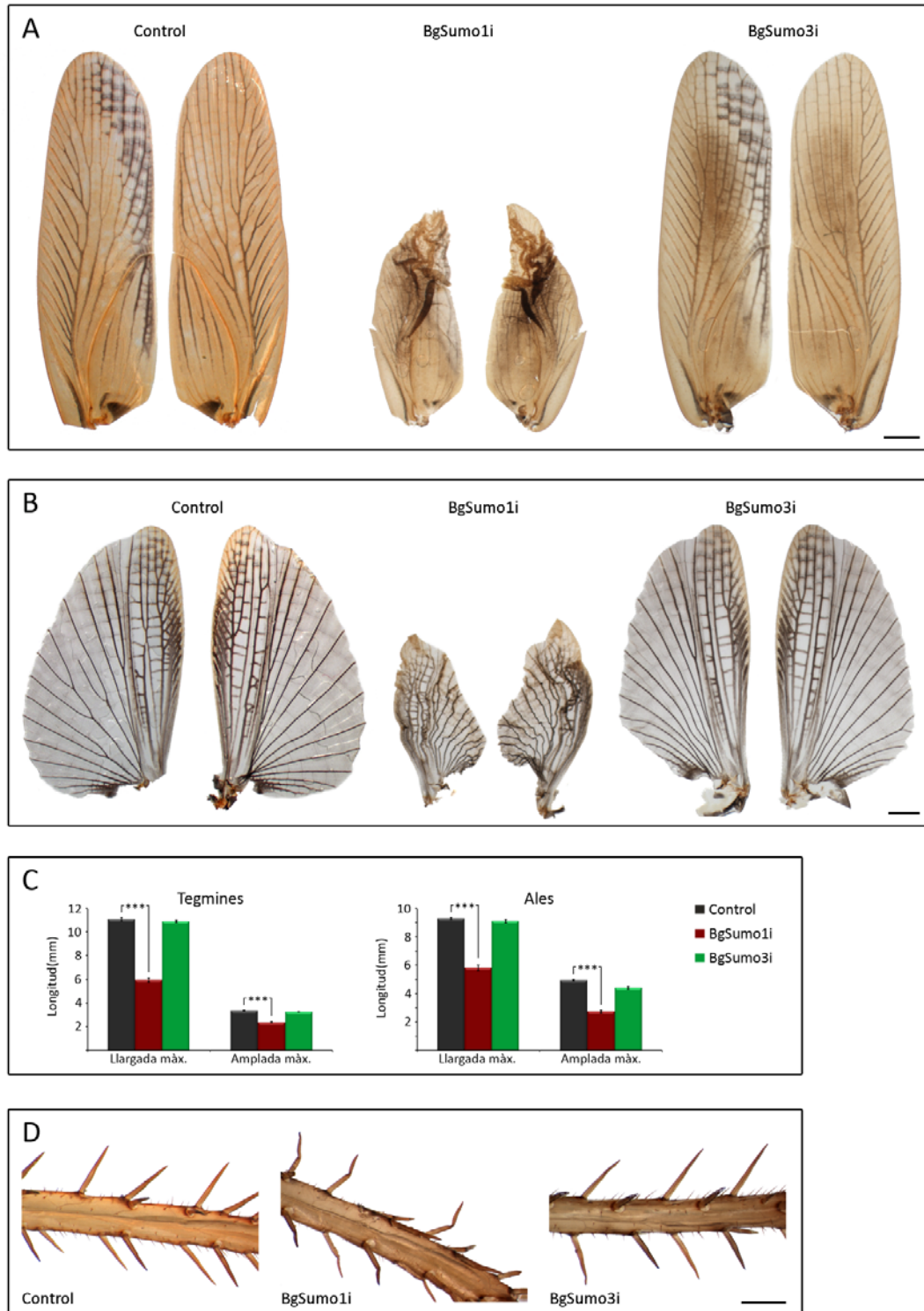


Figura 4.1.19. Efecte del silenciament de *BgSumo1* i *BgSumo3* en el desenvolupament adult de *Blattella germanica*. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 4 μg de *dsMock* (animals Control), 4 μg de *dsBgSumo1* (animals BgSumo1i) o 4 μg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo3i). Un cop mudades al darrer estadi nimfal, es van reinjectar amb 4 μg del *dsRNA* corresponent. Just després de la muda imaginal es va analitzar en detall l'efecte de cada tractament. (A-B) Tegmines (A) i ales (B) d'adults Control, BgSumo1i i BgSumo3i. (C) Mesura de la llargada i l'amplada màximes de les tegmines i les ales en els diferents animals. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.0005$ (t-test). (D) Detall de les quetes de les potes d'individus Control, BgSumo1i i BgSumo3i. Escales: 1 mm en A i B; 0.5 mm en C.

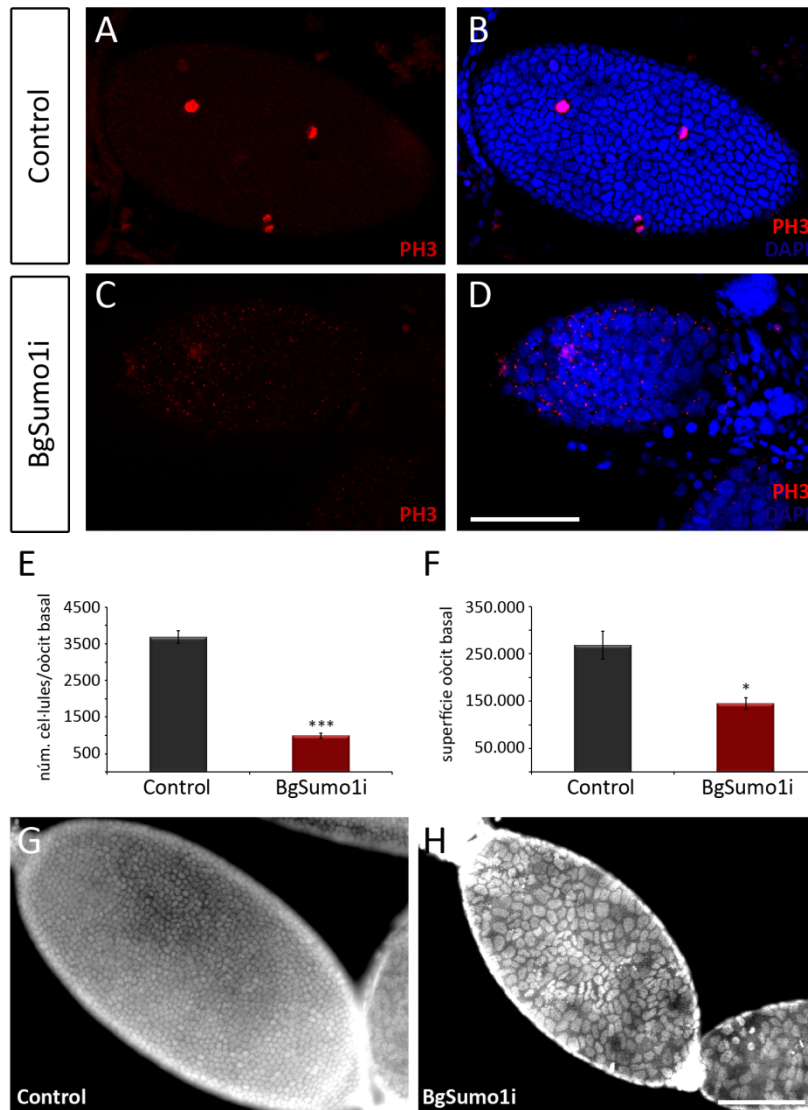


Figura 4.1.20. Efecte del silenciament de *BgSumo1* en la proliferació en l'epiteli fol·licular de l'oòcit basal de *Blattella germanica*. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 4 μg de *dsMock* (animals Control), 4 μg de *dsBgSumo1* (animals BgSumo1i) o 4 μg de *dsBgSumo3* (animals BgSumo3i). Un cop mudades al darrer estadi nimfal, es van reinjectar amb 4 μg del *dsRNA* corresponent. (A-D) Marcatge amb l'anticòs que detecta l'histona 3 fosforilada (PH3) en oòcits Control (A-B) i BgSumo1i (C-D) set dies després de l'entrada al darrer estadi nimfal. Els panells A i C mostren l'immunodetecció de PH3, en vermell, i els panells B i D mostren la superposició d'aquesta amb una tinció DAPI dels nuclis de les cèl·lules fol·liculars, en blau. (E) Nombre de cèl·lules fol·liculars en els oòcit basal d'animals Control i BgSumo1i, just després de la muda imaginal. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.0005$ (t-test). (F) Superfície mitjana (μm^2) de l'oòcit basal d'animals Control i BgSumo1i. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). L'asterisc indica diferències significatives: $p \leq 0.05$ (t-test). (G-H) Tinció DAPI dels nuclis de les cèl·lules fol·liculars de l'oòcit basal en una femella Control (G) i una BgSumo1i (H) per mostrar l'estructura dels oòcits, just després de la muda imaginal. Escala: 5 μm per A-D i G-H.

altres llocs de sumoilació no consens descrits en la bibliografia per tal de cercar totes les zones d'una proteïna que podrien ser susceptibles d'unir-se a SUMO (Ren et al., 2009). Després d'analitzar les seqüències proteïques de BgEcR-A, BgRXR-L, BgE75A, BgHR3-A, BgHR3-B2 i BgFtz-

F1 amb cadascuna de les tres plataformes es va observar que tots aquests receptors nuclears contenien potencials llocs de sumoilació (figura 4.1.21 A).

Tot seguit, en col·laboració amb el grup de la Dra. Rosa Barrio (CIC bioGUNE, Bizkaia), experts en l'estudi d'aquesta modificació postraducciona i en la cerca de proteïnes sumoilades, es va analitzar la capacitat dels receptors nuclears de *B. germanica* d'unir-se a Sumo. L'assaig consistia en la traducció *in vitro* de cadascuna de les proteïnes que es volia analitzar, afegint metionina marcada radioactivament (³⁵S-Metionina) a un sistema de transcripció/traducció. Posteriorment s'afegia el SUMO1 humà, juntament amb totes les proteïnes necessàries per la seva conjugació (SAE1/2, UBC-9) i s'analitzava la seva unió a la proteïna d'interès a través d'un gel d'acrilamida. Tal i com s'observa a la figura 4.1.21 B, en absència de SUMO1 i la seva maquinària de conjugació s'obtenia una banda majoritària corresponent al pes de la proteïna analitzada en cada cas: 62.4 kDa per BgEcR-A, 48.7 kDa per BgRXR-L, 104 kDa per BgE75A, 68 kDa per BgHR3-A, 59.2 kDa per BgHR3-B₂ i 65.5 kDa per BgFtz-F1. D'altra banda, quan s'afegien SUMO1 i les proteïnes necessàries per la seva conjugació s'observaven, a més de la corresponent a la proteïna diana analitzada en cada cas, una o més bandes d'una mida major. Aquest resultat indicava que BgEcR-A, BgRXR-L, BgE75A, BgHR3-A, BgHR3-B₂ i BgFtz-F1 eren capaços d'unir-se a Sumo en condicions *in vitro*, el que suggeria que aquesta modificació podria ser important per al correcte funcionament d'aquests receptors nuclears en la transducció de la senyal de la 20E, que tal i com s'ha indicat anteriorment (apartat 4.1.3.1) es veia afectada després del silenciament amb *dsBgSumo1*. A més, el fet que alguns dels receptors nuclears analitzats (BgEcR-A, BgE75A, BgHR3-B₂ i BgFtz-F1) mostressin més d'una banda de mida superior a la de la proteïna nativa indicava que aquests factors tenien units més d'un SUMO1 a la vegada, fet que suggeria que podrien sumoilar-se a través de més d'un domini.

4.1.5 ANÀLISI FUNCIONAL DE BgSumo1 I BgSumo3 EN *Drosophila melanogaster*

L'estudi funcional dels dos paràlegs *Sumo* de *B. germanica* mostrava que BgSumo1 és essencial pel desenvolupament de la panerola i el seu pas a l'estadi adult, mentre que l'absència de BgSumo3 és compensada pel mateix BgSumo1. Aquests resultats, sumats al fet que *D. melanogaster* té un sol gen *Sumo*, *dSmt3*, que s'ha demostrat imprescindible per a l'inici de la metamorfosi (Talamillo et al., 2008a) i el desenvolupament de l'ala (Talamillo et al., 2010) entre altres, oferien una bona oportunitat per aprofundir en la funcionalitat de cada un dels paràlegs *Sumo* de *B. germanica*, així com en l'evolució d'aquesta funcionalitat. Per això, en col·laboració amb el grup de la Dra. Rosa Barrio (CIC bioGUNE, Bizkaia), es va decidir estudiar la capacitat de BgSumo1 i BgSumo3 de rescatar la deficiència de *dSmt3* en *D. melanogaster*. Aquest dípter és un insecte model àmpliament utilitzat en desenvolupament, fet que ha portat al perfeccionament de gran quantitat d'eines que permeten la seva manipulació genètica d'una manera relativament senzilla. Un exemple n'és el sistema Gal4-UAS, utilitzat en aquest estudi, que permet el silenciament i la sobreexpressió de qualsevol gen sota el control d'un promotor concret (Brand and Perrimon, 1993).

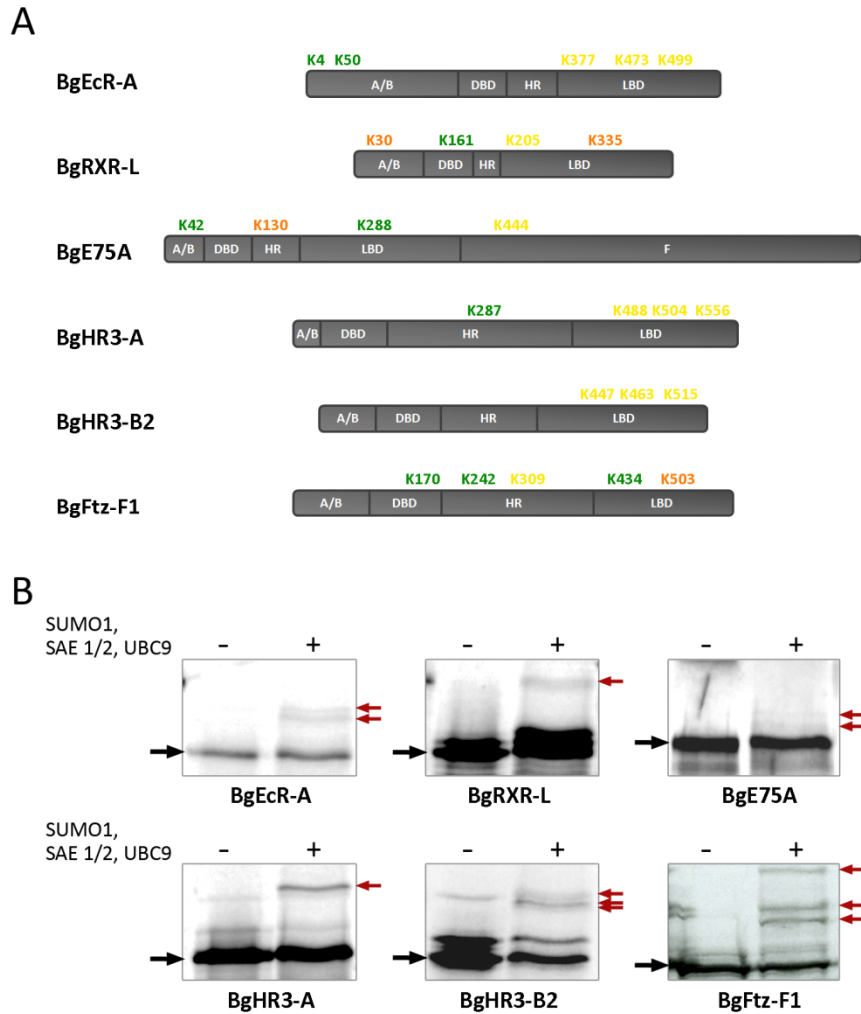


Figura 4.I.21. Sumoïlació dels receptors nuclears que conformen la cascada de resposta a la 20-hidroxicdisona en *Blattella germanica*. (A) Identificació dels dominis potencials d'unió a Sumo presents en la seqüència proteica de BgEcR-A, BgRXR-L, BgE75A, BgHR3-A, BgHR3-B₂ i BgFtz-F1, obtinguts utilitzant els *softwares* SUMOplot (*puntuació* ≥ 0.8), Phosida i SUMOsp 2.0 (*llindar alt*). La situació de cada domini s'indica amb una K, que representa l'aminoàcid lisina que hipotèticament formaria l'enllaç amb la proteïna Sumo, i un número que representa la posició d'aquesta lisina en la seqüència aminoacídica. Els diferents colors indiquen si el domini s'ha obtingut com a potencialment sumoïlable en una (groc), dues (taronja) o les tres (verd) plataformes utilitzades. Les seqüències estan representades en forma de barra, proporcionals a la quantitat d'aminoàcids que conformen la proteïna, i amb els diferents dominis indicats (A/B per la regió N-terminal; DBD pel domini d'unió a DNA; HR per la regió frontissa; LBD pel domini d'unió a lligand; i F per la regió C-terminal). (B) Sumoïlació *in vitro* de BgEcR-A, BgRXR-L, BgE75A, BgHR3-A, BgHR3-B₂ i BgFtz-F1. A la part superior de cada gel es mostren les diferents condicions a les que ha estat exposada cada proteïna, que són: absència (-) o presència (+) de SUMO1 i la seva maquinària de conjugació (SAE1/2 i UBC9). La fletxa negra indica el pes de la proteïna nativa, que és: 62.4 kDa per BgEcR-A, 48.7 kDa per BgRXR-L, 104 kDa per BgE75A, 68 kDa per BgHR3-A, 59.2 kDa per BgHR3-B₂ i 65.5 kDa per BgFtz-F1. Les fletxes vermelles indiquen la presència de bandes de mida superior, que correspondrien al receptor nuclear analitzat unit a un o varis SUMO1.

El teixit escollit per a l'anàlisi de la funció de BgSumo1 i BgSumo3 en *D. melanogaster* va ser l'ala, ja que l'absència de dSmt3 en la part central d'aquesta estructura, utilitzant el *driver* *SalEPv-Gal4* (Barrio and de Celis, 2004), provocava importants conseqüències en la seva

morfologia adulta (figura 4.I.21 A i B). Així, aquestes ales eren més petites i tenien afectades les regions intervena de la zona estudiada, especialment la situada entre les venes longitudinals LII i LIII, que desapareixia gairebé per complet, provocant en alguns casos la fusió d'aquestes dues venes. Quan en aquestes condicions s'expressava de manera ectòpica *BgSumo1*, utilitzant la línia transgènica *UAS-BgSumo1*, no s'aconseguia revertir el fenotip d'absència de *dSmt3* (figura 4.I.21 C). En canvi, sobreexpressant *BgSumo3* (*UAS-BgSumo3*) les ales recuperaven la seva estructura normal, presentaven una mida similar a les ales control, i no s'observaven afectacions en les regions intervena ni fusions entre venes (figura 4.I.21 D).

Per altra banda, també es va estudiar la funció de *BgSumo1* i *BgSumo3* en la glàndula protoràctica, on *dSmt3* és imprescindible per a l'inici de la metamorfosi. Així, la interferència de *dSmt3* durant la darrera fase larvària en aquesta glàndula, mitjançant el *driver phm-Gal4* (Mirth et al., 2005), provoca la prolongació d'aquest estadi (Talamillo et al., 2008a). Tal i com passava en l'ala, la sobreexpressió de *BgSumo3* aconseguia rescatat aquest fenotip, i totes les larves iniciaven la metamorfosi de manera correcta. D'altra banda, introduint de manera ectòpica *BgSumo1* no s'aconseguia revertir l'absència de *dSmt3*. Tots aquests resultat indicaven, doncs, que *BgSumo3* era capaç de substituir funcionalment *dSmt3*, mentre que *BgSumo1* no.

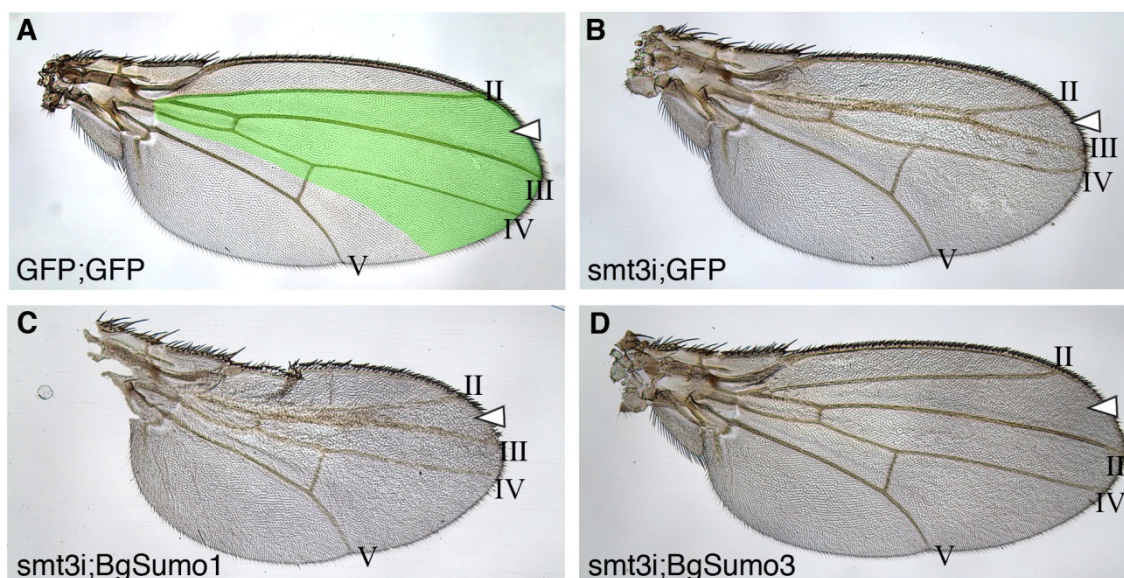


Figura 4.I.22. Anàlisi del rescat de l'absència de *dSmt3* en l'ala de *Drosophila melanogaster* mitjançant l'expressió ectòpica de *BgSumo1* i *BgSumo3*. (A) Ala adulta de *D. melanogaster* on s'ha expressat *GFP* de manera ectòpica, mitjançant *UAS-GFP*, que s'utilitza de Control. En verd s'indica la zona controlada pel *driver* utilitzat en aquests experiments, *SalEPv-Gal4*. També s'indiquen les venes longitudinals II, III, IV i V. La punta de fletxa assenyalat l'espai intervena II-III. (B) Ala en la que s'ha silenciat l'expressió de *dSmt3* mitjançant *UAS-smt3i*. (C) Ala sense *dSmt3* i expressió ectòpica de *BgSumo1*, a través de la línia transgènica *UAS-BgSumo1*. (D) Ala resultant del silenciament de *dSmt3* combinat amb la presència de *BgSumo3*, expressat ectòpicament mitjançant *UAS-BgSumo3*.

CAPÍTOL 4.II

ESTUDI DEL PAPER D'E93 EN LA METAMORFOSI DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL *Blattella germanica*

Tal i com s'ha descrit en l'apartat d'Introducció, la metamorfosi dels insectes engloba el conjunt de canvis morfològics i fisiològics que es donen durant el pas de l'estadi juvenil a l'estadi adult. Aquesta transició requereix de la coordinació de diversos processos de mort cel·lular de teixits juvenils amb el creixement i la morfogènesi de teixits adults, i està controlada per dues hormones: la 20E i l'HJ (Dubrovsky, 2005; Sehna et al., 1996; Truman and Riddiford, 2002). En l'insecte hemimetàbol *B. germanica* aquests canvis metamòrfics es caracteritzen, principalment, per l'aparició de les ales i la genitèlia funcional, la modificació de la pigmentació de la cutícula i la mort del teixit responsable de la síntesi d'ecdisteroides, la glàndula protoràcica (veure Introducció, figura 1.11). En els darrers anys, en el laboratori del Dr. David Martín s'ha demostrat que tots aquests processos metamòrfics estan finament regulats per una complexa cascada de receptors nuclears activada per la 20E (Cruz et al., 2006; Cruz et al., 2007; Cruz et al., 2008; Maestro et al., 2005; Mané-Padrós et al., 2008; Mané-Padrós et al., 2010; Mané-Padrós et al., 2012; Martín et al., 2006). Aquesta cascada transcripcional, però, es troba també present en totes les transicions nimfals anteriors a la metamòrfica, fet que suggereix l'existència d'alguns factors específics de la darrera fase nimfal que actuarà modulant l'acció de la 20E durant aquest període. Com que la metamorfosi requereix de l'eliminació de teixits juvenils i la morfogènesi de teixits adults, es va decidir cercar candidats que poguessin desenvolupar ambdues funcions. Per això, es va fer una recerca de gens que estiguessin relacionats amb mort cel·lular, però que alhora s'expressessin en teixits morfogenètics durant la metamorfosi de *B. germanica*. Mitjançant aquesta aproximació es va identificar el gen *BgE93*, l'ortòleg del qual s'encarrega de controlar la degeneració d'un dels teixits larvaris de *D. melanogaster*, la glàndula salival (Lee et al., 2000). En el present capítol es descriu el clonatge i la caracterització de l'expressió del gen *E93* de *B. germanica*, així com l'estudi de la seva funció durant la metamorfosi mitjançant RNAi *in vivo*. Per altra banda, també s'intenta dilucidar la relació de *BgE93* amb la via de senyalització de l'HJ, donada l'activitat antimetamòrfica d'aquesta última (Wigglesworth, 1947).

4.II.1 CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *E93* DE *Blattella germanica*

4.II.1.1 Clonatge d'un fragment del gen *E93* de *Blattella germanica*

E93 és un gen que codifica per un factor de transcripció de la família de les proteïnes Pipsqueak (Psq), que es caracteritzen per la presència d'un domini pipsqueak d'unió a DNA del tipus HTH (de l'anglès *helix-turn-helix*) (Siegmond and Lehmann, 2002). L'alt grau de conservació d'aquest domini entre les diferents seqüències *E93* d'insectes presents a la base de dades va permetre el disseny d'encebadors degenerats per tal d'amplificar el domini Psq del gen *E93* de *B. germanica* (figura 4.II.1 A). D'aquesta manera es va obtenir un primer fragment de 109 pb que, utilitzant la tècnica del 5' RACE (veure apartat 3.4), es va augmentar fins a un total de 886 pb (figura 4.II.1 B). La comparació d'aquesta seqüència amb les disponibles a la base de dades confirmava que aquest cDNA codificava per un fragment de 295 aminoàcids ortòleg a seqüències *E93*, de manera que se'l va anomenar *BgE93* (número d'accés HF678196).

A

Ap <i>E93</i>	RPKRGKYRNYDRDSLVEAVRAVQRGEMSVHRAGSYYGVPHESTLEYKVKERHLMR
Ph <i>E93</i>	RPKRGKYRNYDRDSLVEAVRAVQRGEMSVHRAGSYYGVPHESTLEYKVKERHLMR
Bg <i>E93</i>	RPKRGKYRNYDRDSLIEAVRAVQRGEMSVHRAGSHFGVPHSTLEYKV-----
Am <i>Mblk-1</i>	RPKRGKYRNYDRDSLVEAVRAVQRGEMSVHRAGSYYGVPHESTLEYKVKERHLMR
Tc <i>E93</i>	RPKRGKYRNYDRDSLVEAVRAVQRGEMSVHRAGSYYGVPHESTLEYKVKERHLMR
Dm <i>E93</i>	RPKRGKYRNYDRDSLVEAVRAVQRGEMSVHRAGSYYGVPHESTLEYKVKERHLMR
Ce <i>MBR1</i>	RPKRGQYRKYDKNALDEAVRSVRRGEMTVHRAGSFFGVPHSTLEYKVKERNLMR
Hs <i>LCoR-2</i>	RKKRGRYRQYNSEILEEAIISVVMSSGKMSVSKAQSIIYGIPHESTLEYKVKERLGLTL

B

```

cacagtgccttaggaccttatggtgccgagttactggctgcgcaaaagaatcctgcatccaccctggagacaaaagtcccacgagcgga 90
H S A L G P Y V A E L L A A Q K N P A S T P G D K S P T S G 30

gacttctgcccagttcccaacgccactcttgccgagttgtacgacgcatgatggctgaggacaagcttcagagcttccacccta 180
D F L P K F P T P L L P E F V R R M M A E D K L Q S F H P N 60

ggcgcccacgcagatgagagagaacctgagagcctttgctgaccaagagtcgcccaccatcgctggcatggccactccaccttct 270
G A H A D E R E P E R P L R D Q E S P D P S P G M A T P P S 90

aatgtgatactgaaaattccgtcctttaaaccgacttcaaaaaatggagtggtctctagcagtgatccacagaaccaccgcccctctg 360
N V I L K I P S F K P T S K N G V A S S S G S T E P P P P L 120

ccaccaccaccacagagcttcttagtcaacagctgagtgattcttctgctcaccacctgtgccgagtttagttgaaaaggcattggggtg 450
P P P P P E S S S Q Q L S D S C S P P V P S L V G K G I G V 150

agtttgcgagatgtcattgctaagagcatcagccaaaagtccagcagcatagtgagctgtcccctaaacttgggatgggtgcccaaaaca 540
S L R D V I A K S I S Q K F Q Q H S E L S P K L G M V P E T 180

gaacctccttcaaaaggggcaggttcaccccaccattggttgctggtgcctctgcaacatccgctataaaacataataacaacaacaat 630
E P P F K R G R F T P P L V A G A S A T S V I K H N N N N N 210

agtcaagctgatgacagaaatgctcaaaagatactcccacaagttcagagcaaacccacggggacatctagtggtgccagcagccagtc 720
S Q A D D R N A Q K I L P Q V Q S K P T G T S S G A S S Q S 240

tcatcttcaggagggaaaggcagcgccttaaacgtggaaaatatcgcaattatgaccgtgatagctgatagaagctgtgagagcggtt 810
S S S G G K G T R P K R G K Y R N Y D R D S L I E A V R A V 270

caaagaggtgaaatgagcgttcatcgggcaggttcacactttgggggtcccacattccacactcgagtacaaggtca 886
Q R G E M S V H R A G S H F G V P H S T L E Y K V 295

```

Figura 4.II.1. Seqüència nucleotídica i aminoacídica de *BgE93*. (A) Alineament del domini Pipsqueak de diverses seqüències *E93* d'insectes (Ap: *Acyrtosiphon pisum*; Ph: *Pediculus humanus*; Bg: *Blattella germanica*; Am: *Apis mellifera*; Tc: *Tribolium castaneum*; Dm: *Drosophila melanogaster*) i també del nematode *Caenorhabditis elegans* i de *LCoR* (*Ligand-dependent corepressor*), ortòleg d'*E93* en humans. (B) Fragment de 886 pb de la seqüència codificant d'*E93* de *B. germanica*. La línia superior mostra la seqüència de nucleòtids i a sota d'aquesta els aminoàcids corresponents. Marcat en taronja es destaca el fragment de seqüència corresponent al domini Pipsqueak.

4.II.1.2 Caracterització de l'expressió del gen *E93* de *Blattella germanica*

Un cop obtinguda la seqüència de *BgE93* es va procedir a estudiar-ne l'expressió en diversos teixits, mitjançant RT-PCR en temps real (qRT-PCR). Com que la funció d'*E93* en *D. melanogaster* s'ha relacionat amb la mort de la glàndula salival durant la metamorfosi (Lee et al., 2000), en primer lloc s'analitzà l'expressió de *BgE93* en la glàndula protoràtica de *B. germanica*, que passa per un procés de mort cel·lular programada durant la transició a l'estadi adult semblant al de la glàndula salival de la mosca (Mané-Padrós et al., 2010). Tal i com s'observa a la figura 4.II.2 A, l'expressió de *BgE93* en aquest teixit era molt baixa durant el penúltim estadi

nimfal i augmentava considerablement en el darrer, presentant els seus nivells més elevats durant la transició imaginal. Finalment, aquests nivells queien bruscament durant els primers dies de l'estadi adult, degut a la degeneració de la glàndula protoràcica. Per tal de comprovar si la presència *BgE93* es restringia a teixits destinats a degenerar durant la metamorfosi, s'analitzà la seva expressió en un teixit que passa per un procés morfogènètic, les estructures alars. L'adult de *B. germanica* presenta un parell de tegmines i un parell d'ales provinents del segon i tercer segments toràcics, respectivament, que durant les fases nimfals es troben recobertes de cutícula, dins una mena d'estoigs anomenats *wing pads*. En el transcurs de la darrera fase nimfal aquestes estructures alars passen per una fase d'activa proliferació i reestructuració cel·lular, deixant de sintetitzar la cutícula que forma el *wing pad* (veure Introducció, figura 1.11). Això permet que, durant la muda imaginal, tegmines i ales s'estenguin i augmentin la seva superfície fins al punt de cobrir completament la part dorsal de l'abdomen de les paneroles adultes. Tal i com s'observava en la glàndula protoràcica, els nivells de *BgE93* en tegmines i ales eren baixos durant la penúltima fase nimfal i augmentaven a l'entrar a la darrera, sobretot a partir del quart dia, coincidint amb el moment en què s'inicia la reestructuració cel·lular d'aquestes ales. Un cop assolit l'estadi adult, aquests nivells queien de manera brusca (figura 4.II.2 B).

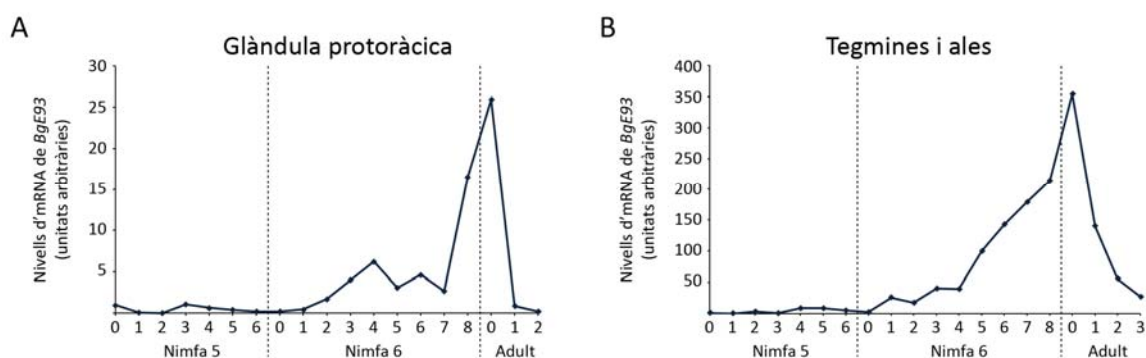


Figura 4.II.2. Patrons d'expressió de *BgE93* durant els dos darrers estadis nimfals de *Blattella germanica*. Nivells d'mRNA de *BgE93* mitjançant qRT-PCR en (A) glàndula protoràcica i (B) tegmines i ales d'individus de les edats assenyalades, obtinguts a partir de la mateixa quantitat de teixit en cada punt (tres glàndules protoràciques en A i tres parells de tegmines i ales en B). Els resultats es mostren en unitats arbitràries, donant el valor de 1 a l'expressió en el punt N5d0. Cada gràfica és representativa de tres rèpliques.

El fet que els nivells de *BgE93* augmentessin, tant en un teixit destinat a degenerar com en un que passa per un procés morfogènètic, suggeria que *BgE93* podia estar implicat en el control de tots els processos metamòrfics d'una manera global. Per això es va analitzar més detalladament l'activació de la seva expressió durant la transició al darrer estadi nimfal, període en el que tenen lloc aquests canvis. Els teixits utilitzats per aquest estudi van ser la glàndula protoràcica, les ales, l'epidermis i el cos gras. L'epidermis és el teixit encarregat de la síntesi de la cutícula, que passa del color negre característic de les fases nimfals al color marró clar de l'estadi adult (Willis et al., 2005). Aquest canvi de coloració representa una de les transformacions metamòrfiques més visibles de *B. germanica*. El cos gras, per la seva banda, és el principal òrgan biosintètic dels insectes, amb funcions equivalents a les del fetge i el teixit adipós en els

vertebrats, i no pateix cap canvi metamòrfic en la panerola. Els diferents moments en els que es va mesurar l'expressió de *BgE93* van ser: el quart dia del quart estadi nimfal (N4d4), el darrer dia de la penúltima fase nimfal (N5d6) i els tres primers dies de la darrera fase nimfal (N6d0, d1 i d2). Tal i com s'observa en la figura 4.II.3, es va comprovar que els nivells de *BgE93* no patien grans variacions entre el quart i el cinquè estadi nimfal en cap dels teixits analitzats, mentre que augmentaven considerablement, just després de l'entrada al darrer estadi nimfal, en els tres teixits metamòrfics estudiats (glàndula protoràctica, ales i epidermis). Remarcablement, els nivells de *BgE93* en el cos gras no variaven al llarg de les diferents fases nimfals, mantenint-se baixos en tots els punts analitzats. Aquests resultats confirmaven l'activació de l'expressió de *BgE93* en els teixits metamòrfics durant el pas al darrer estadi nimfal, fet que suggeria que aquest factor podia estar implicat en diversos dels processos metamòrfics de *B. germanica*.

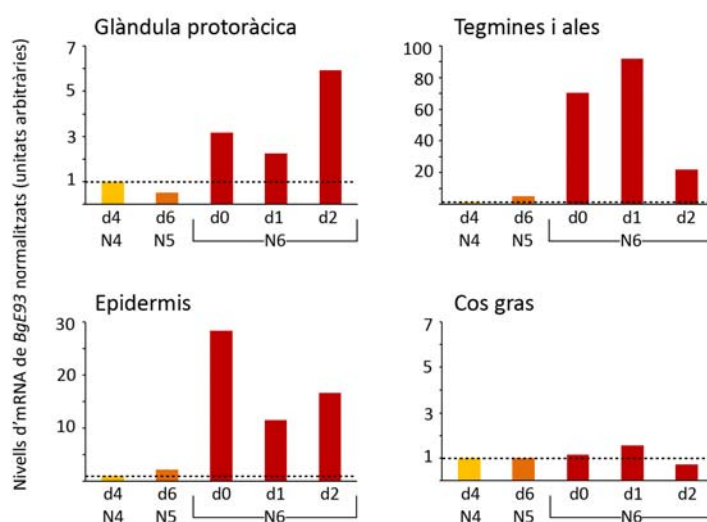


Figura 4.II.3. Nivells d'expressió de *BgE93* durant la transició al darrer estadi nimfal de *Blattella germanica*. Expressió de *BgE93* en glàndula protoràctica, tegmines i ales, epidermis i cos gras, mesurats mitjançant qRT-PCR en diferents moments del desenvolupament nimfal de *B. germanica*: el quart dia de nimfa 4 (N4d4), el darrer dia del penúltim estadi nimfal (N5d6) i els tres primers dies de l'última fase nimfal (N6d0, d1 i d2). L'mRNA utilitzat en cada punt es va obtenir a partir de la mateixa quantitat de teixit, provinent de 5 animals diferents. Els valors d'expressió de *BgE93* es van normalitzar en relació amb l'expressió de *BgActina-5C*, que és constant en aquests teixits al llarg del període analitzat. Els resultats es mostren en unitats arbitràries, donant el valor de 1 a l'expressió a N4d4. Cada gràfica és representativa de tres rèpliques.

4.II.2 ANÀLISI FUNCIONAL DE *BgE93* DURANT LA TRANSICIÓ A L'ESTADI ADULT

Una vegada analitzada l'expressió de *BgE93* es va procedir a estudiar-ne la funció durant la metamorfosi de *B. germanica*, mitjançant la tècnica de l'RNAi *in vivo*. Amb aquest objectiu es va utilitzar un fragment d'RNA de doble cadena, de 318 pb, corresponent a una part de la seqüència d'mRNA de *BgE93* (*dsBgE93-1*, figura 4.II.4 A). Com a control negatiu es va utilitzar

una seqüència de 307 pb del gen de la polihedrina del nucleopolihedrovirus *Autographa californica* (*dsMock*).

4.II.2.1 Efecte de la interferència en els nivells de *BgE93*

En primer lloc, per tal de comprovar l'eficàcia de la interferència, es van injectar 5 µg de *dsMock* (animals Control) o 5 µg de *dsBgE93-1* (animals BgE93i) en l'abdomen de femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal (N5). Tant les femelles Control com les BgE93i mudaven de manera normal a la darrera fase nimfal (N6), i sis dies després d'aquesta muda se'ls va extreure la glàndula protoràcica, les estructures alars i l'epidermis i es analitzar l'expressió de *BgE93* mitjançant qRT-PCR. Tal i com es mostra a la figura 4.II.4, aquests nivells eren significativament inferiors en les nimfes BgE93i, amb una reducció d'aproximadament el 95% en els tres teixits analitzats.

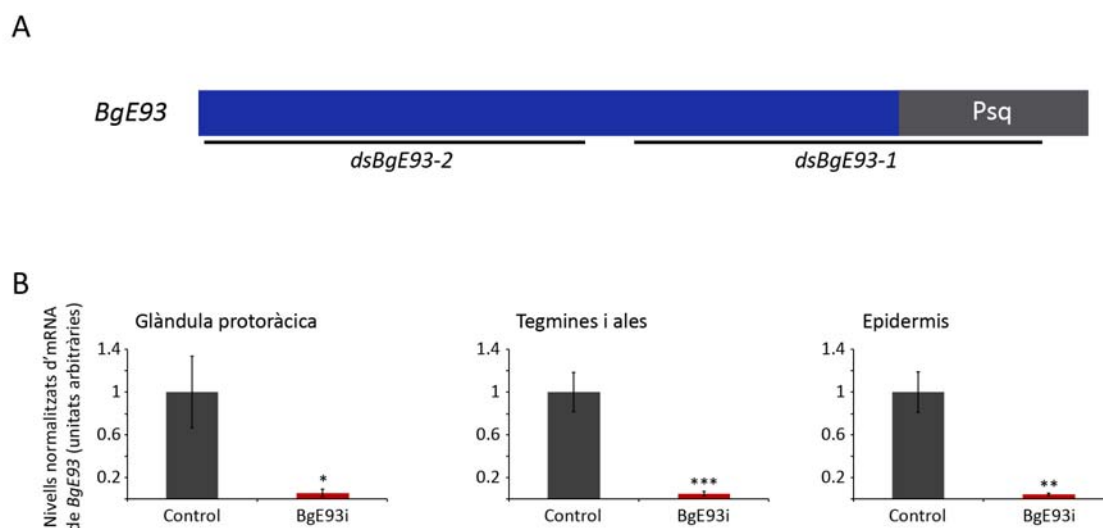


Figura 4.II.4. Efecte del silenciament de *BgE93* mitjançant RNAi *in vivo*. (A) Representació esquemàtica del fragment del gen *E93* de *B. germanica* clonat. El domini d'unió a DNA Pipsqueak (Psq) es mostra en gris. La regions utilitzades per generar els diferents *dsRNAs* s'indiquen com a *dsBgE93-1* i *dsBgE93-2*. (B) Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal, N5, amb 5 µg de *dsMock* (animals Control) o 5 µg de *dsBgE93-1* (animals BgE93i), i es van mesurar els nivells d'expressió de *BgE93* (mitjançant qRT-PCR) en glàndula protoràcica, tegmines i ales, i epidermis sis dies després de la muda al darrer estadi nimfal, N6. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *BgActina-5C* i es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.005$ (**); $p \leq 0.001$ (***) (t-test).

4.II.2.2 Efecte fenotípic del silenciament de *BgE93*

Una vegada comprovada l'eficàcia de la interferència, es va procedir a analitzar l'efecte de l'absència de *BgE93* en aquests mateixos animals, observant el seu comportament durant la muda imaginal. Així, mentre en els individus Control la metamorfosi es donava de manera

normal al final de N6, les nimfes BgE93i no passaven a l'estadi adult, sinó que mudaven a un nou estadi nimfal, que es va anomenar nimfa 7 (N7) (taula 4.II.1 i figura 4.II.5). Aquestes nimfes supernumeràries presentaven totes les característiques externes típiques d'una nimfa de *B. germanica*: (1) coloració negra de la cutícula; (2) tegmines i ales sense desenvolupar, embolcallades en els *wing pads* toràcics; (3) dues franges amples de color negre en el pronot; i (4) cercs nimfals, més curts, amples i foscos que els adults. A més, la durada de l'estadi nimfal N6, que en condicions normals és de vuit dies, es veia reduïda dos dies en el individu BgE93i, passant a ser idèntica a la del penúltim estadi nimfal. Aquestes nimfes BgE93i supernumeràries, incapaces de mudar a l'etapa adulta, continuaven mudant a nous estadis nimfals supernumeraris perfectes, fins a assolir la novena fase nimfal (N9) (figura 4.II.5 C). En aquest punt, molts dels individus interferits presentaven diversos defectes de muda en les potes. Això feia que a l'intentar la següent muda la majoria no aconseguissin desprendre's de la cutícula i acabessin morint. Uns quants, però, aconseguien completar aquesta nova muda (N10), tot i que presentaven un aspecte poc saludable i morien al cap d'uns dies. D'altra banda, les nimfes BgE93i supernumeràries (N7-N10) seguien creixent i augmentant de mida en cada nova muda, arribant a ser fins i tot més grans que els individus Control adults (figura 4.II.5).

Taula 4.II.1 Efecte de la interferència de BgE93 en la muda imaginal de *B. germanica*.

Tractament	n	Adults	Arrestats	Nimfes supernumeràries
Control	45	45 (100%)	-	-
BgE93i	68	-	3 (4.4%)	65 (95.6%)

Per tal de comprovar l'especificitat de la interferència, es va utilitzar un segon *dsRNA* situat en una zona més a 5' de la seqüència de *BgE93* (*dsBgE93-2*; figura 4.II.4 A). Igual que abans, es van injectar nimfes de penúltima fase amb 5 µg de *dsMock* (animals Control) o 5 µg de *dsBgE93-2* (animals BgE93i), i es va comprovar que aquests últims mudaven a un estadi nimfal supernumerari al final de N6, confirmant l'especificitat del fenotip obtingut amb el *dsBgE93-1* (figura 4.II.6). Així doncs, tots aquests resultats mostraven que l'absència de BgE93 impedia que es donessin els canvis metamòrfics que tenen lloc durant el darrer estadi nimfal de *B. germanica*, provocant que els individus BgE93i no assolissin mai l'estadi adult.

4.II.2.3 Anàlisi de les característiques nimfals dels individus BgE93i

Per tal de confirmar que en absència de BgE93 les nimfes de *B. germanica* conservaven totes les característiques nimfals es va estudiar en detall el fenotip dels individus BgE93i. En primer lloc es van analitzar els canvis morfològics que es donen en les cèl·lules epitelials de l'ala durant el darrer estadi nimfal, que passen d'una conformació hexagonal (dia 0-4) a una d'escamosa (dia 5-7) i, finalment, adquireixen un aspecte estrellat (dia 8) (veure Introducció, figura 1.11). Després del silenciament de *BgE93*, però, aquesta transformació no es donava i les

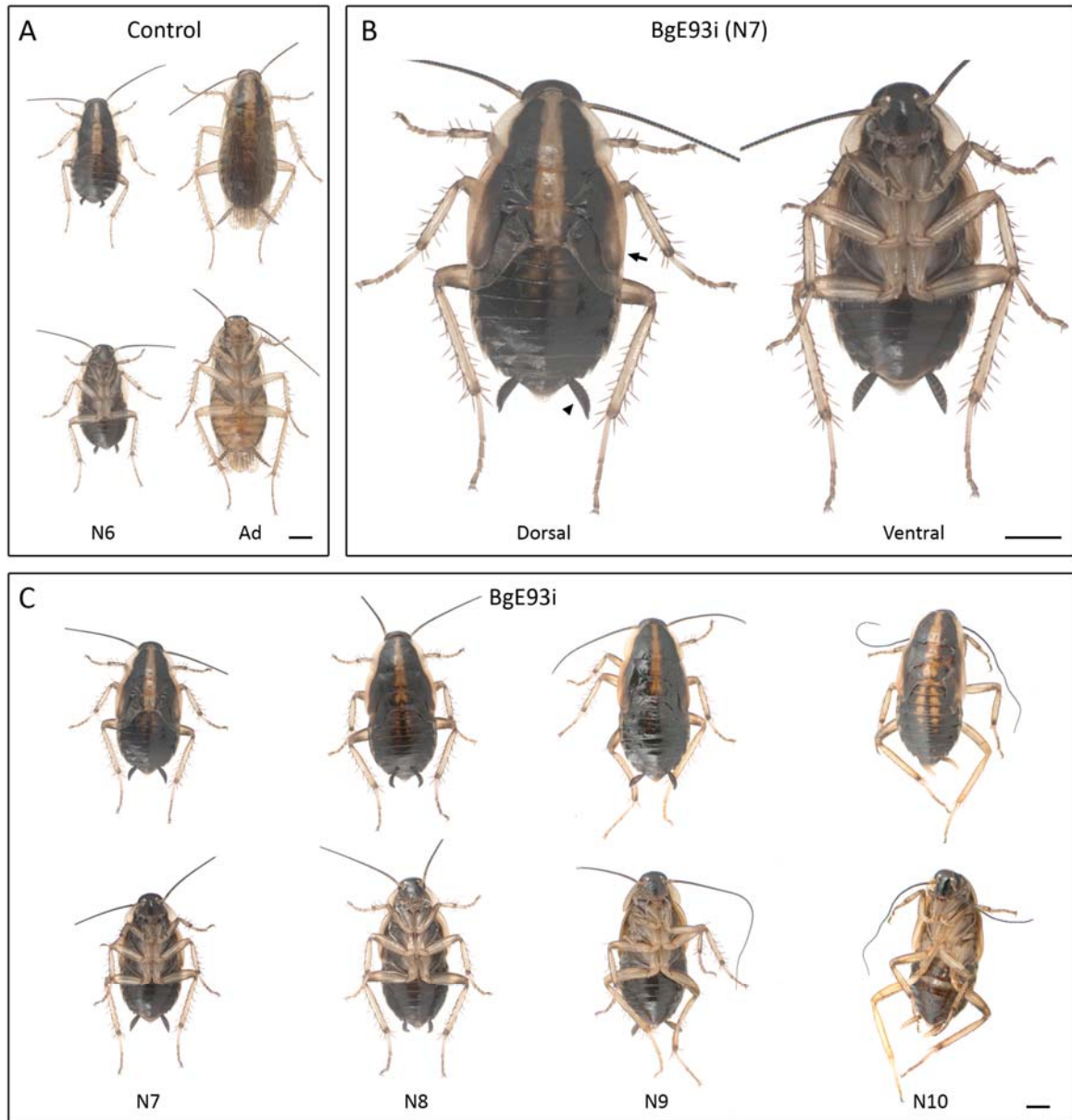


Figura 4.II.5. Efecte fenotípic del silenciament de *BgE93* des del penúltim estadi nimfal. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal (N5) amb 5 μ g de *dsMock* (animals Control) o 5 μ g de *dsBgE93-1* (animals *BgE93i*) i es va analitzar el fenotip resultant. (A) Visió dorsal i ventral d'una nimfa Control acabada d'emergir al darrer estadi (N6) i d'un adult Control, on s'observen les diferents característiques fenotípiques d'aquests dos estadis: color de la cutícula, estructures alars, amplada de la franja pronotal i cercs. (B) Visió dorsal i ventral d'una nimfa supernumerària N7 obtinguda silenciant l'expressió de *BgE93* des de N5. La fletxa negra assenyalava els estoigs que contenen les estructures alars (*wing pads*), la punta de fletxa negra indica els cercs, i la fletxa gris assenyalava el pronot, on s'observen les dues franges amples de color negre característiques de les nimfes de *B. germanica*. (C) Visió dorsal i ventral dels diferents estadis ninfals supernumeraris (N7-N10) obtinguts a conseqüència del silenciament de *BgE93*. Totes les imatges estan preses entre 0 i 24 hores després de la muda a l'estadi indicat. Escala: 2mm.

cèl·lules de l'epiteli alar mantenien un aspecte totalment hexagonal durant tota la fase nimfal (figura 4.II.7 A-A''). En segon lloc es va analitzar la glàndula protoràcica, que tal i com s'ha explicat anteriorment degenera just després del pas a l'estadi adult, convertint-se en un simple feix muscular sense capacitat de sintetitzar ecdisteroides (figura 4.II.7 B i B'). Així es va observar que la glàndula protoràcica de les nimfes supernumeràries BgE93i no patia aquesta degeneració i seguia tenint l'aspecte turgent característic de les fases ninfals (figura 4.II.7 B''). A més, seguia produint ecdisona, com ho demostra el fet que aquestes nimfes eren capaces de tornar a mudar. Un altre dels òrgans que pateix un canvi metamòrfic durant la muda a l'estadi adult són els CA, encarregats de la síntesi de l'HJ. Les cèl·lules que conformen aquest teixit passen d'un estat d'activa proliferació durant el darrer estadi nimfal, a un estat no proliferatiu després de la muda imaginal (figura 4.II.7 C i C'). En els animals BgE93i, en canvi, les cèl·lules dels CA de les nimfes supernumeràries seguien proliferant activament (figura 4.II.7 C''). A més, les cèl·lules dels CA també pateixen un altre canvi una vegada iniciat l'estadi adult en *B. germanica*: comencen a sintetitzar gran quantitat d'HJ, necessària per la reproducció dels individus adults (Raikhel et al., 2005). Aquesta funció de l'HJ, que no s'ha de confondre amb la funció antimetamòrfica que exerceix aquesta hormona durant els diferents estadis ninfals, necessita d'un increment dràstic de l'expressió de *BgHMG-CoA sintasa (BgHMG-S)* i *BgHMG-CoA reductasa (BgHMG-R)*, que codifiquen per dos dels enzims que catalitzen la síntesi de l'HJ (figura 4.II.7 D). En les nimfes supernumeràries obtingudes a partir del silenciament de *BgE93*, en canvi, no es produïa aquest augment d'expressió de *BgHMG-S* i *BgHMG-R*, i es mantenien uns nivells similars als observats a N6 (figura 4.II.7 D).

En conjunt, tots aquests resultats indicaven que les nimfes supernumeràries resultants del tractament amb *dsBgE93-1* presentaven, a més d'un aspecte fenotípic totalment nimfal, totes les característiques fisiològiques pròpies dels estadis juvenils. Això confirmava, per tant, que *BgE93* és el factor clau que controla de manera global la transició a l'estadi adult en *B. germanica*.

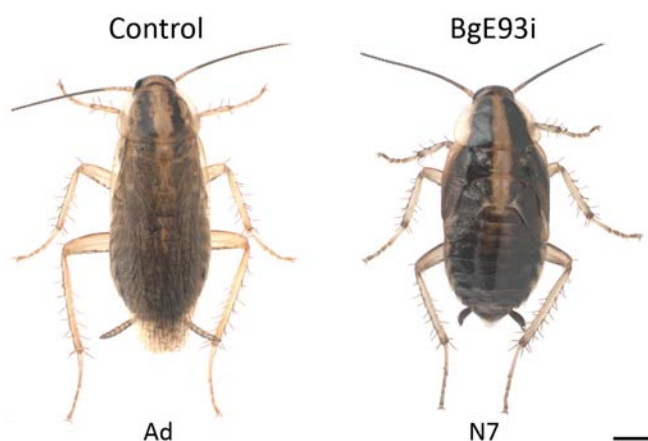


Figura 4.II.6. Efecte fenotípic del silenciament de *BgE93* amb *dsBgE93-2*. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal amb 5 µg de *dsMock* (animals Control) o 5 µg de *dsBgE93-2* (animals BgE93i) i es va analitzar el fenotip resultant. Visió dorsal d'un individu Control acabat de mudar a adult i d'un individu BgE93i acabat de mudar a un estadi nimfal supernumerari (N7).

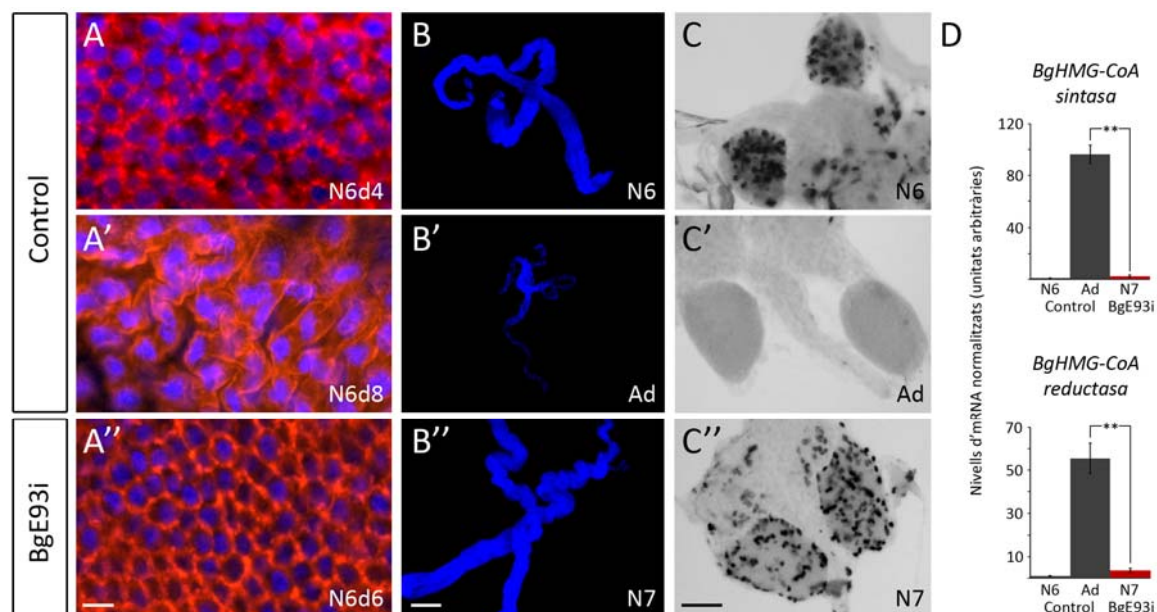


Figura 4.II.7. Característiques nimfals dels animals BgE93i. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal (N5) amb 5 μg de *dsMock* (animals Control) o 5 μg de *dsBgE93-1* (animals BgE93i) i es va analitzar el fenotip resultant. (A-A'') Anàlisi dels canvis morfològics que es donen en les cèl·lules epitelials de tegmines i ales durant el darrer estadi nimfal (N6) mitjançant immunodetecció d'actina (faloidina-TRITC, vermell) i tinció de nuclis (DAPI, blau). (A) Cèl·lules de l'ala de femelles Control de darrer estadi nimfal abans de la transformació cel·lular (N6d4). (A') Cèl·lules de l'ala de femelles Control de darrer estadi nimfal després de la transformació cel·lular (N6d8). (A'') Cèl·lules de l'ala d'individus BgE93i que no pateixen cap transformació morfològica degut a l'absència de *BgE93*. (B-B'') Anàlisi de la degeneració de la glàndula protoràcica mitjançant tinció DAPI. (B) Glàndula protoràcica d'individu Control durant el darrer estadi nimfal. (B') Glàndula protoràcica d'individu Control cinc dies després de la muda imagnal, totalment degenerada. (B'') Glàndula protoràcica d'una nimfa BgE93i supernumerària cinc dies després de la muda, sense símptomes de degeneració. (C-C'') Anàlisi de la proliferació de les cèl·lules dels CA, mitjançant marcatge amb 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) injectada 24 hores abans d'extreure els CA. (C) CA d'una femella Control de darrera fase nimfal tres dies després de la muda a N6 proliferant activament. (C') CA de femella Control tres dies després del pas a l'estadi adult que ha deixat de proliferar. (C'') CA de femella BgE93i tres dies després de mudar a un estadi nimfal supernumerari que continua proliferant. (D) Nivells d'expressió, analitzats mitjançant qRT-PCR, de *BgHMG-CoA sintasa* i *BgHMG-CoA reductasa* en CA d'individus Control de N6d4 i Ad4, i d'individus BgE93i de N7d4. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *BgActina-5C* i es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells del individu Control N6. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen una diferència significativa: $p \leq 0.005$ (t-test). Les imatges mostrades en A-A'', B-B'' i C-C'' són representatives de sis individus de cada tractament. Escales: 20 μm per A, A' i A''; 200 μm per B, B' i B''; 50 μm per C, C' i C''.

4.II.3 ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE *BgE93* I LA VIA DE L'HORMONA JUVENIL

Des que Vincent B. Wigglesworth va descobrir l'efecte antimetamòrfic de l'HJ, durant la dècada dels anys 30, nombrosos estudis en insectes hemimetàbols i holometàbols han confirmat que la seva desaparició durant el darrer estadi juvenil dels insectes, així com la del factor de transcripció Kr-h1 (responsable de la transducció del senyal antimetamòrfic de l'HJ), és essencial per permetre la transició a l'estadi adult (Jindra et al., 2013; Riddiford, 2012). En *B. germanica*, la

correlació temporal que es dona entre la caiguda dels nivells d'HJ i l'activació transcripcional de *BgE93* (just a l'inici del darrer estadi nimfal), juntament amb el fet que tenen funcions oposades (l'HJ és antimetamòrfica i *BgE93* és imprescindible pel pas a l'estadi adult), feia pensar que hi podia haver algun tipus de regulació epistàtica entre aquests dos factors. Per aquest motiu es va estudiar de manera detallada la relació entre l'HJ i *BgE93*.

4.II.3.1 Efecte de l'hormona juvenil sobre l'activació transcripcional de *BgE93*

En primer lloc es va estudiar si l'activació transcripcional de *BgE93* era deguda a la caiguda dels nivells d'HJ que es dona durant la transició N5-N6. Per això es va utilitzar un anàleg sintètic d'aquesta hormona, el metoprè, per tal de mantenir elevats els nivells d'HJ durant aquesta transició i al llarg de tota la darrera fase nimfal. Així, es van agafar femelles de penúltim estadi nimfal (N5) i se'ls va aplicar diverses quantitats de metoprè (10 nmols, 100 nmols o 500 nmols). Com a control negatiu es va aplicar el mateix volum de solvent (acetona) a femelles de la mateixa edat. Un dia després de la muda al darrer estadi nimfal (N6) se'ls van extreure les estructures alars, utilitzades com a model de teixit metamòrfic, i es van mesurar els nivells de *BgE93* mitjançant qRT-PCR. Tal i com s'observa en la figura 4.II.8, la presència de metoprè no impedia la forta activació dels nivells de *BgE93*, tot i que aquests eren lleugerament inferiors als dels individus N6 tractats amb acetona. No obstant, les diferències no resultaven significatives ($p > 0.05$, t-test).

Malgrat la forta activació de *BgE93*, el tractament amb metoprè impedia la correcta diferenciació adulta d'aquests individus, d'una manera més o menys aguda depenent de la dosi administrada (figura 4.II.8 C). Així, mentre l'aplicació de 10 nmols no provocava cap interferència aparent en la formació dels caràcters adults, el tractament amb 100 nmols comportava l'aparició d'algunes característiques ninfals, com la presència de taques fosques en la cutícula abdominal adulta i l'extensió incorrecta de tegmines i ales. D'altra banda, quan la dosi de metoprè administrada s'augmentava fins als 500 nmols s'aconseguia una juvenilització gairebé completa d'aquests animals, que eren totalment foscos i només es diferenciaven d'una nimfa *wild-type* en la zona mesotoràcica i metatoràcica, on s'observava que les tegmines i les ales no arribaven a sintetitzar correctament els *wing pads* que recobreixen aquestes estructures durant els estadis ninfals. En conjunt, aquests resultats demostraven que la juvenilització que s'assolia com a conseqüència del tractament amb metoprè no depenia del grau de repressió de *BgE93*, ja que era pràcticament idèntic entre els individus tractats amb 100 nmols i 500 nmols, i no presentava diferències significatives (segons t-test) entre els tractats amb 10 mM i 500 mM (figura 4.II.8).

A continuació, per tal de comprendre millor per què el metoprè bloquejava la metamorfosi tot i l'activació dels nivells de *BgE93* es va mesurar l'expressió de *BgKr-h1*, factor de transcripció responsable de la transducció del senyal antimetamòrfic de l'HJ (Lozano and Belles, 2011; Minakuchi et al., 2008; Minakuchi et al., 2009). D'aquesta manera es va observar que el grau de juvenilització que s'obtenia mitjançant l'aplicació de les diferents dosis de metoprè correlacionava perfectament amb els nivells de *BgKr-h1*. Així, l'expressió d'aquest factor en els individus tractats amb 500 nmols de metoprè era equiparable a la present durant el penúltim estadi nimfal i la juvenilització era pràcticament total. Després del tractament amb 100 nmols,

en canvi, tant la repressió de *BgKr-h1* com la juvenilització es donaven de manera parcial. Finalment, en els individus tractats amb 10 nmols, que no patien cap juvenilització aparent, la caiguda dels nivells de *BgKr-h1* era gairebé total (figura 4.II.8 B). En conjunt, aquests resultats suggerien que la juvenilització deguda a l'aplicació de metoprè no era conseqüència de la repressió de *BgE93*, sinó del manteniment dels nivells de *BgKr-h1*.

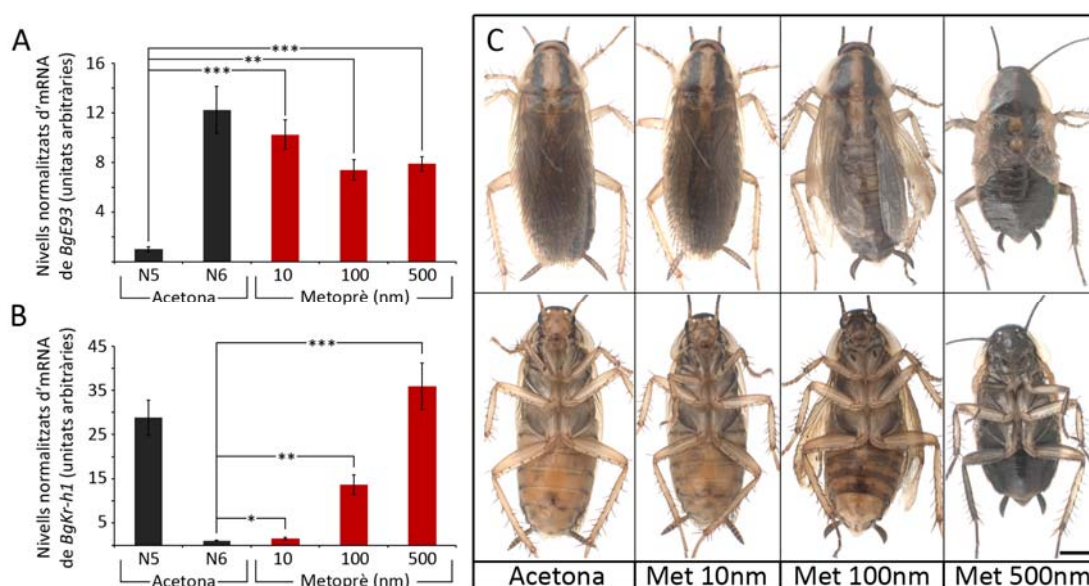


Figura 4.II.8. Efecte del tractament amb metoprè al final del penúltim estadi nimfal. Es van tractar femelles, tres dies després de la muda al penúltim estadi nimfal (N5), amb 1 µl d'acetona o 1 µl de metoprè a diferents concentracions (quantitats aplicades: 10 nmols, 100 nmols i 500 nmols). Un dia després de la muda al darrer estadi nimfal (N6) se'ls van extreure les estructures alars (tegmines i ales) i es van mesurar els nivells de (A) *BgE93* i (B) *BgKr-h1* mitjançant qRT-PCR. Els nivells dels individus acetona N5 estan mesurats en tegmines i ales extretes un dia després del tractament amb acetona. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *BgActina-5C* i es mostren en unitats arbitràries. Es va assignar el valor de 1 als nivells dels individus de cinquena fase tractats amb acetona (A) o als nivells dels individus de sisena fase tractats amb acetona (B). Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.005$ (**); $p \leq 0.001$ (***) (t-test). (C) Visió dorsal i ventral dels fenotips obtinguts després de la muda imaginal en els individus tractats amb acetona o amb les diferents dosis de metoprè, on s'observa el grau de juvenilització deguda al tractament. Escala: 2 mm.

4.II.3.2 Efecte de la interferència de *BgE93* sobre la caiguda dels nivells d'hormona juvenil i *BgKr-h1*

Una vegada comprovat que la inducció de l'expressió de *BgE93* no era deguda a la caiguda dels nivells d'HJ es va estudiar l'efecte contrari, és a dir, la possibilitat que *BgE93* fos el responsable de la desaparició de l'HJ i *BgKr-h1* durant el pas a N6. Per això es van agafar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal (N5) i es van injectar amb 5 µg de *dsMock* o 5 µg de *dsBgE93-1*. Cinc dies després de la muda d'aquestes nimfes al darrer estadi (N6) se'ls va extreure l'hemolimfa i es van mesurar els nivells d'HJ (veure Material i mètodes, apartat 3.16). Remarcablement, aquests queien de manera normal en els individus *BgE93i*, indicant que el

descens dels nivells d'HJ no era conseqüència de l'activació de *BgE93* (figura 4.II.9 A). De manera sorprenent, però, els nivells de *BgKr-h1* es mantenien elevats en aquests individus (figura 4.II.9 B), indicant que la repressió de *BgKr-h1* durant l'entrada al darrer estadi nimfal està controlada per *BgE93* i no per la caiguda de l'HJ, tal i com s'havia proposat anteriorment (Konopova et al., 2011; Lozano and Belles, 2011).

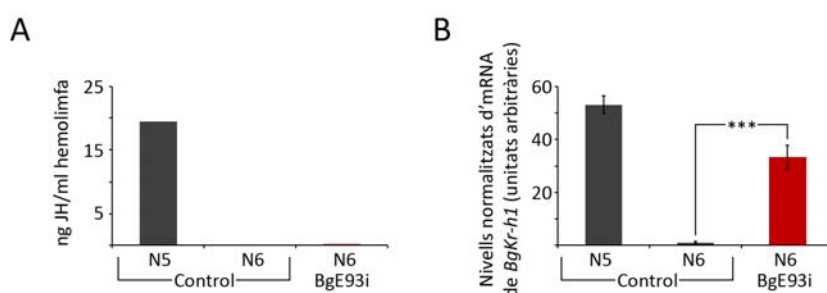


Figura 4.II.9. Efecte del silenciament de *BgE93* en el penúltim estadi nimfal sobre els nivells d'hormona juvenil i *BgKr-h1*. Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal (N5) amb 5 μ g de *dsMock* (animals Control) o 5 μ g de *dsBgE93-1* (animals BgE93i). (A) Es van mesurar els nivells d'hormona juvenil (HJ) en l'hemolimfa d'individus Control de penúltim (N5) i últim (N6) estadi nimfal i d'individus BgE93i a N6, cinc dies després de la muda corresponent. Per aquest anàlisi es van extreure 70-80 μ l d'hemolimfa de 20-25 individus de cada tractament. Els valors s'indiquen en ng d'HJ per ml d'hemolimfa. (B) Nivells d'expressió de *BgKr-h1*, analitzats mitjançant qRT-PCR, en tegmines i ales d'individus Control de N5 i N6, així com en individus BgE93i de N6, cinc dies després de la muda corresponent. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *BgActina-5C* i es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control N6. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.0005$ (***) (t-test).

Aquest resultat suggeria, a més, que el manteniment dels alts nivells de *BgKr-h1* podia ser el responsable dels caràcters juvenils en les nimfes supernumeràries BgE93i. Per tal d'estudiar aquesta possibilitat es va injectar *dsBgE93-1* en femelles de darrer estadi nimfal, 12 hores després de la muda a N6. Aquest nou disseny experimental permetia que es donés de manera normal la desaparició de l'HJ i la repressió dels nivells de *BgKr-h1*, tal i com es va comprovar tres dies després del tractament (figura 4.II.10 A i B). A més, els nivells d'expressió de *BgE93* també havien disminuït dràsticament en aquest individu, indicant que el tractament era efectiu (figura 4.II.10 C). Remarcablement, en aquestes condicions d'absència d'HJ, *BgKr-h1* i *BgE93*, les nimfes BgE93i mudaven igualment a un estadi nimfal supernumerari (N7) perfecte (figura 4.II.10 D). A més, de la mateixa manera que quan el tractament amb *dsBgE93-1* s'aplicava a N5, aquestes nimfes no assolien mai l'estadi adult, arribant a generar fins a quatre estadis nimfals supernumeraris (N10). Aquests resultats indicaven, doncs, que l'HJ i *BgKr-h1* no són imprescindibles pel manteniment dels caràcters nimfals en absència de *BgE93*. Per altra banda, confirmaven que l'absència d'HJ i de *BgKr-h1* no és suficient per assolir l'estadi adult. En definitiva, els resultats obtinguts demostraven que *BgE93* exerceix una doble funció durant la metamorfosi: (a) l'activació del programa genètic adult i (b) la repressió de *BgKr-h1*, necessària per la correcta diferenciació adulta.

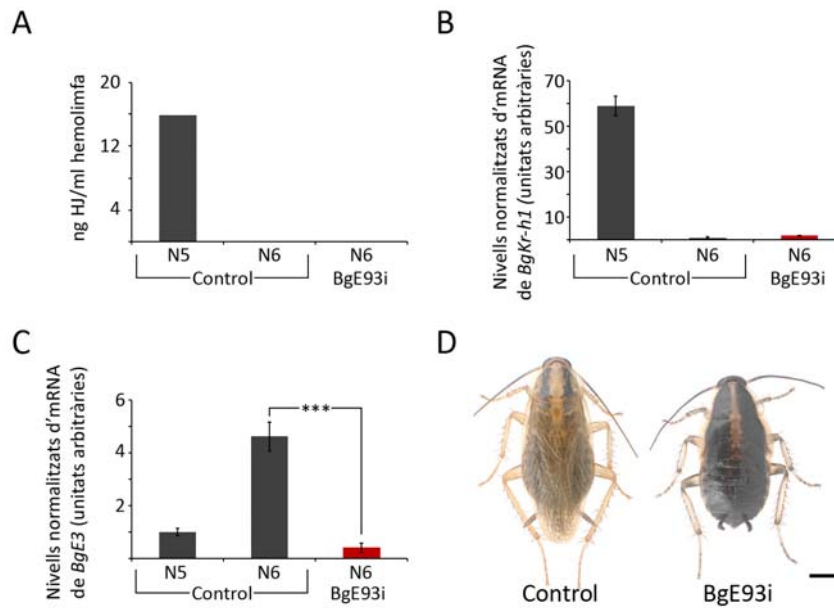


Figura 4.II.10. Efecte del silenciament de *BgE93* al darrer estadi ninfal sobre els nivells d'hormona juvenil i *BgKr-h1*. Es van tractar femelles 12 hores després d'emergir a l'últim estadi ninfal (N6) amb 5 μ g de *dsMock* (animals Control) o 5 μ g de *dsBgE93-1* (animals BgE93i). Per les mesures en animals Control N5 es van tractar femelles recent emergides a N5 amb 5 μ g de *dsMock*. (A) Es van mesurar els nivells d'HJ en l'hemolimfa d'individus Control i d'individus BgE93i tres dies després del tractament. Es van extreure 70-80 μ l d'hemolimfa de 20-25 individus de cada tractament. Els valors s'indiquen en ng d'HJ per ml d'hemolimfa. (B-C) Els nivells d'expressió de *BgKr-h1* (B) i *BgE93* (C) es van mesurar, mitjançant qRT-PCR, en tegmines i ales d'individus Control de penúltim (N5) i últim (N6) estadi ninfal i d'individus BgE93i de N6, tres dies després del tractament. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *BgActina-5C* i es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control N6 (B) o als nivells dels individus Control N5 (C). Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.001$ (***) (t-test). (D) Visió dorsal d'un adult Control i d'una nimfa supernumerària (N7) resultant del tractament amb *dsBgE93-1* des de l'inici de N6. Escala: 2 mm.

CAPÍTOL 4.III

ESTUDI DEL PAPER D'E93 EN LA METAMORFOSI DELS INSECTES HOLOMETÀBOLS *Tribolium castaneum* I *Drosophila melanogaster*

En els insectes holometàbols el pas de l'estadi juvenil a l'estadi adult comporta una transformació molt més radical que en el cas dels insectes hemimetàbols, ja que implica la substitució de pràcticament tots els teixits larvaris per les noves estructures adultes. Aquesta transformació es dona durant els períodes prepupal (darrers dies de l'últim període larvari, on es forma la pupa) i pupal, i igual que en els insectes hemimetàbols està controlada per la 20E i l'HJ (Dubrovsky, 2005; Riddiford, 2012).

En *T. castaneum*, insecte holometàbol basal, la majoria d'estructures adultes es formen a partir de primordis que durant els estadis larvaris contribueixen a la formació de les estructures larvàries, com per exemple el tracte digestiu, o a partir de l'estructura larvària sencera, com és el cas de la pota (Suzuki et al., 2009; Truman and Riddiford, 2002). Un cop iniciada la prepupa les cèl·lules imaginals proliferen i canvien la seva conformació cel·lular, formant les estructures pupals. Aquestes, al seu torn, s'acabaran de diferenciar durant l'estadi de pupa per donar lloc a l'individu adult (veure Introducció, figura 1.13). En *D. melanogaster*, en canvi, la majoria de les estructures adultes es formen a partir de discs imaginals. Aquests, a diferència dels primordis de *T. castaneum*, no formen part de l'estructura larvària, i comencen a proliferar quan s'inicia el període de larva (Madhavan and Schneiderman, 1977). Al principi de la metamorfosi aquests discs esverteixen i formen les estructures de la pupa, que s'acaben de diferenciar durant aquesta fase per donar lloc a les estructures adultes.

En el següent capítol es mostren els estudis funcionals duts a terme en aquests dos insectes holometàbols per tal de comprovar si la funció d'E93 com a especificador adult observada en *B. germanica* està conservada en els insectes amb metamorfosi completa. Per això, s'analitzen els patrons d'expressió de l'ortòleg *E93* en aquests dos insectes holometàbols, així com l'efecte que provoca la seva absència durant la metamorfosi.

4.III.1 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'E93 DURANT LA METAMORFOSI DE *Tribolium castaneum*

4.III.1.1 Característiques del gen *E93* en *Tribolium castaneum*

El gen que codifica per TcE93 es troba en el *locus* *LOC655012* del cromosoma 9 de *T. castaneum* i està format per quatre exons i tres introns (figura 4.III.1 A). L'mRNA predit consta de 2655 parells de bases que codifiquen pels 884 aminoàcids que conformen la proteïna TcE93, la qual conté un domini Pipsqueak d'unió a DNA (figura 4.III.1 B).

El primer pas per la caracterització de TcE93 va ser l'estudi de la seva expressió durant la darrera fase larvària (L7), que inclou el període de formació de la pupa (prepupa), i l'estadi pupal. Es van escollir aquestes fases del desenvolupament perquè abracen tot el període metamòrfic. Com es pot veure a la figura 4.III.2, els nivells de *TcE93* augmentaven durant els primers dies de L7 (fins a 18 vegades a dia 2 respecte a l'expressió a l'inici de la fase, L7d0), i aquest increment es feia molt més acusat durant la prepupa (100 vegades major just abans de pupar). L'expressió de *TcE93* seguia augmentant fins al segon dia de la fase pupal (300 vegades), moment en el qual començava a disminuir. Aquests resultats mostraven que *TcE93* s'expressa

fortament durant tot el període metamòrfic, suggerint que podia tenir una funció important en aquest procés.

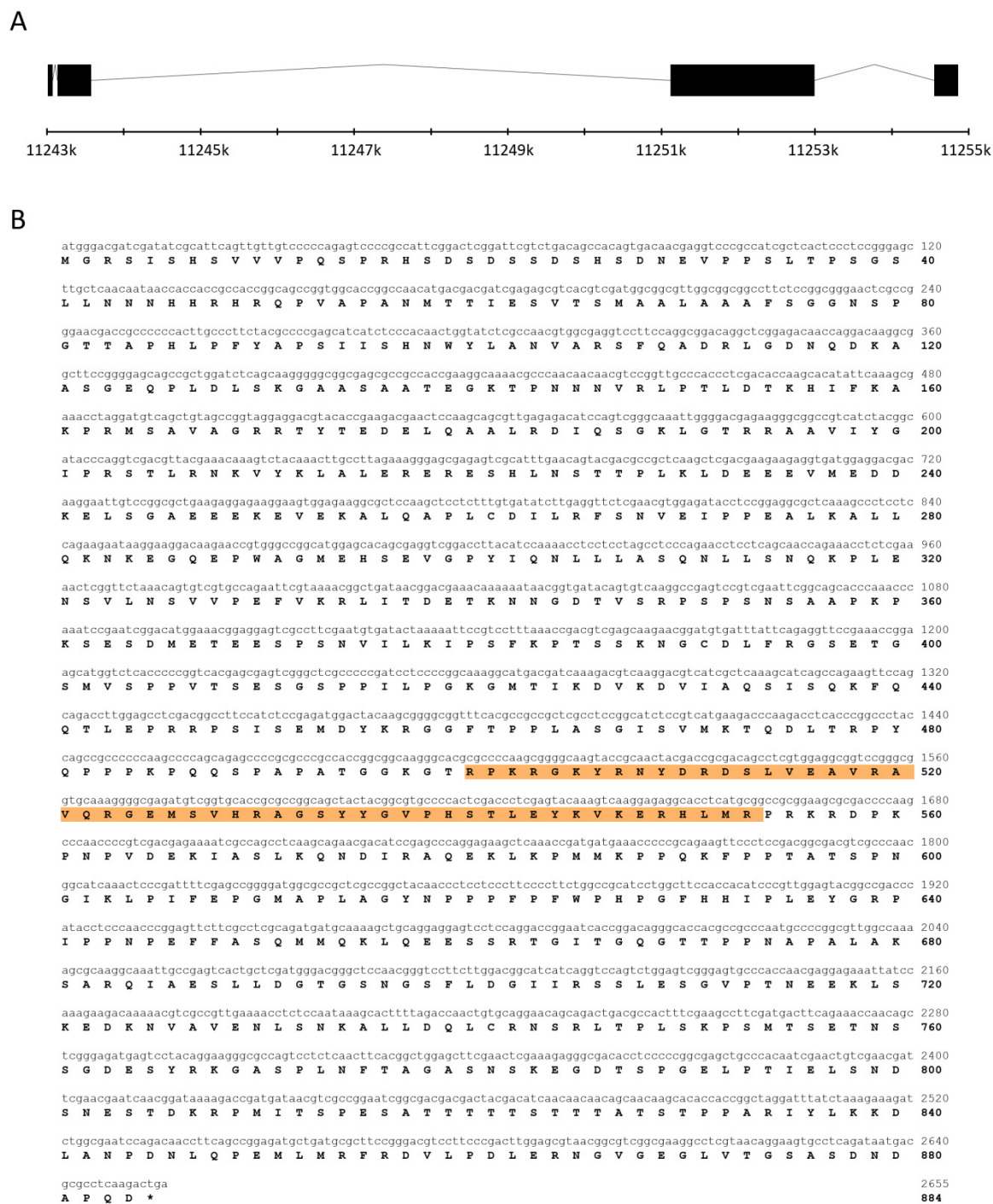


Figura 4.III.1. Estructura del gen *TcE93* de *Tribolium castaneum*. (A) Estructura del gen *TcE93*, format per quatre exons (caixes negres) i tres introns. (B) Seqüència de l'mRNA de *TcE93* (número d'accés XM961480). En minúscula es mostren els nucleòtids i en majúscula els aminoàcids. La regió que comprèn el domini Pipsqueak està ressaltada en taronja.

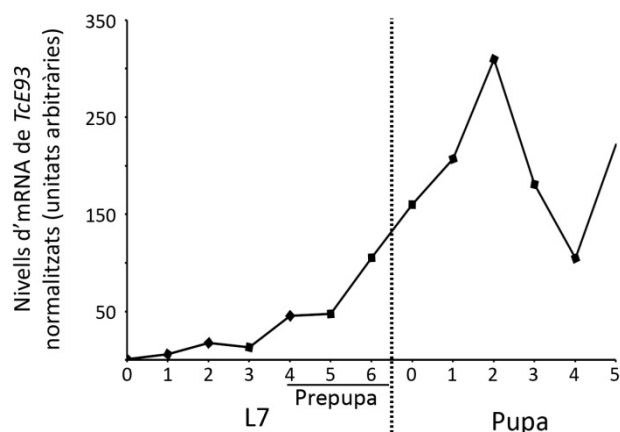


Figura 4.III.2. Estudi de l'expressió de TcE93 al llarg del període metamòrfic de *Tribolium castaneum*. Patrons d'expressió de TcE93, analitzats mitjançant qRT-PCR, durant l'última fase larvària (inclosa la prepupa) i la pupa. Per cadascuna de les edats indicades els nivells es van mesurar a partir de l'mRNA total de cinc individus. Els valors es van normalitzar amb l'expressió del gen *TcRpL32* i es mostren en unitats arbitràries, adjudicant el valor de 1 a l'expressió present just després de la muda a L7 (L7d0). El resultat és representatiu de tres rèpliques.

4.III.1.2 Efecte del silenciament de TcE93

Per estudiar la funció de TcE93 durant la metamorfosi de *T. castaneum* es va utilitzar, novament, la tècnica de l'RNAi *in vivo*. Per això es va seleccionar un fragment de 348 pb de la seqüència de TcE93 (*dsTcE93*, figura 4.III.3 A) i es va utilitzar com a control negatiu un fragment de 307 pb del gen de la polihedrina del nucleopolihedrovirus *Autographa californica* (*dsMock*). Es van injectar larves recent mudades al darrer estadi amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcE93i). Al cap de sis dies les larves Control mudaven a pupa sense cap problema, així com aproximadament la meitat de les tractades amb *dsTcE93* (56.3 %). De la resta de larves TcE93i, el 12.1 % intentaven mudar però no aconseguien desprendre's de la cutícula larvària, aturant el seu desenvolupament durant la fase prepupal. Extraient la cutícula de manera manual es podia comprovar que aquestes individus tenien un aspecte pupal i havien desenvolupat les ales (figura 4.III.3 F). Finalment, el 20.9 % de les larves TcE93i mudaven a un nou estadi larvari (L8), tot i que mostraven un modest creixement en la zona on es formen les èlitres i les ales, en el segon i tercer segments toràcics (taula 4.III.1 i figura 4.III.3).

Taula 4.III.1. Efecte de la interferència de TcE93 sobre la formació de la pupa.

Tractament	n	Mortalitat larvària	Fenotip en muda pupal		
			Larva supernumerària	Aturada en el desenvolup.	Pupa
Control	128	11 (8.6 %)	—	—	117 (91.4 %)
TcE93i	215	23 (10.7 %)	45 (20.9 %)	26 (12.1 %)	121 (56.3 %)

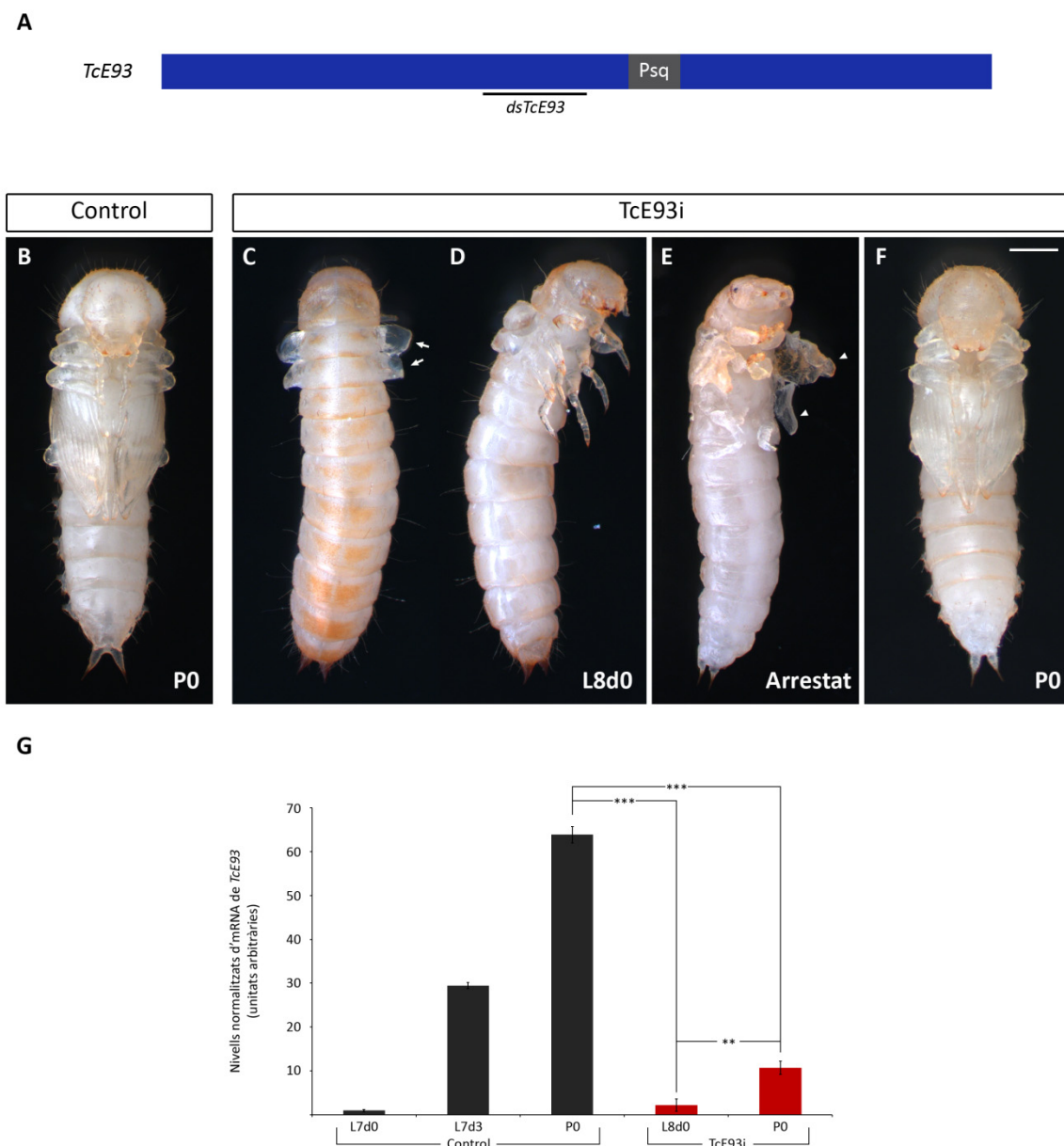


Figura 4.III.3. Efecte del silenciament de *TcE93* en *Tribolium castaneum*. (A) Representació esquemàtica de la regió codificant de *TcE93*, on es marca en gris el domini Pipsqueak (Psq). La regió utilitzada per generar el *dsRNA* s'indica com a *dsTcE93*. (B-F) Efecte del silenciament de *TcE93* durant la darrera fase larvària (L7). Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsMock* (animals Control) o 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsTcE93* (animals TcE93i), i es va observar l'efecte del tractament sobre la formació de la pupa. (B) Visió ventral d'un individu Control recent pupat. (C-D) Visió dorsal (C) i ventral (D) d'una larva TcE93i supernumerària (L8) recent mudada. Les fletxes assenyalen el creixement moderat observat en les zones de l'èlitre i l'ala. (E) Visió ventral d'un individu TcE93i que no ha aconseguit completar la muda pupal, al qual se li ha extret manualment la cutícula larvària. Les puntes de fletxa indiquen la formació de les èlitres i les ales. (F) Visió ventral d'un individu TcE93i recent pupat que presenta un aspecte normal. (G) Es van mesurar els nivells d'expressió de *TcE93*, mitjançant qRT-PCR, en animals Control i en larves supernumeràries i pupes TcE93i de les edats assenyalades. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpl32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control L7d0. Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.005$ (**) i $p \leq 0.00001$ (***) (t-test). Escala: 0.5 mm.

Per tal de confirmar que els fenotips observats eren deguts a una disminució dels nivells de *TcE93*, es van mesurar aquests en les larves supernumeràries i les pupes TcE93i. Tal i com s'observa en la figura 4.III.3 G, l'expressió de *TcE93* es veia dràsticament reduïda en tots dos casos, en comparació amb els nivells presents en una pupa Control recent emergida. A més, s'observava una perfecta correlació entre el grau de caiguda dels nivells de *TcE93* i el fenotip resultant, ja que la reducció era més severa en les larves supernumeràries (96.5 % de reducció) que en les pupes TcE93i (83.2 % de reducció).

4.II.1.2.1 Estudi de les larves supernumeràries obtingudes per l'absència de TcE93

En un anàlisi més detallat dels individus TcE93i que mudaven a un estadi larvari supernumerari (L8) es va comprovar que, a excepció del modest creixement observat en la zona de les èlitres i les ales, no presentaven cap dels canvis morfològics que es donen durant la formació de la pupa. Així, no presentaven *gin traps*, estructures defensives exclusives de l'estadi pupal que es troben a la part lateral de l'abdomen, i els *urogomphis* tenien un aspecte larvari (figura 4.III.4 A-A''). A més, les potes, antenes, mandíbules i maxil·les també seguien mostrant la morfologia característica dels estadis larvaris (figura 4.III.4 B-E''). Cap d'aquestes estructures havia iniciat, doncs, la transformació que té lloc durant el període prepupal. D'altra banda, tal i com s'ha assenyalat prèviament, aquestes larves supernumeràries mostraven una reducció dels nivells de *TcE93* significativament major que la de les pupes TcE93i, presentant uns nivells equivalents als de L7d0 (figura 4.III.3 G). Aquest fet suggereix l'existència d'un llindar per sobre del qual l'expressió de *TcE93* possibilitaria la formació de la pupa, mentre que per sota d'aquest l'individu passaria a un nou estadi larvari.

4.II.1.2.2 Estudi de les pupes obtingudes pel tractament amb dsTcE93

Tot i que un 20.9 % de les larves tractades amb *dsTcE93* mudaven a un estadi larvari supernumerari, la majoria d'individus TcE93i pupaven amb un aspecte normal (56.3 %), excepte pel fet que tenien les èlitres i les ales significativament més petites que les de les pupes Control (figura 4.III.5). Així, les èlitres presentaven un 12.1 % de reducció de la seva llargada, mentre que les ales eren un 14.9 % més curtes. Malgrat el seu aspecte normal, aquestes pupes no assolien mai l'estadi adult, ni presentaven cap dels canvis de pigmentació característics del final del període pupal (figura 4.III.6 A). Per això es va decidir fer un anàlisi més detallat de les potes, antenes, mandíbules i maxil·les d'aquests individus, cinc dies després de la muda a l'estadi pupal. La presa de mostres en aquest punt (just abans de la muda a l'estadi adult, després de completar-se l'apòlisi) permetia estudiar el grau de diferenciació assolit per aquestes estructures durant el període pupal. Tal i com es mostra a la figura 4.III.6 D, en les potes dels individus Control s'observava la cutícula pupal i, a l'interior d'aquesta, la pota adulta perfectament formada, amb un grau de segmentació i pigmentació que indicaven que les transformacions metamòrfiques s'havien donat correctament i que la muda a l'estadi adult s'estava apunt de produir. En les potes de les pupes TcE93i, en canvi, tot i que el procés d'apòlisi s'havia produït de manera correcta, la pota que s'observava a l'interior no presentava ni la segmentació ni la

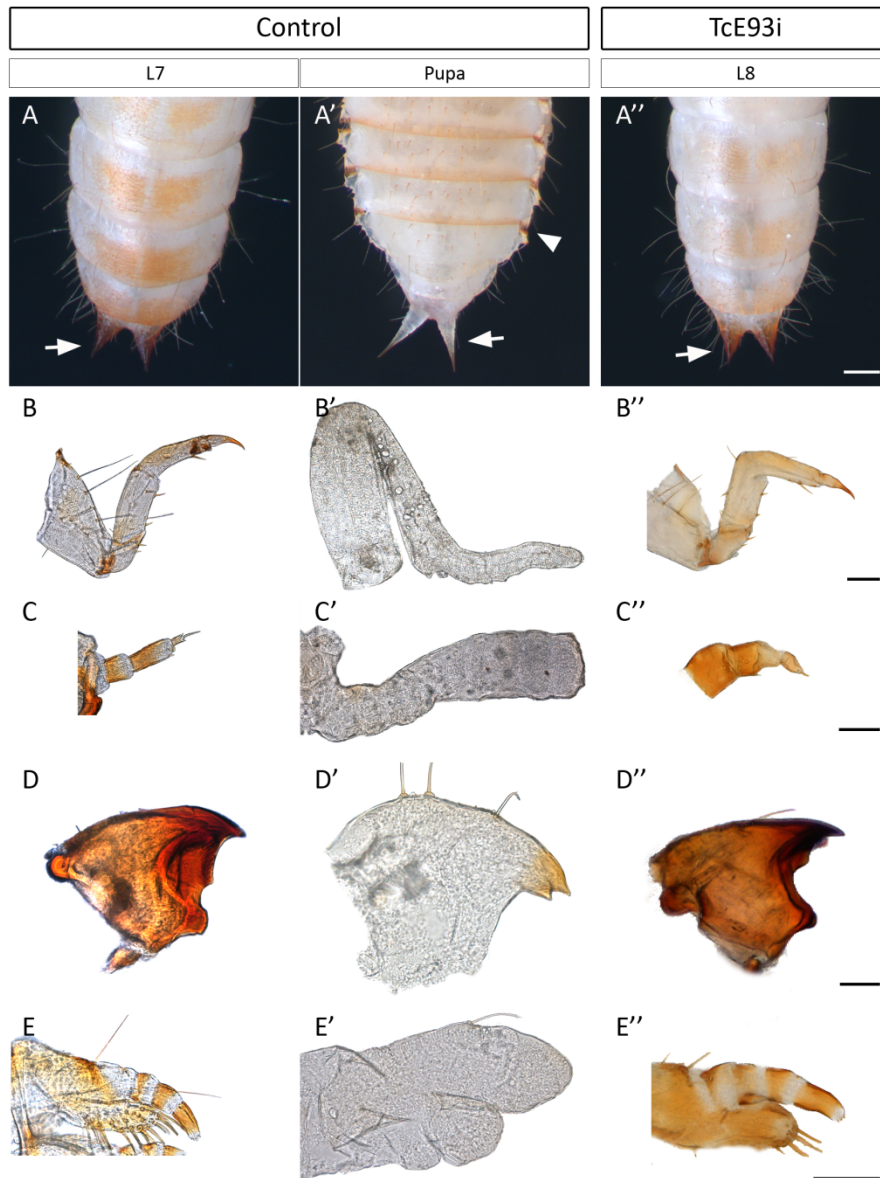


Figura 4.III.4. Estudi fenotípic de les larves supernumeràries (L8) obtingudes pel tractament amb *dsTcE93*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase (L7) amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcE93i), i es va analitzar la morfologia de les estructures dels individus TcE93i que mudaven a un estadi larvari supernumerari. (A-A'') Detall de la zona posterior de l'abdomen, en posició dorsal, de larves (A) i pupes (A') Control, així com de larves TcE93i supernumeràries (A''). Només s'observen *gin traps* (estructures específicament pupals) en les pupes Control (punta de fletxa blanca). Les fletxes blanques corresponen assenyalen els *urogomphis*. (B-E'') Observació, a través de microscopia de camp clar, de la morfologia de potes (B-B''), antenes (C-C''), mandíbules (D-D'') i maxil·les (E-E'') de larves i pupes Control recent emergides, així com de larves supernumeràries TcE93i. Escales: 0.2 mm en A-A''; 100 µm en B-B'', C-C'' i E-E''; 50 µm en D-D''.

pigmentació característiques de la diferenciació adulta (figura 4.III.6 D'). De la mateixa manera, les antenes Control es veien segmentades i pigmentades, i amb les pilositats sensorials pròpies de l'estadi adult, mentre que les antenes de les pupes TcE93i no mostraven cap d'aquests canvis (figura 4.III.6 E-E'). Unes diferències semblants s'observaven en les maxil·les (figura 4.III.6 F-F').

Finalment, l'anàlisi de les mandíbules indicava que, mentre en els individus Control presentaven una estructura i pigmentació totalment adultes, en els individus TcE93i mantenien l'estructura pupal (figura 4.III.6 G-G'). Totes aquestes observacions evidenciaven, doncs, que l'absència de TcE93 impedia la diferenciació adulta d'aquestes estructures.

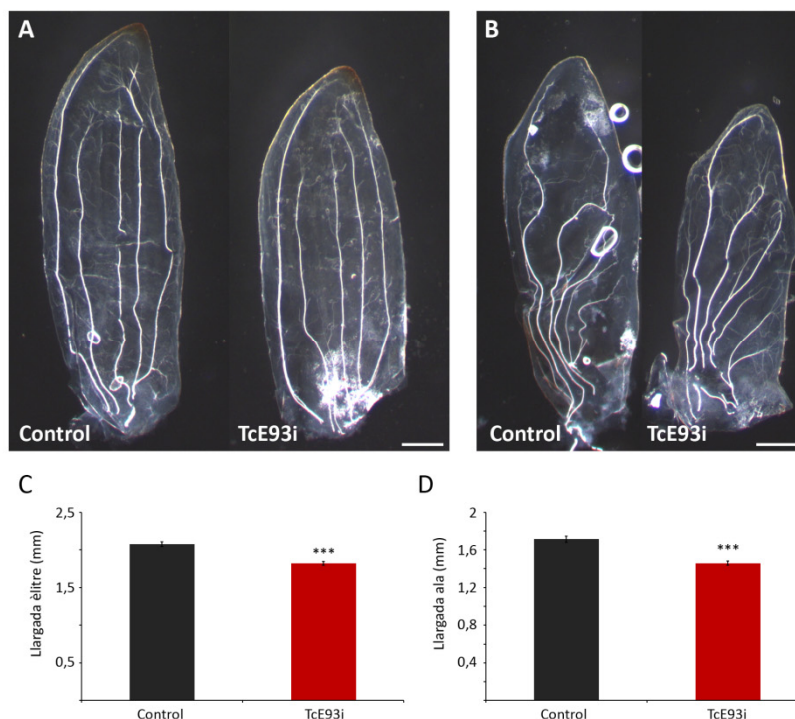


Figura 4.III.5. Efecte del silenciament de TcE93 en la mida de les èlitres i les ales pupals. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase (L7) amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcE93i) i es van analitzar les estructures alars dels individus que pupaven. (A-B) Èlitres (A) i ales (B) de pupes Control i TcE93i recent emergides. (C-D) Mesura de la llargada de les èlitres (C) i les ales (D) d'aquests individus (n=10). Els asteriscs indiquen una diferència significativa: $p \leq 0.00001$ (***) (t-test). Escala: 0.2 mm en A i B.

Tot seguit, per tal d'estudiar les estructures abdominals d'aquests individus, es va retirar manualment la cutícula pupal d'aquesta zona i es van analitzar les diferents estructures mitjançant microscopia electrònica de rastreig. D'aquesta manera es va comprovar que, mentre els individus Control mostraven unes estructures totalment adultes, els TcE93i exhibien una repetició de les estructures pupals (figura 4.III.6 H-J'). En primer lloc presentaven un nou parell d'*urogomphis* pupals, que en condicions normals desapareixen després de la muda a adult (figura 4.III.6 H-H'). També tenien *gin traps* a la part lateral de l'abdomen, estructures específiques de l'estadi pupal (figura 4.III.6 B, I-I'). Per últim, mentre que en els Control s'observava la microescultura típica de la cutícula adulta, amb solcs hexagonals i pilositats sensibles, els individus TcE93i mostraven una superfície cuticular amb característiques pupals, (figura 4.III.6 J-J'). Així doncs, l'absència de TcE93 no només impedia la diferenciació adulta sinó

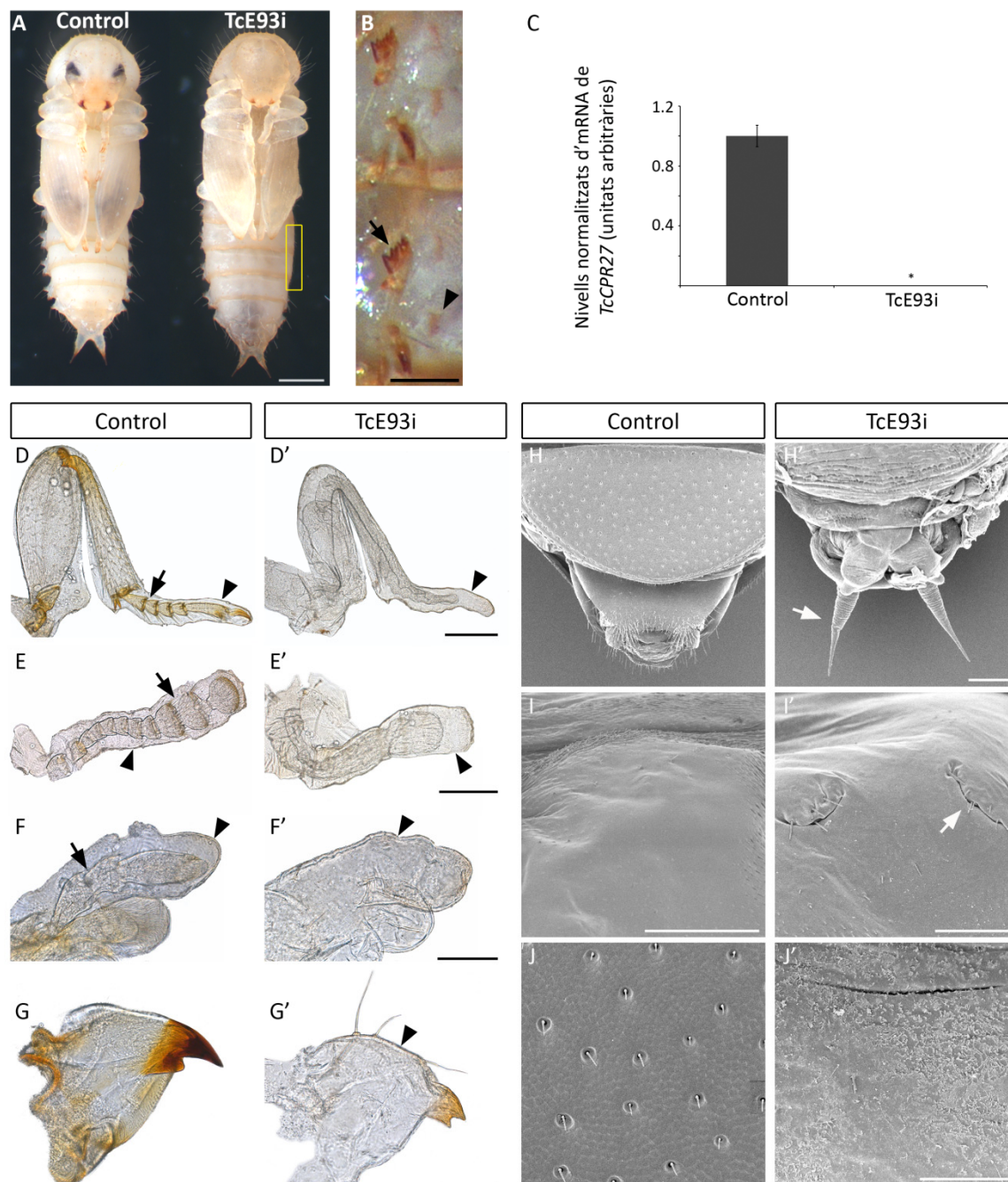


Figura 4.III.6. Efecte del silenciament de *TcE93* en la diferenciació adulta de *Tribolium castaneum*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsMock* (animals Control) o 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsTcE93* (animals TcE93i) i es van analitzar els individus que pupaven normalment. (A) Visió ventral d'una pupa Control i d'una pupa TcE93i cinc dies després de l'inici de l'estadi pupal. (B) Detall de la zona lateral de l'abdomen de la pupa TcE93i (rectangle groc en A) on s'observa la presència dels *gin traps* de la cutícula pupal externa (fletxa negra) i dels *gin traps* ectòpics que es detecten a través d'aquesta (punta de fletxa negra). (C) Nivells d'expressió de *TcCPR27* en pupes Control i TcE93i cinc dies després de l'inici d'aquest estadi, analitzats mitjançant qRT-PCR. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpl32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=3). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor 1 a l'expressió dels individus Control. L'asterisc indica diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*) (t-test). (D-J') Anàlisi morfològic de les estructures de pupes Control i TcE93i cinc dies després de l'entrada a pupa. (D-G') Visió a través de microscopia de camp clar de la diferenciació de potes (D-D'), antenes (E-E'), maxil·les (F-F') i mandíbules (G-G'). Les puntes de fletxa indiquen la cutícula pupal externa, mentre que les fletxes indiquen

que, de manera semblant a l'observat a *B. germanica*, provocava la repetició de l'estadi, és a dir, la formació d'una pupa supernumerària.

Per tal de confirmar que en absència de TcE93 no s'activava el programa genètic adult es va estudiar l'expressió de *TcCPR27* en les pupes TcE93i. Aquest gen codifica per una proteïna específica de cutícula adulta que s'ha demostrat essencial per a la correcta formació de l'èlitr, així com de les cutícules toràcica i abdominal, i la seva expressió augmenta exclusivament durant el final de l'estadi pupal (Arakane et al., 2012). Tal i com s'esperava, en les pupes TcE93i aquesta activació no es produïa, confirmant que l'absència de TcE93 impedeix l'inici del programa genètic adult (figura 4.III.6 C).

En *T. castaneum*, igual que en la resta d'insectes holometàbols, la desaparició dels factors de transcripció TcKr-h1 i TcBr un cop assolit l'estadi pupal és imprescindible per a que es doni la diferenciació adulta (Minakuchi et al., 2009; Suzuki et al., 2008). TcKr-h1 ha estat descrit com el responsable de transmetre el senyal de l'HJ que manté les larves en estat premetamòrfic (Minakuchi et al., 2009), mentre que TcBr s'ha denominat l'especificador pupal (Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy et al., 2008; Suzuki et al., 2008) (veure Introducció, apartat 1.4.3). A més, en el capítol anterior s'ha demostrat que la disminució dels nivells de *BgKr-h1* durant la darrera fase nimfal de *B. germanica*, imprescindible per passar a l'estadi adult, depèn de la presència de BgE93. Per tot això, es va voler comprovar si la repressió de *TcKr-h1* i *TcBr* es donava correctament en els individus sense TcE93. Remarcablement, tal i com s'observa a la figura 4.III.7, l'expressió d'aquests dos factors de transcripció es mantenia elevada en les pupes TcE93i, indicant que TcE93 és l'encarregat d'eliminar-ne l'expressió durant l'estadi pupal de *T. castaneum*.

Donada la conservació de la funció repressora d'E93 sobre els nivells de *Kr-h1* en *B. germanica* i *T. castaneum*, es va decidir estudiar si la capacitat repressora d'E93 sobre *Br* observada en *T. castaneum* es donava també en *B. germanica*. De manera destacable, tot i que *Br* no té una funció metamòrfica en els insectes hemimetàbols, sinó que només té un paper en la regulació del creixement de l'ala (Erezyilmaz et al., 2006; Huang et al., 2013), s'observà que l'expressió de *BgBr* es mantenia elevada durant el darrer estadi nimfal en absència de BgE93 (figura 4.III.7 C). Tots aquests resultats indicaven, doncs, que la funció repressora d'E93 sobre l'expressió de *Kr-h1* i *Br* ja es donava en insectes hemimetàbols, i s'ha conservat en insectes holometàbols basals.

la segmentació de l'estructura interna. En la maxil·la Control (F) no hi ha la cutícula pupal. (H-J') Imatges de microscopia electrònica de rastreig dels mateixos animals un cop retirada la cutícula pupal. (H-H') Detall de la zona posterior de l'abdomen. La fletxa assenyala la presència d'*urogomphis* pupals supernumeraris en els individus TcE93i. (I-I') Detall de la zona lateral de l'abdomen, on s'assenyalen amb una fletxa els *gin traps* ectòpics dels animals TcE93i. (J-J') Visió de la cutícula ventral de l'abdomen. (J) Microescultura adulta caracteritzada per solcs hexagonals i presència de pilositats sensibles. (J') Estructura cuticular de característiques pupals. Escalles: 0.5 mm en A; 200 µm en D-D', E-E'; 100 µm en B, F-F', G-G', H-H', I; 50 µm en I', J-J'.

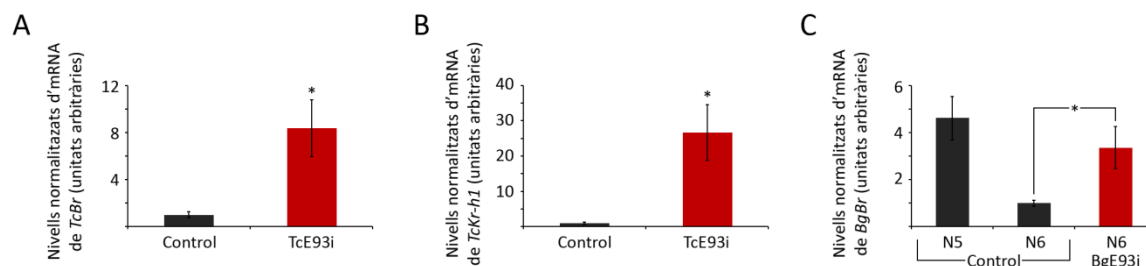


Figura 4.III.7. Acció repressora d'E93 sobre l'expressió de *Kr-h1* i *Br* en *Tribolium castaneum* i *Blattella germanica*. Es van injectar larves de *T. castaneum* recent emergides a la darrera fase amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcE93i) i es van analitzar els individus que pupaven normalment. (A-B) Nivells d'expressió, mitjançant qRT-PCR, de (A) *TcBr* i (B) *TcKr-h1* en pupes Control i TcE93i, dos dies després de l'entrada a aquest estadi. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpl32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control. L'asterisc indica diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*) (t-test). (C) Es van tractar femelles recent emergides al penúltim estadi nimfal (N5) amb 5 µg de *dsMock* (animals Control) o 5 µg de *dsBgE93-1* (animals BgE93i) i es van mesurar els nivells d'expressió de *BgBr* (mitjançant qRT-PCR) en tegmines i ales d'individus Control de penúltim i últim (N6) estadi nimfal i d'individus BgE93i de N6, cinc dies després de la muda corresponent. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *BgActina-5C* i es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control N6. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). L'asterisc indica diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*) (t-test).

4.II.1.2.3 Anàlisi funcional de *TcE93* durant l'estadi pupal

Per tal de confirmar que la incapacitat dels animals tractats amb *dsTcE93* de transformar-se en adults era deguda a la funció que *TcE93* exerceix durant l'estadi pupal, es van tractar pupes recent emergides amb 5 µg/µl de *dsMock* (Control) o de *dsTcE93* (TcE93i), i es va analitzar el fenotip resultant sis dies després. En primer lloc es va comprovar que els nivells d'mRNA de *TcE93* disminuïen significativament en les pupes TcE93i (figura 4.III.8 A). A més, de la mateixa manera que quan s'injectava el *dsTcE93* a l'inici de la darrera fase larvària, no s'activava l'expressió de *TcCPR27* (figura 4.III.8 B). L'anàlisi fenotípic d'aquests individus, un cop retirada la cutícula pupal, mostrava novament la duplicació de les estructures pupals (figura 4.III.8 E-G'). Així, s'observava la formació d'un nou parell d'*urogomphis* (figura 4.III.8 E-E') i de *gin traps* (figura 4.III.8 F-F'), i la superfície de la cutícula abdominal no presentava la microescultura característica de la cutícula adulta, tot i que s'observava la presència de nombrosos pèls sensitius (figura 4.III.8 G-G'). Aquests resultats confirmaven, doncs, la formació d'un estadi pupal supernumerari degut a l'absència de *TcE93* durant el període pupal. D'altra banda, tal i com passava en els individus tractats des de l'inici del darrer estadi larvari, els nivells de *TcBr* es mantenien elevats (figura 4.III.8 C). L'expressió de *TcKr-h1*, en canvi, disminuïa de manera normal, ja que la inhibició de la seva expressió ocorre just abans de l'inici del període pupal (figura 4.III.8 D) (Minakuchi et al., 2009).

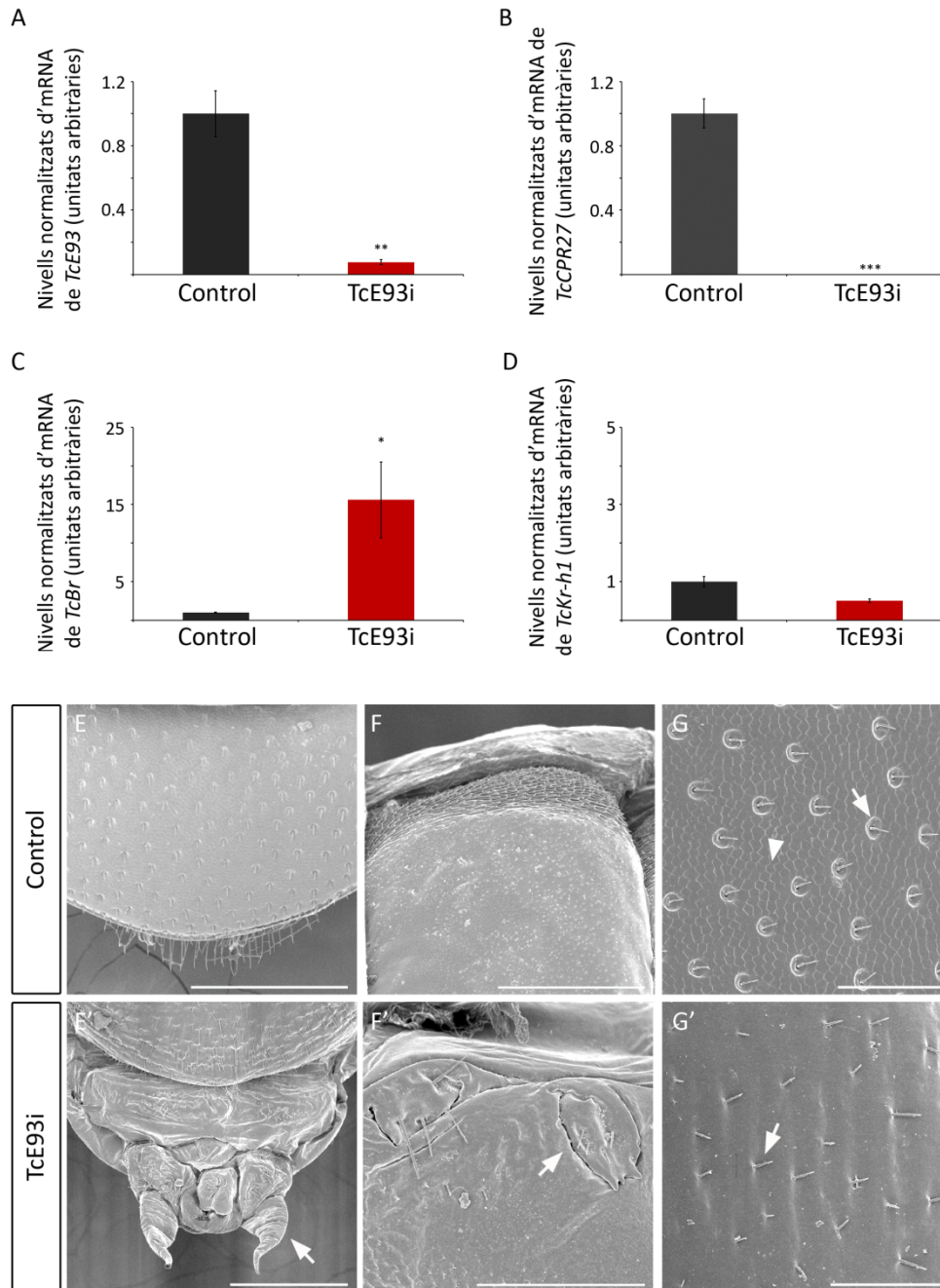


Figura 4.III.8. Efecte del silenciament de *TcE93* a l'inici de l'estadi pupal de *Tribolium castaneum*. Es van injectar pupes de *T. castaneum* just després de la muda pupal amb 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsMock* (animals Control) o 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsTcE93* (animals TcE93i) i es van analitzar aquestes pupes sis dies més tard. (A-D) Nivells d'mRNA de (A) *TcE93*, (B) *TcCPR27*, (C) *TcBr* i (D) *TcKr-h1* en pupes Control i TcE93i, analitzats mitjançant qRT-PCR. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpL32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control. Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.005$ (**); $p \leq 0.0005$ (***) (t-test). (E-F') Anàlisi, mitjançant microscòpia electrònica de rastreig, de les estructures abdominals de pupes Control i TcE93i sis dies després del tractament. Per dur a terme aquest estudi morfològic la cutícula pupal es va extreure manualment. (E-E') Zona posterior de l'abdomen, on la fletxa assenyalava la presència d'urogomphis ectòpics. (F-F') Detall de la zona lateral de l'abdomen. La fletxa indica la formació de gin traps supernumeraris. (G-G') Visió de la microescultura cuticular de la part ventral de l'abdomen, caracteritzada per la presència de solcs hexagonals (punta de fletxa) i pèls sensitius (fletxa). Escalles: 200 μm en E-E'; 100 μm en F-F'; 50 μm en G-G'.

4.III.2 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'E93 DURANT LA METAMORFOSI DE *Drosophila melanogaster*

Una vegada comprovat que la funció del factor de transcripció E93 com a especificador adult estava conservada en l'holometàbol basal *T. castaneum*, es va estudiar si aquesta conservació es donava també en un holometàbol molt més modificat, el dípter *D. melanogaster*. Tot seguit es mostra el treball, realitzat en col·laboració amb la Dra. Cristina Manjón, on es caracteritza funcionalment l'ortòleg *E93* en aquest dípter.

4.III.2.1 Característiques del gen *E93* de *Drosophila melanogaster*

El gen *E93* de *D. melanogaster*, que també es coneix com a *Eip93F* (de l'anglès *Ecdysone-induced protein 93F*, en referència al locus que ocupa en el braç R del cromosoma 3 d'aquest dípter), conté dues isoformes: *DE93A* i *DE93B*. L'mRNA de *DE93A* consta de 12020 parells de bases, amb una regió 3' UTR molt extensa, i codifica per una proteïna de 1165 aminoàcids. *DE93B* conté 4438 parells de bases i la seva traducció proporciona una proteïna de 1188 aminoàcids. Aquestes dues isoformes difereixen només en les regions 5' i 3' UTR dels seus mRNA, i en 32 aminoàcids de la zona N-terminal de la proteïna. Ambdues contenen el domini Pipsqueak d'unió a DNA característic d'aquesta família proteica (figura 4.III.9 A).

Amb l'objectiu de caracteritzar el gen *DE93* es va analitzar, en primer lloc, l'expressió de les dues isoformes des del final de la darrera fase larvària (L3) fins al final de l'estadi pupal, en intervals de 12 hores. Tal i com s'observa a la figura 4.III.9 B, els nivells de *DE93A* augmentaven substancialment ja des de l'inici del període prepupal, mentre que els nivells de *DE93B* començaven a augmentar una mica més tard. L'expressió d'ambdues isoformes seguia incrementant fins 12 hores després de l'inici del període pupal, moment en el qual començaven a disminuir, tot i que es mantenien molt alts al llarg del període pupal. Aquests resultats indicaven que tant *DE93A* com *DE93B* s'estan expressant a nivells molt elevats durant el període metamòrfic de *D. melanogaster*, tal i com s'observava en *B. germanica* i *T. castaneum*.

4.III.1.2 Efecte del silenciament de *DE93*

Per tal d'estudiar la funció de *DE93* durant la metamorfosi de *D. melanogaster* es va utilitzar el sistema Gal4-UAS (Brand and Perrimon, 1993), que permetia silenciar l'expressió de les dues isoformes d'aquest gen en tots els teixits de l'organisme. Per això es va fer servir una línia transgènica que expressava una construcció d'RNA d'interferència de *DE93* (UAS-*DE93i*, línia KK108140, Viena *Drosophila* RNAi Center, VDRC), juntament amb una soca *Act-Gal4* que contenia el promotor del gen *Actina 5C* i que permetia l'expressió de l'RNAi de manera ubíqua i constant, des del desenvolupament embrionari. Per tal d'incrementar l'efectivitat de la interferència es va utilitzar la línia UAS-*Dicer2* (Dietzl et al., 2007).

En primer lloc es va comprovar que la tècnica disminuís de manera eficaç els nivells de *DE93A* i *DE93B*. Per això es van mesurar els nivells d'expressió d'aquestes dues isoformes durant

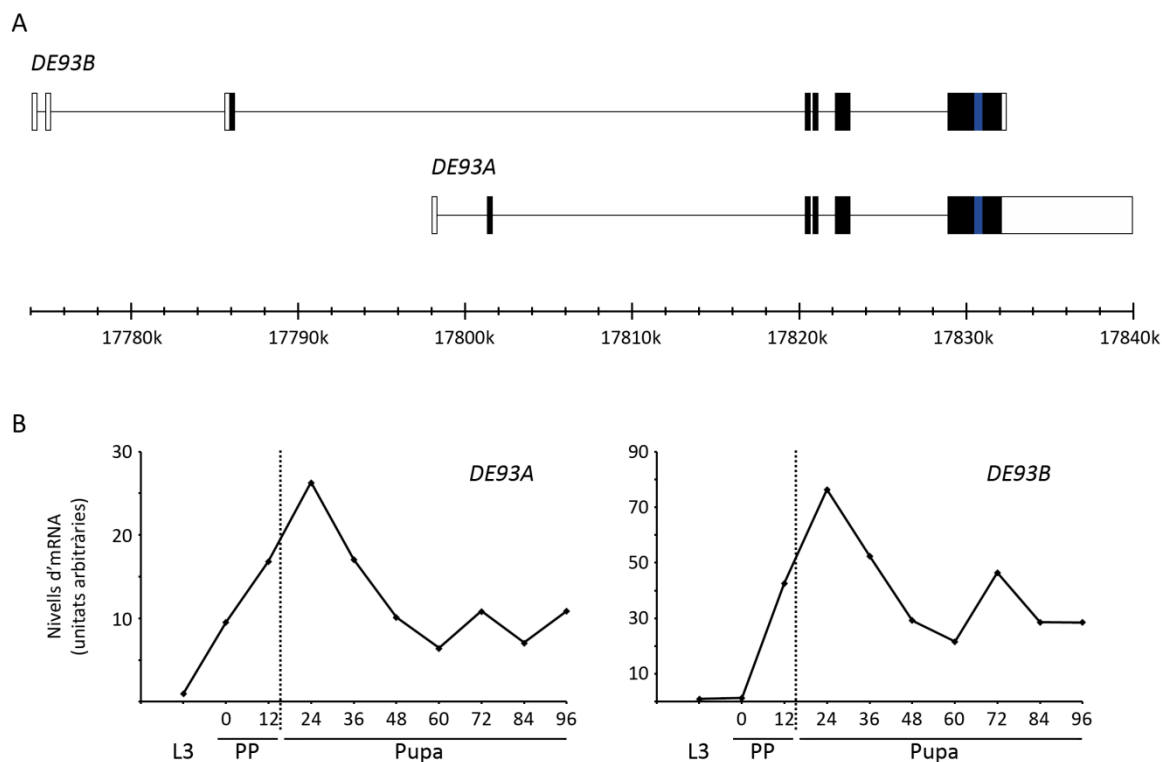


Figura 4.III.9. Estructura i nivells d'expressió del gen *E93* de *Drosophila melanogaster*. (A) Mapa estructural de les dues isoformes del gen *E93* de *D. melanogaster*, *DE93A* i *DE93B*. Per cada isoforma s'indiquen els exons amb un requadre. Els requadres buits assenyalen les regions 5' i 3' UTR, mentre que els negres indiquen la regió codificant. El domini Psq està marcat en blau. (B) Nivells d'expressió de *DE93A* i *DE93B* durant el període metamòrfic de *D. melanogaster*, mesurats per qRT-PCR. Per cadascun dels punts del cicle es va utilitzar l'mRNA total de 5 individus de la soca Oregon R (OR-R). En l'eix d'abscisses s'indiquen les hores transcorregudes des del moment de la formació del pupari. El punt L3 correspon a individus de darrer estadi larvari unes hores abans de la formació del pupari. Els valors d'expressió estan normalitzats respecte l'expressió de *DRpL32* i es representen en unitats arbitràries, adjudicant als nivells en L3 el valor de 1. Els nivells d'expressió de cadascun dels gens són representatius de tres rèpliques.

un dels moments en què són més elevats, just després de l'eversió del cap (12 hores després de l'inici del període prepupal), en individus Control (+;UAS-*DE93i*) i *DE93i* (*Act-Gal4*;UAS-*DE93i*). Així, es va comprovar que la quantitat d'mRNA de les dues isoformes, *DE93A* i *DE93B*, era significativament menor en els *DE93i* (figura 4.III.10 A). Tot seguit es va analitzar el fenotip d'aquests individus, observant que progressaven de manera normal durant l'embriogènesi i tot el desenvolupament larvari. A més, l'eversió dels discs i la progressió del període prepupal també es donaven correctament. Un cop formada la pupa, però, s'aturava el seu desenvolupament, tot i que els animals no morien (figura 4.III.10 A i B). Així, no s'observaven canvis en la pigmentació de les seves estructures, indicatius de la diferenciació adulta, ni s'assolia mai l'estadi adult. Aquests resultats indicaven que, igual que en *B. germanica* i *T. castaneum*, *E93* és un factor clau per a la correcta progressió de la metamorfosi en *D. melanogaster*.

Per confirmar que l'absència de *DE93* impedia l'activació del programa genètic adult, es van utilitzar els nivells d'expressió dels gens *DEdg78E* i *DACP65Aa* com a marcadors moleculars.

El primer codifica per una proteïna essencial per a la deposició de la cutícula pupal, i la seva expressió es restringeix al període immediatament anterior a aquest procés, és a dir, 12 hores després de la formació del pupari (Fechtel et al., 1988). *DACP65Aa*, en canvi, codifica per una proteïna de cutícula adulta, i s'expressa durant la darrera part de l'estadi pupal (Charles et al., 1998). D'acord amb el fenotip observat, el gen de cutícula pupal *DEdg78E* s'expressava de manera normal en els individus DE93i (figura 4.III.10 C). En canvi, l'expressió del gen de cutícula adulta *DACP65Aa* no s'activava en aquestes pupes (figura 4.III.10 D), confirmant que l'absència de DE93 impedia l'inici del programa genètic adult.

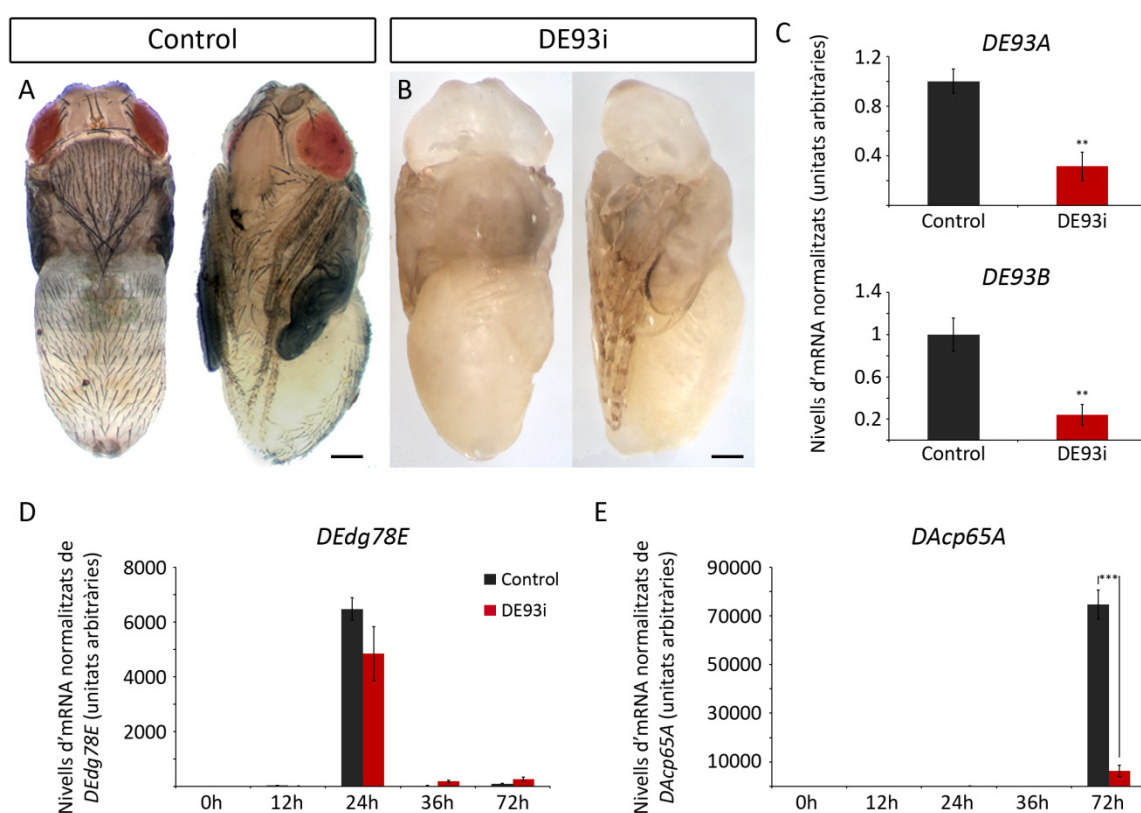


Figura 4.III.10. Efecte del silenciament de *DE93* en la diferenciació adulta de *Drosophila melanogaster*. (A) Visió dorsal i lateral d'una pupa Control (+;UAS-*DE93i*) 96 hores després de la formació del pupari, just abans d'eclosionar, a la que se li ha extret el pupari manualment. (B) Visió dorsal i lateral d'una pupa DE93i (*Act-Gal4;UAS-DE93i*) de la mateixa edat amb absència total de pigmentació i diferenciació adulta. (C) Efecte de la interferència en els nivells d'expressió de *DE93A* i *DE93B*, mesurats mitjançant qRT-PCR, a partir de l'mRNA total d'individus Control i DE93i 12 hores després de la formació del pupari. Els nivells es van normalitzar amb l'expressió de *DRpL32* i es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=3). Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.005$ (**) (t-test). (D-E) Nivells d'expressió del gen de cutícula pupal *DEdg78E* (D) i del de cutícula adulta *DACP65A* (E) en individus Control i DE93i, analitzats mitjançant qRT-PCR. Els valors obtinguts es van normalitzar amb l'expressió de *DRpL32* i es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 als nivells dels individus Control 0 hores. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=3). En l'eix d'abscisses s'hi indiquen les edats, en hores, dels diferents individus respecte al moment de la formació del pupari. Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.0005$ (***) (t-test). Escala: 0.3 mm en A i B.

Així doncs, la funció d'E93 com a especificador adult descrita en l'hemimetàbol *B. germanica* i l'holometàbol basal *T. castaneum* està conservada també en *D. melanogaster*, insecte holometàbol molt modificat. En els dos primers, a més, E93 controla la repressió dels factors de transcripció *Kr-h1* i *Br*, que es dona un cop iniciat l'estadi previ a l'adult (l'últim estadi nimfal en hemimetàbols i l'estadi pupal en holometàbols). Per tal de comprovar si aquesta funció d'E93 també estava conservada en *D. melanogaster* es van mesurar els nivells d'expressió de *DKr-h1* i *DBr* en diferents moments del període pupal d'individus Control (+;UAS-*DE93i*) i *DE93i* (*Act-Gal4*;UAS-*DE93i*). Tal i com s'observa en la figura 4.III.11 A, els nivells de *DBr* es mantenen alts en les pupes *DE93i*, confirmant que la funció repressora d'E93 sobre l'expressió de *Br* està conservada en *D. melanogaster*. En canvi, els nivells de *DKr-h1* si que disminueixen de manera normal en aquests individus (figura 4.III.11 B), indicant que en *D. melanogaster* s'ha perdut la funció repressora d'E93 sobre l'expressió de *Kr-h1*.

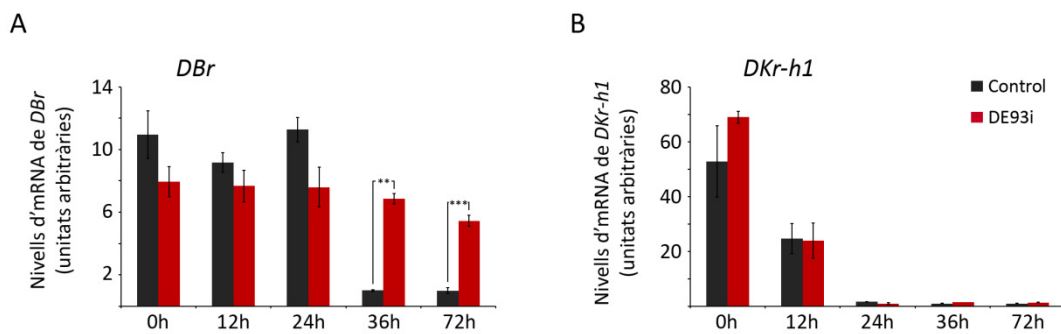


Figura 4.III.11. Efecte de l'absència de DE93 en els nivells de *DBr* i *DKr-h1*. Mesura de l'expressió de (A) *DBr* i (B) *DKr-h1* en individus Control (+;UAS-*DE93i*) i *DE93i* (*Act-Gal4*;UAS-*DE93i*), analitzats mitjançant qRT-PCR i normalitzant amb l'expressió de *DRpL32*. Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 a l'expressió dels individus Control de 72 hores. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=3). En l'eix d'abscisses s'hi indiquen les edats, en hores, dels diferents individus respecte al moment de la formació del pupari. Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.005$ (**); $p \leq 0.0005$ (***) (t-test).

CAPÍTOL 4.IV

L'APARICIÓ DE LA METAMORFOSI COMPLETA: ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE E93, Kr-h1 I Br EN L'HOLOMETÀBOL *Tribolium castaneum*

Els insectes holometàbols van aparèixer a partir d'ancestres hemimetàbols fa uns 300 milions d'anys (Kristensen, 1999). Aquesta transició cap a la metamorfosi completa va comportar l'aparició d'un nou estadi en el desenvolupament postembrionari, la pupa. Dos dels factors que es consideren clau per al procés d'aparició de la pupa són: (1) la reaparició de l'HJ al final del darrer estadi larvari, que impedeix l'adultització prematura de l'organisme durant el període prepupal (Truman and Riddiford, 2002), i (2) l'acció del factor de transcripció Br. Aquest, amb el pas a l'estratègia holometàbola va adquirir funcions essencials per a la formació de la pupa i s'ha arribat a descriure com l'especificador pupal (Konopova and Jindra, 2008; Suzuki et al., 2008).

L'holometàbol basal *T. castaneum* és un model ideal per a l'estudi dels mecanismes moleculars que han permès l'aparició de la metamorfosi completa, ja que presenta un desenvolupament representatiu dels insectes amb aquesta estratègia metamòrfica, alhora que és filogenèticament proper als insectes amb desenvolupament hemimetàbol. Per això, en el següent capítol s'ha utilitzat aquest coleòpter per analitzar la funció de la reinducció de l'HJ durant el període prepupal, a través de l'estudi funcional del factor de transcripció TcKr-h1, així com les relacions epistàtiques entre aquest i els factors de transcripció TcE93 i TcBr.

4.IV.1 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE TcKr-h1 DURANT EL PERÍODE PREPUPAL DE *Tribolium castaneum*

Kr-h1 és el responsable de transduir el senyal antimetamòrfic de l'HJ durant el període larvari a *T. castaneum* (Minakuchi et al., 2009). Així, a l'inici del darrer estadi larvari la disminució dels nivells d'HJ i de *TcKr-h1* permeten l'entrada a la metamorfosi (Konopova and Jindra, 2007; Minakuchi et al., 2009). Malgrat això, l'expressió de *TcKr-h1* torna a augmentar durant el període prepupal (Minakuchi et al., 2009), tot i que la funció que exerceix en aquest moment del desenvolupament no ha estat caracteritzada.

4.IV.1.1 Estudi funcional de TcKr-h1 durant la formació de la pupa

Per tal de conèixer la funció de TcKr-h1 durant la darrera fase larvària de *T. castaneum* es van injectar 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcKr-h1* (animals TcKr-h1i) a larves acabades de mudar a aquest estadi. En primer lloc es va comprovar que el tractament provocava una disminució significativa dels nivells d'expressió de *TcKr-h1* en els individus TcKr-h1i (figura 4.IV.1 G). Tot seguit, es va procedir a analitzar el fenotip resultant d'aquest tractament. Així, es va observar que mentre les larves Control pupaven correctament sis dies després del tractament, la majoria de larves TcKr-h1i no pupaven, mantenint-se en l'estadi prepupal (taula 4.IV.1 i figura 4.IV.1). Quan s'extreia la cutícula larvària d'aquests animals s'hi observava una pigmentació en ulls, potes, antenes i estructures bucals impròpia de la fase prepupal (figura 4.IV.1 C-D). A més, quan la cutícula s'extreia deu dies després del tractament, el grau de pigmentació d'aquestes estructures era major, estenent-se també a tot el cap, al primer segment toràctic, les èlitres, la part ventral del tòrax, i a la superfície ventral de l'abdomen (figura 4.IV.1 E-F).

Taula 4.IV.1. Efecte del silenciament de *TcKr-h1* sobre la formació de pupa

Tractament	n	Mortalitat larvària	Pupa	Arrest prepupal
Control	90	12 (13.3 %)	78 (86.7 %)	—
TcKr-h1i	144	18 (12.5 %)	17 (11.8 %)	109 (75.7 %)

Amb l'objectiu d'analitzar en detall els animals TcKr-h1i es van seleccionar diversos individus vuit dies després del tractament i se'ls va extreure la cutícula larvària. Tot seguit es van observar diverses de les seves estructures mitjançant microscopia electrònica de rastreig, comparant-les amb les estructures de pupes i adults Control. Tal i com es mostra a la figura 4.IV.2, les potes dels TcKr-h1i presentaven un grau de desenvolupament i segmentació propis de l'estadi adult, amb tots els tarsos perfectament diferenciats, tot i que la longitud dels segments era menor. La cutícula d'aquestes potes mostrava una microescultura i pigmentació totalment adultes, i en la part distal de l'apèndix s'hi observaven els ganxos adults perfectament formats (figura 4.IV.2 A-A'''). Les antenes també estaven completament segmentades i recobertes de cutícula adulta, malgrat que presentaven pocs pèls sensorials (figura 4.IV.2 B-B'''). El mateix passava amb els palps i les lacínies de les maxil·les (figura 4.IV.2 C-C'''). Per la seva banda, l'ull compost adult, que en condicions normals es forma durant l'estadi pupal, apareixia de forma prematura en les larves TcKr-h1i, tot i que amb una quantitat d'ommatidis lleugerament inferior (figura 4.IV.2 D-D'''). La superfície de l'èlitre també mostrava la microescultura típica de la cutícula adulta, tot i que no s'hi observaven els pèls sensorials característics (figura 4.IV.2 E-E'''). D'altra banda, aquests individus presentaven *urogomphs* en la part posterior de l'abdomen, tot i que eren més curts i pigmentats que els de les pupes Control (figura 4.IV.2 F-F'''). En la part lateral de l'abdomen també s'observava la presència de *gin traps*, estructures exclusives de l'estadi pupal (figura 4.IV.2 G-G'''). Finalment, la superfície de la cutícula abdominal, tot i presentar clapes de pigmentació adulta, mostrava una barreja de parts més llises i parts més rugoses, amb un aspecte entre larvari i pupal (figura 4.IV.2 H-H''') i figura 1.13). En resum, l'anàlisi dut a terme mostrava que l'absència de TcKr-h1 durant el darrer estadi larvari de *T. castaneum* comportava una greu descoordinació del procés metamòrfic, provocant la diferenciació adulta prematura en els apèndix i les estructures del cap i el tòrax. En l'abdomen, per altra banda, provocava una aspecte entre larvari, pupal i adult.

Per tal de comprovar que en absència de TcKr-h1 s'avançava l'activació del programa genètic adult es van mesurar els nivells del gen de cutícula adulta *TcCPR27*, utilitzat com a marcador molecular del pas a l'estadi imaginal. D'aquesta manera es va observar que l'activació transcripcional d'aquest gen es produïa de manera prematura al final de l'estadi larvari dels individus TcKr-h1i (figura 4.IV.3 C), indicant que en aquests animals el programa genètic adult s'iniciava durant el període prepupal. Aquesta aparició prematura de gens i caràcters adults en els individus tractats amb *dsTcKr-h1* suggeria alteracions en els nivells de *TcE93*, descrit en aquest treball com l'especificador adult de *T. castaneum*. Per tal de comprovar-ho, es van mesurar els nivells d'expressió d'aquest factor durant el període prepupal en larves Control i TcKr-h1i, observant que els nivells de *TcE93* augmentaven prematurament en absència de TcKr-h1 (figura 4.IV.3 A). Finalment es van mesurar els nivells de *TcBr*, essencial per a la correcta

formació de la pupa (Konopova and Jindra, 2008). Aquests es mostraven molt inferiors en els individus TcKr-h1i (figura 4.IV.3 B), fet que s'ajustava a la funció repressora que TcE93 exerceix sobre l'expressió de *TcBr*, tal i com s'ha descrit en el capítol anterior.

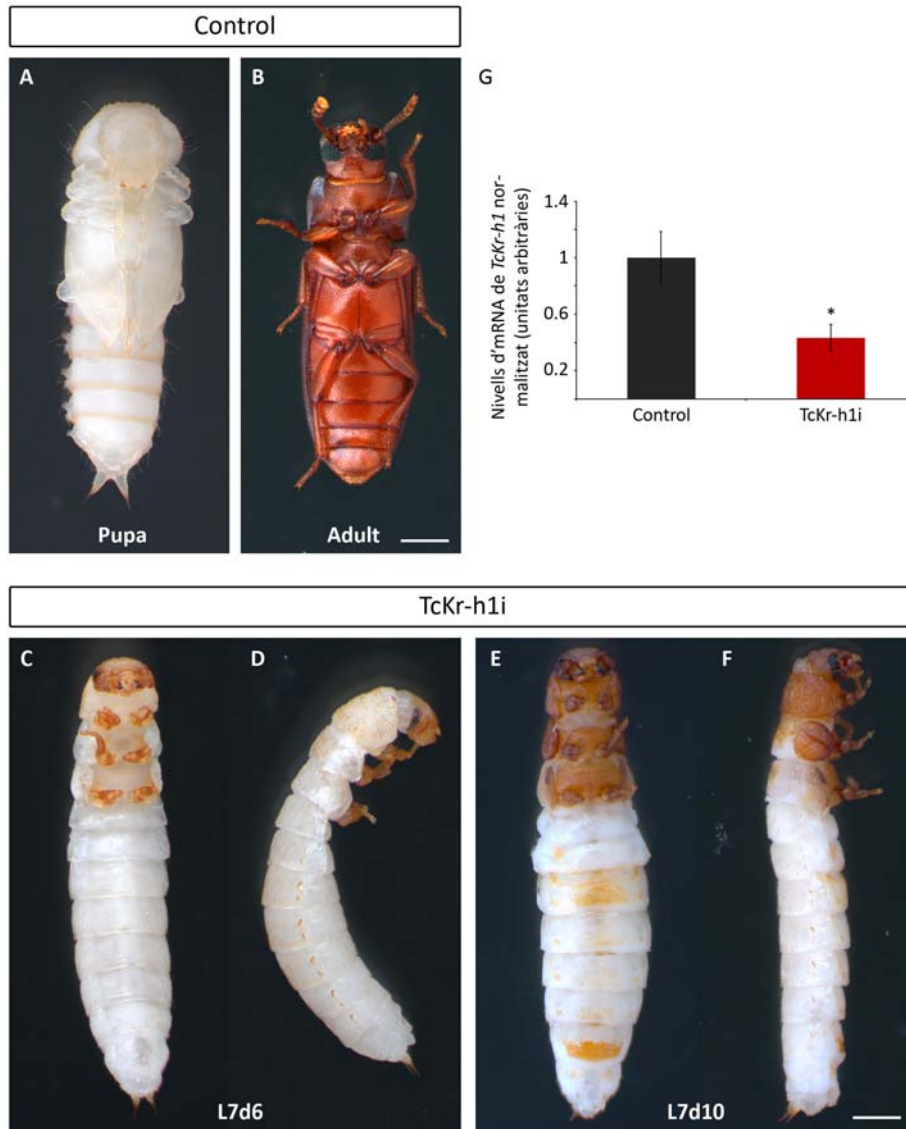
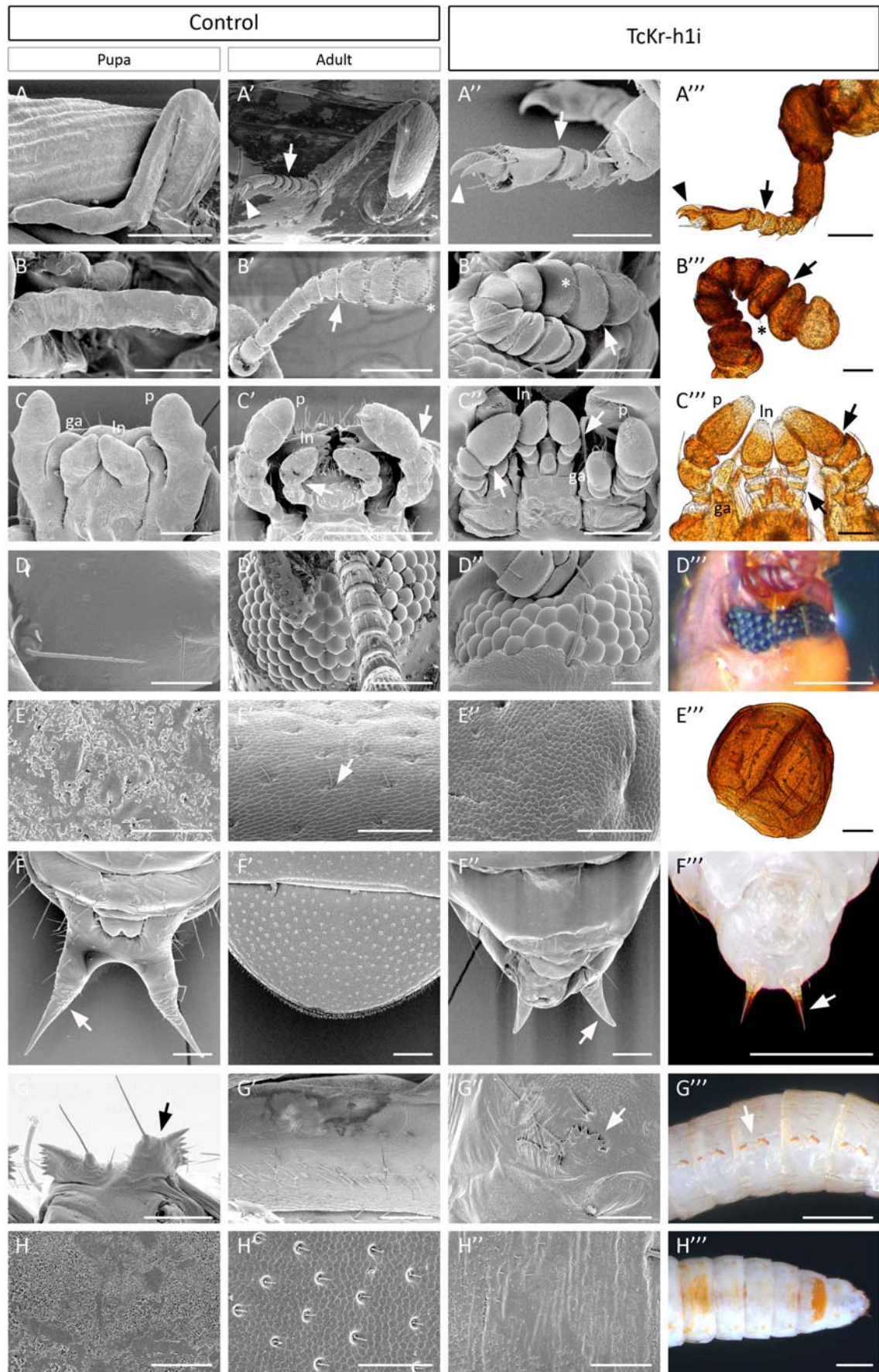


Figura 4.IV.1. Efecte de l'absència de TcKr-h1 durant la darrera fase larvària de *Tribolium castaneum*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcKr-h1* (animals TcKr-h1i) i es va observar l'efecte del tractament sobre la formació de la pupa. (A-B) Visió ventral d'una pupa (A) i un adult (B) Control acabats de mudar als respectius estadis. (C-F) Visió ventral (C, E) i lateral (D, F) d'individus TcKr-h1i als quals se'ls ha extret la cutícula larvària, perfectament apolitzada, per facilitar la visió de les estructures. (C-D) Sis dies després del tractament, els animals TcKr-h1i no havien aconseguit pupar i mostraven clares evidències de diferenciació adulta prematura. (E-F) Deu dies després del tractament la pigmentació adulta a la zona del cap i el tòrax era total. (G) Anàlisi dels nivells d'expressió de *TcKr-h1*, analitzats mitjançant qRT-PCR, en individus Control i TcKr-h1i cinc dies després del tractament. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpL32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=4). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 a l'expressió dels individus Control. L'asterisc indica diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*) (t-test). Escala: 0.5 mm en A-F.



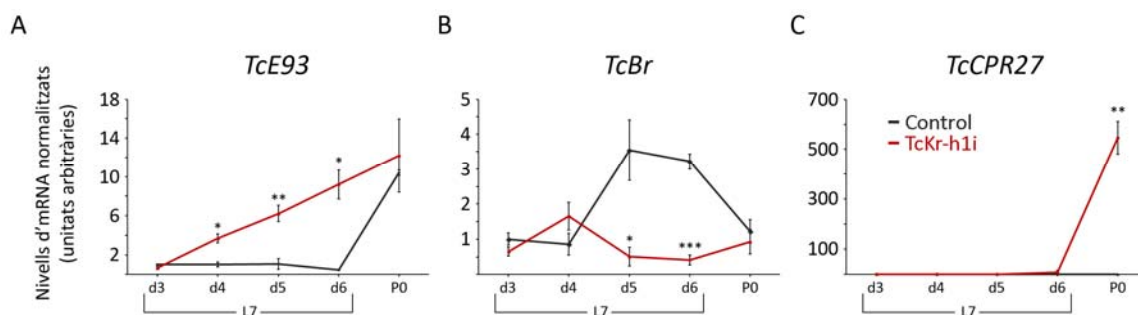


Figura 4.IV.3. Efecte de l'absència de TcKr-h1 en els nivells d'expressió de *TcE93*, *TcBr* i *TcCPR27*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcKr-h1* (animals TcKr-h1i) i es va mesurar l'expressió de (A) *TcE93*, (B) *TcBr* i (C) *TcCPR27* mitjançant anàlisi per qRT-PCR. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpl32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=3). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 a l'expressió dels individus Control L7d3. P0 indica la pupa acabada de mudar en el cas dels individus Control. En els animals TcKr-h1i, que no aconsegueixen pupar, fa referència a les larves set dies després del tractament. Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.005$ (**) i $p \leq 0.0005$ (***) (t-test).

4.IV.1.2 Funció de TcE93 en la diferenciació adulta prematura dels individus TcKr-h1i

Els resultats obtinguts després del tractament amb *dsTcKr-h1* suggerien que la diferenciació precoç observada en aquests individus podia ser deguda a l'avançament de l'expressió de *TcE93* durant la fase prepupal. Per tal de contrastar aquesta hipòtesi es van injectar 4 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 4 µg/µl de *dsTcKr-h1* + 4 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcKr-h1i + TcE93i) en larves recent emergides al darrer estadi. Aquest tractament provocava una reducció significativa dels nivells d'expressió de *TcKr-h1* i *TcE93* en les larves TcKr-h1i + TcE93i (figura 4.IV.4 D). Tot seguit es va estudiar l'efecte d'aquesta interferència en la

Figura 4.IV.2. Efecte de l'absència de TcKr-h1 en la formació de les estructures pupals de *Tribolium castaneum*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 5 µg/µl de *dsTcKr-h1* (animals TcKr-h1i) i es va observar l'efecte del tractament sobre la formació de les estructures pupals. (A-H''') Detall de la morfologia de diverses estructures pupals (A-H) i adultes (A'-H') d'individus Control, i de les estructures dels animals TcKr-h1i (A''-H'') vuit dies després del tractament, caracteritzats mitjançant microscopia electrònica de rastreig (A-H, A'-H', A''-H'') i microscopia de camp clar (A'''-H'''). Les estructures de les larves TcKr-h1i corresponen a individus als quals se'ls extreia la cutícula larvària vuit dies després del tractament. (A-A''') Visió del grau de diferenciació de les potes. Les fletxes marquen la segmentació, mentre que les puntes de fletxa indiquen la presència de ganxos a la part distal de la pota. (B-B''') Detall de les antenes, on les fletxes mostren la segmentació i els asteriscs la presència de pèls sensitius. (C-C''') Zona bucal, on es distingeixen els palps (p), galea (ga) i lacínia (ln) que conformen les maxil·les. Les fletxes assenyalen la segmentació en palps i lacínia. (D-D''') Detall de l'ull, on destaquen els ommatidis que conformen l'ull compost de l'adult. (E-E''') Magnificació de la superfície de l'èlitre (E-E'') i èlitre sencera (E'''). En (E') i (E'') es pot observar la microescultura característica de la cutícula adulta, amb solcs hexagonals i pilositats sensibles (fletxa). (F-F''') Detall de la zona posterior de l'abdomen, en posició ventral. Les fletxes indiquen la presència d'*urogomphis*. (G-G''') Magnificació de la zona lateral de l'abdomen, on els *gin traps* s'assenyalen amb una fletxa. (H-H''') Detall de l'estructura de la cutícula abdominal. Escalles: 0.5 mm en F''', G'' i H'''; 300 µm en A i A'; 200 µm en B, B', C' i D'''; 100 µm en A'', A''', B'', C'', D'', E''', F, F', F'', G i G''; 50 µm en B''', C''', D, D'', E', E'', G', H, H' i H''; 30 µm en E.

formació de la pupa. Així, el 40.9 % de les larves TcKr-h1i + TcE93i aconseguen pupar de manera normal, revertint l'efecte de diferenciació adulta prematura que s'observava en els individus TcKr-h1i (figura 4.IV.4 B i taula 4.IV.2). D'altra banda, el 41.8 % dels individus arrestaven durant el període prepupal, sense aconseguir completar la muda. Aquests, un cop estreta la cutícula larvària, mostraven una pigmentació totalment pupal, excepte en l'ull, on s'observava la presència de diversos ommatidis (figura 4.IV.4 C). En l'abdomen, a més, s'hi podien distingir els *gin traps* característics de l'estadi pupal. Finalment, un percentatge molt baix de les larves TcKr-h1i + TcE93i (6.4 %) mudaven a un estadi larvari supernumerari, mentre que tan sols un individu va arrestar amb característiques adultes semblants a les obtingudes després del tractament amb *dsTcKr-h1* (taula 4.IV.2).

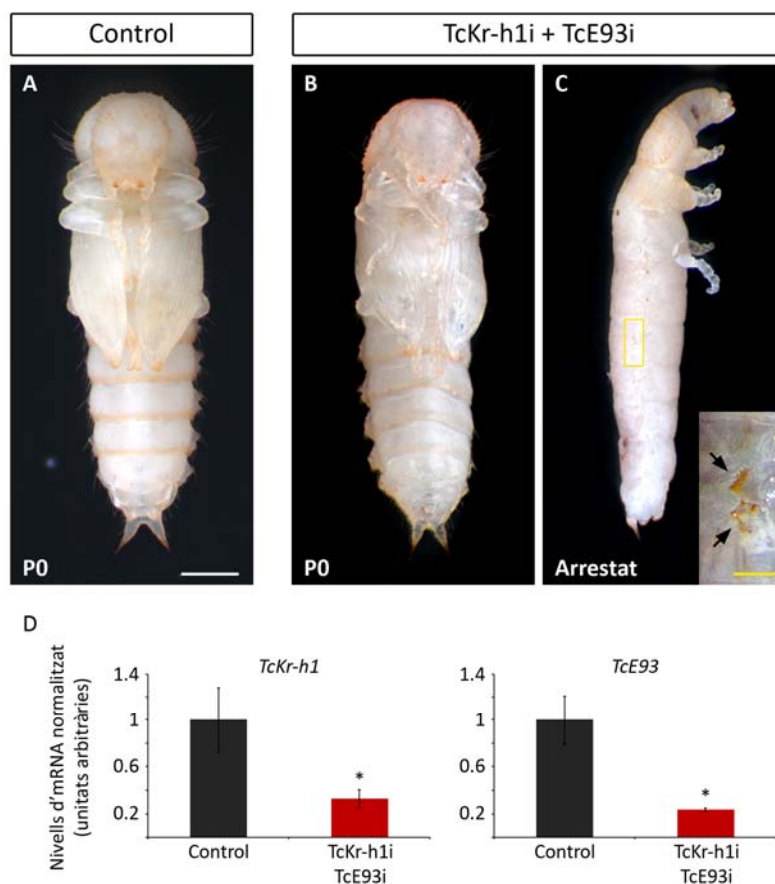


Figura 4.IV.4. Efecte del silenciament simultani de *TcKr-h1* i *TcE93* durant el darrer estadi larvari de *Tribolium castaneum*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 4 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 4 µg/µl de *dsTcKr-h1* i 4 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcKr-h1i+TcE93i) de manera simultània, i es va observar l'efecte del tractament sobre la formació de la pupa. (A) Visió ventral d'una pupa Control acabada de mudar. (B) Visió ventral d'una pupa TcKr-h1i+TcE93i acabada de mudar. (C) Visió lateral d'un individu TcKr-h1i+TcE93i que no ha aconseguit mudar vuit dies després del tractament mostrant un aspecte pupal un cop estreta manualment la cutícula larvària. La magnificació, que correspon al rectangle groc, mostra la presència de *gin traps* pupals en aquest individu (fletxes negres). (D) Nivells d'expressió de *TcKr-h1* i *TcE93* en individus Control i TcKr-h1i+TcE93i quatre dies després del tractament. Els valors, obtinguts mitjançant qRT-PCR, estan normalitzats per l'expressió de *TcRpl32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=3). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 a l'expressió dels individus Control. L'asterisc indica diferències significatives: p≤0.05 (*) (t-test). Escales: 0.5 mm en A, B i C; 0.1 mm en magnificació de C.

Taula 4.IV.2. Efecte de la interferència simultània de *TcKr-h1* i *TcE93* en la formació de la pupa.

Tractament	n	Mortalitat larvària	Larva supernumerària	Pupa	Arrest prepupal	
					Pupals	Adultitzats
Control	47	9 (19.1 %)	—	38 (80.9 %)	—	—
TcKr-h1i TcE93i	110	11 (10 %)	7 (6.4 %)	45 (40.9 %)	46 (41.8 %)	1 (0.9 %)

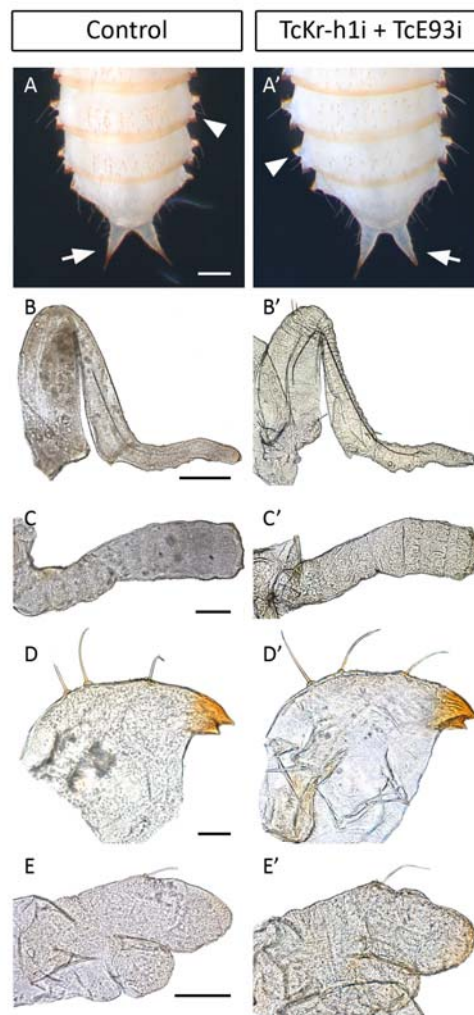


Figura 4.IV.5. Efecte del silenciament simultani de *TcKr-h1* i *TcE93* en la formació de les estructures pupals de *Tribolium castaneum*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 4 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 4 µg/µl de *dsTcKr-h1* i 4 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcKr-h1i+TcE93i) de manera simultània, i es va observar l'efecte del tractament sobre la formació de les estructures pupals. (A-A') Detall de la zona posterior de l'abdomen, en posició dorsal, d'una pupa Control (A) i d'una pupa TcKr-h1i+TcE93i (A'). Les fletxes blanques assenyalen els *urogomphis*, mentre que les puntes de fletxa indiquen la presència de *gin traps*. (B-E') Visió, a través de microscopia de camp clar, de potes (B, B'), antenes (C, C'), mandíbules (D, D') i maxil·les (E-E') de pupes Control i pupes TcKr-h1i+TcE93i. En ambdós casos les estructures són completament pupals. Escales: 200 µm en A, A', B i B'; 100 µm en C, C', E i E'; i 50 µm en D i D'.

En un estudi més detallat de les pupes TcKr-h1i + TcE93i es va comprovar que els seus apèndixs (potes, antenes, mandíbules i maxil·les) presentaven un aspecte totalment pupal, ja que no estaven ni segmentats ni pigmentats (figura 4.IV.5 B-E'). A més, s'hi observava la presència d'*urogomphis* pupals i de *gin traps* perfectament formats (figura 4.IV.5 A-A'). Tot seguit es van mesurar els nivells del gen de cutícula adulta *TcCPR27*, que en les larves TcKr-h1i s'activaven de manera precoç durant el període prepupal. En els individus TcKr-h1i + TcE93i, en canvi, aquesta activació no es donava, indicant que en absència de TcE93 no s'iniciava el programa genètic adult de manera prematura (figura 4.IV.6 B). Per últim, es van mesurar els nivells de *TcBr*, que en els individus TcKr-h1i no s'activaven durant el període prepupal. En les larves TcKr-h1i + TcE93i, en canvi, aquests nivells recuperaven el seu perfil normal, confirmant de nou que TcE93 reprimeix l'expressió de *TcBr* (figura 4.IV.6 A). Tots aquests resultats indiquen, doncs, que la funció de TcKr-h1 durant el darrer estadi larvari de *T. castaneum* consisteix en impedir l'acció diferenciadora de TcE93, fet que permet alhora la correcta expressió de *TcBr* i la formació de la pupa.

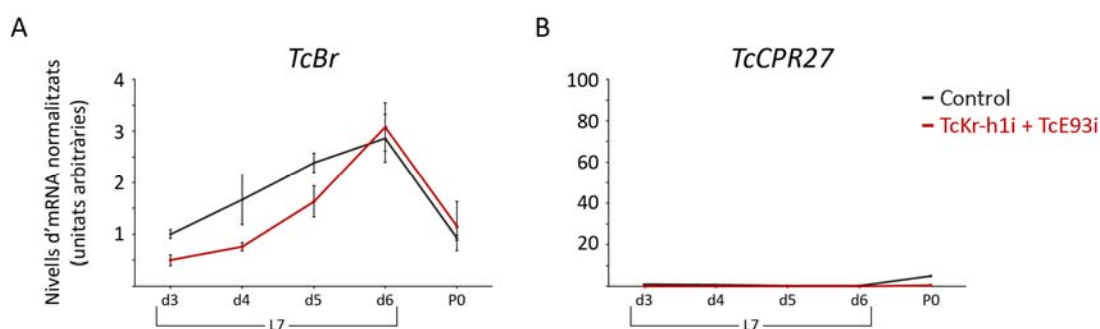


Figura 4.IV.6. Efecte del silenciament simultani de *TcKr-h1* i *TcE93* en els nivells d'expressió de *TcBr* i *TcCPR27*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 4 µg/µl de *dsMock* (animals Control) o 4 µg/µl de *dsTcKr-h1* i 4 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcKr-h1i+TcE93i) de manera simultània i es va mesurar l'expressió de (A) *TcBr* i (B) *TcCPR27*, mitjançant qRT-PCR. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpL32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=3). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 a l'expressió dels individus Control L7d3. L'anàlisi estadístic indicava que no hi havia diferències significatives entre l'expressió dels animals Control i la dels TcKr-h1i+TcE93i de la mateixa edat (t-test).

4.IV.2 CARACTERITZACIÓ DE LA FUNCIÓ DE *TcBr* EN LA DIFERENCIACIÓ ADULTA

Tal i com s'ha explicat en apartats anteriors, l'absència de *TcBr* durant el darrer estadi larvari de *T. castaneum* provoca l'aparició d'individus amb una barreja de caràcters larvaris, pupals i adults, fet pel qual se l'ha anomenat l'especificador pupal (Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy et al., 2008; Suzuki et al., 2008). D'altra banda, en el capítol 4.III d'aquesta tesi doctoral s'ha demostrat que TcE93 és imprescindible per a la diferenciació adulta. A partir d'aquestes dues premisses, i per tal de veure si TcE93 és el responsable de l'aparició prematura

de caràcters adults en absència de *TcBr*, es va decidir estudiar la relació entre aquests dos factors.

En primer lloc es va analitzar el fenotip resultant de l'eliminació de l'expressió de *TcBr*, per tal de reproduir els resultats obtinguts pels laboratoris dels Drs. Marek Jindra i Lynn Riddiford. Per això es van injectar larves recent mudades al darrer estadi larvari amb *dsTcBr* (individus *TcBri*), a una concentració de 5 µg/µl. Com a Control es van injectar larves amb 5 µg/µl de *dsMock*. D'acord amb els resultats publicats, la interferència de *TcBr* produïa dos fenotips diferents (taula 4.IV.3). D'una banda, el 43 % de les larves mudaven a un estadi pupal que presentava una barreja de característiques larvàries, pupals i adults (figura 4.IV.7 B). Aquests individus movien constantment les potes i l'abdomen, fet inusual durant l'estadi pupal de *T. castaneum*, on la pupa és pràcticament immòbil. D'altra banda, el 55 % aturaven el seu desenvolupament durant la fase quiescent de la prepupa. Extraient la cutícula larvària d'aquests individus s'hi podia veure també una mescla de caràcters larvaris, pupals i adults, depenent de l'estructura analitzada (figura 4.IV.7 C). Un anàlisi més detallat mostrava que tenien l'abdomen arrodonit, de manera semblant a les pupes Control, però sense *gin traps* (figura 4.IV.8 B-B'), i els *urogomphis* tenien una morfologia entre larvària i pupal (figura 4.IV.8 A-A'). Les potes mostraven un cert grau de segmentació adulta, amb la formació de ganxos, tot i que molt curts. La longitud dels segments també era menor que en els adults i la coloració s'assemblava a la dels estadis larvaris (figura 4.IV.8 C-C' i Introducció figura 1.13). Les antenes estaven parcialment

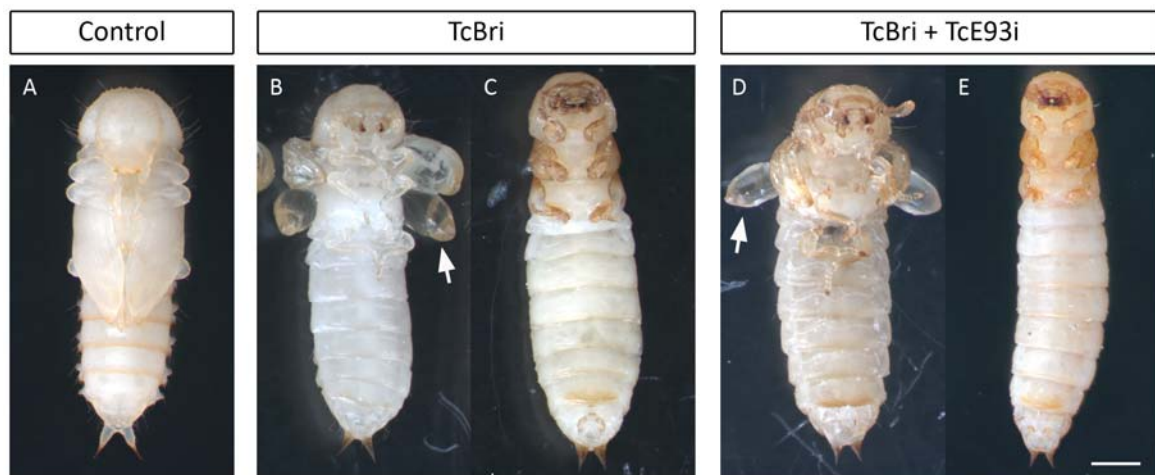


Figura 4.IV.7. Efecte de l'absència de *TcBr* i del silenciament simultani de *TcBr* i *TcE93* durant la darrera fase larvària de *Tribolium castaneum*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control), 5 µg/µl de *dsTcBr* (animals *TcBri*) o 4 µg/µl de *dsTcBr* i 4 µg/µl de *dsTcE93* (animals *TcBri+TcE93i*) de manera simultània, i es va observar l'efecte dels diferents tractaments sobre la formació de la pupa. (A) Visió ventral d'una pupa Control acabada de mudar. (B) Visió ventral d'una pupa *TcBri* que presenta un aspecte inusual, amb les ales anormalment inflades i més petites que en les pupes Control (fletxa blanca). (C) Visió ventral d'un animal *TcBri* que set dies després del tractament no ha aconseguit desprendre's de la cutícula larvària. (D, E) Visió ventral d'individus *TcBri+TcE93i*. Sis dies després del tractament, algunes larves aconseguien pupar (D) amb un aspecte semblant a les pupes *TcBri*, mentre que d'altres aturaven el seu desenvolupament (E). En (C) i (E) la cutícula larvària es va extreure manualment per tal d'observar la morfologia de l'animal. Escala: 0.5 mm en A-E.

segmentades, però no tenien els pèls sensitius característics de les antenes adultes (figura 4.IV.8 D-D'). Les maxil·les, lleugerament segmentades i pigmentades, tenien un aspecte entre pupal i adult, mentre que les mandíbules presentaven una barreja de característiques dels tres estadis (figura 4.IV.8 E-E' i F-F'). Aquestes observacions confirmaven els resultats reportats en anteriors treballs sobre la funció de TcBr (Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy et al., 2008; Suzuki et al., 2008).

Taula 4.IV.3. Efecte de l'absència de TcBr o de TcBr i TcE93 sobre la formació de la pupa.

Tractament	n	Mortalitat larvària	Larva supernumerària	Pupa	Fenotip pupal	
					Suau	Fort
Control	93	7 (7.5 %)	—	86 (92.5 %)	—	—
TcBri	106	5 (4.7 %)	—	—	46 (43.4 %)	55 (51.9 %)
TcBri + TcE93i	121	11 (9.1 %)	17 (14 %)	—	34 (28.1 %)	59 (48.8 %)

Un cop reproduït el fenotip que provoca l'absència de TcBr es va procedir a estudiar la possibilitat que TcE93 estigués actuant de manera prematura durant la formació de la pupa dels individus TcBri. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi es van tractar larves recent emergides al darrer estadi amb 4 µg/µl de *dsTcBr* i 4 µg/µl de *dsTcE93* de manera simultània (individus TcBri + TcE93i). Sorprenentment, però, el fenotip obtingut en absència de TcBr i TcE93 va ser idèntic a l'observat en les larves TcBri (taula 4.IV.3, figura 4.IV.7 i 4.IV.8). Així, el 28.1 % dels individus TcBri + TcE93i mudaven a una pupa que movia constantment les potes i l'abdomen, i que presentava una mescla de característiques larvàries, pupals i adultes (figura 4.IV.7 D). D'altra banda, aproximadament la meitat de les larves d'aquest tractament aturaven el seu desenvolupament durant l'estadi quiescent (figura 4.IV.7 E). Extraient la cutícula larvària d'aquests individus de manera manual es podia veure que també presentaven una barreja de característiques larvàries, pupals i adultes. L'abdomen, amb una forma més o menys pupal, no presentava *gin traps*, i els *urogomphis* tenien una morfologia entre larvària i pupal (figura 4.IV.8 A'', B'' i Introducció figura 1.13). Les potes estaven parcialment segmentades i pigmentades, però els tarsos eren molt curts i els ganxos no estaven ben formats (figura 4.IV.8 C''). Les antenes i les maxil·les també estaven parcialment segmentades, però no presentaven els pèls característics de la fase adulta (figura 4.IV.8 D'' i E''). Les mandíbules estaven pigmentades, però no tenien una estructura adulta (figura 4.IV.8 F''). En conclusió, aquests resultats mostraven que el tractament simultani de *dsTcBr* i *dsTcE93* no impedia la diferenciació adulta parcial que provocava l'absència de TcBr, ja que els fenotips obtinguts en ambdós tractaments eren pràcticament idèntics.

Tot seguit, per tal de comprovar que la interferència estava essent efectiva es van mesurar els nivells d'mRNA de *TcBr* i *TcE93* en individus Control, TcBri i TcBri + TcE93i, just després de la muda pupal. Així, es va constatar que l'expressió de *TcBr* es veia considerablement

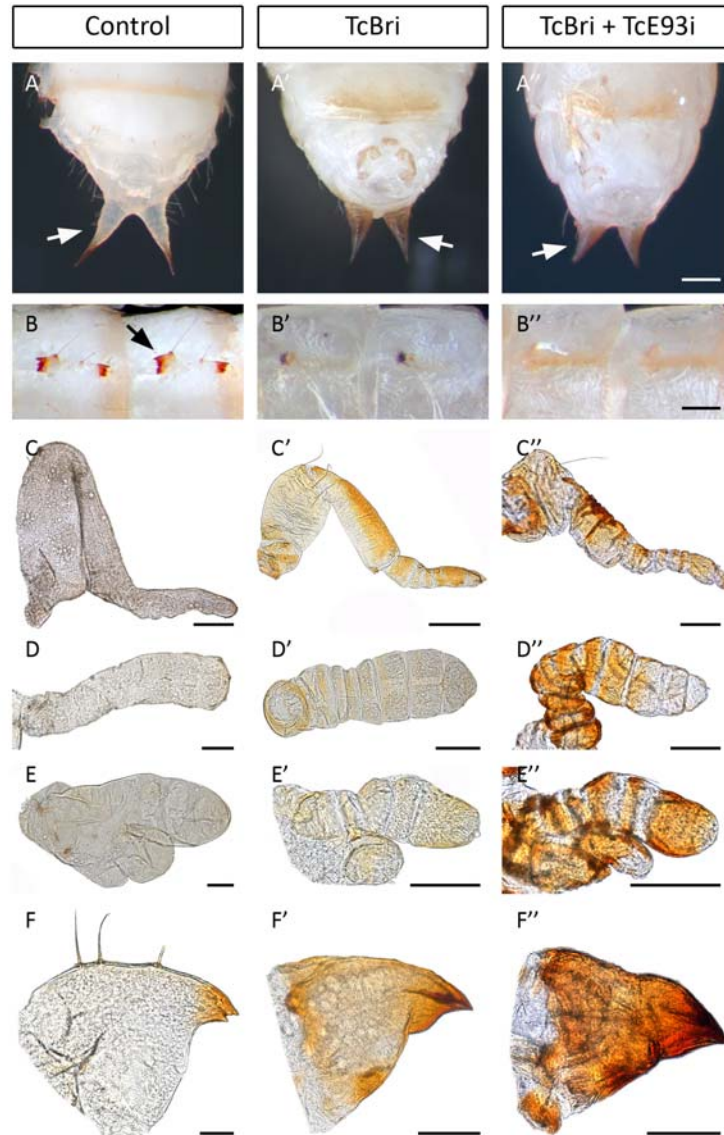


Figura 4.IV.8. Efecte de l'absència de *TcBr* i del silenciament simultani de *TcBr* i *TcE93* en la formació de les estructures pupals. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsMock* (animals Control), 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsTcBr* (animals TcBri) o 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsTcBr* i 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *dsTcE93* (animals TcBri+TcE93i) de manera simultània, i es va observar l'efecte del tractament sobre la formació de les estructures pupals. Per aquest anàlisi es van utilitzar els animals que no havien aconseguit completar la muda pupal al cap de sis dies del tractament. (A-A'') Visió ventral de la part posterior de l'abdomen de pupes Control (A) i d'individus TcBri (A') i TcBri+TcE93i (A''), on s'observa la presència d'*urogomphis* (fletxes blanques). (B-B'') Detall de la zona lateral de l'abdomen, on s'observen *gin traps* en les pupes Control (B) (fletxa negra) però no en els individus TcBri (B') i TcBri+TcE93i (B''). (C-C'') Potes, (D-D'') antenes, (E-E'') maxil·les i (F-F'') mandíbules, lleugerament segmentades i pigmentades en els TcBri i TcBri+TcE93i, a diferència dels apèndix de les pupes Control. Escales: 200 μm en A, A', A'', C i C'; 100 μm en B, B', B'', C'', D, D', D'', E, E'', F i F''; i 50 μm en E i F.

reduïda després dels dos tractaments, tal i com s'esperava (4.IV.9 A). Per la seva banda, els nivells de *TcE93* també eren significativament menors en els individus TcBri + TcE93i. Sorprenentment, però, l'expressió de *TcE93* era anormalment baixa en les pupes TcBri (figura 4.IV.9 B). Així, aquests resultats indicaven que l'activació transcripcional de *TcE93* durant la

prepupa depenia de la presència de *TcBr*. D'altra banda, l'expressió del marcador molecular de cutícula adulta, *TcCPR27*, no s'activava prematurament en cap dels dos tractaments, indicant que el programa genètic adult no s'iniciava completament en aquests individus (figura 4.IV.9 C).

En conclusió, tots aquests resultats indicaven que els caràcters adults observats en absència de *TcBr* no eren deguts a l'acció prematura de *TcE93*, suggerint que la desaparició de *TcBr* durant l'estadi pupal és responsable de part de la diferenciació adulta, de manera independent a *TcE93*.

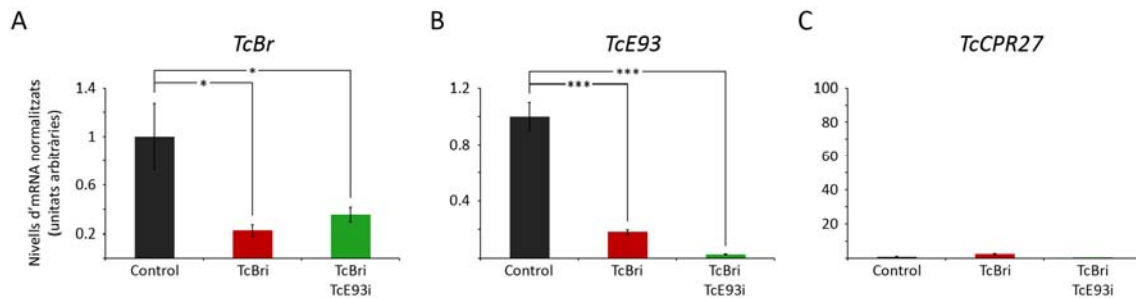


Figura 4.IV.9. Efecte de l'absència de *TcBr* i del silenciament simultani de *TcBr* i *TcE93* en els nivells d'expressió de *TcBr*, *TcE93* i *TcCPR27*. Es van injectar larves recent emergides a la darrera fase amb 5 µg/µl de *dsMock* (animals Control), 5 µg/µl de *dsTcBr* (animals TcBri) o 4 µg/µl de *dsTcBr* i 4 µg/µl de *dsTcE93* (animals TcBri+TcE93i) de manera simultània, i es va mesurar l'expressió, mitjançant qRT-PCR, de (A) *TcBr*, (B) *TcE93* i (C) *TcCPR27* en pupes Control, TcBri i TcBri+TcE93i acabades de pupar. Els valors estan normalitzats per l'expressió de *TcRpL32*. Les barres d'error indiquen l'ESM (n=5). Els nivells es mostren en unitats arbitràries, assignant el valor de 1 a l'expressió dels individus Control. Els asteriscs indiquen diferències significatives: $p \leq 0.05$ (*) i $p \leq 0.0005$ (***) (t-test).

5. DISCUSSIÓ

5.1 LA SUMOILACIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT DE L'INSECTE HEMIMETÀBOL *Blattella germanica*

En el capítol 4.1 s'han mostrat els resultats de l'estudi funcional de la sumoilació en el desenvolupament nimfal de *B. germanica*. Fins ara els estudis d'aquesta modificació posttraduccional en els insectes s'havien centrat exclusivament en el dípter *D. melanogaster*, que contràriament a la panerola presenta un desenvolupament holometàbol. Aquesta mosca conté un sol gen *Sumo*, *Smt3*, mentre que el genoma d'altres insectes menys evolucionats com *B. germanica* en té dos: *Sumo1* i *Sumo3*. Tot això convertia la panerola en un model ideal per l'estudi de l'evolució funcional del procés de sumoilació en la classe Insecta.

5.1.1 Els insectes més modificats han perdut un paràleg *Sumo* al llarg de l'evolució

L'estudi filogenètic dut a terme en aquest treball, utilitzant totes les seqüències proteiques *Sumo* presents a les bases de dades, ha permès constatar que els insectes hemimetàbols contenen dos gens *Sumo* (figura 4.1.3). D'aquests, un s'agrupa, per la seva elevada similitud de seqüència, amb els *SUMO1* de vertebrats, mentre que l'altre ho fa amb la família *SUMO2/3*. Entre els insectes hemimetàbols dels que es disposava de les seqüències *Sumo* en el moment de l'estudi hi trobem, a més de *B. germanica*, un representant de l'ordre Phthiraptera (*P. humanus corporis*) i un de l'ordre Hemiptera (*A. pisum*). Aquest darrer presenta anotades a la base de dades tres seqüències molt semblants (difereixen només en algunes insercions o deleccions) que s'agrupen amb els *SUMO1*, i cinc seqüències més que s'agrupen amb els *SUMO2/3*. Aquest elevat nombre de seqüències *Sumo* en *A. pisum* es podria atribuir a errors durant el procés d'ensamblatge del seu genoma, recentment seqüenciat (International Aphid Genomics Consortium, 2010).

El llinatge holometàbol, en canvi, està molt més ben representat en l'estudi filogenètic, ja que es disposa de les seqüències *Sumo* de sis himenòpters, dos coleòpters, quatre lepidòpters i sis dípters. Cadascun dels himenòpters presenta dues seqüències *Sumo*, de les quals una s'agrupa amb els *SUMO1* i l'altra amb els *SUMO2/3*. Coleòpters, lepidòpters i dípters, en canvi, presenten un sol *Sumo*, que s'agrupa amb la família *SUMO2/3*. Tan sols dos dípters, els mosquits *A. aegypti* i *A. gambiae*, tenen dos *Sumo*, però tots dos s'agrupen amb les seqüències *SUMO2/3*. Segons la relació filogenètica acceptada actualment, l'ordre Hymenoptera va divergir abans que els coleòpters, lepidòpters i dípters (Trautwein et al., 2012). Per tant, de l'anàlisi filogenètic se'n desprèn que el gen paràleg *Sumo1* es va perdre en algun moment de l'evolució dels insectes posterior a la divergència dels himenòpters, però anterior a la dels coleòpters.

D'altra banda, el fet que els insectes més ancestrals continguin, a més de *Sumo3*, un paràleg *Sumo1* molt més semblant al *SUMO1* humà que al *SUMO3* (en el cas de *B. germanica*, *BgSumo1* té 63% d'identitat amb *SUMO1* i 42% amb *SUMO3*), suggereix que la duplicació del gen *Sumo* inicial s'hauria donat en algun ancestre comú entre aquestes espècies tant allunyades filogenèticament. En canvi, estudis filogenètics anteriors, on només s'havia utilitzat la seqüència *dSmt3* de *D. melanogaster* com a representativa de la classe Insecta, consideraven que aquesta duplicació s'havia donat en vertebrats (Su and Li, 2002). Curiosament, en plantes s'han arribat a

descriure fins a nou paràlegs *Sumo* en l'espècie *Arabidopsis thaliana* (Kurepa et al., 2003), tot i que els anàlisis filogenètics indiquen que la família de gens *Sumo* s'ha expandit de manera independent en els regnes animal i vegetal (van den Burg et al., 2010).

Pel que fa a les característiques de les seqüències *BgSumo1* i *BgSumo3*, ambdues presenten una doble glicina prop de l'extrem C-terminal, conservada en totes les proteïnes SUMO (figura 4.1.1). Aquesta diglicina marca la zona on han d'actuar les proteases específiques de SUMO, encarregades de transformar la proteïna immadura en madura (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). En *D. melanogaster*, l'estructura de la proteïna dSmt3 s'ha descrit molt més a fons observant que, igual com els SUMO humans, la seva estructura tridimensional es conforma a partir de cinc làmines β i dues hèlixs α (Bayer et al., 1998; Ding et al., 2005; Huang et al., 2004; Kumar et al., 2009). Aquest tipus d'estructura també és compartida per la ubiqüitina (Alexeev et al., 1994).

5.1.2 *BgSumo1* i *BgSumo3* s'expressen en tots els teixits i es localitzen principalment en el nucli

Els anàlisis d'expressió de *BgSumo1* i *BgSumo3* durant la darrera fase nimfal mostraren que els dos paràlegs s'expressen en tots els teixits analitzats (cos gras, glàndula protoràcica, cervell, CA, tub digestiu i ovari) (figura 4.1.4). A més, en glàndula protoràcica aquests nivells eren bastant constants al llarg dels darrers estadis ninfals. En *D. melanogaster* l'expressió de *dSmt3* també és ubiqüa i es dona al llarg de tot el desenvolupament de l'animal, essent més elevada durant l'embriogènesi i en la femella adulta, sobretot durant l'oogènesi (Hashiyama et al., 2009; Huang et al., 1998; Talamillo et al., 2008b). Alguns dels gens que codifiquen pels enzims encarregats de la via de conjugació de dSmt3, com *Ulp1*, *Aos1*, *Uba2* o *lesswright*, també s'expressen majoritàriament en l'embrió, les gònades de les femelles adultes i els teixits indiferenciats (Talamillo et al., 2008b). Per la seva part, els *SUMO1*, *SUMO2* i *SUMO3* humans s'expressen en tots els teixits, mentre que *SUMO4* es troba fonamentalment a ronyons, nòduls limfàtics i melsa (Bohren et al., 2004; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007).

En aquest treball també s'ha observat que tant *BgSumo1* com *BgSumo3* es localitzen majoritàriament en el nucli en cèl·lules S2 de *D. melanogaster*, tot i que també es trobaven, en menor quantitat, en el citoplasma (figura 4.1.5). De manera destacable, la proporció entre proteïna nuclear i citoplasmàtica era significativament major en el cas de *BgSumo3*. Aquesta localització nuclear dels *Sumo* de *B. germanica* s'adiu perfectament amb el fet que molts dels substrats de *Sumo* descrits són proteïnes nuclears. En el cas de *D. melanogaster*, *dSmt3* també es localitza principalment en el nucli de les cèl·lules S2, tot i que quan s'impedeix la seva conjugació a les proteïnes diana la presència en el citoplasma augmenta (Smith et al., 2004). Aquest fet indica que la localització nuclear de *dSmt3* depèn, almenys en part, de la seva unió a les proteïnes diana. Per això, el fet que *BgSumo1* tingués una major proporció de localització citoplasmàtica que *BgSumo3* suggereix que podria no ser capaç de conjugar-se a algunes proteïnes de les cèl·lules S2, o que la seva eficiència a l'hora de possibilitar el transport de la proteïna diana al nucli fos menor. D'altra banda, *dSmt3* també es localitza en el nucli de les cèl·lules polars durant l'embriogènesi, i en el de l'oòcit i les cèl·lules nodrisses de la femella adulta (Hashiyama et al., 2009).

Pel que fa als vertebrats, en cultius de cèl·lules HeLa el SUMO1 humà es troba majoritàriament en el nuclèol i la membrana nuclear, on regula el transport nucli-citoplasma de determinades proteïnes mitjançant la sumoilació de RanGAP1, proteïna activadora de GTPases (Mahajan et al., 1998; Matunis et al., 1998). SUMO2 i SUMO3, per la seva banda, es distribueixen de manera homogènia per tot el nucli. No obstant, igual que en el cas de dSmt3, la localització dels diferents SUMO humans canvia quan se'ls suprimeix la capacitat de conjugarse a proteïnes diana, passant a trobar-se tant en el nucli com en el citoplasma (Ayaydin and Dasso, 2004).

5.1.3 La sumoilació és essencial durant el desenvolupament postembrionari de *Blattella germanica*

L'estudi funcional de la sumoilació en *B. germanica* es va dur a terme durant els darrers estadis del desenvolupament ninfal mitjançant el silenciament simultani dels dos paràlegs *Sumo* (individus BgSumo1-3i), o del gen que codifica per l'enzim conjugador BgUbc9 (individus BgUbc9i). En tots dos casos es va poder comprovar que la sumoilació és essencial per la supervivència de *B. germanica*, ja que en absència d'aquests gens es produïa la mort dels individus pocs dies després de la muda imaginal. A més, mitjançant l'estudi funcional per separat dels dos paràlegs *Sumo* es va observar que l'absència de només una de les dues proteïnes no compromet la viabilitat de la panerola. Això indica que BgSumo1 i BgSumo3 són redundants per a les funcions de supervivència de *B. germanica* controlades pel procés de sumoilació (figura 5.1).

Com s'ha dit anteriorment, aquesta modificació posttraduccional està involucrada en multitud de processos cel·lulars, com el transport intracel·lular de diverses proteïnes, la transcripció gènica, la regulació del cicle cel·lular i el manteniment de la integritat genòmica i nuclear, entre d'altres (Talamillo et al., 2008b). No és d'estranyar, doncs, que diversos estudis hagin demostrat que la sumoilació és essencial per a la supervivència d'organismes tant distants com els llevats o els mamífers (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Martin et al., 2007). Així, mutacions en els gens que codifiquen pels enzims responsables de la conjugació de SUMO són letals en *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, el peix zebra i els ratolins (Dohmen et al., 1995; Huang et al., 2011; Johnson et al., 1997; Jones et al., 2001; Nacerddine et al., 2005; Nowak and Hammerschmidt, 2006). En *D. melanogaster*, la disrupció de la sumoilació provoca letalitat durant l'embriogènesi i compromet la viabilitat cel·lular en discs imaginals i en el sistema nerviós central (Epps and Tanda, 1998; Nie et al., 2009; Watts et al., 2003). En humans, la desregulació del procés de sumoilació està involucrada en diverses malalties, inclosos alguns càncers, la diabetis i malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, el Parkinson o la malaltia de Huntington (Zhao, 2007).

5.1.4 La sumoilació és necessària per la muda imaginal de *Blattella germanica*

A més d'un efecte letal, la supressió del procés de sumoilació (individus BgSumo1-3i o BgUbc9i) durant el darrer estadi ninfal de *B. germanica* produïa alteracions en la muda imaginal.

Aquests defectes consistien en un desplegament deficient de les estructures alars (tegmines i ales), i la torsió de les quetes de les potes (figures 4.I.8 i 4.I.14). Remarcablement, aquesta funció està associada exclusivament al paràleg *BgSumo1* (figura 5.1), ja que els individus *BgSumo1i* també presentaven aquestes alteracions, mentre que els animals *BgSumo3i* tenien un aspecte totalment normal (figura 4.I.19).

A *B. germanica* s'han descrit defectes molt semblants en la muda imaginal de femelles a les quals s'ha silenciada l'expressió d'algun dels receptors nuclears de la via de transducció de la 20E, com *BgEcR*, *BgRXR*, *BgHR3*, *BgHR4* o *BgFtz-F1* (Cruz et al., 2006; Cruz et al., 2007; Cruz et al., 2008; Mané-Padrós et al., 2012; Martín et al., 2006). Tot i que la majoria d'aquestes nimfes no poden completar la muda, les que ho aconsegueixen presenten un desplegament incorrecte de tegmines i ales, així com malformacions en les quetes de les potes. En els insectes, el desplegament i l'expansió de les ales es dona durant l'última part de l'ècdisi, i s'ha vist que està controlat per bursicon, un neuropèptid sintetitzat en determinades neurones cerebrals en resposta a la 20E (Dewey et al., 2004; Peabody et al., 2008). Els mutants del gen *bursicon* de *D. melanogaster*, igual que els del gen que codifica pel seu receptor, *ricketts*, no poden desplegar correctament les ales, ni tampoc esclerotitzar ni pigmentar la nova cutícula (Baker and Truman, 2002). En el coleòpter *T. castaneum*, però, el silenciament de *bursicon* provoca només defectes en el desplegament de les èlitres, sense afectar la pigmentació de la cutícula (Arakane et al., 2008). En *B. germanica* s'ha proposat que els defectes de muda observats en els individus sense *BgEcR*, *BgRXR*, *BgHR3*, *BgHR4* o *BgFtz-F1* podrien ser deguts a una alteració en l'alliberació de bursicon. De fet, l'absència de *Ftz-F1* en les cèl·lules Inka de *D. melanogaster* (encarregades de produir diverses hormones relacionades amb l'ècdisi) bloqueja la secreció d'aquestes hormones i provoca problemes de muda (Zitnan et al., 2007). El fet que la supressió del procés de sumoïlació provoqui la mateixa afectació suggereix una funció d'aquesta modificació posttraduccional en l'alliberació o la transducció del senyal hormonal de bursicon, interaccionant amb el mateix neuropèptid o amb algun/s dels factors de la seva via de senyalització. En aquest sentit, s'han observat diverses dianes de sumoïlació potencials en la seqüència aminoacídica del receptor *ricketts*. Per altra banda, també és possible que la supressió de la sumoïlació estigui afectant la correcta transducció del senyal hormonal de la 20E. En suport a aquesta segona hipòtesi, en el capítol 4.I s'ha demostrat que els receptors nuclears de *B. germanica* *BgEcR-A*, *BgRXR-L*, *BgE75A*, *BgHR3-A*, *BgHR3-B2* i *BgFtz-F1* són capaços d'unir-se a la proteïna SUMO1 humana en condicions *in vitro*, indicant que poden sumoïlar-se (figura 4.I.21). Recentment, també s'ha comprovat que els dos receptors nuclears de *D. melanogaster* que conformen el receptor heterodimèric de la 20E, *EcR* i *USP*, es poden unir als SUMO1 i SUMO3 humans en cèl·lules HEK293, tot i que es desconeixen les implicacions que això podria tenir en la seva funció (Bielska et al., 2012; Seliga et al., 2013; Watanabe et al., 2010). *Ftz-F1*, per la seva banda, se sumoïla en cèl·lules *S2R+* de *D. melanogaster*, i això fa que es redueixi la seva capacitat d'activació transcripcional sobre el receptor Scavenger *Snmp1* (Talamillo et al., 2013). En vertebrats també s'ha demostrat la sumoïlació de diversos receptors nuclears, com el receptor d'androgen (AR) (Poukka et al., 2000), el receptor d'estrogen (ER) (Sentis et al., 2005), el receptor de progesterona (PR) (Abdel-Hafiz et al., 2002), PPAR- γ (Ohshima et al., 2004), LXR (ortòleg d'*EcR*) (Lee et al., 2009), RXR- α (ortòleg d'*USP*) (Choi et al., 2006), ROR- α (ortòleg d'*HR3*) (Hwang et al., 2009), LRH-1 (Yang et al., 2009) i SF-1 (ortòleg de *Ftz-F1*) (Chen et al., 2004). En la

majoria d'aquests receptors nuclears (AR, PR, PPAR- γ , LXR, RXR- α , LRH-1 i SF-1) la sumoilació produeix una disminució de l'activitat transcripcional, mentre que en ER i ROR- α fa que augmenti.

De manera similar a *B. germanica*, en *D. melanogaster* també s'ha demostrat que la sumoilació és essencial per al desenvolupament de l'ala durant el període larvari i pupal, mitjançant la interacció de dSmt3 amb la proteïna Vestigial (Vg), que controla la proliferació i especificació d'aquest teixit (Takanaka and Courey, 2005). A més, l'absència de dSmt3 en el disc imaginal provoca la formació d'una ala adulta molt petita i mal formada, degut a l'activació de mecanismes de mort cel·lular (Huang et al., 2011). Aquest podria ser el cas de les tegmines i les ales dels individus BgSumo1-3i, BgUbc9i i BgSumo1i de *B. germanica*, que són significativament més petites (figures 4.I.8, 4.I.14 i 4.I.19). D'altra banda, s'ha descrit que la sumoilació dels factors de transcripció Spalt (Sal) i Spalt-related (Salr) és essencial per la formació correcta del patró de venes de l'ala adulta, ja que la seva absència provoca l'aparició de venes ectòpiques (Sánchez et al., 2010; Sánchez et al., 2011). En *B. germanica*, tot i que no s'observa la presència de venes ectòpiques en les tegmines i ales dels individus BgSumo1-3i, BgUbc9i i BgSumo1i, la visió en detall d'aquestes estructures si que mostra una lleugera afectació en la delimitació de la zona vena-intervena, que en *D. melanogaster* s'ha comprovat que depèn de l'acció del receptor de membrana Notch (de Celis and García-Bellido, 1994; de Celis et al., 1997). Tot i que fins al moment no s'ha estudiat la capacitat de sumoilarse d'aquest factor, podria ser que es veies afectat per l'absència d'aquesta modificació posttraduccional.

5.1.5 El paràleg BgSumo1 controla la cascada de resposta a la 20E durant la metamorfosi de *Blattella germanica*

El silenciament de *BgSumo1* durant els dos darrers estadis nimfals comportava una altra afectació important: el retard significatiu de la muda imaginal. Els individus BgSumo1i que mudaven a adult ho feien una mitjana de 2.5 dies més tard que els Control, mentre que els BgSumo3i no mostraven cap retard en el seu desenvolupament (figura 4.I.17). A més, el 19% dels BgSumo1i ni tan sols aconseguen mudar, i romanien en el sisè estadi nimfal durant tota la vida (taula 4.I.3). En aquests individus, l'anàlisi d'expressió de diferents receptors nuclears encarregats de la transducció del senyal ecdisteroidal suggeria que el pic de 20E que indueix la muda imaginal no es donava de manera normal (figura 4.I.18). Aquest fenotip era molt semblant a l'observat en *D. melanogaster*, on s'ha comprovat que l'absència de dSmt3 en la glàndula protoràtica durant el període larvari impedeix l'inici de la metamorfosi degut a la baixa producció de 20E (Talamillo et al., 2008a). Això fa que aquestes larves es quedin en el darrer estadi pre-metamòrfic (L3) indefinidament. La incapacitat d'aquestes larves per sintetitzar ecdisteroides es deu al fet que dSmt3 regula l'expressió de receptors Scavenger (SR-BI) que controlen la incorporació de colesterol a la glàndula protoràtica (Talamillo et al., 2013). A més, dSmt3 també controla l'expressió i modifica l'activitat del receptor nuclear β Ftz-F1, imprescindible per l'inici de la metamorfosi i necessari per a la inducció del receptor Scavenger Snmp1 (Talamillo et al., 2013).

Remarcablement, quan se silenciaven els dos paràlegs *Sumo* de *B. germanica* de manera simultània (animals BgSumo1-3i) també hi havia un percentatge d'individus (13%) que no iniciaven la muda imaginal (taula 4.I.2). Això suggeria que, igual que en el cas dels BgSumo1i, podrien presentar una afectació en la producció i/o transducció del senyal de la 20E. Aquests individus, però, morien tot seguit, fet que impedia saber si haurien mudat amb retard o no haurien mudat mai. Curiosament, aquest fenomen tenia més incidència en els individus BgSumo1i que en els BgSumo1-3i (el 81% dels quals mudaven amb un *timing* normal), probablement pel fet que el tractament amb *dsRNA* en els primers s'aplicava a l'inici del penúltim estadi nimfal, mentre que en els BgSumo1-3i s'aplicava a l'inici del darrer estadi nimfal. Aquests BgSumo1-3i, per tant, disposaven de menys temps per eliminar BgSumo1 abans de la muda imaginal.

5.1.6 El paràleg *BgSumo1* controla la proliferació de les cèl·lules fol·liculars

La sumoilació és essencial per a la proliferació i la progressió del cicle cel·lular en la majoria de models on s'ha estudiat a nivell funcional, des d'organismes unicel·lulars com el protist *Trypanosoma brucei* a organismes més complexos com el nemàtode *C. elegans*, el peix zebra *Danio rerio*, la granota africana *Xenopus laevis* o el ratolí *Mus musculus* (Liao et al., 2010; Nacerddine et al., 2005; Nowak and Hammerschmidt, 2006; Poulin et al., 2005; Terada and Furukawa, 2010). En *B. germanica*, per estudiar la funció de la sumoilació sobre la proliferació cel·lular s'ha utilitzat com a model un teixit que es divideix activament durant el darrer estadi nimfal, l'epiteli fol·licular de l'oòcit basal. El silenciament del procés de sumoilació (animals BgSumo1-3i o BgUbc9i) provocava una deficiència significativa en la proliferació de les cèl·lules d'aquest teixit (figura 4.I.9 i 4.I.15). Aquest fet s'observava també en els oòcits dels individus BgSumo1i (figura 4.I.20). Això feia que, un cop assolit l'estadi adult, tant els animals BgSumo1-3i com els BgUbc9i i els BgSumo1i presentessin ovaris significativament més petits i no iniciessin el cicle gonadotròfic. Per tant, els seus oòcits no eren mai fecundats i aquests individus no es podien reproduir. D'altra banda en els individus BgSumo3i s'observaven uns oòcits basals completament normals que eren capaços, un cop fecundats, de formar embrions perfectament viables. Tot això indicava que la funció de proliferació en les cèl·lules fol·liculars de *B. germanica* està controlada per el paràleg *BgSumo1* (figura 5.1). D'altra banda, també es va observar que les tegmines i les ales dels individus BgSumo1-3i, BgUbc9i i BgSumo1i eren significativament més petites que les dels Control o les dels BgSumo3i (figura 4.I.8, 4.I.14 i 4.I.19), el que suggereix que BgSumo1 també podria estar involucrat en la proliferació d'aquestes estructures. No obstant, no s'ha explorat amb més detall aquesta possibilitat.

El paper de Sumo en la regulació de la proliferació cel·lular també s'ha descrit en *D. melanogaster*. En aquest dípter s'ha comprovat que la sumoilació és essencial per la progressió del cicle cel·lular en l'embrió i els discs imaginals de l'ull i l'ala, on les cèl·lules sense l'enzim activador Aos1 arreten durant la transició G2/M (inici de la mitosi) (Kanakousaki and Gibson, 2012). La sumoilació també és imprescindible per a la divisió de les cèl·lules S2, on la manca de dSmt3 provoca l'arrest del cicle cel·lular durant la transició G1/S (just abans de l'inici de la duplicació del contingut genètic) (Nie et al., 2009). D'acord amb aquestes afectacions, en *D.*

melanogaster s'han descrit nombroses proteïnes diana de dSmt3 que tenen una funció durant la mitosi, com per exemple la quinasa Polo, necessària per a la formació del fus mitòtic, la Topoisomerasa 2, involucrada en la segregació dels cromosomes, o la fosfatasa PP2A, que

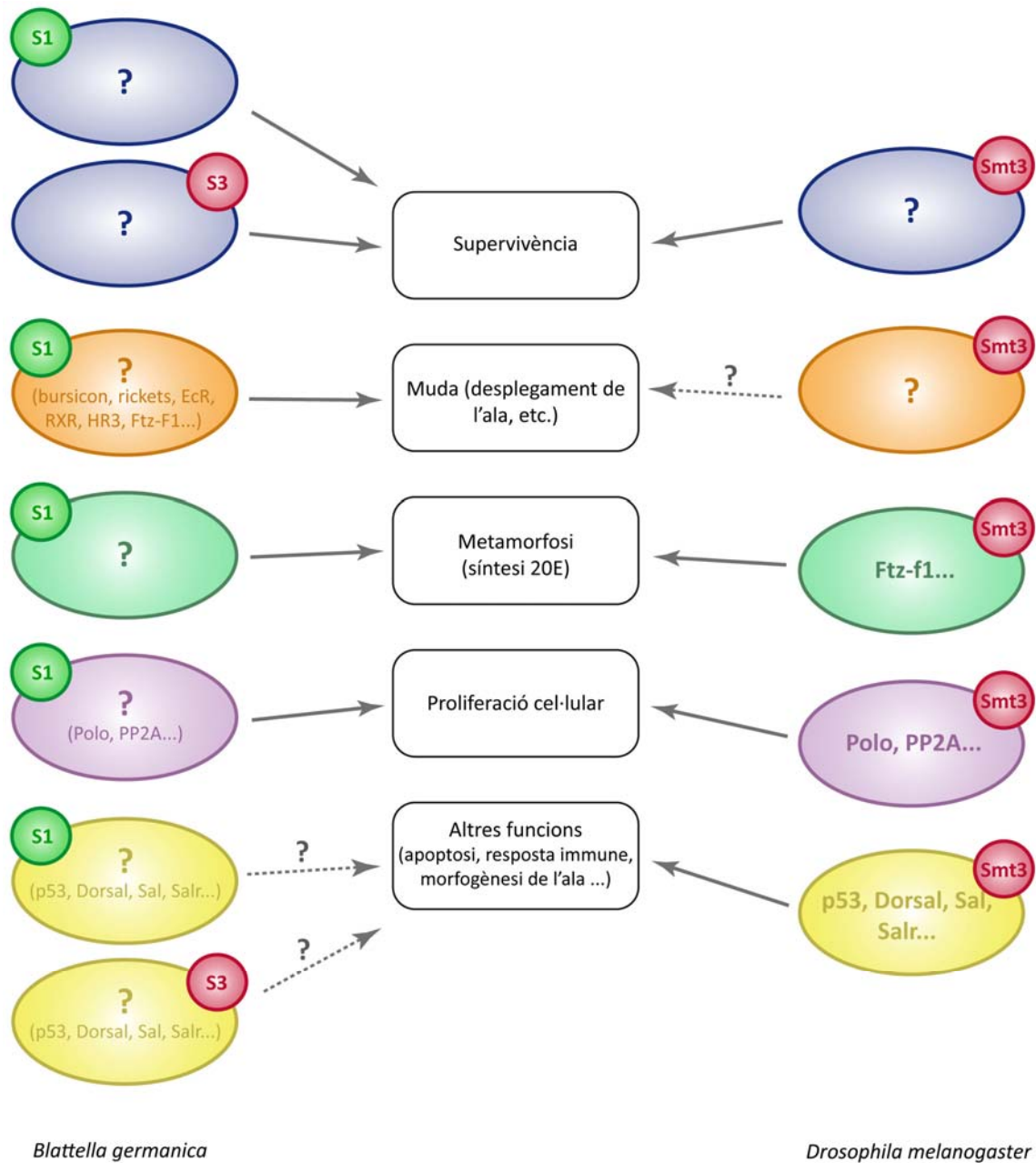


Figura 5.1. Funcions de la sumoïlació en *Blattella germanica* i *Drosophila melanogaster*. Esquema on es correlacionen les funcions que el procés de sumoïlació controla en la panerola *B. germanica* i la mosca *D. melanogaster*, així com el paràleg *Sumo* concret que les desenvolupa. Les esferes de color verd representen la proteïna BgSumo1 (S1), i les de color vermell representen BgSumo3 (S3) o la proteïna Smt3 de *D. melanogaster*. Les el·lipses representen la/les proteïna/es que se sumoïllen per dur a terme les funcions indicades. L'interrogant del seu interior indica que no han estat descrites de moment, i en parèntesi s'assenyalen possibles candidats. Les fletxes discontinües indiquen que la funció assenyalada no s'ha descrit de moment en aquesta espècie.

participa en la síntesi del DNA i altres etapes del cicle cel·lular (Dasso, 2008; Nie et al., 2009). A més, la localització de dSmt3 en la regió centromèrica durant el període mitòtic recolza les evidències que assenyalen que té una funció clau durant aquest procés (Nie et al., 2009).

Per altra banda, les cèl·lules fol·liculars de *B. germanica* presentaven uns nuclis molt grans i d'aspecte anormal en els individus BgSumo1-3i, BgUbc9i i BgSumo1i (figures 4.1.9, 4.1.15 i 4.1.20, respectivament). En aquest sentit, s'han descrit fenotips semblants en alguns mutants on l'absència de la sumoilació provoca segregació aberrant dels cromosomes, hipercondensació i polipoidia, com en els embrions de ratolí deficientes per Ubc9 (Nacerddine et al., 2005). També en el peix zebra la manca d'Ubc9 durant l'embriogènesi, a més d'impedir la proliferació, provoca replicacions addicionals del DNA en algunes cèl·lules, que poden arribar a tenir entre quatre i vuit còpies cromosòmiques (Nowak and Hammerschmidt, 2006). Tot això suggereix que l'absència de BgSumo1 en *B. germanica* podria estar provocant la formació de nuclis poliploides.

5.1.7 L'evolució de la funcionalitat de les proteïnes Sumo en insectes

Per tal d'aprofundir en l'estudi de les diferències funcionals que presenten els dos paràlegs *Sumo* de *B. germanica* es va analitzar la seva capacitat de rescatar la deficiència de dSmt3 en *D. melanogaster*. Contràriament a l'observat en *B. germanica* (on BgSumo1 és indispensable per a diversos processos nimfals mentre que BgSumo3 duu a terme funcions redundants), només BgSumo3 era capaç de compensar la deficiència de dSmt3 en el disc d'ala i la glàndula protoràcica de *D. melanogaster* (figura 4.1.22). Aquests resultats indicaven que BgSumo3 conté tots els elements necessaris per a substituir funcionalment dSmt3, mentre que BgSumo1 no. A nivell de seqüència, BgSumo3 és molt més semblant a dSmt3 (82%) que BgSumo1 (43%). Sembla lògic pensar que BgSumo3 podria estar aportant a les proteïnes diana de *D. melanogaster* una conformació i unes propietats molt semblants a les conferides per la unió amb dSmt3. En aquest sentit, l'estructura tridimensional de dSmt3 i la de la proteïna SUMO3 humana presenten una semblança molt gran (Kumar et al., 2009). En canvi, l'estructura del SUMO1 humà, tot i presentar la conformació característica de les proteïnes SUMO amb dues hèlix- α i cinc làmines- β , mostra més diferències amb les proteïnes SUMO3 humana i dSmt3 (Martin et al., 2007). D'altra banda, s'ha descrit en l'apartat de resultats que la localització dels dos paràlegs *Sumo* de *B. germanica* en cèl·lules S2 de *D. melanogaster* era majoritàriament nuclear, tot i que BgSumo1 contenia una proporció major de localització citoplasmàtica que BgSumo3. Tal i com s'ha especulat en l'apartat 5.1.2, això podria indicar que la capacitat de BgSumo1 per transportar les proteïnes sumoilades al nucli de les cèl·lules S2 és menor, ja que s'ha descrit en diversos estudis que la localització de dSmt3 en aquest tipus cel·lular és, gairebé exclusivament, nuclear (Smith et al., 2004).

Una segona possibilitat seria el fet que la maquinària de conjugació de dSmt3 no pogués reconèixer i unir BgSumo1 a les proteïnes dianes. Això no sembla probable si es té en compte que les espècies amb més d'un *Sumo*, com per exemple els vertebrats, utilitzen el mateix mecanisme de conjugació per als diferents paràlegs (Gareau and Lima, 2010; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). A més, l'alt grau de conservació entre els diferents enzims conjugadors Ubc9 d'insectes, inclòs el de *B. germanica*, suggereix que aquest enzim no seria limitant per a la

unió de BgSumo1. Tot i això, caldria comprovar si realment BgSumo1 és capaç de sumoilar proteïnes de *D. melanogaster* per desestimar aquesta hipòtesi.

Finalment, s'ha vist que en vertebrats els SUMO2/3 tenen residus Lisina prop de l'extrem amino terminal que s'utilitzen com a acceptors de SUMO, i que no estan presents en SUMO1. Això permet a les proteïnes SUMO2/3 formar cadenes de manera eficient, tant *in vitro* com *in vivo* (Pedrioli et al., 2006; Tatham et al., 2001). Aquestes cadenes s'acumulen en condicions d'estrès, i s'ha suggerit que actuen com a senyal per a la ubiquïtinació i posterior degradació de les proteïnes a les quals estan unides (Castorálová et al., 2012; Tatham et al., 2011). Recentment, a partir d'estudis proteòmics s'ha observat que també els SUMO1 poden formar cadenes *in vivo*, en Lisines no-consens, tot i que de moment se'n desconeix la funcionalitat (Blomster et al., 2010; Galisson et al., 2011). Tenint en compte aquesta característica d'alguns SUMO de formar cadenes, existeix la possibilitat que la clau del rescat de la deficiència de dSmt3 estigui en la diferent habilitat dels paràlegs BgSumo1 i BgSumo3 per formar cadenes. En aquest sentit, *BgSumo1* conté un consens de sumoilació (EQKP) que no està present en *BgSumo3* ni en *dSmt3*. No obstant, caldria estudiar la capacitat de sumoilar-se dels diferents Sumo per tal d'aprofundir en aquesta possibilitat.

5.II E93 ACTUA COM A ESPECIFICADOR ADULT EN ELS INSECTES HEMIMETÀBOLS I HOLOMETÀBOLS

En els capítols 4.II, 4.III i 4.IV s'han mostrat els resultats obtinguts en l'estudi funcional del factor de transcripció E93 que han permès descriure'l com l'especificador adult tant en insectes hemimetàbols (*B. germanica*) com holometàbols (*T. castaneum* i *D. melanogaster*). Aquest és un fet molt rellevant en l'estudi dels mecanismes moleculars que regulen la metamorfosi dels insectes, ja que introdueix un element clau en aquest procés que fins al moment es desconeixia. A més, obre la porta al plantejament de noves hipòtesis que puguin ajudar a desxifrar l'enigma que suposa l'aparició de la metamorfosi completa a partir d'ancestres amb metamorfosi incompleta.

5.II.1 E93 és un factor de transcripció de la família Pipsqueak

Les proteïnes E93 contenen un domini d'unió a DNA *helix-turn-helix* (HTH) de tipus Pipsqueak (Psq), que les engloba dins la família de proteïnes Psq (Siegmond and Lehmann, 2002). Aquest domini consta de 54 aminoàcids molt conservats en tots els ortòlegs d'E93 d'insectes, i fins i tot en els d'humans (*LCoR* i *LCoR-Like*) (figura 4.II.1). Aquest elevat grau de conservació ha permès el clonatge de la seqüència E93 de la panerola *B. germanica*, *BgE93*. En aquesta, igual que en *T. castaneum* (*TcE93*), s'ha detectat un sol domini Psq, mentre que d'altres ortòlegs com el d'*A. mellifera* (anomenat *Mblk-1*) en contenen dos: RHF1 i RHF2 (Takeuchi et al., 2001). Per la seva banda, les dues isoformes de l'ortòleg en *D. melanogaster* (*DE93A* i *DE93B*) presenten, a més del Psq canònic, un segon domini molt semblant que conté substitucions d'alguns residus que el fan incompatible amb l'estructura HTH clàssica (Siegmond and Lehmann, 2002).

Nombrosos indicis indiquen que les proteïnes E93 són factors de transcripció. A més del citat domini d'unió a DNA (Psq), contenen un potencial senyal de localització nuclear (RPKRGKYR) (Kalderon et al., 1984), així com dominis rics en glutamina, en el cas de *DE93*, i prolina, en el cas de *BgE93*, que poden actuar com a dominis activadors de la transcripció (Gerber et al., 1994). A més, tal i com s'espera en un factor de transcripció, *DE93* es localitza en el nucli de les cèl·lules de *D. melanogaster*, s'uneix en regions específiques dels cromosomes politènics de la glàndula salival i la seva absència afecta la transcripció de gens situats en aquests *loci* (Lee et al., 2000). Tot i això, fins al moment només s'ha demostrat la capacitat d'unió a DNA en l'ortòleg present a *A. mellifera*, *Mblk-1*. Aquest s'uneix específicament a la seqüència 5'-CCCTATCGATCGATCTCTACCT-3', que conté un motiu palindròmic (ATCGATCGAT) (Park et al., 2002).

5.II.2 E93 s'expressa durant el període metamòrfic en insectes hemimetàbols i holometàbols

En la caracterització d'E93 com a factor indispensable per al correcte progrés de la metamorfosi dels insectes s'han utilitzat com a model l'hemimetàbol *B. germanica* i els

holometàbols *T. castaneum* i *D. melanogaster*. En totes tres espècies, l'expressió dels respectius ortòlegs *E93* s'activa just abans de l'inici del període metamòrfic, i es manté fins a l'eclosió de l'adult, en coherència amb la funció de diferenciació adulta desenvolupada per aquest factor. En *B. germanica*, *BgE93* augmenta considerablement els seus nivells immediatament després de l'inici del darrer estadi nimfal. Remarcablement, aquesta activació es dona en els tres teixits metamòrfics analitzats (glàndula protoràcica, estructures alars i epidermis) mentre que no es produeix en un teixit que no pateix canvis metamòrfics, el cos gras (figura 4.II.3). En *T. castaneum* l'expressió de *TcE93* augmenta durant els primers dies de la darrera fase larvària, es fa molt més pronunciada durant la prepupa i arriba als seus nivells màxims en els primers dies de l'estadi pupal, on té lloc la diferenciació adulta (figura 4.III.2). També en *D. melanogaster* tant *DE93A* com *DE93B* s'activen durant la fase prepupal i presenten els seus nivells més alts durant el període pupal (figura 4.III.9). No obstant, estudis en aquest dípter han demostrat que la presència de *DE93* no es dona de manera idèntica en tots els teixits, sinó que presenta un patró molt més complex, amb especificitat temporal i tissular. En general l'activació transcripcional de *DE93* es dona en resposta a diferents pics de 20E, tot i que en alguns teixits és independent dels nivells d'aquesta hormona (Baehrecke and Thummel, 1995; Lee et al., 2000; Mou et al., 2012; Tweedie et al., 2009). Així, en el tub digestiu s'activa responant al pic que es dona durant la formació del pupari (0h APF), però només en les cèl·lules larvàries, ja que ens les imaginals ho fa un cop formada la pupa. En la glàndula salival, en canvi, s'indueix pel pic de 20E de 12h APF, i provoca l'inici de la degeneració del teixit (Lee et al., 2000). La regulació específica en aquest òrgan es podria donar a través del receptor nuclear β Ftz-f1, que s'ha comprovat que s'uneix directament al promotor de *DE93* i que actua de factor de competència per permetre la seva inducció en resposta a la 20E (Broadus et al., 1999; Woodard et al., 1994). En les cèl·lules que han de formar les estructures adultes, com els discs imaginals i els nius d'histoblasts abdominals, *DE93* no es detecta fins després de l'eversió del cap i la formació de la pupa, de manera consistent amb la seva funció de diferenciador adult (Mou et al., 2012). En aquests teixits, la seva presència és uniforme en un primer moment, però posteriorment es fa més restrictiva. En l'ala pupal, per exemple, *DE93* disminueix en els venes en desenvolupament; en la pota pupal, per la seva banda, està present tant en les cèl·lules que formaran les quetes com en les que formaran les bràctees (estructures unicel·lulars pigmentades, adjacents a les quetes) fins a les 30-36h APF, quan desapareix en les quetes i es manté tan sols a les bràctees, essent imprescindible per l'especificació d'aquesta estructura (Mou et al., 2012). En l'ull, el patró d'expressió és molt dinàmic i extremadament complex. En d'altres teixits, com el sistema nerviós central (CNS), l'activació de *DE93* es dona a les 12h APF, però no depèn de la 20E (Baehrecke and Thummel, 1995). Aquesta complexa variabilitat en la regulació de *DE93*, específica de cada teixit i estadi, suggereix que pot estar duent a terme diferents processos depenent del moment i el lloc on està present. Per altra banda, en l'abella de la mel, *A. mellifera*, s'ha estudiat l'expressió de *Mblk-1* en el cervell adult, que es concentra a les cèl·lules Kenyon (Takeuchi et al., 2001).

5.II.3 E93 és l'especificador adult en els insectes hemimetàbols i holometàbols

L'anàlisi funcional en cadascun dels organismes estudiats va revelar que *E93* és imprescindible per assolir l'estadi adult. En *B. germanica*, l'absència de *BgE93* durant el darrer

estadi nimfal provocava la formació d'un estadi nimfal supernumerari. Aquest mantenien totes les característiques de les nimfes: (1) les tegmines i les ales es trobaven dins els *wing pads* toràcics i les seves cèl·lules no canviaven de conformació; (2) mantenien la coloració nimfal de la cutícula, així com la morfologia dels cercs nimfals i dues franges amples de color negre en el pronot; (3) la glàndula protoràcica no degenerava, fet que els permetia mudar a nous estadis nimfals supernumeraris; i (4) les cèl·lules dels CA seguien proliferant i no s'activaven els gens encarregats de la producció massiva d'HJ característica de l'entrada a l'estadi adult (figures 4.II.5 i 4.II.7). De manera semblant, l'absència de TcE93 durant la darrera fase larvària de *T. castaneum* també impedia el pas a l'estadi adult. Així, tot i que la majoria de larves pupaven de manera normal, durant aquest estadi no es donaven els processos de segmentació i pigmentació característics de la diferenciació adulta, i en comptes de l'individu adult es formava un segon estadi pupal (figura 4.III.6). De la mateixa manera, l'absència de DE93 en *D. melanogaster* també impedia la diferenciació adulta durant la fase pupal (figura 4.III. 10).

Inicialment, DE93 es va descriure en aquest dípter com l'encarregat de transmetre el senyal hormonal que indueix la mort cel·lular programada de teixits larvaris, com les glàndules salivals o el sistema digestiu larvari, durant la metamorfosi (Lee et al., 2000). Aquesta funció també s'ha observat en *B. germanica*, on BgE93 controla la mort de la glàndula protoràcica al final del període nimfal (figura 4.II.7). En *D. melanogaster*, DE93 controla la degeneració de les glàndules salivals regulant l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes inductores de mort cel·lular com *reaper (rpr)*, *head involution defective (hid)*, *croquemort (crq)*, *apaf-1-related killer (ark)* o el gen que codifica per la caspasa Dronc (*dronc*) (Daish et al., 2003; Lee and Baehrecke, 2001; Lee et al., 2000). A més, s'ha localitzat DE93 en algunes zones dels cromosomes politènics d'aquestes glàndules que contenen gens involucrats en la mort cel·lular programada, com *dredd*, *crq*, *dcp-1* o *drICE* (Lee et al., 2000). Recentment, però, s'han descrit alguns al·lels mutants de DE93 que demostren que aquest factor de transcripció no controla només els processos de degeneració que es donen durant la metamorfosi de la mosca, sinó que també està involucrat en la formació i diferenciació de diverses estructures adultes com els ulls, les antenes, les estructures bucals, les ales, les potes i l'abdomen (Mou et al., 2012). A més, l'estudi exhaustiu de la funció de DE93 en la formació de les bràctees de les potes ha demostrat que actua com a factor d'identitat adulta en aquesta estructura, permetent que la cèl·lula pugui respondre als senyals específics que n'indueixen la diferenciació (Mou et al., 2012). La funció diferenciadora de DE93 també ha estat descrita àmpliament per la Dra. Cristina Manjón, en el laboratori del Dr. David Martín, a través de la interferència específica d'aquest factor en diversos teixits de la mosca (figura 4.III.10 i resultats no publicats).

Les dades obtingudes en aquesta tesi doctoral indiquen que E93 és el factor encarregat de regular tots els processos metamòrfics en els insectes hemimetàbols i holometàbols, tant els que impliquen la degeneració de teixits larvaris com els que comporten el desenvolupament i la diferenciació de les estructures adultes. Aquests processos estan alhora controlats per la cascada de resposta a la 20E (Dubrovsky, 2005). El fet que aquesta cascada gènica es trobi també present en totes les transicions nimfals/larvàries anteriors a la metamòrfica suggereix que E93 podria ser el factor responsable de modular l'acció de la 20E durant la metamorfosi, permetent l'activació del programa genètic adult. A més, la seva distribució tissular diferencial suggereix que aquest factor podria proporcionar un mecanisme molecular capaç de refinar el senyal

sistèmic de la 20E per possibilitar una resposta biològica concreta depenent del teixit. En favor d'aquesta hipòtesi s'ha descrit que un dels dos ortòlegs *E93* en humans, LCoR (de l'anglès *ligand-dependent nuclear corepressor*), s'uneix a diversos receptors nuclears que actuen de receptors hormonals esteroidals, com el receptor d'estrogen α (ER α), el de progesterona (PR) i el de glucocorticoides (GR), de manera dependent de lligand (Fernandes et al., 2003; Palijan et al., 2009). També d'altres receptors nuclears interaccionen amb LCoR, com el receptor de vitamina D (VDR) i RXR α . Aquesta unió, que es dona a través d'un domini LXXLL, provoca la repressió de la transcripció una vegada el receptor nuclear s'ha unit al seu lligand (Fernandes et al., 2003; Heery et al., 1997). El domini d'interacció amb receptors nuclears LXXLL està present en tots els ortòlegs *E93* d'insectes dels que es disposa de la seqüència completa, fet que suggereix que *E93* podria estar actuant com a corepressor del receptor de 20E, EcR, o d'algun altre receptor nuclear. D'acord amb aquesta hipòtesi, l'estudi de la localització de DE93 en els cromosomes politènics de *D. melanogaster* mostra la seva presència en algunes regions cromosòmiques que contenen gens regulats per la 20E, com *E74*, *E75* o el mateix *E93* (Lee et al., 2000). Així doncs, seria interessant explorar la capacitat d'interacció dels *E93* d'insectes amb el receptor de la 20E o altres receptors nuclears, per tal de comprovar si aquest és el mecanisme molecular utilitzat pel diferenciador adult per modificar la cascada de resposta a la 20E durant la metamorfosi.

De manera similar al que ocorre durant el darrer estadi juvenil dels insectes, la pubertat en els mamífers també està controlada per diversos factors hormonals. Dels dos ortòlegs d'*E93* descrits en humans, fins al moment només s'ha estudiat la funció de *LCoR-Like*, que s'ha relacionat amb el control de l'alçada (Kim et al., 2010; Soranzo et al., 2009). L'altre ortòleg, *LCoR*, s'expressa en nombrosos teixits del fetus i l'adult, inclosos la placenta, el cerebel, el cos callós i el ronyó (Fernandes et al., 2003). Donat el grau de conservació entre *E93* i LCoR, juntament amb el fet que aquest darrer interacciona amb diversos receptors hormonals, seria interessant comprovar si desenvolupa algun paper durant la maduració sexual i l'activació del programa genètic adult en humans.

5.II.4 *E93* i l'hormona juvenil actuen de manera coordinada durant l'inici de la metamorfosi

Tant en els insectes hemimetàbols com en els holometàbols el pas de l'estadi juvenil a l'estadi adult depèn, a més de la presència d'*E93*, de la desaparició de l'HJ durant el darrer període nimfal/larvari (Nijhout, 1994; Riddiford, 2012). D'acord amb aquesta funció antimetamòrfica de l'HJ, en el capítol 4.II s'ha demostrat que l'aplicació ectòpica de metoprè (anàleg de l'HJ) durant la darrera fase nimfal de *B. germanica* provocava l'aparició de caràcters ninfals després de la muda imaginal, de manera dosi-dependent (figura 4.II.8). A més, la juvenilització observada era directament proporcional a la presència de BgKr-h1: quant major era la dosi de metoprè administrada, més elevats eren els nivells d'expressió de *BgKr-h1* i major el grau de juvenilització (figura 4.II.8). Aquesta funció antimetamòrfica s'ha demostrat també en d'altres insectes hemimetàbols, com *R. prolixus* o *P. apterus*, on el tractament amb HJ ectòpica durant la darrera fase nimfal impedeix la metamorfosi i provoca l'aparició d'un nou estadi nimfal mitjançant l'activació de *Kr-h1* (Konopova et al., 2011; Wigglesworth, 1940). A més, la presència de *Kr-h1* durant el penúltim estadi nimfal és imprescindible per impedir la metamorfosi

prematura (Konopova et al., 2011; Lozano and Belles, 2011). De manera similar, en l'holometàbol *T. castaneum* Kr-h1 respon a l'HJ per bloquejar la metamorfosi durant els estadis larvaris previs al darrer (Konopova and Jindra, 2007; Minakuchi et al., 2008b; Minakuchi et al., 2009), mentre que l'aplicació ectòpica d'anàlegs d'aquesta hormona durant la darrera fase larvària provoca la formació de larves supernumeràries (Parthasarathy and Palli, 2009).

Malgrat la funció antimetamòrfica de l'HJ, en aquest treball s'ha comprovat que l'activació transcripcional de l'especificador adult BgE93 durant el darrer estadi nimfal no està controlada, almenys principalment, per aquesta hormona (figura 4.II.8). Per altra banda, la interferència de *BgE93* des de l'inici d'aquesta fase tampoc provocava la reinducció dels nivells d'HJ i *BgKr-h1* (figura 4.II.9), demostrant que l'especificador adult no controla la producció d'aquesta hormona. Aquests resultats, en definitiva, indicaven que BgE93 i la via de senyalització de l'HJ controlen l'entrada a la metamorfosi a través de vies d'acció paral·leles (figura 5.2). Això fa imprescindible la perfecta coordinació temporal entre la caiguda dels nivells d'HJ i l'activació transcripcional de *BgE93*, i suggereix que ambdós fets podrien estar regulats per un mateix senyal. Aquest senyal podria estar relacionat amb la mida de l'animal, tenint en compte que en d'altres insectes, com *D. melanogaster* o *M. sexta*, s'ha comprovat que es requereix arribar a un pes mínim (pes crític) per tal de poder iniciar la metamorfosi (Mirth and Riddiford, 2007; Mirth and Shingleton, 2012) (figura 5.2).

D'altra banda, els resultats obtinguts en *B. germanica* demostraven que l'HJ i BgKr-h1 no són essencials per al manteniment dels caràcters nimfals en absència de BgE93, i que la seva funció es limita a impedir la diferenciació adulta. En aquest sentit, recentment s'ha comprovat que l'absència de BgKr-h1 durant la penúltima fase nimfal (N5) de *B. germanica* provoca la muda prematura a l'estadi adult al final d'aquesta fase (Lozano and Belles, 2011). Tenint en compte que BgE93 és imprescindible per a que es doni la metamorfosi, aquesta aparició precoç de caràcters adults es podria donar per (a) l'acció adultitzadora dels nivells basals de *BgE93* presents durant la penúltima fase nimfal, o bé per (b) l'activació transcripcional prematura de *BgE93*. La primera hipòtesi indicaria que la quantitat de BgE93 present a N5 és suficient per a l'activació del programa genètic adult, però que BgKr-h1 actua durant aquesta fase impeding-ne l'acció. La segona opció, en canvi, implicaria que l'HJ, a través de BgKr-h1, està impeding l'activació transcripcional de *BgE93* durant el penúltim estadi nimfal. Aquest fet entraria en contradicció amb el resultat observat després de l'aplicació de metoprè durant la darrera fase nimfal, que no evitava l'activació de *BgE93* (figura 4.II.8). No obstant, podria ser que el senyal que induï *BgE93* estigués ja present durant el penúltim estadi nimfal però que BgKr-h1 fos capaç de bloquejar-lo, impeding l'activació transcripcional de *BgE93*. Aquest senyal, un cop iniciat l'últim període nimfal, hauria de fer-se molt més intens, de manera que el manteniment d'alts nivells de *BgKr-h1* a través de l'aplicació ectòpica d'HJ no fos capaç d'impedir l'activació transcripcional de l'especificador adult. La mesura dels nivells d'expressió de *BgE93* a N5, en absència de BgKr-h1, permetria saber quina de les dues hipòtesis és més probable.

Remarcablement, l'absència de BgKr-h1 en estadis nimfals anteriors al penúltim no provoca la formació d'un adult prematur fins al final de N5 en *B. germanica* (Lozano and Belles, 2011). De manera semblant, en el cuc de seda *B. mori* el mutant nul del gen *CYP15C1*, que codifica per un dels enzims involucrats en la síntesi de l'HJ, provoca l'absència d'aquesta

hormona des de l'inici del desenvolupament larvari, però la metamorfosi precoç no es dona fins al final del tercer estadi larvari (Daimon et al., 2012). A més, la sobreexpressió d'una esterasa específica de l'HJ en aquest lepidòpter també implica l'inici prematur de la metamorfosi només a

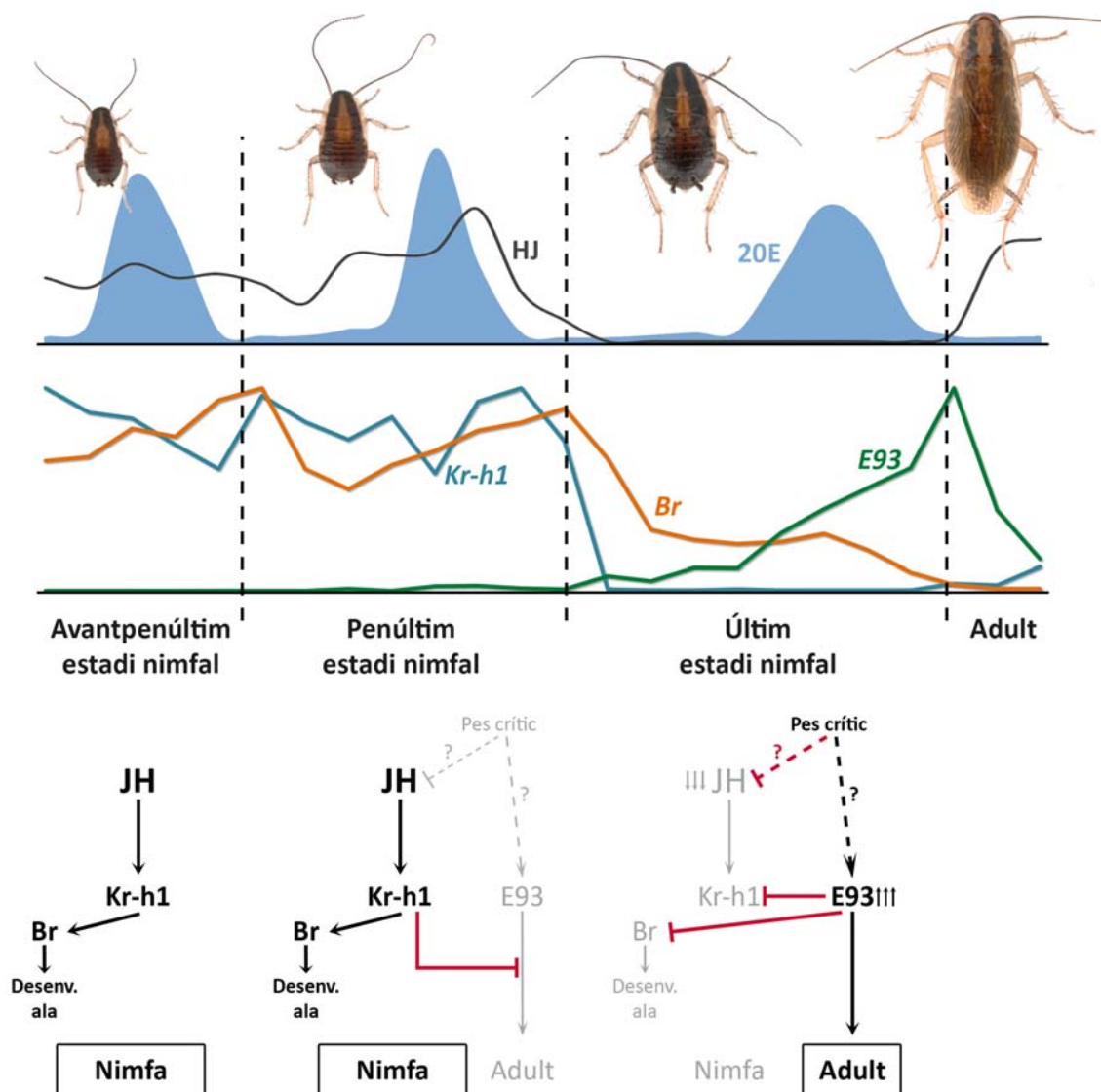


Figura 5.2. Model de regulació de la metamorfosi hemimetàbola. A la part superior es representen els nivells de 20-hidroxieclicidona (20E) (àrea blava) i d'hormona juvenil (HJ) (línia gris fosc) presents durant el desenvolupament nimfal de *B. germanica*. Es mostren també les variacions en l'expressió de *BgE93*, *BgKr-h1* i *BgBr* durant els darrers tres estadis nimfals. Els esquemes de la part inferior de la figura descriuen les interaccions que es donen entre els diversos factors involucrats en la regulació de la metamorfosi, basant-se principalment en els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, així com en d'altres treballs en insectes hemimetàbols. Les fletxes negres assenyalen induccions, mentre que les línies vermelles indiquen repressió. Les fletxes i línies grises indiquen regulacions i interaccions que no s'estan donant en el moment representat. Les fletxes i línies discontinües indiquen induccions i repressions no demostrades. Els nivells de 20E i HJ durant l'últim i el penúltim estadi nimfal s'han extret de Cruz et al. (2003) i Treiblmayr et al. (2006), respectivament. Els nivells de 20E i HJ durant l'avantpenúltim estadi nimfal corresponen a *Nauphoeta cinerea* (Lanzrein et al., 1985), panerola que pertany al mateix ordre que *B. germanica* (Blattodea). L'expressió de *BgKr-h1* prové de Lozano et al. (2011), i la de *BgBr* de Huang et al. (2013).

partir del tercer estadi larvari (Tan et al., 2005). En *T. castaneum* s'ha observat que l'absència de Met i Kr-h1, així com de la metiltransferasa de l'HJ (JHAMT, enzim que catalitza una de les últimes reaccions de la via de síntesi de l'HJ), tan sols provoca l'inici prematur de la metamorfosi un cop transcorregudes les quatre primeres fases larvàries (Konopova and Jindra, 2007; Minakuchi et al., 2008b; Minakuchi et al., 2009). Tot això suggereix que el manteniment de les característiques juvenils durant les primeres fases nimfals/larvàries és independent de l'HJ, que només actuaria com a factor antimetamòrfic a partir d'un cert moment, una cop adquirida la "competència per a la metamorfosi", per impedir l'inici d'aquesta abans de completar-se del tot el creixement nimfal/larvari (Daimon et al., 2012; Feyereisen and Jindra, 2012). Segons els resultats observats en aquesta tesi doctoral en *B. germanica* i *T. castaneum*, que descriuen E93 com el factor que assenyalava l'inici de la metamorfosi, l'adquisició de la "competència per a la metamorfosi" vindria donada per la inducció d'E93. A partir d'aquest moment, i fins a completar-se el creixement nimfal/larvari, la presència de l'HJ impediria l'activació transcripcional i/o acció diferenciadora d'E93 a través de Kr-h1. En insectes molt evolucionats, com *D. melanogaster*, s'ha observat una insensibilitat als nivells d'HJ durant el període larvari (Riddiford, 1994). Aquest fet suggereix que en aquests insectes, que han disminuït molt la duració i el nombre de fases larvàries, es podria haver perdut el període de sensibilitat a l'HJ, i la metamorfosi es duria a terme just a l'activar-se la "competència per a la metamorfosi".

5.II.5 E93 reprimeix l'expressió de *Kr-h1* i *Br* durant la metamorfosi hemimetàbola i holometàbola

En aquest treball també s'ha pogut comprovar que E93 té una doble funció en el control de la metamorfosi dels insectes model utilitzats, ja que a més d'induir la diferenciació adulta s'encarrega de reprimir l'expressió dels factors de transcripció *Kr-h1* i *Br* (figura 5.2 i 5.4). Així, el silenciament de *BgE93* durant la penúltima fase nimfal de *B. germanica* provocava que els nivells de *BgKr-h1* i *BgBr* es mantinguessin elevats un cop iniciat el darrer estadi nimfal (figures 4.II.10 i 4.III.7). De la mateixa manera, en *T. castaneum* l'absència de *TcE93* impedia la caiguda transcripcional de *TcKr-h1* i *TcBr* que es dona just després de la muda pupal (figura 4.III.8), mentre que en *D. melanogaster* aquesta funció repressora estava conservada només per *DBr* (figura 4.III.11).

L'eliminació d'aquests dos factors de transcripció durant la darrera fase juvenil (últim estadi nimfal/pupa) és essencial en insectes hemimetàbols i holometàbols perquè es doni la diferenciació adulta. Així, en l'hemimetàbol *P. apterus* l'acció antimetamòrfica provocada per l'aplicació d'HJ ectòpica durant l'última fase nimfal es dona a través de la reinducció de *Kr-h1* (Konopova et al., 2011). De manera semblant, en *T. castaneum* l'acció d'aquesta hormona durant la pupa, que provoca la formació d'un segon estadi pupal i impedeix el pas a adult, també es transmet a través de l'activació transcripcional de *Kr-h1* i *Br* (Minakuchi et al., 2009). Finalment, en *D. melanogaster* la sobreexpressió de *DKr-h1* o *DBr* durant el període pupal comporta la formació d'una segona cutícula pupal, impeding la diferenciació adulta (Minakuchi et al., 2008a; Zhou and Riddiford, 2002). Totes aquestes dades suggereixen que la presència de *Kr-h1* i *Br* durant la diferenciació adulta està interferint en l'acció d'E93, impeding que la

metamorfosi es completi correctament. Per aquest motiu, el fet que E93 inclogui al mateix temps les funcions de diferenciador adult i de repressor de l'expressió de *Kr-h1* i *Br* és clau per coordinar ambdós processos i assegurar la correcta progressió de la metamorfosi.

5.II.6 TcE93 i TcBr controlen la correcta formació de la pupa i la diferenciació adulta en *Tribolium castaneum*

En el coleòpter *T. castaneum* l'absència de TcE93 durant la darrera fase larvària provocava dos fenotips diferents. D'una banda, la majoria de larves aconseguien pupar de manera normal (56 %), tot i que no assolien mai l'estadi adult (Discussió apartat 5.II.3). Un segon grup de larves (21 %), en canvi, mudaven a un estadi larvari supernumerari. Aquest fenotip més sever coincidia amb una caiguda dels nivells de *TcE93* significativament major que l'observada en els individus que aconseguen pupar (figura 4.III.3), fet que suggereix l'existència d'un llindar de *TcE93* per sobre del qual s'iniciaria la metamorfosi (figura 5.3). D'acord amb aquesta hipòtesi, la mesura dels nivells de *TcE93* durant la darrera fase larvària mostrava un increment substancial de l'expressió d'aquest gen en els primers dies de L7, just abans de l'inici del període prepupal (figura 4.III.2). Aquest augment, que permetria sobrepassar el llindar pupal de TcE93, podria estar controlat per la caiguda de l'HJ, que es dona en el mateix moment del desenvolupament. A més, tal i com s'ha descrit anteriorment, l'aplicació d'anàlegs d'aquesta hormona a l'inici de l'últim estadi larvari també comporta la formació de larves supernumeràries (Parthasarathy and Palli, 2009). No obstant, caldria confirmar aquest punt mesurant l'activació dels nivells de *TcE93* en les larves tractades amb HJ.

Anteriorment, nombrosos treballs han descrit un altre factor, *Br*, com a responsable de la formació de la pupa en els insectes holometàbols (Kiss et al., 1988; Zhou and Riddiford, 2002). L'activació de *Br*, que es dona a l'inici del període prepupal, està controlada per un petit pic de 20E en absència d'HJ durant la darrera fase larvària (Suzuki et al., 2008). En *D. melanogaster*, els mutants als quals els manca el gen *Br* (mutants *npr1*, de l'anglès *nonpupariating*) arriben al seu desenvolupament al final del tercer estadi larvari, sense evertir els discs ni iniciar cap dels processos metamòrfics (Bayer et al., 1997; Kiss et al., 1988). En *T. castaneum*, l'aplicació d'anàlegs de l'HJ durant l'últim estadi larvari impedeix l'activació de *TcBr* i provoca la formació de larves supernumeràries (Suzuki et al., 2008). Aquest fenotip, però, no depèn exclusivament de l'absència de *TcBr*, ja que el tractament amb *dsTcBr* en larves de darrer estadi no implica el bloqueig complet de la metamorfosi, sinó que es formen pupes aberrants que presenten una barreja de caràcters larvaris, pupals i fins i tot adults (Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy et al., 2008a; Suzuki et al., 2008) (figura 4.IV.8). Així, en absència de TcBr la morfogènesi pupal es dona parcialment en diverses estructures, com les ales o les potes, indicant que altres factors són necessaris per la formació de la pupa. Per aquest motiu, alguns autors no consideren TcBr l'especificador pupal de *T. castaneum*, sinó més aviat un coordinador temporal de la morfogènesi que es dona en diferents teixits durant la metamorfosi (Konopova and Jindra, 2008). En aquest sentit, els resultats obtinguts en la present tesi doctoral recolzen aquesta idea, i suggereixen que TcE93 actuaria juntament amb TcBr per tal de permetre la formació de la pupa (figures 5.3 i 5.4).

La coordinació de TcE93 i TcBr també és essencial per possibilitar la diferenciació adulta que es dona durant l'estadi pupal de *T. castaneum*. L'increment exponencial dels nivells de TcE93 durant la prepupa i els primers dies de pupa, imprescindible per la formació de l'adult, suggereix la presència d'un segon llindar per sobre del qual aquest factor indueix la diferenciació de les estructures adultes (figura 5.3). Aquest increment depèn de la presència de TcBr durant l'estadi prepupal (figura 4.IV.9), que permet l'activació completa de TcE93 (figura 5.3). De manera semblant, en *D. melanogaster* DBr es localitza, entre d'altres, en el *puff* E93F dels cromosomes politènics de la glàndula salival, i és imprescindible per a l'activació transcripcional de DE93 (Baehrecke and Thummel, 1995; Zhimulev et al., 1982).

D'altra banda, tal i com s'ha assenyalat anteriorment, l'absència de TcBr provocava la presència de certs caràcters adults de manera prematura en *T. castaneum*. Aquesta diferenciació, però, no es devia a la quantitat de TcE93 present en aquests individus, ja que el silenciament simultani de TcBr i TcE93 no n'impedia l'aparició (figures 4.IV.7, 4.IV.8 i 4.IV.9). Aquest fet suggereix que part de la funció d'inducció dels caràcters adults no recau estrictament en TcE93, sinó en la desaparició de TcBr. Aquest fet s'ha observat de manera molt més accentuada en la metamorfosi de l'ala de *D. melanogaster*. En aquest teixit, l'absència de DE93 durant l'estadi pupal impedeix la diferenciació adulta i manté els nivells de DBr elevats (figura 4.III.11) (Mou et al., 2012). Aquesta afectació, però, es pot revertir silenciant de manera simultània l'expressió de DE93 i DBr, fet que indica que DE93 controla la diferenciació adulta de

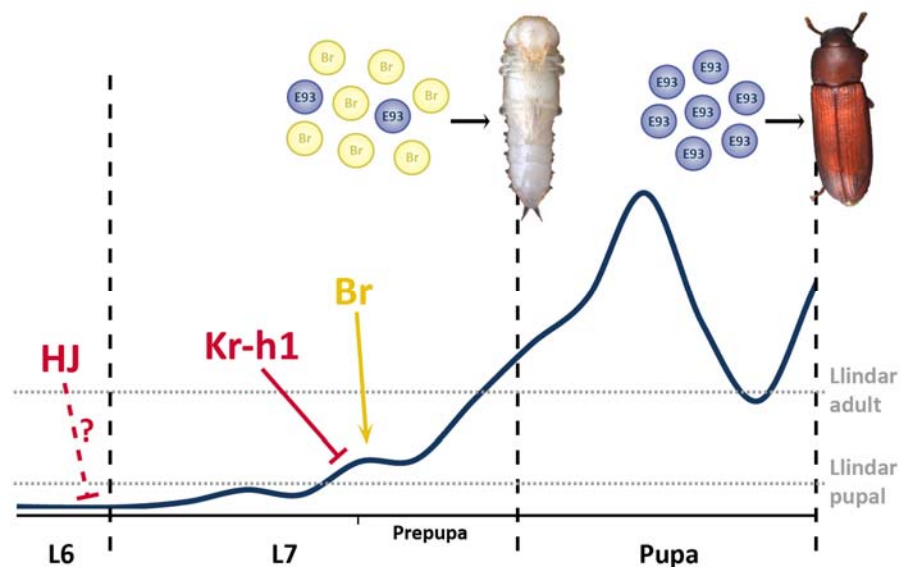


Figura 5.3. Model d'acció de TcE93 en la formació de la pupa i la diferenciació adulta de l'insecte holometàbol *Tribolium castaneum*. La línia blava representa els nivells d'expressió de TcE93 durant la darrera part de L6, l'última fase larvària i la pupa de *T. castaneum*. A finals de L6 s'indica una hipotètica repressió de l'hormona juvenil en l'activació de TcE93. Durant la darrera fase larvària i la prepupa TcKr-h1 impedeix un increment prematur dels nivells de TcE93, mentre que TcBr en permet l'activació. Nivells baixos de TcE93, juntament amb la coordinació de TcBr, permeten la formació de la pupa durant el darrer estadi larvari. Nivells elevats de TcE93 durant l'estadi pupal permeten la formació de l'adult. Les línies grises puntejades indiquen els llindars per sobre dels quals els nivells de TcE93 induïrien la formació de la pupa (llindar pupal) o la diferenciació adulta (llindar adult).

l'ala pupal a través de la repressió dels nivells de *D_{Br}* (C. Manjón i D. Martín, manuscrit en preparació). En insectes amb característiques més ancestrals, en canvi, la funció de *Br* és molt menys rellevant per a la metamorfosi. Així, en els hemimetàbols *O. fasciatus*, *P. apterus* i *B. germanica* *Br* s'encarrega del creixement anisomètric progressiu de les ales durant el període nimfal, però la seva absència no afecta ni el nombre ni la naturalesa de les mudes (Erezyilmaz et al., 2006; Huang et al., 2013; Konopova et al., 2011). De manera conjunta, els estudis sobre la funció de *Br* realitzats en diferents espècies d'insectes suggereixen que aquest factor ha anat cooptant cada vegada més funcions durant l'evolució de la metamorfosi. Així, en els insectes amb metamorfosi incompleta tan sols controla el creixement de les estructures alars durant el desenvolupament nimfal. Posteriorment, amb el pas a la metamorfosi completa ha concentrat la seva funció al final del període larvari, com a coordinador pupal en holometàbols més basals, i com a especificador pupal i encarregat de l'eversió dels discs en holometàbols més evolucionats, esdevenint en tots dos casos imprescindible per a la metamorfosi (Kiss et al., 1988; Konopova and Jindra, 2008; Suzuki et al., 2008).

5.II.7 La reinducció de *Kr-h1* durant el període prepupal és essencial per a la metamorfosi holometàbola

En els insectes holometàbols, després de la caiguda dels nivells d'HJ que té lloc a l'inici de l'últim estadi larvari es produeix una reaparició d'aquests durant el període prepupal. Posteriorment, l'HJ torna a desaparèixer un cop iniciada la pupa (Riddiford, 1994; Truman and Riddiford, 2002). La reaparició d'aquesta hormona durant la prepupa és essencial per a la correcta transició larva-pupa. Així, en el lepidòpter *Hyalophora cecropia* l'ablació dels *CA* durant la darrera fase larvària provoca la formació d'una pupa amb nombrosos caràcters adults (Williams, 1961), mentre que en *M. sexta* i *D. melanogaster* accelera la formació de l'ull compost (Kiguchi and Riddiford, 1978; Riddiford et al., 2010).

La reaparició de l'HJ durant la prepupa provoca la reinducció de l'expressió de *Kr-h1* (Minakuchi et al., 2009; Pecasse et al., 2000; Wang et al., 2012), fet que en el capítol 4.IV s'ha observat que és essencial per impedir l'aparició prematura de caràcters adults durant la formació de la pupa de *T. castaneum* (figures 4.IV.1 i 4.IV.2). Un fenotip idèntic s'havia observat anteriorment en absència de *TcMet*, imprescindible per l'activació transcripcional de *TcKr-h1* durant el període prepupal (Parthasarathy et al., 2008b). En el capítol 4.IV també s'ha demostrat que l'aparició de caràcters adults durant la transició larva-pupa es deu a l'activació prematura de *TcE93*, que sobrepassa els nivells del llindar d'adultització i provoca la repressió de *TcBr* (figura 4.IV.3). Aquesta afectació s'aconseguia revertir mitjançant el silenciament simultani de *TcKr-h1* i *TcE93*, que permetia l'activació normal de *TcBr* i la correcta formació de la pupa (figures 4.IV.4, 4.IV.5 i 4.IV.6). Tots aquests resultats suggereixen que la reinducció de l'HJ al final del darrer estadi larvari permet endarrerir la diferenciació adulta, possibilitant que la metamorfosi es doni en dos passos: primer a través de la morfogènesi que dona lloc a les estructures pupals, molt més semblants morfològicament a les adultes, i després amb la diferenciació de les estructures adultes per part d'E93. En els insectes hemimetàbols, en canvi, aquesta reinducció no s'observa, ja que la morfologia de les estructures ninfals és molt semblant a la de les estructures adultes, i

un cop completat el període de creixement ja es pot donar la diferenciació adulta. D'aquesta manera, l'eliminació experimental del pic d'HJ a través del silenciament de *TcKr-h1* avançava i accelerava la diferenciació de *T. castaneum*, transformant-lo en un insecte amb metamorfosi hemimetàbola.

Les dades obtingudes en aquest treball, juntament amb les ja presents en la bibliografia, han permès l'elaboració d'un model que resumeix la regulació de la metamorfosi en els insectes holometàbols (figura 5.4). Així, durant el penúltim estadi larvari, la presència d'HJ reprimeix l'activació de *Br* a través de *Kr-1* i, juntament amb l'absència d'E93, fa que l'animal mudi a un nou estadi larvari. Un cop al darrer estadi larvari, la desaparició de l'HJ fa que disminueixin considerablement els nivells de *Kr-h1*, fet que permetrà l'activació de *Br* durant el pic de 20E prepupal. A més, també augmenten els nivells d'E93, que permet l'entrada al període prepupal, tot i que es desconeix quin/s factor/s possibiliten aquesta activació. Durant la prepupa els nivells de *Br* augmenten considerablement, mentre que l'activació d'E93 es veu d'una banda promoguda per aquesta presència de *Br*, i de l'altra frenada per la reaparició d'alts nivells d'HJ i *Kr-h1*. D'aquesta manera, la gran quantitat de *Br*, juntament amb uns nivells moderats d'E93, permet la formació de la pupa (figura 5.3). Un cop completada la muda pupal, els nivells d'E93 esdevenen molt elevats, induint la diferenciació adulta i reprimint alhora l'expressió de *Kr-h1* i *Br* (figura 5.4).

5.II.8 L'evolució de la metamorfosi

La diferent morfologia que presenten els estadis larvari i adult dels insectes holometàbols fa que puguin viure en hàbitats distints i explotar així diferents recursos, permetent que els períodes de creixement i reproducció no competeixin entre ells. Aquest avantatge ha permès als insectes erigir-se com el grup més nombrós i divers dins el regne animal, motiu pel qual un dels objectius d'aquest treball ha estat avançar en la comprensió de l'enigma que suposa el pas de l'hemimetabolia a l'holometabolia. Des de fa anys, dues teories que intenten explicar l'aparició de la metamorfosi completa mantenen els experts dividits. D'una banda, els partidaris de la teoria que formulà per primera vegada Howard Hinton consideren que la darrera fase nimfal hemimetàbola és equivalent a la pupa holometàbola. De l'altra, els partidaris de la teoria desenvolupada per James W. Truman i Lynn M. Riddiford consideren que la larva s'hauria originat a partir de la "desembrionització" d'una fase embrionària dels hemimetàbols (la pronimfa), mentre que la condensació de totes les fases nimfals en una de sola hauria donat lloc a la pupa (veure Introducció, apartat 1.1.3). Tot seguit, com a culminació d'aquesta tesi doctoral es proposa una nova variant de la teoria de Hinton, en base a les dades més recents obtingudes en aquest camp.

El descobriment de l'especificador adult E93 ha proporcionat una peça clau dins el trencaclosques que conforma l'estudi de la regulació i l'evolució de la metamorfosi dels insectes. La comparació de les funcions que aquest factor desenvolupa en un insecte hemimetàbol (*B. germanica*) i un d'holometàbol (*T. castaneum*) ha permès comprovar que la metamorfosi es desencadena en tots dos casos quan apareix E93, durant l'última fase nimfal dels hemimetàbols o l'última fase larvària dels holometàbols. A més, recentment s'ha demostrat en ambdós

sistemes que la funció antimetamòrfica de l'HJ es desenvolupa a través de l'eix Met-Kr-h1, que desapareix al principi de la darrera fase ninfal/larvària per permetre l'inici de la metamorfosi (Konopova and Jindra, 2007; Konopova et al., 2011; Lozano and Belles, 2011; Minakuchi et al., 2009). Per tant, tenint en compte totes aquestes dades, és lògic pensar en una homologia entre

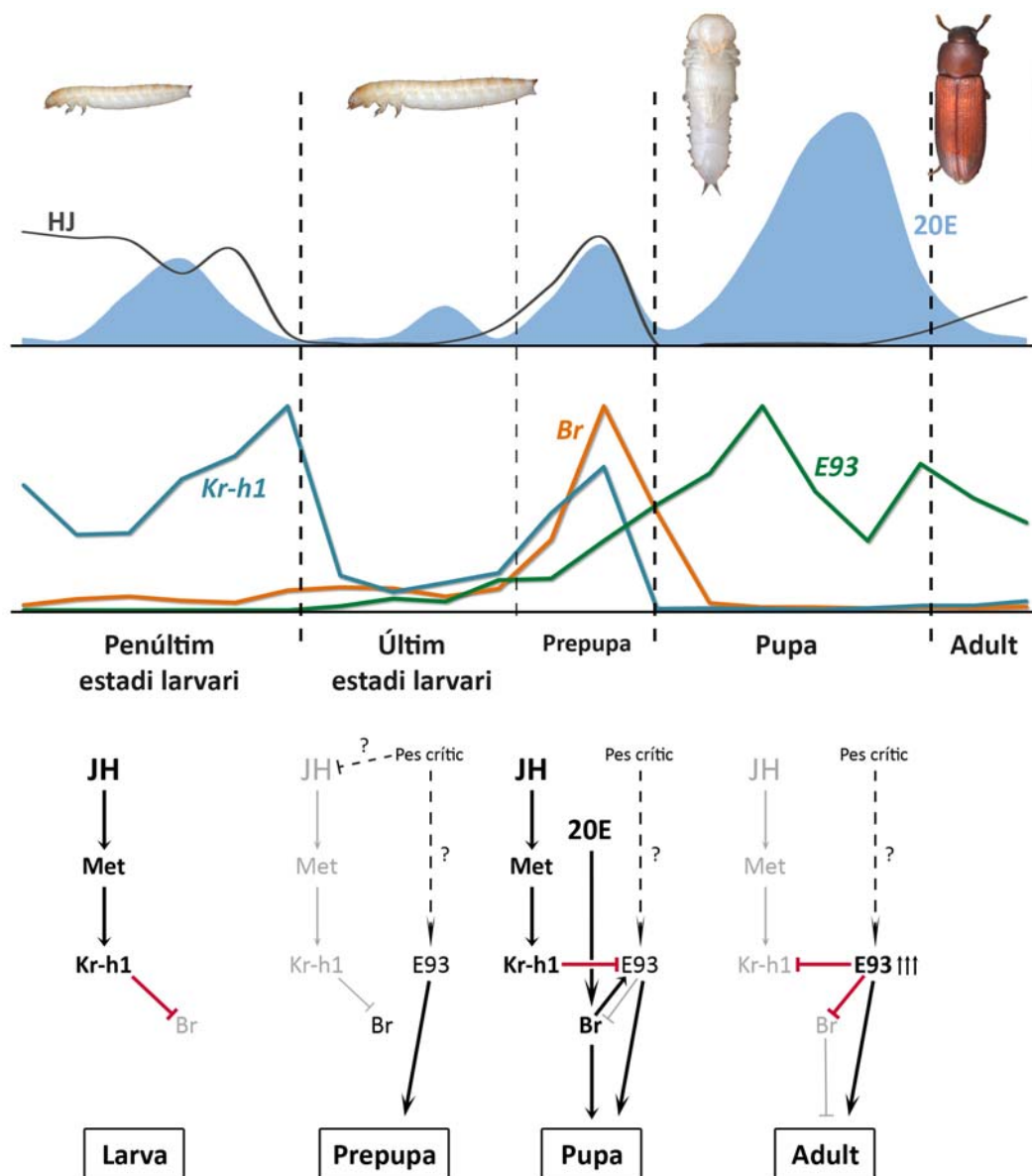


Figura 5.4. Model de regulació de la metamorfosi holometàbola. A la part superior es representen els nivells de 20-hdroxiecdisona (20E) (àrea blava) i d'hormona juvenil (HJ) (línia gris fosc), així com els nivells d'expressió de *TcE93*, *TcKr-h1* i *TcBr* durant les dues darreres fases ninfals i l'estadi pupal i de l'insecte holometàbol *T. castaneum*. Els esquemes en la part inferior de la figura indiquen les diferents interaccions que permeten la correcta transformació dels individus juvenils en insectes adults. Les fletxes de color negre assenyalen induccions i les línies de color vermell repressions. Els factors i interaccions marcats en gris indiquen absència en el període mostrat. Les fletxes i línies discontinües reflecteixen interaccions hipotètiques. Els nivells de 20E en *T. castaneum* s'han demostrat en Parthasarathy *et al.* (2008). Els nivells d'HJ mostrats en aquesta figura pertanyen al lepidòpter *M. sexta* (Riddiford, 1994) ja que de moment no s'han mesurat en *T. castaneum*. Els nivells de *TcKr-h1* i *TcBr* provenen de Minakuchi *et al.* (2009).

la darrera fase nimfal i l'última fase larvària (figura 5.5). No obstant, mentre que al final de l'última fase nimfal es produeix la muda imaginal dels insectes hemimetàbols, en els holometàbols la metamorfosi es dona en dos passos: primer a través de la morfogènesi que dona lloc a la pupa, molt més semblant morfològicament a l'adult, i després amb la diferenciació de les estructures adultes durant el període pupal. Per tal d'aconseguir que la metamorfosi es dividís en aquests dos passos, s'haurien donat almenys dues modificacions en el desenvolupament hemimetàbol. D'una banda, la reinducció de l'HJ al final de la darrera fase nimfal, que impedeix la completa activació d'E93 i la diferenciació adulta, i permet que es doni la morfogènesi pupal. De l'altra, l'adquisició per part d'E93 i Br de la funció d'especificació de l'estadi pupal. L'aparició de la pupa, on és possible coordinar la reestructuració completa de les estructures juvenils per estructures adultes, hauria permès que els estadis immadurs poguessin modificar-se. Així, s'haurien seleccionat aquelles morfologies que permetessin a les formes juvenils adaptar-se a altres medis no colonitzats per les formes adultes, ja que el fet de no competir amb aquestes els conferiria l'avantatge de disposar de molts més recursos. D'aquesta manera s'haurien convertit en larves vermiformes i, en alguns casos, fins i tot àpodes, aptes per a la vida a l'interior de fruits o en altres hàbitats no accessibles per als adults. Les modificacions morfològiques d'aquestes larves haurien arribat fins al punt de la invaginació, durant l'etapa embrionària, de les cèl·lules que més tard conformen les estructures pupals i adultes, en forma de primordis i discs imaginals (Erezyilmaz, 2011; Madhavan and Schneiderman, 1977).

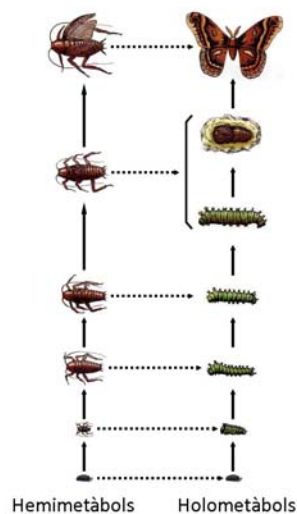


Figura 5.5. Nova Teoria sobre l'evolució de la metamorfosi. Representació esquemàtica d'una nova proposta d'homologia entre els diferents estadis del desenvolupament dels insectes hemimetàbols i holometàbols que es basa en els resultats presentats en aquesta tesi. Segons aquesta proposta, la darrera fase nimfal dels hemimetàbols seria equivalent a la suma de la darrera fase larvària holometàbola i la pupa, que s'hauria originat com a conseqüència de la reinducció de l'hormona juvenil durant els últims dies del darrer estadi nimfal. Aquesta reinducció és clau per impedir l'adultització prematura de la larva per efecte de TcE93 durant els darrers dies de l'última fase larvària.

Alguns insectes hemimetàbols representen un pas intermedi en el procés cap a la metamorfosi completa. Són els anomenats neometàbols, entre els quals s'hi troben els trips

(Thysanoptera). La seva metamorfosi és inusual, ja que entre el període nimfal i l'adult contenen dos o tres estadis quiescents, anomenats propupa i pupa (Sehnal et al., 1996). Tal i com passa en la resta d'hemimetàbols, la morfologia externa de les nimfes dels trips és molt semblant a la dels adults, excepte pel fet que aquestes espècies no tenen *wing pads* externs. Les seves ales adultes es desenvolupen a l'interior de l'individu al final del darrer estadi nimfal, i esdevenen visibles després de la muda a propupa o a pupa, depenent de l'espècie (Minakuchi et al., 2011). A més, algunes estructures ninfals com l'antena i les parts bucals degeneren parcialment durant la formació de la propupa, on són substituïdes per les estructures adultes (Heming, 1973). Aquestes peculiars característiques, que situen la metamorfosi dels trips a mig camí entre l'hemimetabolia i l'holometabolia, els fa molt interessants per a l'estudi de l'aparició de la metamorfosi completa. D'acord amb la hipòtesi abans plantejada, els perfils d'expressió de *Kr-h1* i *Br* en els trips *Frankliniella occidentalis* i *Haplothrips brevitubus* és molt similar al de les espècies holometàboles (Minakuchi et al., 2011), suggerint que abans de la modificació morfològica que convertiria les fases ninfals hemimetàboles en fases larvàries holometàboles s'haurien produït els canvis endocrins necessaris per la formació de la pupa, és a dir, la reinducció de l'HJ al final del darrer període nimfal. L'anàlisi dels perfils hormonals, així com l'estudi funcional de *Kr-h1*, *Br* i *E93* en el desenvolupament d'aquestes espècies, serien essencials per comprendre millor l'evolució de la metamorfosi.

Tot i que les dades més recents, juntament amb els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, suggereixen una equivalència entre la darrera fase nimfal hemimetàbola i l'últim estadi larvari holometàbol, no representen proves que permetin descartar l'elegant teoria de la "desembrionització" proposada per Truman i Riddiford (Truman and Riddiford, 1999; Truman and Riddiford, 2002). Segons aquests autors, la larva holometàbola s'hauria format a partir de l'estadi embrionari hemimetàbol anomenat pronimfa, gràcies a l'avançament en la producció d'HJ durant el desenvolupament embrionari. Això hauria permès que el període de creixement es donés durant l'estadi pronimfal/larvari, i que per tant tot l'estadi nimfal s'acabés reduït a una sola fase, la pupa. Així, segons aquesta teoria, els nivells d'HJ i de *Kr-h1* presents durant tot el període nimfal hemimetàbol serien homòlegs als observats durant la prepupa holometàbola. Després, un cop iniciada la pupa, aquests es reprimeixen per acció d'*E93*, tal i com s'observa durant la darrera fase nimfal, possibilitant la diferenciació adulta. D'altra banda l'activació de *Br*, que necessita d'un pic de 20E en absència d'HJ, en els insectes hemimetàbols es dona durant l'embriogènesi, on té un paper essencial en la formació de l'embrió (Erezyilmaz et al., 2009; Piulachs et al., 2010). En els insectes holometàbols, en canvi, l'avançament en la producció d'HJ durant el període embrionari n'hauria retardat l'activació fins al final de l'estadi larvari, on duria a terme la funció de morfogènesi de la pupa, equivalent segons aquesta teoria a la funció que desenvolupa en l'embrió hemimetàbol (Erezyilmaz, 2011). No obstant, en aquesta tesi doctoral s'ha comprovat que *E93* també és necessari per a l'especificació pupal, de manera que resultaria interessant comprovar si aquest factor està involucrat en la morfogènesi nimfal durant l'etapa embrionària hemimetàbola.

Malgrat els darrers avenços en la comprensió de la regulació de la metamorfosi dels insectes, encara resten per resoldre moltes preguntes. Per això, futurs estudis sobre el mecanisme d'acció d'*E93*, *Kr-h1* i *Br* en models hemimetàbols i holometàbols com els utilitzats en aquest treball, així com en d'altres models menys habituals com els ametàbols o els

neometàbols, han d'ajudar a avançar en el coneixement d'aquesta apassionant incògnita: l'aparició de la metamorfosi completa.

6. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts en l'estudi funcional de la sumoilació se'n poden extreure les següents conclusions:

1. L'insecte hemimetàbol *B. germanica* presenta dos paràlegs *Sumo*, ortòlegs a *SUMO1* i *SUMO3* de vertebrats, i que s'han anomenat *BgSumo1* i *BgSumo3* respectivament.
2. Durant l'evolució de la classe Insecta, en algun moment posterior a la divergència dels himenòpters i anterior a la dels coleòpters, es va perdre el paràleg *Sumo1*.
3. *BgSumo1* i *BgSumo3* s'expressen de manera ubiqua i més o menys constant al llarg del dos darrers estadis ninfals de *B. germanica*, i les proteïnes per les que codifiquen es localitzen majoritàriament al nucli en cèl·lules S2 de *D. melanogaster*.
4. La sumoilació és essencial per a la supervivència durant el desenvolupament postembrionari de *B. germanica*, i els dos paràlegs *Sumo* tenen un paper redundat en aquesta funció.
5. La sumoilació és imprescindible per al correcte desplegament de tegmines i ales durant la muda imaginal de *B. germanica*. Aquesta funció la duu a terme el paràleg *BgSumo1*.
6. *BgSumo1* també és imprescindible per a la metamorfosi de la panerola i per a la correcta activació de diversos gens de la cascada de resposta a la 20E (*BgE75A*, *BgHR3-A* i *BgFtz-F1*).
7. El paràleg *BgSumo1* controla la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de l'oòcit basal durant el darrer estadi ninfal de *B. germanica*.
8. Els receptors nuclears de *B. germanica* *BgEcR-A*, *BgRXR-L*, *BgE75A*, *BgHR3-A*, *BgHR3-B₂* i *BgFtz-F1* són capaços de sumoilar-se en condicions *in vitro*.
9. *BgSumo3* conté tots els elements necessaris per a substituir funcionalment *dSmt3* en *D. melanogaster*, mentre que *BgSumo1* no.

Per la seva banda, l'estudi del factor de transcripció E93 ha permès arribar a les següents conclusions:

10. L'expressió d'*E93* augmenta de manera molt clara durant el període metamòrfic en l'hemimetàbol *B. germanica* i els holometàbols *T. castaneum* i *D. melanogaster*.
11. El factor de transcripció E93 és l'especificador adult dels insectes hemimetàbols i holometàbols.
12. *BgE93* i l'HJ controlen l'entrada a la metamorfosi mitjançant vies d'acció paral·leles en *B. germanica*.

13. L'HJ i BgKr-h1 no són essencials per al manteniment dels caràcters nimfals en absència de BgE93. Alhora, l'absència de l'HJ i BgKr-h1 no és suficient per assolir l'estadi adult. Tot això implica que abans de l'aparició de BgE93, l'estat per defecte de l'insecte és el nimfal.
14. BgE93 té una doble funció durant la metamorfosi, ja que s'encarrega de l'activació del programa genètic adult i de la repressió de *BgKr-h1* necessària per la correcta diferenciació adulta.
15. En *T. castaneum* un augment moderat dels nivells d'expressió de *TcE93* durant els primers dies de la darrera fase larvària permet l'inici de la fase prepupal i la formació de la pupa (llindar pupal). Un cop formada la pupa, nivells molt elevats de *TcE93* permeten la diferenciació adulta (llindar adult).
16. En *D. melanogaster* la diferenciació adulta que es dona durant l'estadi pupal de la mosca també està controlada per DE93.
17. Igual que en *B. germanica*, TcE93 s'encarrega de la repressió de *TcBr* i *TcKr-h1* durant l'estadi pupal, imprescindible per a la correcta diferenciació adulta. En *D. melanogaster* l'acció repressora de DE93 està conservada només per a l'eliminació de *DBr*.
18. La reinducció de *TcKr-h1* durant el període prepupal impedeix l'activació prematura de *TcE93*, conferint a *T. castaneum* el temps necessari perquè es pugui donar la morfogènesi pupal abans que la diferenciació adulta.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G. S., Tung, L. and Horwitz, K. B.** (2002). The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *The Journal of biological chemistry* **277**, 33950–6.
- Abdou, M. a, He, Q., Wen, D., Zyaan, O., Wang, J., Xu, J., Baumann, A. a, Joseph, J., Wilson, T. G., Li, S., et al.** (2011). Drosophila Met and Gce are partially redundant in transducing juvenile hormone action. *Insect biochemistry and molecular biology* **41**, 938–45.
- Abed, M., Barry, K. C., Kenyagin, D., Koltun, B., Phippen, T. M., Delrow, J. J., Parkhurst, S. M. and Orián, A.** (2011). Degringolade, a SUMO-targeted ubiquitin ligase, inhibits Hairy/Groucho-mediated repression. *The EMBO journal* **30**, 1289–301.
- Alexeev, D., Bury, S. M., Turner, M. A., Ogunjobi, O. M., Muir, T. W., Ramage, R. and Sawyer, L.** (1994). Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: chemically synthesized and native ubiquitin fold into identical three-dimensional structures. *The Biochemical journal* **299**, 159–63.
- Apionishev, S., Malhotra, D., Raghavachari, S., Tanda, S. and Rasooly, R. S.** (2001). The Drosophila UBC9 homologue lesswright mediates the disjunction of homologues in meiosis I. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* **6**, 215–24.
- Arakane, Y., Li, B., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W., Kramer, K. J. and Park, Y.** (2008). Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of development* **125**, 984–95.
- Arakane, Y., Lomakin, J., Gehrke, S. H., Hiromasa, Y., Tomich, J. M., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W., Kramer, K. J. and Kanost, M. R.** (2012). Formation of rigid, non-flight forewings (elytra) of a beetle requires two major cuticular proteins. *PLoS genetics* **8**, e1002682.
- Ashburner, M.** (1973). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. I. Dependence upon ecdysone concentration. *Developmental biology* **35**, 47–61.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. and Richards, G.** (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **38**, 655–62.
- Ashok, M., Turner, C. and 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* **95**, 2761–6.
- Ayaydin, F. and Dasso, M.** (2004). Distinct In Vivo Dynamics of Vertebrate SUMO Paralogues. *Molecular biology of the cell* **15**, 5208–5218.
- Badenhorst, P., Xiao, H., Cherbas, L., Kwon, S. Y., Voas, M., Rebay, I., Cherbas, P. and Wu, C.** (2005). The Drosophila nucleosome remodeling factor NURF is required for Ecdysteroid signaling and metamorphosis. *Genes & development* **19**, 2540–5.

- Baehrecke, E. H. and Thummel, C. S.** (1995). The *Drosophila* E93 gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. *Developmental biology* **171**, 85–97.
- Baker, J. D. and Truman, J. W.** (2002). Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuro peptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program. *The Journal of experimental biology* **205**, 2555–65.
- Barrio, R. and de Celis, J. F.** (2004). Regulation of spalt expression in the *Drosophila* wing blade in response to the Decapentaplegic signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6021–6.
- Bate, M. and Arias, A. M.** (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* **112**, 755–61.
- Baumann, A., Barry, J., Wang, S., Fujiwara, Y. and Thomas, G.** (2010). Paralogous genes involved in juvenile hormone action in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **185**, 1327–36.
- Bayer, C. A., von Kalm, L. and Fristrom, J. W.** (1997). Relationships between protein isoforms and genetic functions demonstrate functional redundancy at the Broad-Complex during *Drosophila* metamorphosis. *Developmental biology* **187**, 267–82.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. and Becker, J.** (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of molecular biology* **280**, 275–86.
- Belgacem, Y. H. and Martin, J.-R.** (2007). Hmger in the corpus allatum controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila*. *PLoS one* **2**, e187.
- Bellés, X.** (2013). La metamorfosis de los insectos. *CSIC- Catarata*, Colección ¿Qué sabemos de?
- Bendena, W. G., Zhang, J., Burtenshaw, S. M. and Tobe, S. S.** (2011). Evidence for differential biosynthesis of juvenile hormone (and related) sesquiterpenoids in *Drosophila melanogaster*. *General and comparative endocrinology* **172**, 56–61.
- Bender, M., Imam, F. B., Talbot, W. S., Ganetzky, B. and Hogness, D. S.** (1997). *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* **91**, 777–88.
- Berlese, A.** (1913). Intorno alle metamorfosi degli insetti. *Redia* **9**, 121–36.
- Bernardo, T. J. and Dubrovsky, E. B.** (2012). The *Drosophila* juvenile hormone receptor candidates methoprene-tolerant (MET) and germ cell-expressed (GCE) utilize a conserved LIXL motif to bind the FTZ-F1 nuclear receptor. *The Journal of biological chemistry* **287**, 7821–33.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D. a, Matunis, M. J. and Lima, C. D.** (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**, 345–56.

- Bhaskar, V., Smith, M. and Courey, A. J.** (2002). Conjugation of Smt3 to dorsal may potentiate the *Drosophila* immune response. *Molecular and cellular biology* **22**, 492–504.
- Bielska, K., Seliga, J., Wieczorek, E., Kędracka-Krok, S., Niedenthal, R. and Ożyhar, A.** (2012). Alternative sumoylation sites in the *Drosophila* nuclear receptor Usp. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **132**, 227–38.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3312–7.
- Bitra, K. and Palli, S. R.** (2009). Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction. *Archives of insect biochemistry and physiology* **70**, 90–105.
- Blomster, H. A., Imanishi, S. Y., Siimes, J., Kastu, J., Morrice, N. A., Eriksson, J. E. and Sistonen, L.** (2010). In vivo identification of sumoylation sites by a signature tag and cysteine-targeted affinity purification. *The Journal of biological chemistry* **285**, 19324–9.
- Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H. and Owerbach, D.** (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *The Journal of biological chemistry* **279**, 27233–8.
- Borràs-Castells, F.** (2011). Caracterització dels factors de transcripció E74 i Seven up en el desenvolupament de l'insecte hemimetàbol *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). 160.
- Brand, a H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* **118**, 401–15.
- Broadus, J., McCabe, J. R., Endrizzi, B., Thummel, C. S. and Woodard, C. T.** (1999). The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Molecular cell* **3**, 143–9.
- Bucher, G.** (2009). *The Beetle Book*.
- Cáceres, L., Necakov, A. S., Schwartz, C., Kimber, S., Roberts, I. J. H. and Krause, H. M.** (2011). Nitric oxide coordinates metabolism, growth, and development via the nuclear receptor E75. *Genes & development* **25**, 1476–85.
- Castorálová, M., Březinová, D., Svěda, M., Lipov, J., Ruml, T. and Knejzlík, Z.** (2012). SUMO-2/3 conjugates accumulating under heat shock or MG132 treatment result largely from new protein synthesis. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 911–9.
- Charles, J. P., Chihara, C., Nejad, S. and Riddiford, L. M.** (1998). Identification of proteins and developmental expression of RNAs encoded by the 65A cuticle protein gene cluster in *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology* **28**, 131–8.

- Charles, J.-P., Iwema, T., Epa, V. C., Takaki, K., Rynes, J. and 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* **108**, 21128–33.
- Chávez, V. M., Marqués, G., Delbecque, J. P., Kobayashi, K., Hollingsworth, M., Burr, J., Natzle, J. E. and O'Connor, M. B.** (2000). The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development (Cambridge, England)* **127**, 4115–26.
- Chen, W.-Y., Lee, W.-C., Hsu, N.-C., Huang, F. and Chung, B.-C.** (2004). SUMO modification of repression domains modulates function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1). *The Journal of biological chemistry* **279**, 38730–5.
- Choi, S. J., Chung, S. S., Rho, E. J., Lee, H. W., Lee, M. H., Choi, H.-S., Seol, J. H., Baek, S. H., Bang, O. S. and Chung, C. H.** (2006). Negative modulation of RXRalpha transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO-specific protease SUSP1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 30669–77.
- Citro, S. and Chiocca, S.** (2013). Sumo paralogs: redundancy and divergencies. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* **5**, 544–53.
- Clark, A. J. and Bloch, K.** (1959). The absence of sterol synthesis in insects. *The Journal of biological chemistry* **254**, 2578–2582.
- Colombani, J., Andersen, D. S. and Léopold, P.** (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science (New York, N.Y.)* **336**, 582–5.
- Cruz, J.** (2005). Receptores nucleares implicados en la regulación endocrina en *Blattella germanica* (L) (Dictyoptera, Blattellidae). Caracterización de los genes BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1. 166.
- Cruz, J., Martín, D., Pascual, N., Maestro, J. ., Piulachs, M. . and Bellés, X.** (2003). Quantity does matter. Juvenile hormone and the onset of vitellogenesis in the German cockroach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 1219–1225.
- Cruz, J., Mané-Adrós, D., Bellés, X. and Martín, D.** (2006). Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Developmental biology* **297**, 158–71.
- Cruz, J., Martín, D. and Bellés, X.** (2007). Redundant ecdysis regulatory functions of three nuclear receptor HR3 isoforms in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Mechanisms of development* **124**, 180–9.
- Cruz, J., Nieva, C., Mané-Adrós, D., Martín, D. and Bellés, 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* **237**, 3179–91.

- Daimon, T., Kozaki, T., Niwa, R., Kobayashi, I., Furuta, K., Namiki, T., Uchino, K., Banno, Y., Katsuma, S., Tamura, T., et al.** (2012). Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS genetics* **8**, e1002486.
- Daish, T. J., Cakouros, D. and Kumar, S.** (2003). Distinct promoter regions regulate spatial and temporal expression of the *Drosophila* caspase *dronc*. *Cell death and differentiation* **10**, 1348–56.
- Dasso, M.** (2008). Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell division* **3**, 5.
- De Celis, J. F. and García-Bellido, A.** (1994). Roles of the Notch gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mechanisms of development* **46**, 109–22.
- De Celis, J. F., Bray, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development (Cambridge, England)* **124**, 1919–28.
- Desterro, J. M., Thomson, J. and Hay, R. T.** (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS letters* **417**, 297–300.
- Dewey, E. M., McNabb, S. L., Ewer, J., Kuo, G. R., Takanishi, C. L., Truman, J. W. and Honegger, H.-W.** (2004). Identification of the Gene Encoding Bursicon, an Insect Neuropeptide Responsible for Cuticle Sclerotization and Wing Spreading. *Current biology : CB* **14**, 1208–1213.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–6.
- Ding, H., Xu, Y., Chen, Q., Dai, H., Tang, Y., Wu, J. and Shi, Y.** (2005). Solution structure of human SUMO-3 C47S and its binding surface for Ubc9. *Biochemistry* **44**, 2790–9.
- Dohmen, R. J., Stappen, R., McGrath, J. P., Forrová, H., Kolarov, J., Goffeau, A. and Varshavsky, A.** (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18099–18109.
- Dubrovsky, E. B.** (2005). Hormonal cross talk in insect development. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **16**, 6–11.
- Epps, J. L. and Tanda, S.** (1998). The *Drosophila* *semushi* mutation blocks nuclear import of bicoid during embryogenesis. *Current biology : CB* **8**, 1277–80.
- Erezyilmaz, D. F.** (2011). The genetic and endocrine basis for the evolution of metamorphosis in insects. In *Mechanisms of Life History Evolution*, pp. 56–71.
- Erezyilmaz, D. F., Riddiford, L. M. and Truman, J. W.** (2006). The pupal specifier *broad* directs progressive morphogenesis in a direct-developing insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6925–30.

- Erezyilmaz, D. F., Rynerson, M. R., Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (2009). The role of the pupal determinant broad during embryonic development of a direct-developing insect. *Development genes and evolution* **219**, 535–44.
- Fechtel, K., Natzle, J. E., Brown, E. E. and Fristrom, J. W.** (1988). Prepupal differentiation of *Drosophila* imaginal discs: identification of four genes whose transcripts accumulate in response to a pulse of 20-hydroxyecdysone. *Genetics* **120**, 465–74.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H. S., Eng, F., Bertos, N. R., Pelletier, N., et al.** (2003). Ligand-Dependent Nuclear Receptor Corepressor LCoR Functions by Histone Deacetylase-Dependent and -Independent Mechanisms. *Molecular cell* **11**, 139–150.
- Feyereisen, R. and Jindra, M.** (2012). The silkworm coming of age--early. *PLoS genetics* **8**, e1002591.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. and 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* **85**, 8998–9002.
- Galisson, F., Mahrouche, L., Courcelles, M., Bonneil, E., Meloche, S., Chelbi-Alix, M. K. and Thibault, P.** (2011). A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **10**, M110.004796.
- Garcia-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1971). Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Developmental biology* **26**, 264–76.
- Gareau, J. R. and Lima, C. D.** (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 861–71.
- Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E. and Dominguez, M.** (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science (New York, N.Y.)* **336**, 579–82.
- Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F.** (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 947–56.
- Gerber, H. P., Seipel, K., Georgiev, O., Höfferer, M., Hug, M., Rusconi, S. and Schaffner, W.** (1994). Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 808–11.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.-E., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K.** (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Molecular cell* **25**, 57–70.
- Gibbens, Y. Y., Warren, J. T., Gilbert, L. I. and O'Connor, M. B.** (2011). Neuroendocrine regulation of *Drosophila* metamorphosis requires TGFbeta/Activin signaling. *Development (Cambridge, England)* **138**, 2693–703.

- Gilbert, L. I. and Warren, J. T.** (2005). A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone. *Vitamins and hormones* **73**, 31–57.
- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.** (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & development* **14**, 121–41.
- Godlewski, J., Wang, S. and Wilson, T. G.** (2006). Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. *Biochemical and biophysical research communications* **342**, 1305–11.
- Goodman, W. G. and Cusson, M.** (2012). The juvenile hormones. In *Insect Endocrinology*, pp. 310–65.
- Goodman, W. G. and Granger, N. A.** (2005). The Juvenile Hormones. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, pp. 319–409.
- Graham, F. L. and van der Eb, A. J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456–67.
- Grimaldi, D. and Engel, M. S.** (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Guindon, S. and Gascuel, O.** (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology* **52**, 696–704.
- Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J.-P., Pasricha, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P. J. and Dauphin-Villemant, C.** (2011). CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Developmental biology* **349**, 35–45.
- Halme, A., Cheng, M. and Hariharan, I. K.** (2010). Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Current biology : CB* **20**, 458–63.
- Hashiyama, K., Shigenobu, S. and Kobayashi, S.** (2009). Expression of genes involved in sumoylation in the *Drosophila* germline. *Gene expression patterns : GEP* **9**, 50–3.
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G.** (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733–6.
- Heming, B. S.** (1973). Metamorphosis of the pretarsus in *Frankliniella fusca* (Hinds) (Thripidae) and *Haplothrips verbasci* (Osborn) (Phlaeothripidae) (Thysanoptera). *Canadian Journal of Zoology* **51**, 1211–1234.
- Henrick, C. A.** (2007). Methoprene. *Journal of the American Mosquito Control Association* **23**, 225–39.
- Henson, H.** (1946). The theoretical aspect of insect metamorphosis. *Biol Rev* **21**, 1–14.
- Herboso, L., Talamillo, A., Pérez, C. and Barrio, R.** (2011). Expression of the Scavenger Receptor Class B type I (SR-BI) family in *Drosophila melanogaster*. *The International journal of developmental biology* **55**, 603–11.

- Heslop-Harrison, G.** (1958). On the origin and function of the pupal stadia in holometabolous Insecta. *Proc Univ Durham Philo Soc Ser A* **13**, 59–79.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L. and Sistonen, L.** (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Molecular and cellular biology* **23**, 2953–68.
- Hinton, H. E.** (1963). The Origin and Function of the Pupal Stage. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology* **38**, 77–85.
- Hiruma, K. and Riddiford, L. M.** (2010). Developmental expression of mRNAs for epidermal and fat body proteins and hormonally regulated transcription factors in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of insect physiology* **56**, 1390–5.
- Hoffmann, J. A., Koolman, J. and Beyler, C.** (1975). [The role of the prothoracic glands in the production of ecdysone during the last larval instar of *Locusta migratoria* L.]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles* **280**, 733–6.
- Huang, H. W., Tsoi, S. C., Sun, Y. H. and Li, S. S.** (1998). Identification and characterization of the SMT3 cDNA and gene encoding ubiquitin-like protein from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry and molecular biology international* **46**, 775–85.
- Huang, W.-C., Ko, T.-P., Li, S. S.-L. and Wang, A. H.-J.** (2004). Crystal structures of the human SUMO-2 protein at 1.6 Å and 1.2 Å resolution: implication on the functional differences of SUMO proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**, 4114–22.
- Huang, J., Tian, L., Peng, C., Abdou, M., Wen, D., Wang, Y., Li, S. and Wang, J.** (2011a). DPP-mediated TGFβ signaling regulates juvenile hormone biosynthesis by activating the expression of juvenile hormone acid methyltransferase. *Development (Cambridge, England)* **138**, 2283–91.
- Huang, H., Du, G., Chen, H., Liang, X., Li, C., Zhu, N., Xue, L., Ma, J. and Jiao, R.** (2011b). *Drosophila* Smt3 negatively regulates JNK signaling through sequestering Hipk in the nucleus. *Development (Cambridge, England)* **138**, 2477–85.
- Huang, J.-H., Lozano, J. and Belles, X.** (2013). Broad-complex functions in postembryonic development of the cockroach *Blattella germanica* shed new light on the evolution of insect metamorphosis. *Biochimica et biophysica acta* **1830**, 2178–87.
- Hwang, E. J., Lee, J. M., Jeong, J., Park, J. H., Yang, Y., Lim, J.-S., Kim, J. H., Baek, S. H. and Kim, K. II** (2009). SUMOylation of RORα potentiates transcriptional activation function. *Biochemical and biophysical research communications* **378**, 513–7.
- Imms, A. D.** (1937). Recent advances in entomology. *Philadelphia, PA: Blakiston*.
- International Aphid Genomics Consortium** (2010). Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS biology* **8**, e1000313.

- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D.** (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development (Cambridge, England)* **124**, 761–71.
- Jiang, C., Baehrecke, E. H. and Thummel, C. S.** (1997). Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development (Cambridge, England)* **124**, 4673–83.
- Jindra, M., Palli, S. R. and Riddiford, L. M.** (2013). The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual review of entomology* **58**, 181–204.
- Johnson, E. S. and Blobel, G.** (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *The Journal of biological chemistry* **272**, 26799–802.
- Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J. and Blobel, G.** (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p / Uba2p heterodimer. *The EMBO journal* **16**, 5509–5519.
- Jones, D., Crowe, E., Stevens, T. A. and Candido, E. P. M.** (2001). Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biology* **1**, 1–15.
- Kage, E., Hayashi, Y., Takeuchi, H., Hirotsu, T., Kunitomo, H., Inoue, T., Arai, H., Iino, Y. and Kubo, T.** (2005). MBR-1, a novel helix-turn-helix transcription factor, is required for pruning excessive neurites in *Caenorhabditis elegans*. *Current biology : CB* **15**, 1554–9.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A. and Wotton, D.** (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**, 127–37.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499–509.
- Kanakousaki, K. and Gibson, M. C.** (2012). A differential requirement for SUMOylation in proliferating and non-proliferating cells during *Drosophila* development. *Development (Cambridge, England)* **139**, 2751–62.
- Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Ishizaki, H. and Suzuki, A.** (1991). Prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: amino acid sequence and dimeric structure. *Agricultural and biological chemistry* **55**, 73–86.
- Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T., Mizoguchi, A., Kimura-Kawakami, M., Adachi, T., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A. and Ishizaki, H.** (1990). Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science (New York, N.Y.)* **247**, 1333–5.
- Kayukawa, T., Minakuchi, C., Namiki, T., Togawa, T., Yoshiyama, M., Kamimura, M., Mita, K., Imanishi, S., Kiuchi, M., Ishikawa, Y., et al.** (2012). Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 11729–34.

- Kerscher, O.** (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO reports* **8**, 550–5.
- Kiguchi, K. and Riddiford, L. M.** (1978). The role of juvenile hormone in pupal development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of insect physiology* **24**, 673–680.
- Kim, J.-J., Lee, H.-I., Park, T., Kim, K., Lee, J.-E., Cho, N. H., Shin, C., Cho, Y. S., Lee, J.-Y., Han, B.-G., et al.** (2010). Identification of 15 loci influencing height in a Korean population. *Journal of human genetics* **55**, 27–31.
- Kiss, I., Beaton, A. H., Tardiff, J., Fristrom, D. and Fristrom, J. W.** (1988). Interactions and Developmental Effects of Mutations in the Broad-Complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 247–259.
- Klug, K. M., Alvarado, D., Muskavitch, M. A. T. and Duffy, J. B.** (2002). Creation of a GAL4/UAS-coupled inducible gene expression system for use in *Drosophila* cultured cell lines. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **34**, 119–22.
- Knipscheer, P., van Dijk, W. J., Olsen, J. V, Mann, M. and Sixma, T. K.** (2007). Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *The EMBO journal* **26**, 2797–807.
- Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P. and Hogness, D. S.** (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**, 59–77.
- Konopova, B. and Jindra, M.** (2007). Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10488–93.
- Konopova, B. and Jindra, M.** (2008). Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolous metamorphosis. *Development (Cambridge, England)* **135**, 559–68.
- Konopova, B., Smykal, V. and Jindra, M.** (2011). Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. *PLoS one* **6**, e28728.
- Konopová, B. and Zrzavý, J.** (2005). Ultrastructure, development, and homology of insect embryonic cuticles. *Journal of morphology* **264**, 339–62.
- Kotaki, T., Shinada, T., Kaihara, K., Ohfune, Y. and Numata, H.** (2009). Structure determination of a new juvenile hormone from a heteropteran insect. *Organic letters* **11**, 5234–7.
- Kristensen, N. P.** (1999). Phylogeny of endopterygote insects, the most successful lineage of living organisms. *European Journal of Entomology* **96**, 237–253.
- Kumar, D., Misra, J. R., Kumar, A., Chugh, J., Sharma, S. and Hosur, R. V** (2009). NMR-derived solution structure of SUMO from *Drosophila melanogaster* (dSmt3). *Proteins* **75**, 1046–50.

- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D.-Y. and Vierstra, R. D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *The Journal of biological chemistry* **278**, 6862–72.
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J. T. and Rees, H. (2005). Ecdysteroid Chemistry and Biochemistry. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, pp. 125–242.
- Lanzrein, B., Gentinetta, V., Abegglen, H., Baker, F. C., Miller, C. A. and Schooley, D. A. (1985). Titters of ecdysone, 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone III throughout the life cycle of a hemimetabolous insect, the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Experientia* **41**, 913–917.
- Layalle, S., Arquier, N. and Léopold, P. (2008). The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*. *Developmental cell* **15**, 568–77.
- Lee, C. Y. and Baehrecke, E. H. (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development (Cambridge, England)* **128**, 1443–55.
- Lee, G. W., Melchior, F., Matunis, M. J., Mahajan, R., Tian, Q. and Anderson, P. (1998). Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *The Journal of biological chemistry* **273**, 6503–7.
- Lee, C. Y., Wendel, D. P., Reid, P., Lam, G., Thummel, C. S. and Baehrecke, E. H. (2000). E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Molecular cell* **6**, 433–43.
- Lee, J. H., Park, S. M., Kim, O. S., Lee, C. S., Woo, J. H., Park, S. J., Joe, E. and Jou, I. (2009). Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Molecular cell* **35**, 806–17.
- Li, M., Mead, E. a and 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* **108**, 638–43.
- Liao, S., Wang, T., Fan, K. and Tu, X. (2010). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is essential in cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Experimental cell research* **316**, 704–15.
- Liu, J. and Ma, J. (2012). *Drosophila* Bicoid is a substrate of sumoylation and its activator function is subject to inhibition by this post-translational modification. *FEBS letters* **586**, 1719–23.
- Lorenzen, M. D., Berghammer, a J., Brown, S. J., Denell, R. E., Klingler, M. and Beeman, R. W. (2003). piggyBac-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect molecular biology* **12**, 433–40.
- Lozano, J. and Belles, X. (2011). Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Scientific reports* **1**, 163.

- Madhavan, M. M. and Schneiderman, H. A.** (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **183**, 269–305.
- Maestro, O., Cruz, J., Pascual, N., Martín, D. and Bellés, X.** (2005). Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the hemimetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Molecular and cellular endocrinology* **238**, 27–37.
- Mahajan, R., Gerace, L. and Melchior, F.** (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *The Journal of cell biology* **140**, 259–70.
- Mané-Adrós, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Pascual, N., Bellés, X. and Martín, D.** (2008). The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Developmental biology* **315**, 147–60.
- Mané-Adrós, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Nieva, C., Ureña, E., Bellés, X. and Martín, D.** (2010). The hormonal pathway controlling cell death during metamorphosis in a hemimetabolous insect. *Developmental Biology* **346**, 150–160.
- Mané-Adrós, D., Borràs-Castells, F., Belles, X. and Martín, D.** (2012). Nuclear receptor HR4 plays an essential role in the ecdysteroid-triggered gene cascade in the development of the hemimetabolous insect *Blattella germanica*. *Molecular and cellular endocrinology* **348**, 322–30.
- Marchal, E., Vandersmissen, H. P., Badisco, L., Van de Velde, S., Verlinden, H., Iga, M., Van Wielendaele, P., Huybrechts, R., Simonet, G., Smagghe, G., et al.** (2010). Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: a review. *Peptides* **31**, 506–19.
- Martin, S., Wilkinson, K. a, Nishimune, A. and Henley, J. M.** (2007). Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 948–59.
- Martín, D.** (2010). Functions of Nuclear Receptors in Insect Development. In *Nuclear Receptors. Current Concepts and Future Challenges*, pp. 31–63.
- Martín, D., Maestro, O., Cruz, J., Mané-Adrós, D. and Bellés, X.** (2006). RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *Journal of insect physiology* **52**, 410–6.
- Matunis, M. J., Wu, J. and Blobel, G.** (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology* **140**, 499–509.
- Mauri, F., McNamee, L. M., Lunardi, A., Chiacchiera, F., Del Sal, G., Brodsky, M. H. and Collavin, L.** (2008). Modification of *Drosophila* p53 by SUMO modulates its transactivation and proapoptotic functions. *The Journal of biological chemistry* **283**, 20848–56.
- McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J.-P., Beckstead, R. B., Warren, J. T., Thummel, C. S., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L. I. and O'Connor, M. B.** (2007). Prothoracicotropic

- hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Developmental cell* **13**, 857–71.
- Meister, G. and Tuschl, T.** (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343–9.
- Mello, C. C. and Conte, D.** (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**, 338–42.
- Meluh, P. B. and Koshland, D.** (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Molecular biology of the cell* **6**, 793–807.
- Meulmeester, E., Kunze, M., Hsiao, H. H., Urlaub, H. and Melchior, F.** (2008). Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Molecular cell* **30**, 610–9.
- Minakuchi, C., Zhou, X. and Riddiford, L. M.** (2008a). Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of development* **125**, 91–105.
- Minakuchi, C., Namiki, T., Yoshiyama, M. and Shinoda, T.** (2008b). RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase gene causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *The FEBS journal* **275**, 2919–31.
- Minakuchi, C., Namiki, T. and Shinoda, T.** (2009). Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental biology* **325**, 341–50.
- Minakuchi, C., Tanaka, M., Miura, K. and Tanaka, T.** (2011). Developmental profile and hormonal regulation of the transcription factors broad and Krüppel homolog 1 in hemimetabolous thrips. *Insect biochemistry and molecular biology* **41**, 125–34.
- Mirth, C. K. and Riddiford, L. M.** (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **29**, 344–55.
- Mirth, C. K. and Shingleton, A. W.** (2012). Integrating body and organ size in *Drosophila*: recent advances and outstanding problems. *Frontiers in endocrinology* **3**, 49.
- Mirth, C., Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Current biology: CB* **15**, 1796–807.
- Miura, K., Oda, M., Makita, S. and Chinzei, Y.** (2005). Characterization of the *Drosophila* Methoprene-tolerant gene product. Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *The FEBS journal* **272**, 1169–78.

- Mou, X., Duncan, D. M., Baehrecke, E. H. and Duncan, I.** (2012). Control of target gene specificity during metamorphosis by the steroid response gene E93. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 2949–54.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**, 263–73.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P. P. and Dejean, A.** (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Developmental cell* **9**, 769–79.
- Nagaraju, G. P. C.** (2011). Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *The Journal of experimental biology* **214**, 3–16.
- Namiki, T., Niwa, R., Sakudoh, T., Shirai, K.-I., Takeuchi, H. and Kataoka, H.** (2005). Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochemical and biophysical research communications* **337**, 367–74.
- Nie, M., Xie, Y., Loo, J. a and Courey, A. J.** (2009). Genetic and proteomic evidence for roles of Drosophila SUMO in cell cycle control, Ras signaling, and early pattern formation. *PLoS one* **4**, e5905.
- Nijhout, H. F.** (1994). *Insect Hormones*.
- Ninov, N., Chiarelli, D. A. and Martín-Blanco, E.** (2007). Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during Drosophila metamorphosis. *Development (Cambridge, England)* **134**, 367–79.
- Niwa, R., Matsuda, T., Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Fujimoto, Y. and Kataoka, H.** (2004). CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of Bombyx and Drosophila. *The Journal of biological chemistry* **279**, 35942–9.
- Niwa, R., Namiki, T., Ito, K., Shimada-Niwa, Y., Kiuchi, M., Kawaoka, S., Kayukawa, T., Banno, Y., Fujimoto, Y., Shigenobu, S., et al.** (2010). Non-molting glossy/shroud encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the “Black Box” of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Development (Cambridge, England)* **137**, 1991–9.
- Nowak, M. and Hammerschmidt, M.** (2006). Ubc9 Regulates Mitosis and Cell Survival during Zebrafish Development. *Molecular biology of the cell* **17**, 5324–5336.
- Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K.** (2004). Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *The Journal of biological chemistry* **279**, 29551–7.
- Ono, H., Rewitz, K. F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J. T., Marqués, G., Shimell, M. J., et al.** (2006). Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental biology* **298**, 555–70.

- Oostra, V., de Jong, M. A., Invergo, B. M., Kesbeke, F., Wende, F., Brakefield, P. M. and Zwaan, B. J.** (2011). Translating environmental gradients into discontinuous reaction norms via hormone signalling in a polyphenic butterfly. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **278**, 789–97.
- Oro, A. E., McKeown, M. and Evans, R. M.** (1990). Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* **347**, 298–301.
- Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T. H., Gabbay, K. H. and Bohren, K. M.** (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochemical and biophysical research communications* **337**, 517–20.
- Palijan, A., Fernandes, I., Verway, M., Kourelis, M., Bastien, Y., Tavera-mendoza, L. E., Sacheli, A., Bourdeau, V., Mader, S. and White, J. H.** (2009). Ligand-dependent Corepressor LCoR Is an Attenuator of Pregesterone-regulated Gene Expression. *The Journal of biological chemistry* **284**, 30275–30287.
- Palvimo, J. J.** (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochemical Society transactions* **35**, 1405–8.
- Park, J.-M., Kunieda, T., Takeuchi, H. and Kubo, T.** (2002). DNA-binding properties of Mblk-1, a putative transcription factor from the honeybee. *Biochemical and biophysical research communications* **291**, 23–8.
- Parthasarathy, R. and Palli, S. R.** (2009). Molecular analysis of juvenile hormone analog action in controlling the metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Archives of insect biochemistry and physiology* **70**, 57–70.
- Parthasarathy, R., Tan, A., Bai, H. and Palli, S. R.** (2008a). Transcription factor broad suppresses precocious development of adult structures during larval-pupal metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of development* **125**, 299–313.
- Parthasarathy, R., Tan, A. and Palli, S. R.** (2008b). bHLH-PAS family transcription factor methoprene-tolerant plays a key role in JH action in preventing the premature development of adult structures during larval-pupal metamorphosis. *Mechanisms of development* **125**, 601–16.
- Peabody, N. C., Diao, F., Luan, H., Wang, H., Dewey, E. M., Honegger, H.-W. and White, B. H.** (2008). Bursicon functions within the *Drosophila* CNS to modulate wing expansion behavior, hormone secretion, and cell death. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 14379–91.
- Pecasse, F., Beck, Y., Ruiz, C. and Richards, G.** (2000). Krüppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Developmental biology* **221**, 53–67.
- Pedrioli, P. G. A., Raught, B., Zhang, X.-D., Rogers, R., Aitchison, J., Matunis, M. and Aebersold, R.** (2006). Automated identification of SUMOylation sites using mass spectrometry and SUMOn pattern recognition software. *Nature methods* **3**, 533–9.

- Petryk, A., Warren, J. T., Marqués, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., Parvy, J.-P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C. and O'Connor, M. B.** (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13773–8.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T. K. and Melchior, F.** (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nature structural & molecular biology* **11**, 984–91.
- Piulachs, M.-D.** (1987). Estudi morfològic i funcional dels corpora allata de *Blattella germanica* (Ditcyoptera,Blattellidae).
- Piulachs, M.-D., Pagone, V. and Bellés, X.** (2010). Key roles of the Broad-Complex gene in insect embryogenesis. *Insect biochemistry and molecular biology* **40**, 468–75.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A. and Palvimo, J. J.** (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14145–50.
- Poulin, G., Dong, Y., Fraser, A. G., Hopper, N. A. and Ahringer, J.** (2005). Chromatin regulation and sumoylation in the inhibition of Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* **24**, 2613–23.
- Poyarkoff, E.** (1914). Essai d'une théorie de la nymphe des insectes holométaboles. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **54**, 221–265.
- Raikhel, A. S., Brown, M. R. and Belles, X.** (2005). Hormonal Control of Reproductive Processes. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, pp. 433–491. Elsevier.
- Ren, J., Gao, X., Jin, C., Zhu, M., Wang, X. and Shaw, A.** (2009). Systematic study of protein sumoylation : Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2 . 0. *Proteomics* **9**, 3409–3412.
- Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C. and Taghert, P. H.** (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* **99**, 791–802.
- Rewitz, K. F., Rybczynski, R., Warren, J. T. and Gilbert, L. I.** (2006). Developmental expression of *Manduca* shade, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Molecular and cellular endocrinology* **247**, 166–74.
- Rewitz, K. F., Yamanaka, N., Gilbert, L. I. and O'Connor, M. B.** (2009). The insect neuropeptide PTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science (New York, N.Y.)* **326**, 1403–5.
- Rewitz, K. F., Yamanaka, N. and O'Connor, M. B.** (2010). Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Developmental cell* **19**, 895–902.
- Riddiford, L. M.** (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* **3**, 203–9.

- Riddiford, L. M.** (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. In *Advances in Insect Physiology*, pp. 213–74.
- Riddiford, L. M.** (2012). How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *General and comparative endocrinology* **179**, 477–84.
- Riddiford, L. M., Hiruma, K., Zhou, X. and 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* **33**, 1327–38.
- Riddiford, L. M., Truman, J. W., Mirth, C. K. and Shen, Y.-C.** (2010). A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)* **137**, 1117–26.
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C. and Hay, R. T.** (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of biological chemistry* **276**, 12654–9.
- Roe, R. M. and Venkatesh, K.** (1990). Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. In *Morphogenetic Hormones of Arthropods*, pp. 126–179.
- Röller, H. and Dahm, K. H.** (1968). The chemistry and biology of juvenile hormone. *Recent progress in hormone research* **24**, 651–80.
- Rountree, D. B. and Bollenbacher, W. E.** (1986). The release of the prothoracicotropic hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is controlled intrinsically by juvenile hormone. *The Journal of experimental biology* **120**, 41–58.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* **239**, 487–91.
- Saitoh, H., Sparrow, D. B., Shiomi, T., Pu, R. T., Nishimoto, T., Mohun, T. J. and Dasso, M.** (1998). Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Current biology: CB* **8**, 121–4.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sánchez, J., Talamillo, A., Lopitz-Otsoa, F., Pérez, C., Hjerpe, R., Sutherland, J. D., Herboso, L., Rodríguez, M. S. and Barrio, R.** (2010). Sumoylation modulates the activity of Spalt-like proteins during wing development in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry* **285**, 25841–9.
- Sánchez, J., Talamillo, A., González, M., Sánchez-Pulido, L., Jiménez, S., Pirone, L., Sutherland, J. D. and Barrio, R.** (2011). *Drosophila* Sal and Salr are transcriptional repressors. *The Biochemical journal* **438**, 437–45.
- Savare, J., Bonneaud, N. and Girard, F.** (2005). SUMO represses transcriptional activity of the *Drosophila* SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Molecular biology of the cell* **16**, 2660–9.

- Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Kimura, S., Fujiyama, S., et al.** (2010). A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes & development* **24**, 159–70.
- Schröder, R., Beermann, A., Wittkopp, N. and Lutz, R.** (2008). From development to biodiversity--*Tribolium castaneum*, an insect model organism for short germband development. *Development genes and evolution* **218**, 119–26.
- Sedkov, Y., Cho, E., Petruk, S., Cherbas, L., Smith, S. T., Jones, R. S., Cherbas, P., Canaani, E., Jaynes, J. B. and Mazo, A.** (2003). Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature* **426**, 78–83.
- Sehnal, F., Svácha, P. and Zrzavý, J.** (1996). Evolution of Insect Metamorphosis. In *Metamorphosis. Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells* (ed. Gilbert, L. I., Tata, J. R., and Atkinson, B. G.), pp. 3–58. San Diego (Calif.): Academic Press.
- Seliga, J., Bielska, K., Wieczorek, E., Orłowski, M., Niedenthal, R. and Ożyhar, A.** (2013). Multidomain sumoylation of the ecdysone receptor (EcR) from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **138C**, 162–173.
- Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M.-C. and Corbo, L.** (2005). Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **19**, 2671–84.
- Shearn, A. and Garen, A.** (1974). Genetic Control of Imaginal Disc Development in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**, 1393–1397.
- Shin, E. J., Shin, H. M., Nam, E., Kim, W. S., Kim, J.-H., Oh, B.-H. and Yun, Y.** (2012). DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO reports* **13**, 339–46.
- Siegmund, T. and Korge, G.** (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of comparative neurology* **431**, 481–91.
- Siegmund, T. and Lehmann, M.** (2002). The *Drosophila* Pipsqueak protein defines a new family of helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Development genes and evolution* **212**, 152–7.
- Smith, M., Bhaskar, V., Fernandez, J. and Courey, A. J.** (2004). *Drosophila* Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates. *The Journal of biological chemistry* **279**, 43805–14.
- Smith, M., Mallin, D. R., Simon, J. A. and Courey, A. J.** (2011). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation impedes transcriptional silencing by the polycomb group repressor Sex Comb on Midleg. *The Journal of biological chemistry* **286**, 11391–400.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. and Chen, Y.** (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14373–8.

- Soranzo, N., Rivadeneira, F., Chinappen-Horsley, U., Malkina, I., Richards, J. B., Hammond, N., Stolk, L., Nica, A., Inouye, M., Hofman, A., et al.** (2009). Meta-analysis of genome-wide scans for human adult stature identifies novel Loci and associations with measures of skeletal frame size. *PLoS genetics* **5**, e1000445.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science (New York, N.Y.)* **218**, 341–7.
- Su, H.-L. and Li, S. S.-L.** (2002). Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* **296**, 65–73.
- Suzuki, Y., Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (2008). The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. *Development (Cambridge, England)* **135**, 569–77.
- Suzuki, Y., Squires, D. C. and Riddiford, L. M.** (2009). Larval leg integrity is maintained by Distal-less and is required for proper timing of metamorphosis in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Developmental biology* **326**, 60–7.
- Takanaka, Y. and Courey, A. J.** (2005). SUMO enhances vestigial function during wing morphogenesis. *Mechanisms of development* **122**, 1130–7.
- Takeuchi, H., Kage, E., Sawata, M., Kamikouchi, A., Ohashi, K., Ohara, M., Fujiyuki, T., Kunieda, T., Sekimizu, K., Natori, S., et al.** (2001). Identification of a novel gene, Mblk-1, that encodes a putative transcription factor expressed preferentially in the large-type Kenyon cells of the honeybee brain. *Insect molecular biology* **10**, 487–94.
- Talamillo, A., Sánchez, J., Cantera, R., Pérez, C., Martín, D., Caminero, E. and Barrio, R.** (2008a). Smt3 is required for *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Development (Cambridge, England)* **135**, 1659–68.
- Talamillo, A., Sánchez, J. and Barrio, R.** (2008b). Functional analysis of the SUMOylation pathway in *Drosophila*. *Biochemical Society transactions* **36**, 868–73.
- Talamillo, A., Martín, D., Hjerpe, R., Sánchez, J. and Barrio, R.** (2010). SUMO and ubiquitin modifications during steroid hormone synthesis and function. *Biochemical Society transactions* **38**, 54–9.
- Talamillo, A., Herboso, L., Pirone, L., Pérez, C., González, M., Sánchez, J., Mayor, U., Lopitz-Otsoa, F., Rodríguez, M. S., Sutherland, J. D., et al.** (2013). Scavenger Receptors Mediate the Role of SUMO and Ftz-f1 in *Drosophila* Steroidogenesis. *PLoS Genetics* **9**, e1003473.
- Tan, A. and Palli, S. R.** (2008). Identification and characterization of nuclear receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect biochemistry and molecular biology* **38**, 430–9.
- Tan, A., Tanaka, H., Tamura, T. and Shiotsuki, T.** (2005). Precocious metamorphosis in transgenic silkworms overexpressing juvenile hormone esterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11751–6.

- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T.** (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *The Journal of biological chemistry* **276**, 35368–74.
- Tatham, M. H., Matic, I., Mann, M. and Hay, R. T.** (2011). Comparative proteomic analysis identifies a role for SUMO in protein quality control. *Science signaling* **4**, rs4.
- Terada, K. and Furukawa, T.** (2010). Sumoylation controls retinal progenitor proliferation by repressing cell cycle exit in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **347**, 180–94.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* **25**, 4876–82.
- Thummel, C. S.** (1996). Flies on steroids--*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends in genetics : TIG* **12**, 306–10.
- Thummel, C. S.** (2001). Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Developmental cell* **1**, 453–65.
- Tomoyasu, Y. and Denell, R. E.** (2004). Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development genes and evolution* **214**, 575–8.
- Trautwein, M. D., Wiegmann, B. M., Beutel, R., Kjer, K. M. and Yeates, D. K.** (2012). Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annual review of entomology* **57**, 449–68.
- Treiblmayr, K., Pascual, N., Piulachs, M.-D., Keller, T. and 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)* **6**, 1–7.
- Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (1999). The origins of insect metamorphosis. *Nature* **401**, 447–52.
- Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (2002a). ENDOCRINE INSIGHTS INTO THE EVOLUTION OF METAMORPHOSIS IN INSECTS. 467–500.
- Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (2002b). Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual review of entomology* **47**, 467–500.
- Tsai, C. C., Kao, H. Y., Yao, T. P., McKeown, M. and Evans, R. M.** (1999). SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Molecular cell* **4**, 175–86.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Millburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., et al.** (2009). FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic acids research* **37**, D555–9.
- Vafopoulou, X., Steel, C. G. H. and Terry, K. L.** (2007). Neuroanatomical Relations of Prothoracicotropic Hormone Neurons With the Circadian Timekeeping System in the Brain

- of Larval and Adult *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *The Journal of comparative neurology* **503**, 511–524.
- Van den Burg, H. A., Kini, R. K., Schuurink, R. C. and Takken, F. L. W.** (2010). Arabidopsis small ubiquitin-like modifier paralogs have distinct functions in development and defense. *The Plant cell* **22**, 1998–2016.
- Wang, Y. and Dasso, M.** (2009). SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *Journal of cell science* **122**, 4249–52.
- Wang, H.-B., Ali, S. M., Moriyama, M., Iwanaga, M. and Kawasaki, H.** (2012). 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone analog prevent precocious metamorphosis in recessive trimolter mutants of *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology* **42**, 102–8.
- Ward, R. E., Reid, P., Bashirullah, A., D'Avino, P. P. and Thummel, C. S.** (2003). GFP in living animals reveals dynamic developmental responses to ecdysone during *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology* **256**, 389–402.
- Warren, J. T., Sakurai, S., Rountree, D. B., Gilbert, L. I., Lee, S. S. and Nakanishi, K.** (1988). Regulation of the ecdysteroid titer of *Manduca sexta*: reappraisal of the role of the prothoracic glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 958–62.
- Warren, J. T., Petryk, A., Marques, G., Jarcho, M., Parvy, J.-P., Dauphin-Villemant, C., O'Connor, M. B. and Gilbert, L. I.** (2002). Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11043–8.
- Warren, J. T., Petryk, A., Marqués, G., Parvy, J.-P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M. B., et al.** (2004). Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect biochemistry and molecular biology* **34**, 991–1010.
- Watanabe, T., Takeuchi, H. and Kubo, T.** (2010). Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and -B1 isoforms in insects. *BMC evolutionary biology* **10**, 40.
- Watts, R. J., Hoopfer, E. D. and Luo, L.** (2003). Axon Pruning during *Drosophila* Metamorphosis : Evidence for Local Degeneration and Requirement of the Ubiquitin-Proteasome System. *Neuron* **38**, 871–885.
- Westerlund, S. A. and Hoffmann, K. H.** (2004). Rapid quantification of juvenile hormones and their metabolites in insect haemolymph by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Analytical and bioanalytical chemistry* **379**, 540–3.
- Wheeler, W.** (2001). The Phylogeny of the Extant Hexapod Orders. *Cladistics* **17**, 113–169.

- Wigglesworth, B. Y. V. B.** (1940). The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera).
- Wigglesworth, B. Y. V. B.** (1947). The corpus allatum and the control of metamorphosis in insects. *Nature* **159**, 872.
- Williams, C. M.** (1961). The juvenile hormone. II. Its role in the endocrine control of molting, pupation, and adult development in the *Cecropia* silkworm. *The Biological Bulletin* **121**, 572–585.
- Willis, J. H., Iconomidou, V. A., Smith, R. F. and Hamodrakas, S. J.** (2005). Cuticular proteins. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, pp. 79–109. Elsevier.
- Wilson, T. G. and Fabian, J.** (1986). A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Developmental biology* **118**, 190–201.
- Woodard, C. T., Baehrecke, E. H. and Thummel, C. S.** (1994). A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* **79**, 607–15.
- Yamanaka, N., Honda, N., Osato, N., Niwa, R., Mizoguchi, A. and Kataoka, H.** (2007). Differential Regulation of Ecdysteroidogenic P450 Gene Expression in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 2808–2814.
- Yang, F.-M., Pan, C.-T., Tsai, H.-M., Chiu, T.-W., Wu, M.-L. and Hu, M.-C.** (2009). Liver receptor homolog-1 localization in the nuclear body is regulated by sumoylation and cAMP signaling in rat granulosa cells. *The FEBS journal* **276**, 425–36.
- Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H. and Niwa, R.** (2006). Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development (Cambridge, England)* **133**, 2565–74.
- Zeng, X. and Hou, S. X.** (2012). Broad relays hormone signals to regulate stem cell differentiation in *Drosophila* midgut during metamorphosis. *Development (Cambridge, England)* **139**, 3917–25.
- Zhang, Q. and Denlinger, D. L.** (2011). Molecular structure of the prothoracicotropic hormone gene in the northern house mosquito, *Culex pipiens*, and its expression analysis in association with diapause and blood feeding. *Insect molecular biology* **20**, 201–13.
- Zhang, Z., Xu, J., Sheng, Z., Sui, Y. and Palli, S. R.** (2011). Steroid receptor co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, methoprene tolerant. *The Journal of biological chemistry* **286**, 8437–47.
- Zhao, J.** (2007). Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**, 3017–33.
- Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T. A., Evans, R. M. and Yao, T.-P.** (2005). Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Molecular and cellular biology* **25**, 8456–64.

- Zhimulev, I. F., Vlassova, I. E. and Belyaeva, E. S.** (1982). Cytogenetic analysis of the 2B3-4--2B11 region of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. III. Puffing disturbance in salivary gland chromosomes of homozygotes for mutation l(1)pp1t10. *Chromosoma* **85**, 659–72.
- Zhou, X. and 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)* **129**, 2259–69.
- Zhou, B., Hiruma, K., Shinoda, T. and Riddiford, L. M.** (1998). Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of broad complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental biology* **203**, 233–44.
- Zitnan, D., Kim, Y.-J., Zitnanová, I., Roller, L. and Adams, M. E.** (2007). Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *General and comparative endocrinology* **153**, 88–96.

