

**MECANISMES MOLECULARS D'ACCIÓ DELS ECDISTEROIDES
EN L'INSECTE HEMIMETÀBOL *BLATTELLA GERMANICA* (L.)
(DICTYOPTERA, BLATTELLIDAE). CARACTERITZACIÓ DELS
RECEPTORS NUCLEARS BgE75 i BgHR4**

Daniel Mañé Padrós

Treball realitzat en el Departament de Fisiologia i Biodiversitat Molecular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB, CSIC), sota la direcció dels Drs. David Martín Casacuberta i Xavier Bellés Ros per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Dr. David Martín Casacuberta
Científic Titular del CSIC

Dr. Xavier Bellés Ros
Professor d'Investigació del CSIC

Tutora

Dra. Isabel Navarro Álvarez
Professor Titular de Fisiologia
Departament de Fisiologia
Universitat de Barcelona

Doctorand

Daniel Mañé Padrós

Barcelona, 2007

ÍNDEX

PREFACI	I
1 INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	1
1.1. Control hormonal del desenvolupament dels insectes	3
1.1.1. Les hormones juvenils i els <i>corpora allata</i>	4
1.1.2. Els ecdisteroides i la glàndula protràctica	5
1.2. Les bases moleculars del creixement dels insectes	6
1.3. Coordinació del creixement i la metamorfosi en els insectes holometàbols per la 20E a través d'una cascada de factors de transcripció	8
1.4. Els receptors nuclears d'insectes	11
1.4.1. Estructura	12
1.4.2. Mecanisme d'acció	13
1.4.3. Regulació de les respostes biològiques dependents de 20E mitjançant la interacció dels diferents receptors nuclears	17
1.5. Paper de la 20E en el desenvolupament dels insectes hemimetàbols	18
1.5.1. El receptor nuclear E75	20
1.5.2. El receptor nuclear HR4	21
1.6. OBJECTIUS	22
2. MATERIAL I MÈTODES	25
2.1. Insectes	27
2.2. Tècniques quirúrgiques	27
2.2.1. Dissecció dels ovaris, el cos gras i l'epidermis	27
2.2.2. Dissecció de les ooteques	28
2.2.3. Dissecció de la glàndules protoràctiques	28
2.2.4. Obtenció d'hemolimfa	28
2.2.5. Preparació de la cutícula	28
2.3. Cèl·lules embrionàries UM-BGE-1 de <i>B. germanica</i>	29
2.4. Extracció d'àcids ribonucleics	29
2.5. Clonatge dels cdnas de BgE75 i BgHR4	29
2.5.1. PCR	29

2.5.2. Amplificació ràpida dels extrems 5' i 3' dels cDNAs	31
2.5.3. Obtenció dels cDNAs sencers dels receptors nuclears	32
2.6. Electroforesi de DNA	33
2.7. Lligació d'inserts en plàsmids	33
2.8. Purificació de plàsmids	33
2.9. Seqüenciació de DNA	33
2.10. Separació de proteïnes mitjançant electroforesi	
en gels d'acrilamida-bisacrilamida-sds	34
2.11. RT-PCR semiquantitativa	35
2.11.1. Tractament amb DNasa	35
2.11.2. Retrotranscripció	36
2.11.3. PCR	36
2.12. Southern blot	39
2.12.1. Electroforesi i transferència del DNA	39
2.12.2. Hibridació i detecció	39
2.13. Marcatge de sondes amb fluoresceïna	40
2.14. Tractaments en cossos grassos incubats <i>in vitro</i>	40
2.15. Interferència d'rna <i>in vivo</i>	41
2.15.1. Obtenció del RNA de doble cadena (dsRNA)	41
2.15.1.1. Clonatge del fragment diana	41
2.15.1.2. Linearització del DNA plasmídic	43
2.15.1.3. Síntesi del dsRNA	43
2.15.2. Preparació i injecció del dsRNA	45
2.16. Tinció d'oòcits amb dapi i quantificació de les cèl.lules fol·liculars	45
2.17. Talls histològics de la cutícula ventral	46
2.18. Observacions microscòpiques	47
2.19. Quantificació dels ecdisteroides hemolimfàtics	47
2.20. Injecció de 20e	48
2.21. Producció <i>in vitro</i> d'hormona juvenil	48
2.21.1. Incubació dels <i>corpora allata</i>	48
2.21.2. Extracció de l'hormona juvenil	48

2.22. Arbre filogenètic	49
2.23. Tunel de glàndula protoràtica	50
3. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL RECEPTOR	
NUCLEAR BgE75	51
3.1. Antecedents	53
3.2. Resultats	55
3.2.1. Clonatge de cinc cDNAs corresponents a cinc isoformes del receptor nuclear E75 a <i>B. germanica</i>	55
3.2.2.- Similituds enter les seqüències d'E75 d'artròpodes	59
3.2.3. Anàlisi filogenètica del receptor nuclear E75	60
3.3. Discussió	63
4. CARACTERITZACIÓ DELS PATRONS D'EXPRESSIÓ	
I REGULACIÓ HORMONAL DE BgE75	67
4.1. Antecedents	69
4.2. Resultats	70
4.2.1. Patrons d'expressió de BgE75 durant l'embriogènesi	70
4.2.2. Patrons d'expressió de BgE75 durant les dues darreres fases ninfals	73
4.2.3. Efecte de la 20E sobre l'expressió de BgE75 <i>in vitro</i>	73
4.3. Discussió	76
4.3.1. Expressió de BgE75 durant l'embriogènesi	76
4.3.2. Expressió de BgE75 durant les dues últimes fases ninfals	78
4.3.3. Efecte de la 20E sobre l'expressió de BgE75 <i>in vitro</i>	79
5. ANÀLISI FUNCIONAL DEL RECEPTOR BgE75	
MITJANÇANT RNA_i <i>IN VIVO</i>	83
5.1. Antecedents	85
5.2. Resultats	86

5.2.1. La interferència de RNA redueix els nivells de missatge de BgE75 en diferents teixits de <i>B. germanica</i>	86
5.2.2. Anàlisi fenotípica de les nimfes de sisena fase interferides per BgE75 ...	89
5.2.3. Nivells d'ecdisteroides en les nimfes de sisena fase interferides per BgE75	93
5.2.4. BgE75 regula la degeneració de la glàndula protoràcica en la transició nimfa-adult	97
5.2.5. Les nimfes de sisena fase interferides per BgE75 inicien el programa genètic d'adult, tot i no fer la muda imaginal	98
5.2.6. La interferència específica de cadascuna de les isoformes del receptor BgE75 indica que són redundants	101
5.3. Discussió	107
5.3.1. La interferència de BgE75 provoca un dèficit d'ecdisteroides que impedeix la muda imaginal i afecta el creixement de l'epiteli fol·licular	107
5.3.2. El receptor nuclear BgE75 regula la degeneració de la glàndula protoràcica en la transició nimfa-adult	110
5.3.3. La muda no senyalitza la transició a la fase adulta a <i>B. germanica</i>	111
6. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR BgHR4	113
6.1. Antecedents	115
6.2. Resultats	117
6.2.1. Clonatge i caracterització estructural del receptor nuclear BgHR4	117
6.2.2. Similituds entre BgHR4 i els seus homòlegs en insectes i en <i>H. sapiens</i> ..	120
6.2.3. Anàlisi filogenètica del receptor nuclear HR4	121
6.2.4. Patrons d'expressió de BgHR4 durant l'embriogènesi i les dues últimes fases ninfals de <i>B. germanica</i>	123
6.2.5. Efecte de la 20E sobre l'expressió de BgHR4 <i>in vitro</i>	124
6.2.6. Influència de factor BgHR3 sobre l'expressió de BgHR4	125
6.2.7. Funcions de BgHR4 durant la cinquena i la sisena fase ninfal	129

6.2.8. Nivells d'ecdisteroides en les nimfes interferides amb dsBgHR4 durant la sisena fase nimfal.....	130
6.2.9. Efecte de la interferència de BgHR4 sobre l'expressió d'altres receptors nuclears	130
6.3. Discussió.....	132
6.3.1. Estructura del receptor nuclear BgHR4.....	133
6.3.2. Patrons d'expressió i regulació hormonal de BgHR4	134
6.3.3. Estudi funcional del receptor BgHR4 mitjançant RNAi <i>in vivo</i>	135
7. FUNCIO DELS RECEPTORS NUCLEARS EN LA DEGENERACIO DE LA GLANDULA PROTORACICA DE <i>Blattella germanica</i>.....	139
7.1. Antecedents.....	141
7.2. Resultats.....	142
7.2.1. Efecte de la interferència de BgE75 sobre l'expressió de BgHR3, BgHR4 i BgFTZ1.....	142
7.2.2. Efecte de la interferència de BgFTZ-F1 sobre la degeneració de la glàndula protoràcica.....	145
7.2.3. Efecte de la interferència de BgE75 sobre la degeneració de la glàndula protoràcica a la cinquena fase nimfal.....	146
7.2.4. Paper de l'HJ en el manteniment de la glàndula protoràcica durant el desenvolupament nimfal.....	147
7.3. Discussió.....	155
7.3.1. Funció dels receptors nuclears en la degeneració de la glàndula protoràcica durant la sisena fase nimfal de <i>B. germanica</i>	155
7.3.2. Paper de l'HJ en el manteniment de la glàndula protoràcica durant el desenvolupament nimfal.....	158
7.3.3. Les múltiples funcions de BgE75 al llarg del desenvolupament nimfal...	160
8 CONCLUSIONS.....	161
9 BIBLIOGRAFIA.....	165

I. PREFACI

Durant la “Karlson Lecture” del 16è Congrés Internacional d’Ecdisona de Ghentz (Bèlgica) el professor Lawrence I. Gilbert de la Universitat de North Carolina (EEUU) va fer, al meu parè, una magnífica introducció del que significa treballar en el món de la ciència. L’aula magna de la universitat de Ghent estava plena de científics de tot el món especialitzats en diversos camps de l’endocrinologia molecular d’insectes, i jo vaig tenir el privilegi d’escoltar-lo. El professor Gilbert va explicar la increïble sort que té un científic per poder arribar cada matí al laboratori i saber que allò que està a punt de fer mai ningú ho ha intentat prèviament. La sensació, explicava el professor Gilbert, que es té dia rera dia quan es descobreix un petit nou detall que permet entendre millor com funcionen els éssers vius, és d’una satisfacció que molt poques feines et poden donar. Efectivament, fer ciència és un desafiament diari.

El Departament de Fisiologia i Biodiversitat Molecular del CSIC, sota la direcció del professor Xavier Bellés, treballa desde fa anys tan en la fisiologia com en la endocrinologia molecular del desenvolupament i la reproducció dels insectes. En aquest departament, el Dr. David Martín dirigeix una de les línies d’investigació centrada en l’estudi de les hormones ecdisteroidals i els gens que formen la cascada gènica de resposta a aquestes hormones durant diferents períodes del desenvolupament de la panerola *Blattella germanica*. Aquest insecte primitiu és un model d’experimentació molt valuós ja que és relativament fàcil de manipular, té una gran capacitat reproductora i, recentment, s’ha descobert que es pot manipular genèticament. Dins d’aquesta línia de recerca s’està estudiant, a nivell funcional, diferents gens de resposta als ecdisteroides. Així, el present projecte de tesi està encaminat a ampliar el coneixement en aquest camp mitjançant el clonatge i l’estudi funcional dels receptors nuclears E75 i HR4, dos factors de transcripció que podrien estar implicats en la resposta als ecdisteroides. A més, es pretén investigar la possible relació de tots aquests gens en diferents processos que es donen al llarg del cicle vital d’aquest insecte, com ara per exemple la muda.

En la presentació d’una tesi doctoral és habitual dedicar un apartat als agraïments. En el meu cas, m’agradaria dir que són moltes les persones a les que vull agrair la seva generositat alhora d’ajudar-me, d’una manera o altre, a que aquesta tesi hagi estat possible. A totes aquestes persones, i de tot cor, els vull donar les gràcies.

M'agradaria donar les gràcies al professor Xavier Bellés, el meu co-director de tesi, per la increïble oportunitat que em va donar al oferir-me la beca per treballar en el seu grup de recerca. He passat quatre anys meravellosos i gràcies a aquesta oportunitat he pogut descobrir que la ciència és un món increïblement apassionant i enriquidor. Moltíssimes gràcies per ajudar-me a ser millor científic. Així mateix voldria agrair a la Dra. Dolors Piulachs, del mateix departament, l'ajuda i el suport que m'ha donat. Vull donar-li les gràcies per tot el que m'ha ensenyat, pels consells que m'ha donat.

També m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Isabel Navarro del Departament de Fisiologia de la Universitat de Barcelona, que ha estat la tutora de la present tesi doctoral. Vull agrair-li la seva ajuda i la seva amabilitat que m'ha permès, finalment, arribar a presentar aquesta memòria.

M'agradaria dedicar aquesta tesi a moltes persones, però molt especialment als meus pares, a la Marta i a en JosepM^a. Ells són a qui dec més per tot el que m'han ensenyat, i als quals mai els podré agrair tot el que han arribat a fer per mi, que és molt, moltíssim. Gràcies de tot cor, us estimo molt. A la meva estimada Alba també li vull dedicar aquest treball. Ella ha hagut de patir en primera persona els bons i els mals moments que he passat durant aquests quatre anys. No sé com puc agrair-te tot el que arribes a fer per mi. Tu m'has ajudat a saber que ser feliç és el més important, i que cal lluitar per les coses que et motiven. Gràcies Alba. M'agradaria també tenir unes paraules de record pels meus avis, Joan, Paquita, Pepeta i Joaquim. Uns fa més temps, altres menys, que ja no són entre nosaltres, però la meua vida ha estat sempre influenciada per vosaltres. Als meus fills Jana i Pau, també els correspon un trocet d'aquesta tesi. Durant aquests quatre anys us he dedicat menys temps del que volia, ho sé. Espero que m'ho sabreu perdonar, com jo no us tinc en compte les "tormentoses" nits que a vegades em doneu. Us estimo moltíssim. També vull dedicar aquesta tesi al meu germà Ferran, amb qui m'uneix una amistat molt especial, qui ens ho havia de dir si recordem aquelles batalles que teníem de petits. Al meu tiet Xavier li dedico també aquesta memòria. Jo era molt petit, pero recordo com si fós avui les coses que m'ensenyaves. Les xerrades, de ciència o de qualsevol altre tema, amb tu, sempre són agradables i molt interessants. Gràcies a tots.

Als meus companys i amics del laboratori, els hi agraeixo l'ajuda i l'amistat que m'han donat. Conèixer-vos ha estat extraordinari. M'agradaria donar les gràcies especialment a unes quantes persones. Núria, sense la teva ajuda no hauria pogut tirar endavant aquesta tesi. Gràcies, de veritat, però gràcies sobretot per la teva amistat, això queda per sempre. Sempre recordaré les nostres converses de bon matí, quina gran manera de començar el dia! Pepi, a tu també et dec moltíssim. Gràcies per la paciència amb la que em vas introduir en l'increïble món de la biologia molecular i per tot el que m'has ensenyat. Gràcies, mil gràcies per tot el temps que m'has dedicat i per les fantàstiques discussions científiques i no científiques que vam tenir, pels moments tant divertits que vam passar i per les alegries que vam anar compartint a mesura que avançavem en els nostres descobriments. Lluïsa, gràcies a tu també per la teva amistat, per mi ets una persona molt especial. Els teus consells i la teva ajuda han estat molt valuosos per mi al llarg d'aquests quatre anys. Jose, et vull donar les gràcies per la teva amistat, els teus consells i tot el que he après amb tu tot discutint de ciència. Hem compartit moments increïbles tan científicament com personalment, gràcies. Òscar, la nostra amistat és quelcom molt especial que ha anat sorgint poc a poc al llarg d'aquests anys. Les nostres reunions al "club" sempre han estat molt divertides. Gràcies per les teves opinions i els teus consells, fer ciència al teu costat ha estat fantàstic. Claudia, vull agrair-te la teva amistat, els teus consells i la teva ajuda, m'has ensenyat molt i he disfrutat molt treballant al teu costat. M'hagués agradat molt haver coincidit molt més temps al laboratori amb tu. També vull tenir un record per dos persones que m'han ajudat molt en la meva feina i a qui he intentat transmetre el poc que sé del marevellós món de la biologia molecular. A vosaltres, Ferran i Glòria, gràcies de tot cor per l'ajuda i l'amistat. A la resta de companys del laboratori, també el meu agraïment i el meu record per tots ells. Paula, Laura, Viviana, Santiago, Juliana, Nathalie, Marisol, Ruth i Daniel, espero que tot us vagi molt i molt bé.

L'últim agraïment és per mi un dels més importants, i és per la persona que ha fet possible aquesta tesi i molt, molt més. David vull agrair-te la oportunitat que em vas donar i que creiéssis en mi. Vull donar-te les gràcies per la teva amistat i per tot el que m'has ensenyat, tan a nivell personal com a nivell científic. Treballar al teu costat ha estat un privilegi. El teu entusiasme, les teves idees, el teu coneixement i el teu amor per

la ciència és increïble i ho saps transmetre com ningú. El temps que m'has dedicat i la teva generositat cap a mi ha estat increïble. T'estic molt agraït. Agraït per fer-me entendre que en ciència les idees són el més important i que investigar no és una feina, sinó una manera de viure apassionant i un repte diari increïble. Agraït per les mil i una xerrades i discussions, per tot el que m'has ensenyat, i per totes les teories que sorgien cada dia de tornada cap a Badalona amb el tren. Al teu costat i durant aquests quatre anys he viscut moments increïblement emocionants, per mi impossibles d'oblidar. Espero i desitjo poder fer ciència al teu costat molt més temps. Gràcies de tot cor David.

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Els insectes són el grup més divers i important numèricament de tot el regne animal. Actualment es coneixen al voltant d'un milió d'espècies, però es pensa que n'hi poden haver fins a 30 milions. El seu èxit evolutiu es deu a la seva versatilitat per poder aprofitar tot tipus de nínxols ecològics i d'aliments diferents, així com a la seva facilitat de dispersió i gran capacitat reproductora.

Els insectes tenen també gran importància econòmica ja que afecten l'activitat humana de moltes maneres. Així, alguns insectes són beneficiosos perquè actuen com a pol·linitzadors, són depredadors d'altres organismes nocius o perjudicials per l'home, o proporcionen substàncies útils com ara cera, mel o seda, entre d'altres. A més, intervenen en la formació del sòl i en la degradació de la matèria orgànica i són l'aliment d'altres animals insectívors que poden ser útils per a l'espècie humana.

Hi ha també algunes espècies d'insectes que són perjudicials per a l'espècie humana. N'hi ha que afecten greument els conreus o les masses forestals. Altres són paràsits de determinats animals o de la pròpia espècie humana, i alguns poden transmetre malalties tan greus com la malària o el dengue.

1.1. Control hormonal del desenvolupament dels insectes

Una característica comuna a tots els diferents tipus d'insectes, és que les transicions entre els diferents estadis del desenvolupament, tant durant l'embriogènesi, com el desenvolupament post-embrionari, estan controlades per dos tipus diferents d'hormones. Aquestes són, els ecdisteroides, i principalment la seva forma més activa, la 20-hidroxiecdisona (20E), i la hormona juvenil (HJ). Així, els diferents pics de 20E que es donen a la hemolimfa, al final de cada fase del desenvolupament, indueixen el procés de muda, mentre que la presència d'HJ determina la naturalesa d'aquesta. Quan el pic de 20E es dona en presència d'HJ, la muda es produeix a un nou estadi juvenil, mentre que quan els nivells de HJ són molt baixos, el pic de 20E determina que la muda sigui a l'estadi adult (Riddiford, 1993, 1994, 1996b). Detallem a continuació, les principals característiques, tant de l'HJ com dels ecdisteroides.

1.1.1. Les hormones juvenils i els *corpora allata*

Les hormones juvenils són l'epoxifarnesoat de metil (HJ-III) i altres molècules derivades de l'homomevalonat (Bellés *et al.*, 2005). La seva funció és mantenir els teixits en estadis premetamòrfics, mentre que la seva absència determina que els teixits de l'insecte comencin a diferenciar-se en teixits adults (Riddiford, 1996a). Les glàndules encarregades de la síntesi d'HJ són els *corpora allata*. La regulació dels nivells d'HJ sintetitzats pels *corpora allata* depèn de factors alatotròpics i allostàtics mentre que el seu catabolisme depèn de diferents enzims, com són ara l'esterasa de l'HJ (Browder *et al.*, 2001). En la majoria d'insectes, l'HJ-III és la més comuna, excepte en els lepidòpters, on les formes més habituals són la HJ-I i la HJ-II (Truman i Riddiford, 2002). Un cas particular el trobem a *Manduca sexta*, on l'efecte de l'HJ durant l'entrada a pupa ha estat estudiat en detall. Així, s'ha observat que determinats discs imaginals de *M. sexta* converteixen un precursor de l'HJ en la seva forma activa per evitar un creixement prematur de les estructures adultes a les que han de donar lloc aquells discs imaginals (Truman i Riddiford, 2002; Zhou i Riddiford, 2002).

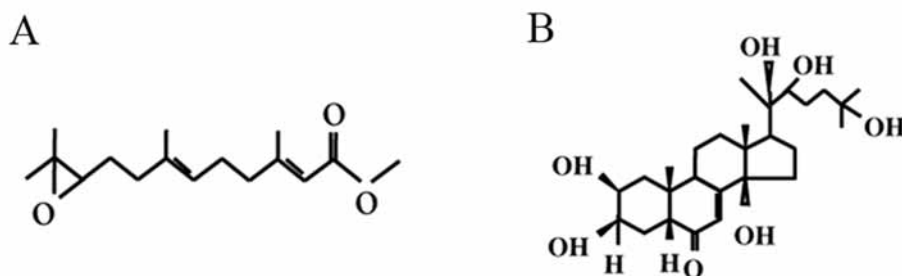


Figura 1.1.- Estructura química de les dues hormones més importants en la regulació endocrina de *Blattella germanica*. (A) Hormona juvenil III. Aquesta molècula és de natura sesquiterpènica, sintetitzada en unes glàndules retrocerebrals anomenades *corpora allata*. Exerceix un efecte pleiotròpic realitzant un paper rellevant en el marc de la metamorfosi i la reproducció. (B) 20-hidroxiecdisona. Ecdisteroide biològicament actiu en la panerola estudiada. Presenta una estructura química esteroidal. Durant les fases nimfals, bona part de la seva síntesi té lloc a la glàndula protoràcica. Té diverses funcions, essent molt important en el procés de la muda.

1.1.2. Els ecdisteroides i la glàndula protoràcica

La 20E, la forma més activa dels ecdisteroides en els insectes, és un esterol polihidroxilat que es produeix en diversos teixits de l'insecte a partir de l'ecdisona, que és el seu precursor. Al seu torn, l'ecdisona es sintetitza en les cèl.lules de la glàndula protoràcica, que es situa al protòrax. En els insectes basals, aquesta glàndula generalment consta de dos eixos musculars envoltats de cèl.lules que sintetitzen pròpiament els ecdisteroides, mentre que en insectes més modificats, com són ara dípters i lepidòpters, la glàndula protoràcica és una porció de la glàndula anular. La glàndula anular conté també els *corpora allata*, encarregats de sintetitzar HJ, i els *corpora cardiaca*, òrgans neurohemals i neurosecretors (Dai i Gilbert, 1991).

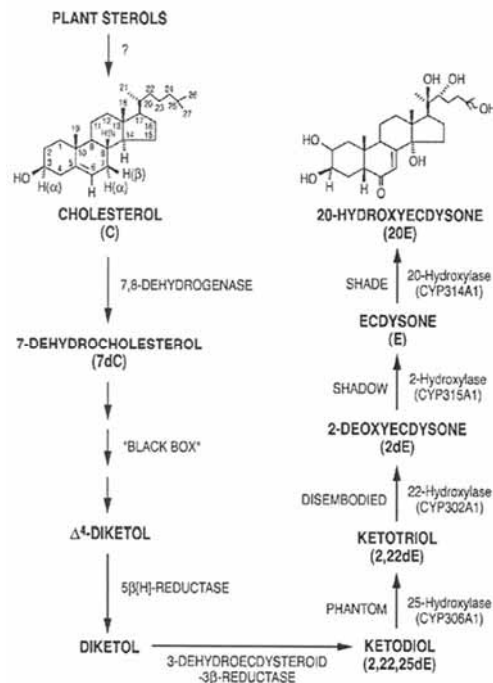


Figura 1.2.- Esquema de la biosíntesi de la 20-hidroxiecdisona. En aquest procés estan implicats com a mínim set enzims de tipus citocrom P450. On es dibuixen múltiples fletxes indica que és un pas de la ruta encara per caracteritzar i el qual segurament implicarà diversos passos de transformació bioquímica. Adaptat de Ono *et al.*, (2006).

En els insectes, la ecdisteroidogènesi està controlada per neuropèptids. En els insectes més modificats s'ha demostrat que l'hormona protoracicotròpica (PTTH), que es sintetitza en dues cèl·lules neurosecretores del cervell, s'encarrega d'estimular la síntesi d'ecdisteroides en les cèl·lules de la glàndula protoràtica. Aquesta activació es du a terme mitjançant la unió de la PTTH al seu receptor de membrana, que al seu torn activa segons missatgers encarregats de transduir el senyal que donarà lloc a la producció d'ecdisona (vegeu Henrich et al., 2005).

Per la seva banda, la biosíntesi de la 20E és un procés que depèn del colesterol ingerit a través de la dieta, ja que els insectes no poden produir-lo per ells mateixos. La conversió del colesterol ingerit en 20E requereix com a mínim set passos enzimàtics. En un primer pas el colesterol que arriba a la glàndula protoràtica és convertit a 7-dehidrocolesterol (7dC) per una deshidrogenasa microsomal (Gilbert *et al.*, 2002). Les conversions que es donen a continuació encara no es coneixen en la seva totalitat, però els quatre darrers passos, i la conversió del ketodiol en 20E, són portats a terme seqüencialment per enzims de la família del citocrom P450, hidroxilases que pertanyen a la família dels gens "*Halloween*" (vegeu Gilbert, 2004 i Lafont *et al.*, 2005). La conversió de l'ecdisona en 20E, no la realitza la glàndula protoràtica sinó diferents òrgans i teixits perifèrics, com el cos gras o el tub digestiu, que capten l'ecdisona de l'hemolimfa (Petryk *et al.*, 2003; Rewitz *et al.*, 2006b, 2006a).

1.2. Les bases moleculars del creixement dels insectes

Un dels processos més remarcables que té lloc en els organismes superiors, i que està controlat hormonalment, és la maduració que té lloc desde formes inmadures incapaces de reproduir-se fins a la formació d'un animal adult amb capacitat de reproducció. En els insectes, aquesta transformació té lloc, principalment, seguint dos tipus diferents de patró. En els insectes holometàbols, com ara *Drosophila melanogaster*, aquesta maduració es dona durant el procés de la metamorfosi, just després del creixement larvari, mentre que en els insectes ametàbols i hemimetàbols té lloc progressivament al llarg de totes les fases inmadures de l'insecte, és a dir, durant les

diferents fases nimfals. De fet, els insectes es poden dividir en tres grups segons el tipus de metamorfosi que presenten; els més primitius, com ara els peixets de plata, no presenten cap tipus de metamorfosi i és per això que es denominen ametàbols. Les formes inmadures d'aquests insectes són morfològicament idèntiques a les seves formes adultes, amb l'excepció que no tenen una genitèlia funcional. En segon lloc trobem els insectes que presenten una metamorfosi incompleta, els hemimetàbols, les formes inmadures dels quals, anomenades nimfes, presenten una morfologia molt semblant a les formes adultes. Les nimfes, a part de no presentar una genitèlia funcional, presenten uns rudiments alars que esdevindran ales funcionals en les formes adultes. Paneroles, saltamartins i llagostes, entre d'altres insectes, pertanyen a aquest tipus. Per últim, els insectes amb metamorfosi completa, els holometàbols, presenten tres estadis del desenvolupament morfològicament molt diferenciats, la larva, la pupa i l'adult. El creixement, en aquests insectes es dona a les fases larvàries, mentre que durant la pupa té lloc el procés de la metamorfosi, durant el qual es destrueixen els teixits larvaris i es generen els teixits adults a partir del creixement controlat dels discs imaginis.

Des d'un punt de vista endocrí, tant el desenvolupament nimfal d'insectes hemimetàbols com el larvari de holometàbols són similars, ja que les successives mudes que els permeten créixer, tal i com hem esmentat anteriorment, estan controlades per la 20E i per l'HJ. Tanmateix, aquests grups d'insectes difereixen marcadament en els patrons endocrins que coordinen el creixement i la metamorfosi (Fig. 1.3). En els insectes hemimetàbols, els nivells d'HJ decauen fins ésser indetectables a l'inici de la darrera fase nimfal, de tal manera que al següent pic de 20E s'indueix la muda imaginal. En els insectes holometàbols, per contra, la caiguda dels nivells d'HJ es dona en un moment concret durant la darrera fase larvària. Aleshores, apareix un petit pic de 20E que s'encarrega de finalitzar el període d'alimentació de la nimfa, i que promou un comportament pre-metamòrfic, i a la vegada senyalitza als teixits larvaris pel proper desenvolupament pupal (Riddiford, 1978; Nijhout, 1994). Una mica més tard, un segon, i més gran, pic de 20E, juntament amb la reaparició de l'HJ, induceix la formació de la cutícula pupal. Aquesta reaparició de l'HJ, a l'inici de la metamorfosi, no té lloc als insectes hemimetàbols. Finalment, l'HJ es elimina de la circulació just abans de l'ècdisi pupal, de tal manera que el següent pic de 20E, que es dona durant la pupa,

provoca la destrucció dels teixits larvaris i la diferenciació dels adults (Thummel, 2001) (Fig. 1.3).

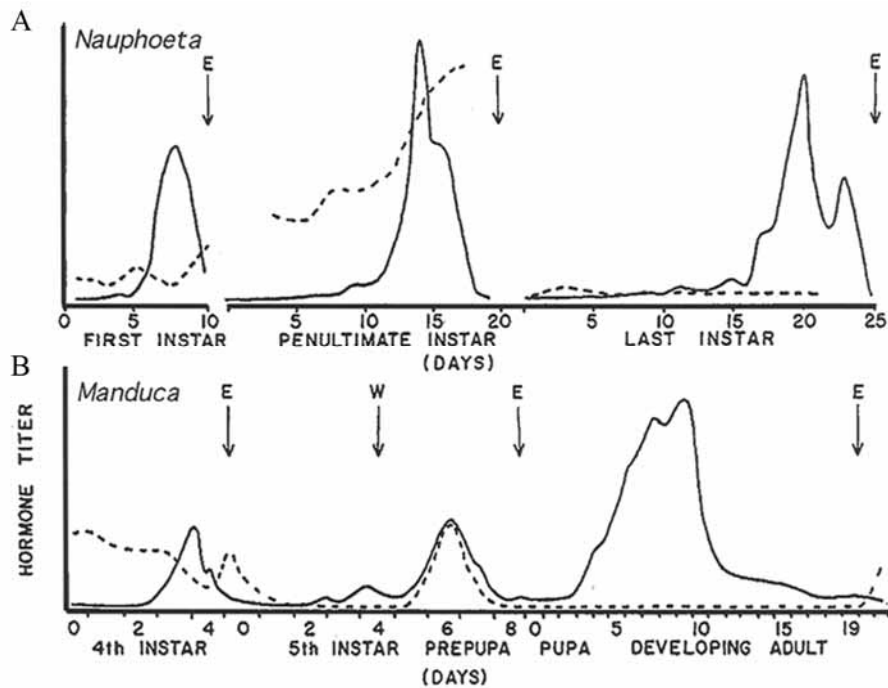


Figura 1.3.- Nivells d'hormona juvenil i d'ecdisona al llarg de les diferents fases de desenvolupament d'un insecte hemimetàbol i d'un holometàbol. En el gràfic de la dalt es mostren els patrons descrits per aquestes dues hormones en el cas de la panerola *Nauphoeta cinerea* i en el de baix el perfil d'aquestes dues important hormones observat en el lepidòpter *Manduca sexta*. Adaptat de Truman i Riddiford (2002).

1.3. Coordinació del creixement i la metamorfosi en els insectes holometàbols per la 20E a través d'una cascada de factors de transcripció

Donat el paper principal que exerceixen els diferents pics de 20E sobre el desenvolupament i maduració dels insectes holometàbols, s'ha dedicat molt esforç a establir les bases moleculars de l'acció d'aquesta hormona en aquests organismes.

La primera aproximació per caracteritzar el mecanisme d'acció de la 20E a escala molecular va tenir lloc als anys 70, quan el professor Michael Ashburner (Universitat de

Cambridge), utilitzant una sèrie d'experiments basats en incubacions *in vitro* de cromosomes politènics gegants de la mosca del vinagre, *D. melanogaster*, va proposar un model d'acció de la 20E basat en l'existència d'una jerarquia de factors de transcripció (Ashburner, 1973, 1974). Aquest model, amb el temps, rebria el nom de model d'Ashburner (Fig. 1.4). D'acord amb aquest model, la 20E s'uniria al seu receptor i activaria de forma ràpida i directa un seguit de gens que es van denominar primerencs, els quals, al seu torn, activarien un número més gran de gens tardans que serien els que s'encarregarien de portar a terme la funció biològica.

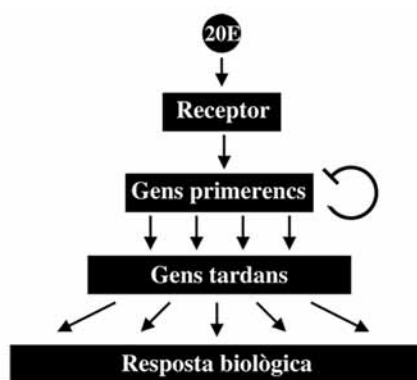


Figura 1.4.- Esquema de la cascada de factors reguladors induïts per la 20-hidroxicdisona (20E). Model d'Ashburner. Amb la unió de la 20E al seu receptor s'indueixen de forma directa una sèrie de gens primerencs, que a la vegada controlen l'expressió d'un nombre més gran de gens tardans, els quals induiran la resposta biològica. A més, les proteïnes generades pels gens primerencs reprimeixen l'expressió dels seus propis gens, controlant així temporalment l'efecte de l'hormona.

Aquest model va ser totalment confirmat durant els anys següents, principalment pel treball dels grups dels professors Ronald Evans (Institut Salk) i David Hogness (Universitat de Berkeley). Així, es va demostrar que el receptor funcional de la 20E és un heterodímer compost per dues proteïnes, el propi receptor de 20E (EcR), que s'encarrega d'unir a l'hormona, i ultraspiracle (USP) (Koelle *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1992). Una vegada l'heterodímer s'ha unit a la 20E, aquest heterodímer induïx l'expressió d'un nombre petit de gens primerencs, entre els que destaquem, *Broad complex (BR-C)*, *E74*, així com els receptors nuclears *E75*, *HR3*, *HR4*, *HR39*, *E78* i *FTZ-F1*. Finalment, són aquest factors, sols o de forma conjunta, els que en activar els gens secundaris, produeixen els efectes biològics observats. Tal i com hem descrit, tan

els dos components del receptor de la 20E, com la pràctica totalitat dels gens primerencs, pertanyen a la superfamília dels receptors nuclears, els quals es caracteritzen per la seva capacitat d'unir determinades molècules, o lligands, i d'unirse al DNA, activant d'aquesta manera la transcripció dels gens diana. En els darrers anys, amb la seqüenciació completa del genoma de *D. melanogaster*, s'ha completat la llista dels receptors nuclears d'aquest organisme, resultant un total de 18 membres (Taula 1.1).

Taula 1.1.- Llistat dels 18 receptors nuclears presents al genoma de *D. melanogaster*. Entre parèntesi s'indiquen els lligands coneguts per cada receptor nuclear. La columna de regulació per 20E fa referència als gens regulats per 20E a nivell transcripcional. (+) indica una resposta feble a la 20E. A la columna de número d'isoformes es mostra el número de proteïnes descrites (PD), el número de proteïnes possibles en funció de l'anàlisi genòmic (PP) i el número d'isoformes d'RNA (RNA). Dades obtingudes de King-Jones i Thummel (2005).

Receptors nuclears a <i>D. melanogaster</i> (ligand)	Regulació per 20E	Nº d'isoformes (PD/PP/RNA)	homòleg a <i>H. sapiens</i> (ligand)
E75	+	3/4/4	REV-ERB
E78	+	2/3/2	REV-ERB
DHR3	+	1/3/3	RORB (all trans retinoic acid)
EcR (20-hidroiecdisona)	+	3/3/5	FXR (Chenodeoxycholic acid) LXR (22(R)-hidroxicholesterol)
DHR96	(+)	1/1/2	VDR (1 α , 25-dihidroxyvitamin D ₃)
HNF-4	?	1/3/3	HNF4A
USP	-	1/1/1	RXRA (9-cis-retinoic acid)
DHR78	(+)	1/2/4	TR2
Tailless	?	1/1/1	TLX
Dissatisfaction	?	1/1/1	TLX
DHR83/CG10296	?	0/1/1	PNR
DHR51/CG16801	?	0/2/2	PNR
Seven up	?	1/3/3	COUP-TF1
ERR	?	0/2/2	ERRb (diethylstilbestrol)
DHR38	-	2/2/2	NURR1
FTZ-F1	+	2/2/3	LRH-1 (phospholipid) SF-1 (phospholipid)
DHR39	+	2/2/2	LRH-1 (phospholipid) SF-1 (phospholipid)
DHR4	+	1/2/2	GCNF

1.4. Els receptors nuclears d'insectes

Els receptors nuclears són proteïnes que es troben en grups tant diversos com els platelmints, els cnidaris, els artròpodes o els vertebrats (Laudet i Bonneton, 2005). L'anàlisi filogenètica d'aquesta família de factors de transcripció els ha classificat en sis subfamílies diferents, en funció del grau de conservació que s'observa en les seves seqüències (King-Jones i Thummel, 2005). Així, es poden relacionar filogenèticament els receptors nuclears de *D. melanogaster*, que en té 18 diferents, amb els d'*H. sapiens* que en té 48. Allò que s'observa és que la similitud en les seqüències del domini d'unió al DNA (vegeu més a baix), és molt alta (74-93% en la majoria d'ells), tot i tractar-se de dos clades tant separats evolutivament (King-Jones i Thummel, 2005). D'altra banda, a *C. elegans* se'n coneixen 284, dels quals només 15 estan relativament conservats respecte a la resta de metazous (Gissendanner *et al.*, 2004).



Figura 1.5.- Arbre filogenètic que mostra les relacions evolutives entre els receptors nuclears humans (en blau) i els de *Drosophila melanogaster* (en verd). Els receptors nuclears s'agrupen en sis subfamílies (enumerades a la dreta de l'arbre). Les dades per a l'obtenció de l'arbre estan extretes de Laudet i Bonneton (2005). La figura està adaptada de King-Jones i Thummel (2005).

1.4.1. Estructura

Els receptors nuclears formen una superfamília de factors de transcripció amb una estructura comú formada per diferents dominis funcionals. D'aquests, els més característics són el domini d'unió al DNA (DBD), que sol estar molt conservat, i el domini d'unió a lligand (LBD) (Fig. 1.6A). El DBD conté una estructura de dos dits de zinc que li permet al receptor unir-se a DNA. Dins del primer dit de zinc trobem la caixa proximal (caixa-p) formada pels aminoàcids que determinen la seqüència de DNA que reconeixerà el receptor. D'altra banda, el segon dit de zinc facilita al receptor la dimerització amb altres receptors, però només en el cas que el receptor estigui unit a DNA. Aquesta funció la realitza a través dels aminoàcids que conformen la caixa distal (caixa-d), dins del segon dit de zinc (Fig. 1.6B) (Evans, 2005). L'LBD, que està separat del DBD per la regió frontissa, és el domini d'unió al lligand i de dimerització amb altres receptors nuclears. Aquest domini s'organitza en 12 ó 13 hèlixs- α que conformen una caixa hidrofòbica on es poden unir diferents lligands de natura lipofílica. A més, a l'extrem carboxi terminal d'aquest domini trobem el domini de transactivació AF-2 dependent de lligand. Diferents estudis han demostrat que quan l'LBD uneix el seu lligand, es dona un canvi de conformació en l'estructura de l'LBD que permet al domini AF-2 reclutar diferents coactivadors, conferint al receptor la capacitat activadora de la transcripció (Glass i Rosenfeld, 2000). De tota manera, no es coneix si tots els receptors nuclears tenen lligands. D'aquells que no se'n coneix el lligand se'ls anomena receptors nuclears orfes, i s'ha vist que alguns d'aquests poden funcionar sense necessitat d'unir lligand (Mangelsdorf i Evans, 1995; Chawla *et al.*, 2001). A l'extrem carboxi terminal, alguns receptors nuclears tenen la regió F, que és un domini que té la capacitat d'unir corepressors o activadors. Finalment, a l'extrem amino terminal i dins del domini A/B, trobem el domini d'activació AF-1 que té la capacitat d'activar la transcripció de manera independent del lligand.

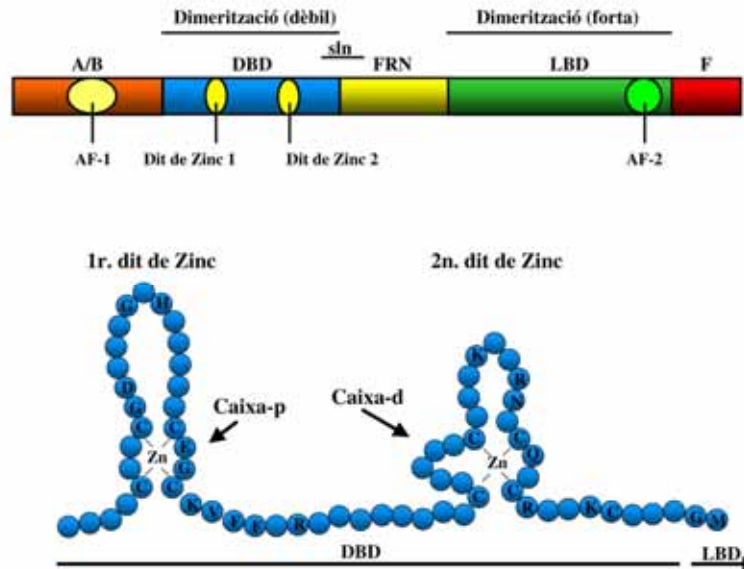


Figura 1.6.- Estructura dels receptors nuclears. (A) Dominis estructurals i funcionals característics de la superfamília dels receptors nuclears. El domini A/B conté la regió activadora AF-1. Dins del DBD s'indiquen els dos dits de zinc necessaris per la unió a DNA. Entre la regió frontissa (FRN) i el DBD es troba la senyal de localització nuclear (sln). Al final del LBD hi ha la regió activadora depenent de lligand AF-2, i a continuació, la regió F. El LBD es considera la regió de dimerització forta, mentre que el DBD també és necessari perquè el receptor nuclear pugui dimeritzar quan aquest està unit a DNA. (B) Estructura de dos dits de zinc característica dels receptors nuclears i responsable de la unió del receptor a DNA. S'indiquen els aminoàcids que estan conservats en tots els receptors nuclears. La caixa proximal del primer dit de zinc (caixa-p) determina la seqüència que serà capaç de reconèixer i unir el receptor, mentre que la caixa distal situada en el segon dit de zinc (caixa-d) intervé en la capacitat de dimerització del receptor nuclear.

1.4.2. Mecanisme d'acció

El mecanisme molecular a través del qual els receptors nuclears converteixen un senyal hormonal en una resposta transcripcional, difereix de la clàssica via de transducció de senyals a través de receptors de membrana. Així, quan els receptors nuclears s'activen, es transloquen al nucli on reconeixen i s'uneixen a seqüències específiques de DNA, que són els elements de resposta. Cada receptor nuclear s'uneix a

un element de resposta igual o derivat de la seqüència consens 5'-AGGTCA-3', en funció dels aminoàcids que componguin la caixa-p del DBD. Alguns receptors nuclears poden funcionar com a monòmers, unint-se a elements de resposta senzills, mentre que d'altres ho fan com a homodímers o heterodímers unint-se a dos elements de resposta situats un al costat de l'altre en el DNA. En aquest cas, els dos elements de resposta poden ser repeticions directes, invertides o evertides, i poden estar contigües o separades per 1-6 nucleòtids (Fig 1.7C). Així, la seqüència i la disposició dels elements de resposta, com la separació entre ells, determina l'especificitat de la resposta hormonal que tindrà lloc ((Mangelsdorf i Evans, 1995).

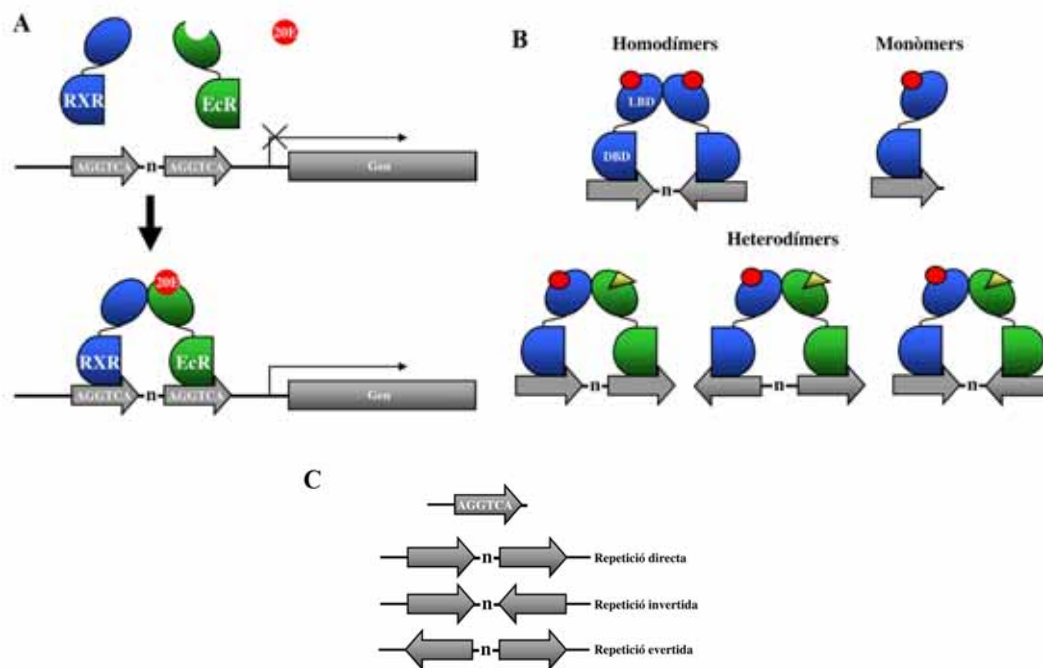


Figura 1.7. Característiques funcionals dels receptors nuclears. (A) Representació esquemàtica del funcionament de l'heterodímer EcR/USP. En absència de lligand, la 20E, l'heterodímer no es capaç d'induir l'activació del gen. Una vegada EcR uneix el seu lligand, l'heterodímer es capaç d'unir-se a seqüències específiques del DNA, anomenades elements de resposta i activar, d'aquesta manera, la transcripció del gen diana. (B) Els receptors nuclears actuen com a monòmers, homodímers i heterodímers unint-se als elements de resposta al DNA. (C) Els elements de resposta dels receptors nuclears són elements simples o repeticions directes, invertides i evertides de la seqüència consens AGGTCA separades per 0-6 nucleòtids.

Els mecanismes moleculars d'acció dels receptors nuclears són molt variats. Així, la modulació de l'activitat transcripcional poden efectuar-la de diverses maneres, i pot donar lloc a l'activació o a la repressió del gen que regulen.

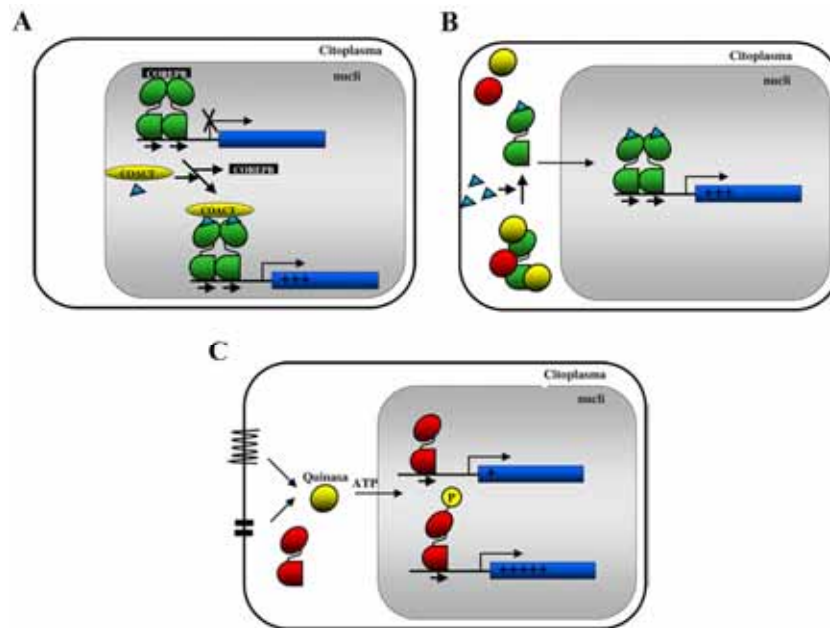


Figura 1.8.- Possibles mecanismes d'acció dels receptors nuclears que produeixen la transactivació del gen diana. (A) Un homodímer (en verd) està unit al seu element de resposta al promotor del gen que regula però un corepressor el manté inactiu (en negre). La presència de coactivadors (en groc) i/o del seu lligand (triangle blau) desplaça el corepressor i permeten l'activació del gen (B) En aquest cas el receptor nuclear està inactiu al citoplasma perquè està associat a xaperones. Quan el receptor s'uneix al seu lligand, s'allibera de les xaperones, va al nucli, dimeritza i activa la transcripció del gen diana. (C) Un receptor nuclear que pot actuar com a monòmer (en vermell) activa dèbilment la transcripció del gen diana. Quan una quinasa (en groc) fosforila el receptor nuclear, aquest té molta més capacitat transactivadora.

A la figura 1.8 es mostren tres possibles mecanismes d'acció que produeixen la transactivació del gen diana. En el primer cas, un heterodímer està unit al seu element de resposta però manté la transcripció bloquejada perquè no hi ha el lligand i, a més, l'heterodímer està interactuant amb corepressors. Quan l'heterodímer interacciona amb el seu lligand, s'allibera del repressor, s'uneix a coactivadors i pot activar la transcripció (Fig. 1.8A). En un segon exemple, el receptor nuclear es troba inactiu al citoplasma unit

a xaperones. Quan el receptor s'uneix al seu lligand es transloca al nucli on dimeritza, s'uneix al seu element de resposta i activa la transcripció del gen diana (Fig. 1.8B). En el tercer exemple, la capacitat de transactivació depèn de la fosforilació del receptor nuclear. En aquest cas quan el receptor nuclear, que actua com a monòmer, no està fosforilat té poca capacitat transactivadora, però quan es fosforila la capacitat transactivadora és molt més gran (Fig. 1.8C).

En altres casos els receptors nuclears poden regular negativament la transcripció, i ho poden fer de maneres diferents (Fig. 1.9). En el primer exemple, veiem com un receptor que no té capacitat transactivadora, per exemple si li manca el domini AF-2, competeix amb l'homodímer activador per unir-se a l'element de resposta (fig 1.9A). En un altre cas un receptor nuclear dimeritza amb el receptor activador però, com que no es pot unir al DNA, el manté inactiu (fig 1.9B).

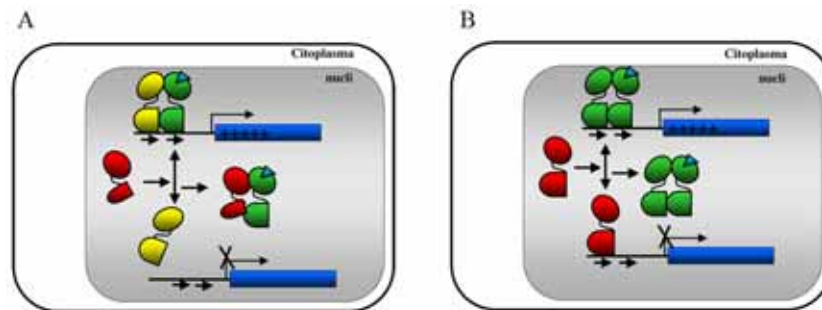


Figura 1.9.- Possibles mecanismes d'acció dels receptors nuclears que produeixen l'inhibició de la transactivació del gen diana. (A) Un heterodímer format per dos receptors nuclears transactiva el gen diana (en groc i verd). En presència d'un receptor nuclear amb capacitat represora que sigui capaç d'unir-se a algun dels dos components de l'heterodímer (en vermell), la transactivació del gen diana queda inhibida. (B) Un homodímer amb capacitat activadora (en verd) i un monòmer amb capacitat represora (en vermell) competien per el mateix element de resposta en el promotor del gen diana.

1.4.3. Regulació de les respostes biològiques dependents de 20E mitjançant la interacció dels diferents receptors nuclears

L'anàlisi funcional detallada dels diferents receptors nuclears, en el marc de la metamorfosi de *D. melanogaster*, ha mostrat l'existència de relacions transcripcionals complexes entre ells. Així, per exemple, s'ha demostrat que la interacció entre una isoforma d'E75 (E75B) i HR3 és responsable de l'activació específica de *FTZ-F1* al principi de la metamorfosi. El mecanisme pel qual té lloc aquesta regulació és relativament complex. HR3 és suficient i necessari per induir l'expressió de *FTZ-F1* de manera directa mitjançant la seva unió a tres elements de desposta situats al promotor de *FTZ-F1* (Kageyama *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1997; White *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1999). D'altra banda, E75B pot heterodimeritzar amb HR3 i, per tant, impedir la capacitat d'HR3 per activar *FTZ-F1* (White *et al.*, 1997). Aquests tres factors, doncs, defineixen un eix regulador que controla diversos processos que tenen lloc durant la prepupa de *D. melanogaster*. Els patrons d'expressió d'HR3, E75B i *FTZ-F1* al principi de la metamorfosi són consistents amb aquesta funció reguladora (Sullivan i Thummel, 2003). De forma remarcable, aquest eix regulador també és present en diferents fases del desenvolupament, coincidint amb cadascun dels pics de 20E que es donen a l'embriogènesi, i al final de cadascuna de les fases larvàries, la qual cosa pot indicar que aquest factors controlen processos com ara la deposició de les diferents cutícules.

Recentment, s'ha demostrat que dos receptors nuclears més, E75A i HR4, s'expressen de forma coordinada amb els tres factors prèviament mencionats, tant durant l'embriogènesi, com durant les fases nimfals i de prepupa (Sullivan i Thummel, 2003). Un pic d'expressió d'E75A senyalitza l'inici de cadascuna de les cascades gèniques descrites. Seguidament, s'expressa HR3, E75B i HR4, l'expressió dels quals és seguida finalment per l'activació puntual de *FTZ-F1* (vegeu Fig. 6.1). En resum, es pot considerar que a *D. melanogaster*, la 20E exerceix el seu efecte, en part, a través de l'eix regulador format pels receptors nuclears E75A-HR3-E75B-HR4-*FTZ-F1*. Entre els processos que els diferents factors d'aquest eix controlen, es troba la degeneració de la glàndula salival, per autofàgia, durant la fase prepupal (vegeu Thummel, 2001).

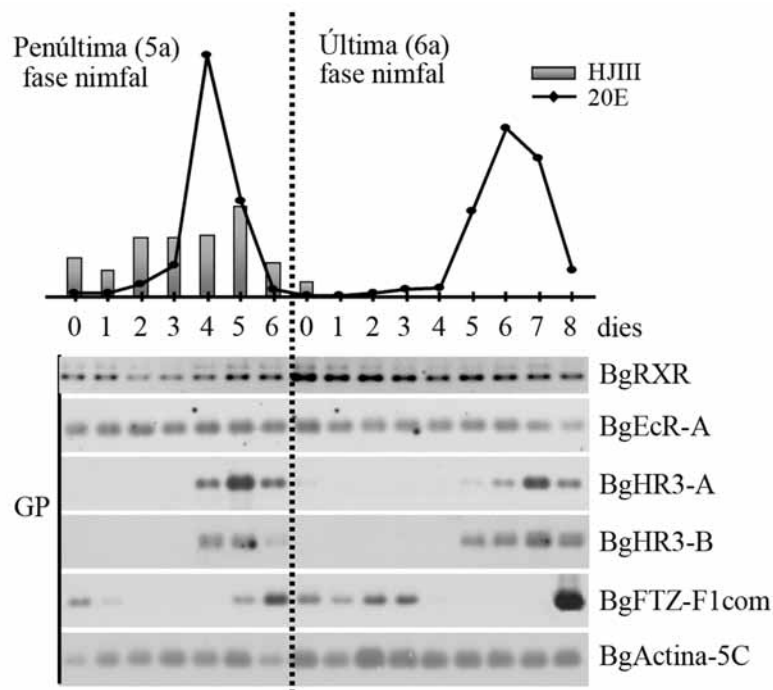


Figura 1.10. Patrons d'expressió de diferents receptors nuclears a la glàndula protoràcica de *B. germanica* durant les dues darreres fases nimfals. A la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E (línia) i d'HJ (barres), segons Cruz *et al.*, (2003). Els diferents patrons d'expressió provenen de Maestro *et al.*,(2005); Cruz, (2006); Cruz *et al.*, (Cruz, 2006); Cruz *et al.*, (2007).

1.5. Paper de la 20E en el desenvolupament dels insectes hemimetàbols

L'anàlisi del mecanisme d'acció de la 20E a escala molecular que hem descrit als anteriors apartats, s'ha dut a terme únicament en insectes holometàbols, principalment a *D. melanogaster* i, en menor mesura, a *M. sexta*. Fora dels holometàbols, no coneixem pràcticament res quant a la conservació i la funció dels gens que conformen la cascada gènica de resposta a la 20E. Atès que la majoria de processos que es donen a la metamorfosi dels insectes hemimetàbols, estan controlats íntimament per la 20E és totalment necessari, si volem establir les bases moleculars de l'evolució de la metamorfosi, començar a caracteritzar en detall aquestes cascades de factors transcripcionals dependents de la 20E, en insectes més basals.

Amb aquest objectiu, es va començar recentment al nostre laboratori la caracterització dels receptors nuclears que pertanyen a la cascada gènica de resposta a la 20E al dictiòpter *Blattella germanica*. Aquesta panerola presenta un desenvolupament hemimetàbol caracteritzat per l'existència de sis fases nimfals. Les cinc primeres fases finalitzen amb un clar pic de 20E que juntament amb la presència constant d'HJ, provoca la muda nimfa-nimfa. Per contra, a la darrera fase nimfal, els nivells d'HJ són indetectables i el pic de 20E promou la muda imaginal (Cruz *et al.*, 2003).

Durant els darrers anys, a *B. germanica* s'han clonat i caracteritzat el receptor funcional de la 20E, és a dir, el receptor de l'ecdisona (BgEcR-A; Cruz *et al.*, 2006) i dues isoformes del seu heterodímer, l'homòleg del receptor-X de retinoides, ultaspiracle (BgRXR-S i BgRXR-L; Maestro *et al.*, 2005). A més, s'han clonat els homòlegs de HR3 i de FTZ-F1. Així, *B. germanica* té 3 isoformes de HR3, anomenades BgHR3-A, BgHR3-B₁ i HR3-B₂ (Cruz *et al.*, 2007) i dues isoformes de FTZ-F1, BgFTZ-F1A i BgFTZ-F1B (Cruz, 2006).

L'anàlisi exhaustiva de l'expressió d'aquests factors en diferents teixits durant la penúltima i última fase nimfal, ha mostrat que aquest factors tenen patrons d'expressió característics i repetitius (Fig. 1.10). A més, amb el desenvolupament d'un sistema de interferència de l'RNA (RNAi) *in vivo*, mitjançant l'aplicació de RNAs de doble cadena (dsRNAs) (Martín *et al.*, 2006), hem demostrat que aquests factors són essencials pel correcte desenvolupament nimfal, adult i embrionari d'aquesta espècie (Cruz, 2006; Cruz *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007).

Així, quan s'interfereix BgEcR-A o BgRXR en nimfes de *B. germanica*, aquestes aturen el seu desenvolupament a la muda corresponent, essent incapaces de despendre's de l'exúvia, tot i que mostren totes les estructures d'origen ectodèrmic duplicades. Durant l'etapa adulta, els insectes interferits pels components del receptor de la 20E, no són capaços de completar les darreres etapes de l'oogènesi (únic procés a l'etapa adulta que depèn de la 20E), de manera que els oòcits degeneren durant la coriogènesi, just abans de l'oviposició (Cruz *et al.*, 2006). Per la seva banda, l'interferència de BgHR3 i de BgFTZ-F1 durant el desenvolupament nimfal, també provoca que els animals tractats completin el procés de muda, però les nimfes interferides moren amb les estructures ectodèrmiques duplicades. Durant l'etapa adulta,

tanmateix, BgHR3 no té cap paper vital durant l'oogènesi, mentre que l'absència de BgFTZ-F1 provoca, al igual que amb el receptor de la 20E, la degeneració dels oòcits durant la coriogènesi (Cruz et al., 2006; Cruz et al., 2007),

Arribats a aquest punt, cal destacar que per completar la caracterització de l'eix regulador, depenent de la 20E, descrit anteriorment a *D. melanogaster*, ens mancava clonar i caracteritzar dos receptors nuclears més, E75 i HR4. És per això que l'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat, precisament, aïllar i caracteritzar funcionalment aquests dos factors nuclears en el nostre insecte model, *B. germanica*. A continuació, es descriuen resumidament, les principals característiques d'aquests dos receptors nuclears.

1.5.1. El receptor nuclear E75

El receptor nuclear E75 ha estat identificat en els dípters *D. melanogaster* (Feigl et al., 1989; Segraves i Hogness, 1990), *Aedes aegypti* (Pierceall et al., 1999) i en diferents lepidòpters (Segraves i Woldin, 1993; Jindra et al., 1994; Palli et al., 1997; Zhou et al., 1998; Swevers et al., 2002a; Paul et al., 2006). Així mateix s'ha clonat en dues espècies de crustacis, *Metapenaeus ensis* (Chan, 1998) i *Gecarcinus lateralis* (Kim et al., 2005). En la majoria dels casos se n'han descrit varies isoformes. Aquestes proteïnes són homòlogues als receptors nuclears Rev-erb i PPAR de vertebrats. Aquests, estan relacionats amb diferents processos homeostàtics i del control del metabolisme (vegeu el capítol 3). E75 actua com a repressor del receptor nuclear HR3, tan a *D. melanogaster* com al lepidòpter *Bombyx mori* (White et al., 1997; Swevers et al., 2002b). D'altra banda a *D. melanogaster* s'ha vist que el mutant d'E75 és letal al final de la primera fase larvària, però els mutants específics de cadascuna de les tres isoformes presenten diferents fenotips al llarg del desenvolupament de la mosca (Bialecki et al., 2002). Els estudis d'expressió i la seva regulació hormonal suggereixen que aquest receptor nuclear està implicat en la resposta a la 20E durant les mudes i en la metamorfosi (Jindra et al., 1994; Palli et al., 1997; Zhou et al., 1998). A més, també

sembla estar implicat en la oogènesi i la vitelogènesi de *D. melanogaster*, *A. aegypti* i *B. mori* (Pierceall *et al.*, 1999; Swevers *et al.*, 2002a; Terashima i Bownes, 2006).

1.5.2. El receptor nuclear HR4

El receptor nuclear HR4 és l'homòleg del receptor nuclear GCNF de vertebrats, i s'ha identificat en diferents espècies d'insectes com, per exemple, *D. melanogaster*, (Adams *et al.*, 2000), *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001), *B. mori* (Charles *et al.*, 1999) i el coleòpter *Tenebrio molitor* (Mouillet *et al.*, 1999). HR4 és un repressor transcripcional regulat per 20E i durant el desenvolupament de *D. melanogaster*, *M. sexta*, *B. mori* i *T. molitor* s'expressa just després d'HR3 però abans de FTZ-F1 (Charles *et al.*, 1999; Mouillet *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2001; Sullivan i Thummel, 2003).

D'altra banda, els estudis funcionals d'HR4 només s'han portat a terme a *D. melanogaster*, i s'ha vist que actua com a repressor transcripcional (King-Jones *et al.*, 2005; Palanker *et al.*, 2006). Així, el mutant d'HR4 a *D. melanogaster* no coordina correctament el final del creixement durant la darrera fase larvària i en iniciar l'estadi pupal. A més, també s'ha demostrat que DmHR4 és un potent repressor dels gens primerencs (vegeu el model d'Ashburner a la secció 1), a la vegada que és un factor necessari per a l'activació de DmFTZ-F1 (King-Jones *et al.*, 2005).

Finalment cal esmentar que l'homòleg d'HR4 en vertebrats és el receptor nuclear "Germ Cell Nuclear Factor" (GCNF), un potent repressor de la transcripció que és essencial durant l'embriogènesi i el desenvolupament (Fuhrmann *et al.*, 2001; Hummelke i Cooney, 2001). El receptor GCNF està implicat, per exemple, en la diferenciació de les cèl.lules mare que donaran lloc a les cèl.lules germinals, tot reprimint l'expressió d'Oct-4, un factor encarregat de mantenir la pluripotència de les cèl.lules mare. Així, quan s'inicia la gastrulació i s'expressa GCNF, aquest inhibeix l'expressió d'Oct-4, la qual cosa permet que es puguin iniciar els processos de diferenciació cel.lular (Fuhrmann *et al.*, 2001; Zhang i Dufau, 2004).

1.6. OBJECTIUS

Aquesta tesi s'engloba dins el projecte que pretén caracteritzar, a escala molecular, els mecanismes hormonals que controlen el desenvolupament dels insectes hemimetàbols. En l'actualitat, la pràctica totalitat d'estudis existents en aquest tema, estan centrats, tal i com hem esmentat prèviament, en el dípter *D. melanogaster*. Aquest insecte té el gran avantatge que és manipulable genèticament i, a més, se'n coneix tot el genoma. Tanmateix, des d'un punt de vista evolutiu, *D. melanogaster* és un insecte que es pot considerar molt modificat. En aquest sentit, és més l'excepció que la regla. Amb els treballs que s'estan portant a terme al laboratori, pretenem caracteritzar els mecanismes evolutius que han donat lloc a la metamorfosi completa. Així, tal i com hem detallat prèviament, ja s'han caracteritzat els receptors nuclears BgRXR i BgEcR-A, és a dir, el receptor heterodimèric funcional de la 20E, així com els gens primerencs BgHR3 i BgFTZ-F1, i s'han estudiat a escala funcional al llarg del desenvolupament del nostre insecte model, *B. germanica*. Seguint amb aquest objectiu general, aquesta tesi pretén aprofundir en l'anàlisi de la cascada gènica de resposta a la 20E, mitjançant el clonatge, la caracterització i l'estudi funcional mitjançant RNAi *in vivo*, dels receptors nuclears E75 i HR4, per tal de completar la caracterització de l'eix funcional E75-HR3-HR4-FTZ-F1. En concret, els objectius proposats són els següents:

1. Clonarem el receptor nuclear E75 de *B. germanica*, i caracteritzarem el patró d'expressió de les diferents isoformes que aïllem, durant el desenvolupament embrionari i nimfal i també, estudiarem la resposta que presentin les isoformes a la 20E.
2. Analitzarem funcionalment, mitjançant la tècnica del RNAi *in vivo*, el receptor nuclear E75 de *B. germanica* durant el desenvolupament nimfal d'aquesta panerola.
3. Clonarem el receptor nuclear HR4 a *B. germanica*. De la mateixa manera que pretenem fer per E75, caracteritzarem el seu patró d'expressió durant l'embriogènesis i en els diferents estadis ninfals, així com la seva resposta a la 20E.

4. Caracteritzarem funcionalment HR4 de *B. germanica* durant el desenvolupament nimfal, de nou mitjançant l'ús de RNAi in vivo.
5. Establirem les bases reguladores de l'interacció entre els diferents receptors nuclears que conformen l'eix regulador: E75-HR3-HR4-FTZ-F1, en relació a processos fonamentals que es donen durant el desenvolupament nimfal.

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. INSECTES

Per realitzar els diferents assajos es van utilitzar femelles de *B. germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) provinents d'una colònia mantinguda en condicions controlades de temperatura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), d'humitat relativa (70-75 %) i en foscor constant. La alimentació que se'ls subministrava consistia en pinso especial per a gossos PANLAB 125 i aigua *ad libitum* (Piulachs, 1987).

2.2. TÈCNIQUES QUIRÚRGIQUES

Les disseccions dels insectes es van realitzar prèvia anestèsia mitjançant un fluxe constant de CO_2 . Per a la manipulació i l'extracció dels diferents teixits s'utilitzaven pinçes INOX 5 Super Wit i microtissores Diener. Totes les disseccions es van realitzar en solució salina Ringer.

Solució salina Ringer:

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

2.2.1. Dissecció dels ovaris, el cos gras i l'epidermis

Per extreure els ovaris es realitzava una obertura longitudinal a la part ventral de l'abdomen de l'insecte, des del segment genital fins al tòrax. Seguidament, es separaven els estèrnits abdominals i es retirava el cos gras fins deixar els dos ovaris visibles, un a cada costat del tub digestiu. Per obtenir el cos gras, primer es retirava el tub digestiu, els ovaris i les glàndules colaterals, i a continuació es recollia cuidadosament tot el cos gras abdominal amb l'ajuda de les pinçes. L'epidermis dorsal lliure de cos gras es va utilitzar per fer els cicles d'expressió en aquest teixit. L'edat de les nimfes de cinquena i sisena

fase es determinava cronològicament perquè no es disposava de cap paràmetre adequat per fixar l'edat fisiològica. En canvi, l'edat de les femelles adultes es determinava en funció de la longitud del oòcit basal, segons està establert per Piulachs (1987).

2.2.2. Dissecció de les ooteques

Les ooteques es retiraven de les femelles que les transportaven aplicant una lleugera pressió amb les pinces sobre els laterals de la ooteca i s'extreia acuradament. Per dissecar els embrions les ooteques es sumergien en un bany a 95°C durant uns minuts i seguidament s'obrien, s'extreien els embrions i se'n separava el corion.

2.2.3. Dissecció de la glàndules protoràciques

Amb l'ajuda d'unes agulles entomològiques s'inmovilitzava l'insecte deixant la regió ventral del coll visible. Es retirava la cutícula i les tràquees dorsals deixant exposat el gangli protoràcic i els seus nervis connectius. A continuació, es tenyia la zona amb blau de metilè durant un minut i s'extreia el gangli, deixant al descobert la glàndula protoràcica sobre el tub digestiu. Finalment, i per extreure-la, es tallaven les quatre branques de la glàndula per la zona més distal.

2.2.4. Obtenció d'hemolimfa

La hemolimfa s'obtenia seccionant un metafèmur i, sobre el tall, s'aplicava una micropipeta de vidre aforada de 5 µl que permetia recollir la hemolimfa per capilaritat.

2.2.5. Preparació de la cutícula

L'extracció de cutícula per poder fer talls histològics es realitzava practicant dos obertures longitudinals en la zona lateral-dorsal de l'insecte prèviament anestesià i immobilitzat, des de l'últim segment abdominal fins al tòrax. Posteriorment, es tallava transversalment el tòrax i es descartaven els esternits abdominals.

2.3. CÈL·LULES EMBRIONÀRIES UM-BGE-1 DE *B. germanica*

La línia cel·lular UM-BGE-1 deriva d'embrions de 5 dies de *B. germanica* (Kurtti i Brooks, 1977). Aquesta línia cel·lular es mantenia a 25°C en medi de cultiu L15B (Sigma) suplementat com van descriure (Munderloh i Kurtti, 1989).

2.4. EXTRACCIÓ D'ÀCIDS RIBONUCLEICS

Les extraccions d'RNA es van realitzar utilitzant el kit de Sigma GenElute Mammalian Total RNA d'acord amb les instruccions del fabricant. Per a les extraccions d'RNA total de cos gras, ovari i ooteques, els teixits prèviament congelats en nitrògen líquid es trituraven amb l'ajuda d'un homogenitzador mecànic. En el cas de les glàndules protoràciques o de les cèl·lules UM-BGE-1 de *B. germanica*, les mostres es congelaven amb el tampó de lisi i se'n extreia l'RNA directament. L'RNA es quantificava per obtenir-ne la seva concentració i puresa llegint-ne la seva absorvància a 260 i 280 nm amb l'ajut d'un biofotòmetre (Eppendorf).

2.5. CLONATGE DELS cDNAs DE BgE75 i BgHR4

El clonatge dels receptors nuclears BgE75 i BgHR4 a *B. germanica* es va realitzar mitjançant tècniques de PCR i l'ús d'oligonucleòtids degenerats. Un cop s'obtenia un primer fragment, es completaven amb les tècniques de 5'- i 3'-RACE.

2.5.1. PCR

Per clonar un primer fragment del receptor nuclear es feia una PCR amb oligonucleòtids degenerats dissenyats en el DBD que era la regió més conservada. Com a motlle per a la PCR s'utilitzava un cDNA obtingut a partir d'RNA de cèl·lules UM-BGE-1 de *B. germanica*. Les reaccions de PCR es van realitzar amb Accutaq (Sigma)

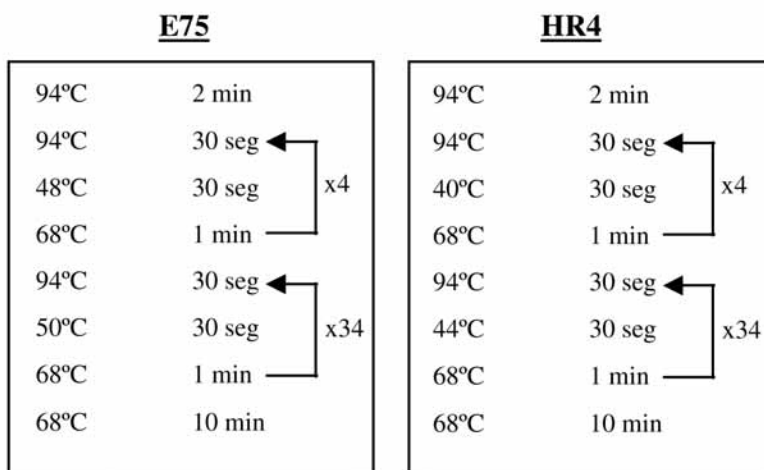
seguint les especificacions del fabricant, excepte en la concentració de oligonucleòtids a utilitzar: en tractar-se d'oligonucleòtids degenerats, aquests es posaven a una concentració cinc vegades superior a la indicada.

En el cas de BgE75 es va fer una primera PCR amb els oligonucleòtids degenerats BgE75F1 i BgE75R1, i seguidament es va utilitzar 1 µl d'aquesta PCR amb la combinació d'oligonucleòtids BgE75F1 i BgE75R2 per fer una nova PCR i es va obtenir un primer fragment de 198 parells de bases de BgE75.

OLIGONUCLEÒTIDS DEGENERATS UTILITZATS:

Molècula	Nom	Oligonucleòtid	Tamany amplificat
BgE75	BgE75F1	5'-TGYGARGGNTGYAARGG-3'	198pb
	BgE75R1	5'-GTRAAYTTRTCRTCYTG-3'	
	BgE75R2	5'-GCYTTYTCNCKYTTNGG-3'	
BgHR4	HR4F1	5'-ATGATVTGYGARGAYAARGC-3'	189pb
	HR4R1	5'-TGYTCDATRCAYTTYTTRAA-3'	

Les condicions de pcr van ser:



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

Les seqüències de BgE75 i BgHR4 es van completar mitjançant les tècniques de 5' i 3'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Aquesta tècnica va ser descrita inicialment per (Forhman et al., 1988)) i la vàrem portar a terme seguint les instruccions del 5'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versió 2.0 (Invitrogen), o bé, les instruccions del 3'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versió 2.0 (Invitrogen), a partir d'RNA total obtingut de cèl·lules UM-BGE-1 de *B. germanica*.

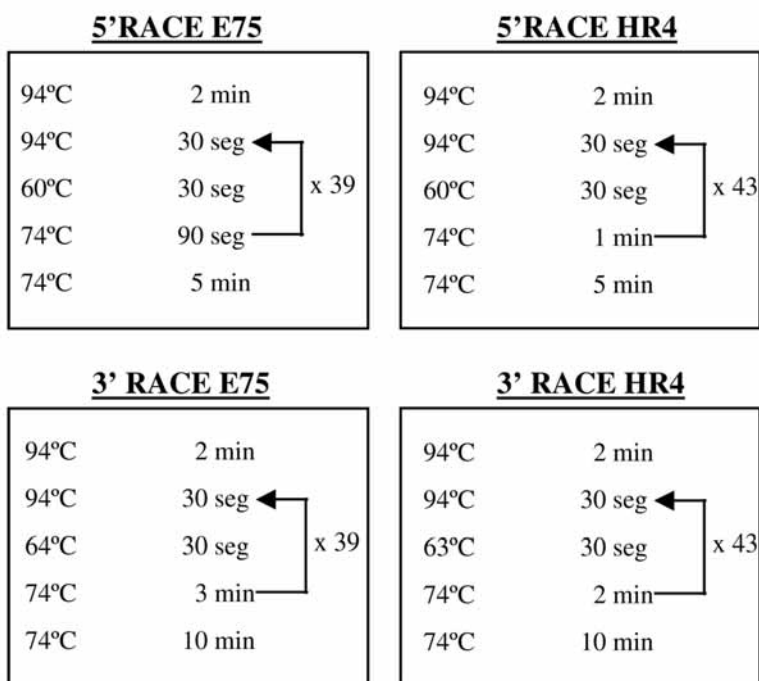
Els oligonucleòtids específics que es van utilitzar en aquestes tècniques es van dissenyar sobre el primer fragment de BgE75 i BgHR4 que s'havia obtingut tal i com es descriu en l'apartat anterior. La única excepció va ser en el clonatge de BgE75D, pel qual es va dissenyar un altre oligonucleòtid en l'LBD de BgE75 (E75DR5), ja que aquesta isoforma no té DBD.

OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS:

Tècnica	Molècula	Nom	Oligonucleòtid
5'RACE	BgE75	E75R3	5'-AACCGCACCGCATCTCTACTCATT-3'
5'RACE	BgE75	E75R4	5'-ATGGAGCACTGTTGGTTCTTGGTA-3'
3'RACE	BgE75	E75F2	5'-TACCAAGAACCAACAGTGCTCCAT-3'
5'RACE	BgE75D	E75DR5	5'-TCAGCGTCGGACAGTCTTAGTGA-3'
5'RACE	BgHR4R2	HR4	5'-TACAAGTTGTAAACAGCTCCAGAGTT-3'
5'RACE	BgHR4R3	HR4	5'-CGTAGTGCAGACCTGTAGCCTTAT-3'
5'RACE	BgHR4R4	HR4	5'-TTGCGACCAGATCATCGTCCTTACA-3'
3'RACE	BgHR4F2	HR4	5'-ACCACAAGTCTGATCTCTCAGACAA-3'
3'RACE	BgHR4F3	HR4	5'-CACACAAGATTATTAACGCACAAGTG-3'

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

Les condicions de les PCRs varen ser:



2.5.3. Obtenció dels cDNAs sencers dels receptors nuclears

Les seqüències senceres dels diferents cDNAs es van aconseguir mitjançant l'ús d'una parella d'oligonucleòtids que flanquejaven la regió codificant d'aquests cDNAs. L'oligonucleòtid directe estava situat davant la metionina inicial i el revers després del codó stop.

Totes aquestes amplificacions es van realitzar amb la DNA-polimerasa amb activitat correctora d'errors, Accutaq (Sigma), seguint les especificacions del fabricant. Com a motlle es va utilitzar cDNA originat a partir d'RNA-polyA⁺ procedent de cèl·lules UM-BGE-1 de *B. germanica*.

2.6. ELECTROFORÈSI DE DNA

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

Tampó electroforèsi TBE 0,5X:

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

2.7. LLIGACIÓ D'INSERTS EN PLÀSMIDS

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

2.8. PURIFICACIÓ DE PLÀSMIDS

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

2.9. SEQÜENCIACIÓ DE DNA

La seqüenciació del DNA es va realitzar mitjançant el mètode de terminació de la cadena per dideoxinucleòtids. Els diferents clons es seqüenciaven en ambdós sentits utilitzant els oligonucleòtids T7 i SP6 (presentes en el vector de clonatge), o bé amb oligonucleòtids específics interns del propi insert, en el sistema ABI de seqüenciació automàtica per fluorescència. Les seqüenciacions es realitzaven en el Servei de Seqüenciació de DNA de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona, del CSIC.

2.10. SEPARACIÓ DE PROTEÏNES MITJANÇANT ELECTROFORÈSI EN GELS D'ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA-SDS

L'electroforèsi en gel d'acrilamida-bisacrilamida (poliacrilamida) (Laemmli, 1970) permet separar proteïnes segons el seu pes molecular a mesura que migren a través d'una matriu de poliacrilamida. En el nostre cas, les mostres es diluïen convenientment en tampó de mostra amb SDS i β -mercaptoetanol, i es desnaturalitzaven per ebullició durant 5 min. Seguidament, la solució proteïca es sotmetia a electroforèsi amb un amperatge constant de 20 mA durante 2-3 h.

SOLUCIONS:

Tampó concentrador:

Acrilamida-bisacrilamida	2,5%
Tris-HCl (pH6.8)	0,5M
SDS	0,4%

Tampó separador:

Acrilamida-bisacrilamida	10%
Tris-HCl (pH8.8)	1,5M
SDS	0,4%

<u>Tampó de mostra:</u>		<u>Tampó d'electroforèsi:</u>	
Tris-HCl (pH6.8)	1,5M	Glicina	1,92M
Glicerol	10%	Tris	0,25M
SDS	2%	SDS	1%
β -mercaptoetanol	5%		pH 8.3 – 8.5
Blau de bromofenol	0,001%		

2.11. RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

La determinació de les quantitats relatives dels mRNA d'interès es van realitzar mitjançant la tècnica de RT-PCR semiquantitativa. Aquesta tècnica es basa en la retrotranscripció d'una quantitat constant de RNA que s'utilitzarà posteriorment per realitzar PCR amb oligonucleòtids específics de l'mRNA d'interès. Això permet determinar l'abundància relativa de cadascun dels transcrits estudiats. Previament a la retrotranscripció es tractava l'RNA amb DNAsa per eliminar el DNA genòmic. La metodologia seguida es passa a descriure a continuació:

2.11.1. Tractament amb DNAsa

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

PROCEDIMENT:

1. En un volum final de 10 μ l afegir els components següents:
 - 300 ng – 1 μ g d'RNA
 - 1 μ l tampó de la DNAsa
 - 1 μ l RQ1 RNase-Free DNase (Promega)
2. Incubar 30 min a 37°C.

3. Afegir 1 µl de solució Stop de la DNAsa a la reacció i incubar 5 min a 75°C per aturar la reacció, inactivar l'enzim, i a la vegada desnaturalitzar l'RNA.
4. Posar en gel per evitar hibridacions entre les cadenes d'RNA.

2.11.2. Retrotranscripció

PROCEDIMENT:

1. Afegir els diferents reactius, a concentració final:

1 X	tampó de reacció
250 ng	Random Primer (Promega)
500 µM	de cada dNTP
10 mM	DTT
40 unitats	RNAsin Ribonuclease Inhibitor (Promega)
2. Equilibrar la reacció durant 10 min a temperatura ambient.
3. Afegir 200 unitats de SuperScriptTM II RNase H⁺ Reverse Transcriptase (Invitrogen) o un volum equivalent d'H₂O en els controls negatius.
4. Equilibrar la reacció 10 min més a temperatura ambient.
5. Incubar 50 min a 42°C per fer la retrotranscripció.
6. Incubar durant 10 min a 75°C per acabar la reacció.
7. Deixar equilibrar 10 min a temperatura ambient.
8. Afegir 20 µl de TE pH8.0.

2.11.3. PCR

Les condicions de PCR eren dins la zona d'amplificació lineal per cadascun dels diferents transcrits.

REACCIÓ DE PCR:

En un tub Eppendorf de 0,2 ml afegir els següents reactius, a concentració final:

1 x	tampó de PCR
1,5 mM	MgCl ₂
200 µM	de cada dNTP
200 nM	oligonucleòtid directe
200 nM	oligonucleòtid antisentit
1 µl	cDNA
1 unitat	Go-Taq DNA polimerasa (Promega)
Volum final de 25 µl en H ₂ Odd.	

OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS:

Molècula	Nom	Seqüència	Tamany amplificat
BgE75A	E75AF1	5'-TTAGTGCTAGTGCAATGTGCTATTGA-3'	324pb
	E75R6	5'- ATGGAGCACTGTTGGTTCTTGGTA-3'	
BgE75B	E75BF1	5'-CTAACGCTCCGCAATCCAGTTCA-3'	237pb
	E75R6	5'- ATGGAGCACTGTTGGTTCTTGGTA-3'	
BgE75C	E75CF1	5'-TTCAGGATTCCGACGTCGGTGAT-3'	363pb
	E75R6	5'- ATGGAGCACTGTTGGTTCTTGGTA-3'	
BgE75D	E75DF1	5'-TGGATGACGAACTACCTATACTCAAA-3'	680pb
	E75R7	5'-TCAGCGTCGGACAGTCTTAGTGA-3'	
BgE75E	E75EF1	5'-GATAAGGATATCAAAAATGACCGTGA-3'	366pb
	E75R8	5'- AACCGCACCGCATCTCTACTCATT-3'	

BgE75	E75F3	5'-AATGAGTAGAGATGCGGTGCGGT-3'	612pb
	E75R7	5'-TCAGCGTCGGACAGTCTTAGTGA -3'	
BgHR4	HR4F4	5'-AACTCTGGAGCTGTTTACAACCTTGTA-3'	477pb
	HR4R5	5'-CACTTGTGCGTTAATAATCTTGTGT-3'	
BgFTZ-F1	FTZ-F1F6	5'-GAGGAATTCCGTCTTCTTCAAGGA-3'	601pb
	FTZ-F1R3	5'-GGACTTTGTCAACAATTCATTTCAAGT-3'	
BgHR3	HR3-F7	5'-TCCCAGAGCTCCGTCGTCAACTA-3'	411 pb
	HR3-R4	5'-CGCTGATGTCGTACGGCATCT-3'	
BgRXR	RXRF3	5'-ATAATTGACAAGAGGCAGAGGAA-3'	346pb
	RXRR4	5'-TGGTCACTAAGAGGCAAGGTAGT-3'	
BgEcR-A	EcR-A-F1	5'-TACTCCGGAGGTAGCGTCATCAT-3'	520 pb
	EcR-A-R1	5'-GACGGTGAAGACAACCAGTCATC-3'	
BgActina5C	Actina5C-F	5'-TCGTTTCGTGACATCAAGGAGAAGCT-3'	308pb
	Actina5C-R	5'-TGTCGGCAATTCCAGGGTACATGGT-3'	

En les mostres que provenien de tractaments amb dsRNA, l'amplificació del transcrit silenciats es va realitzar utilitzant un oligonucleòtid dins de la seqüència utilitzada com a dsRNA i un altre extern.

2.12. SOUTHERN BLOT

2.12.1. Electroforèsi i transferència del DNA

Les electroforèsi de DNA es van realitzar tal i com s'ha descrit previament en l'apartat 2.6. Posteriorment, els gels d'agarosa es desnaturalitzaven durant 30 min en agitació constant, i a continuació es neutralitzaven durant 30 min. Seguidament, el DNA es transferia durant tota la nit a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) per capilaritat en una solució SSC x10. Finalment, el DNA es fixava a la membrana mitjançant irradiació amb llum ultraviolada (UVStratalinker 2400, Stratagene).

SOLUCIONS:

Solució de desnaturalització:

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Solució de neutralització:

NaCl	1,5 M
Tris-HCl (pH7.2)	0,5 M

SSC x10:

NaCl	1,5 M
Citrat sòdic	150 mM

Ajustar el pH a 7 i filtrar.

2.12.2. Hibridació i detecció

Les membranes amb el DNA fixat, es pre-hibridaven en una solució d'hibridació durant 1 h a 42°C en agitació constant. Seguidament, s'afegia la sonda corresponent marcada amb fluoresceïna i es deixava en agitació a 42°C durant tota la nit. Per detectar el marcatge es seguien les instruccions del Gene Images CDP-Star Detection module (Amersham).

Solució de hibridació:

SSC	2x
SDS	0,1% (p/v)
Sulfat de dextrà	5% (p/v)
Líquid de bloqueig	1/20

2.13. MARCATGE DE SONDAS AMB FLUORESCÈÏNA

Les sondes que es van utilitzar en els Southern blot de les diferents RT-PCRs, es van generar per PCR, utilitzant les diferents parelles de oligonucleòtids detallades en l'apartat 2.11.3. Com a motlle s'utilitzaven els cDNAs corresponents clonats previament en el vector pSTBlue1. Aquestes PCRs es netejaven utilitzant el kit de Sigma GenElute PCR Clean-up, i a continuació es marcaven amb fluoresceïna seguint les instruccions del Gene Images Random Labelling Module (Amersham).

2.14. TRACTAMENTS EN COSSOS GRASSOS INCUBATS *IN VITRO*

Les incubacions es varen fer amb el cos gras abdominal que quedava adherit a la cutícula dorsal entre el tercer segment toràcic i el penúltim segment abdominal. Aquesta dissecció facilitava la incubació perquè la cutícula quedava flotant en el medi i els lòbuls de cos gras completament submergits. Els cossos grassos s'incubaven en una placa de 48 pous (Nunc). En primer lloc, el teixit es pre-incubava 30 min en 500 µl de medi de cultiu Grace amb L-Glutamina i sense hemolimfa (Sigma). Seguidament, els cossos grassos es transferien a una nova placa amb 1 ml de medi fresc. Els diferents tractaments hormonals es duïen a terme afegint al medi 1 µl de la solució hormonal, o del solvent en el cas dels controls, durant diferents períodes de temps segons l'experiment. Les incubacions es feien a 30°C en completa foscor, i el medi es canviava cada 4 h per evitar contaminacions.

2.15. INTERFERÈNCIA D'RNA *IN VIVO*

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

2.15.1. Obtenció de l'RNA de doble cadena (dsRNA)

La metodologia per a l'obtenció de l'RNA de doble cadena (dsRNA) es detalla a continuació:

2.15.1.1. Clonatge del fragment diana

En primer lloc s'amplificava i clonava una regió del receptor nuclear per poder sintetitzar el corresponent dsRNA i silenciar-ne l'expressió. En el cas de BgE75 es van sintetitzar dsRNAs específics per a cadascuna de les cinc isoformes, i dos fragments comuns a totes les isoformes, un en l'LBD (dsBgE75-1) i un altre en la regió F (dsBgE75-2). En el cas de BgHR4 es va sintetitzar un fragment que abarcava la regió frontissa i l'LBD d'aquest receptor nuclear (dsBgHR4). En aquesta tesi també es va utilitzar el silenciament d'altres receptors nuclears com ara BgFTZ-F1 i BgHR3. per aquestes molècules es van sintetitzar els corresponents dsRNAs tal i com es descriu en (Cruz, 2006).

OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS:

Molècula	Nom	Seqüència	Tamany amplificat
BgE75-1	E75F3	5'-AATGAGTAGAGATGCGGTGCGGTT-3'	612pb
	E75R7	5'-TCAGCGTCGGACAGTCTTAGTGA -3'	
BgE75-2	E75F4	5'-GGTATTGAGTCTGGTACCGAGAAA-3'	613pb
	E75R10	5'-TTGATGTTGTCTGAGGCGGAATTAG-3'	
BgE75A	E75AF2	5'-ACTATCCATTGTGCTTCGCTCGGAA-3'	205pb
	E75AR1	5'-TATTTTAAGTTCTGGTTCCCGATGGA-3'	
BgE75B	E75BF1	5'-CTAACGCTCCGCAATCCAGTTCA-3'	163pb
	E75BR1	5'-GTGAATTAGAAGAAGTGCAGTCACTT-3'	
BgE75C	E75CF2	5'-ATGACCGATACTAAGGACTTCAGGAT-3'	223pb
	E75CR1	5'-CGAGATCTGGGATGGAAGTAGATG-3'	
BgE75D	E75DF2	5'-GTGCAGCCCGTACTTGTGGATTAA-3'	151pb
	E75DR	5'-CGGTGCGTTATGGTACTTGACCAT-3'	
BgE75E	E75EF1	5'-GATAAGGATATCAAAAATGACCGTGA-3'	130pb
	E75ER1	5'-TCCCATCGAACTCTGCTAGGACT-3'	
BgHR4	HR4F4	5'-AACTCTGGAGCTGTTTACAACCTTGTA-3'	477pb
	HR4R5	5'CACTTGTGCGTTAATAATCTTGTGT-3'	

BgHR3	HR3-F7	5'-TCCCAGAGCTCCGTCGTCAACTA-3'	
	HR3-R4	5'-CGCTGATGTCGTACGGCATCT-3'	411 pb
BgFTZ-F1	FTZ-F1-F7	5'-GAATAGTTCAGGGCTTTTTGAAGCT-3'	
	FTZ-F1-R	5'-CGACGCATGTGTAGTCCTTCTT-3'	502 pb

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

2.15.1.2. Linearització del DNA plasmídic

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

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

2.15.1.3. Síntesi del dsRNA

PROCEDIMENT:

1. Les reaccions de síntesi d'RNA de cadena senzilla (ssRNA) es realitzaven de forma independent.

En un volum final de 50 µl:

23,5 µl	fragment lineal del DNA plasmídic
10 µl	5x Promega Buffer (Promega)
4 µl	100 mM DTT (Promega)
1 µl	RNAsin Ribonuclease Inhibitor (40 u/µl) (Promega)
10 µl	10 mM de cada rNTP (Amersham)
1,5 µl	SP6 RNA-pol (15 u/ µl) (Promega) o T7 RNA-pol (20 u/ µl) (Promega)

2. Incubar 2 h a 37°C.
3. Verificar el correcte funcionament d'ambdues reaccions mitjançant electroforèsi en gel d'agarosa d'1 µl de cada reacció.
4. Ajuntar les dues reaccions de ssRNA (per SP6 RNA-pol i per T7 RNA-pol).
5. Incubar en un bany a 95°C durant 10 min.
6. Deixar disminuir la temperatura del bany fins a temperatura ambient durant unes sis hores aproximadament per permetre que les dues cadenes d'ssRNA hibridin.
7. Concentrar el dsRNA obtingut mitjançant precipitació amb fenol-cloroform/etanol.

Resuspendre el precipitat en 39,5 µl d'H₂O depc.

8. Realitzar un tractament amb DNAsa i RNAsaA a la vegada per eliminar el DNA plasmídic i l'ssRNA que no hagi hibridat correctament:

En un volum final de 50 µl:

5 µl	Tampó de la DNAsa (x10) (Promega)
5 µl	DNase/RNase-free (1 u/µl) (Promega)
0,5 µl	RNaseA (10 µg/µl) (Sigma)

Incubar 15 min a 37°C.

9. Netejar i concentrar el dsRNA mitjançant precipitació amb fenol-cloroform/etanol. Resuspendre el precipitat en 40 µl de H₂O depc.

2.15.2. Preparació i injecció del dsRNA

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

2.16. TINCIÓ D'OÒCITS AMB DAPI I QUANTIFICACIÓ DE LES CÈL·LULES FOL·LICULARS

El número de cèl·lules fol·liculars de l'oòcit basal es determinava fent una tinció per DAPI (Sigma) de l'oòcit basal i es comptant el número de cèl·lules que hi havia en un requadre d'àrea coneguda amb el programa informàtic AdobePhotoshop (Adobe Systems Incorporated). Per a cada mostra es feien un mínim de tres comptatges i per determinar el número total de cèl·lules fol·liculars s'aplicava la formula:

$$\text{Número cèl.lules fol.liculars en un oòcit} = n \cdot (4\pi \cdot L/2 \cdot A/2) / Ar$$

On n és el número de cèl·lules fol·liculars comptades dins del requadre de medició, L és la longitud de l'oòcit basal, A és l'amplada de l'oòcit basal i Ar és l'àrea del requadre de medició.

PROCEDIMENT PER A LA TINCIÓ DAPI:

1. Incubar els oòcits durant 30 min en paraformaldèhid (PF) 4% per fixar-los.
2. Rentar dues vegades durant 10 min amb PBS 0,2 N, pH 6.8.
3. Incubar els oòcits durant 10 min a temperatura ambient en PBT per permeabilitzar-los.
4. Incubar durant 10 min amb una solució d'1 µg de DAPI (Sigma)/ml PBT.

5. Rentar l'excés de marcatge mitjançant dos rentats de 5 min amb PBS 0,2 N.
6. Muntar les diferents preparacions en medi de muntatge Mowiol 4-88 (Calbiochem).

2.17. TALLS HISTOLÒGICS DE LA CUTÍCULA VENTRAL

PROCEDIMENT:

1. Fixar la mostra en PF al 4% en PBS a 4°C durant tota la nit.
2. Deshidratar el teixit tres cops durant 10 min en cadascuna de les següents solucions:
 - Etanol (EtOH) 70 %
 - EtOH 90 %
 - EtOH 95 %
 - EtOH 100 %
 - EtOH 100 % : Xilol (1:1)
3. Per incloure el teixit en parafina, primer sumergir-lo en una solució de Xilol:Parafina (1:1) a 42°C durant tota la nit, i posteriorment, sumergir-lo en parafina durant 3-4 h a 42°C.
4. Realitzar els blocs de parafina i guardar-los a 4°C tota la nit.
5. Tallar amb el micròtom les mostres en talls de 6 µm de gruix i posar-les sobre del portaobjectes previament humitejat.
6. Assecar els portaobjectes amb una placa calefactora a 42°C durant un mínim de 3 h.
7. Rehidratar les mostres prèviament col·locades en cistelles de tinció sumergint-les 6 min en cadascuna de les següents solucions:
 - Xilol
 - EtOH 100 %
 - EtOH 90 %
 - EtOH 70 %
 - H₂O

8. Tenyir les mostres histològiques 5 min en blau de toluidina.
9. Rentar l'excés de tinció 10 min amb H₂O.
10. Deshidratar les mostres durant 5min en EtOH 90 % y EtOH 100 %, i durant 10 min en Xilol.
11. Muntar les mostres en medi de montatge DPX.

2.18. OBSERVACIONS MICROSCÒPIQUES

Les diferents preparacions microscòpiques s'observaven amb un microscòpi Zeiss Axiophot. Les imatges es capturaven amb una càmera Olympus acoblada al microscòpi i s'analitzaven utilitzant el programa AdobePhotoshop (Adobe Systems Incorporated).

2.19. QUANTIFICACIÓ DELS ECDISTEROIDES HEMOLIMFÀTICS

Els ecdisteroides hemolimfàtics es quantificaven mitjançant la tècnica d'ELISA seguint el procediment descrit per (Porcheron et al., 1989) i adaptat per a *B. germanica* per (Pascual et al., 1992) i (Romañá et al., 1995). S'utilitzaven 20-hidroxicdisona (20E) (SIGMA) i 20E-acetilcolinesterasa (Cayman) com a patró i traçador enzimàtic, respectivament. L'antiserum (AS 4919, facilitat pel Prof. Porcheron, Université de Paris) s'utilitzava a una dilució 1:50.000. Les lectures d'absorvència a 450 nm es realitzaven en un espectrofotòmetre Multiscan Plus II (Labsystems). L'antiserum presenta la mateixa afinitat per l'ecdisona que per la 20E (Porcheron et al., 1989), però com que les corbes patró s'obtenien utilitzant 20E, els resultats s'expressaven com equivalents de 20E.

2.20. INJECCIÓ DE 20E

Per als experiments en que s'injectava diferents dosis de 20E a nimfes tractades amb dsRNA es va utilitzar 20E de Sigma. L'hormona es preparava en una solució Ringer-Etanol 10% i s'injectava 1 µl a la cavitat abdominal de l'insecte. Per als controls negatius s'injectava 1 µl de solució Ringer-etanol 10%.

2.21. PRODUCCIÓ IN VITRO D'HORMONA JUVENIL

2.21.1 Incubació dels *corpora allata*

Les extraccions dels *corpora allata* es feien en una cabina de flux laminar per evitar contaminacions. Els *corpora allata* s'incubaven en medi TC-199 (Flow) prèviament esterilitzat amb filtres Millipore de 0,22 µm (Sterivex GS9). Al medi se li va afegir tampó Hepes (Sigma) a una concentració de 20mM, i Ficoll (Pharmacia) per tenir una concentració de 20 mg/ml. Després s'ajustava el pH a 7,2. Els CA s'incubaven 3 hores en un tub de vidre estèril revestit amb carbowax (polietilenglicol, 2000, Merck), i amb 100 µl de medi al que se li havia incorporat el precursor marcat L-[metil-³H] metionina amb una activitat específica de 7,4 Gbq/mmol. Les incubacions es feien en una estufa a 30°C.

2.21.2 Extracció de l'hormona juvenil

L'HJ es va extreure segons (Pratt i Tobe, 1977) i adaptat a *B. germanica* per (Bellés et al., 1987).

Un cop finalitzada l'incubació s'afegien 200 µl de metanol per aturar l'activitat enzimàtica, 500 µl de cloroform per dissoldre l'HJ i 100 µl d'EDTA per facilitar la separació entre la fase orgànica i l'aquosa. Es separava la fase clorofòrmica i a la fase aquosa se li feia una segona extracció amb cloroform. S'ajuntaven les dues fases clorofòrmiques i s'afegien 10 µg d'HJ III, per tal de facilitar el revelat amb llum UV.

Seguidament, s'evaporava l'extracte clorofòrmic per centrifugació al buit (Univap, Unscience). L'extracte obtingut es tornava a dissoldre en 100 µl de cloroform i es sembrava en capes fines de Silicagel sobre suport plàstic (Merck, 5735). L'elució es feia amb una mescla Hexà:Acetat d'etil (4:1). Després es detectava la zona corresponent a l'HJ amb llum UV, es retallava i es colocava en un vial d'escintil·lació, on s'afegien 10 ml d'Optiphase II. Tot seguit, es quantificava la radioactivitat, obtenint els resultats en dpm i amb una eficiència del 41%.

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

2.22. ARBRE FILOGENÈTIC

Per construir l'arbre filogenètic dels LBDs dels receptors nuclears E75 i HR4 es van utilitzar aquelles espècies d'artròpodes en que s'havia seqüenciat completament l'LBD. En el cas d'E75 es va utilitzar com a grup extern la seqüència del receptor nuclear PPAR γ d'*H. sapiens*, i per HR4 el receptor GCNF de la mateixa espècie. Les seqüències aminoacídiques es van alinear amb el programa Clustal X (Thompson et al., 1997). Seguidament es van eliminar les posicions que no alineaven i les regions més divergents amb el programa Gblocks 0,91b i amb els paràmetres que venien fixats per defecte (Castresana, 2000). Així es van poder utilitzar per l'arbre el 72% de les posicions per E75 i el 62% de les posicions per HR4. El nou alineament que es va obtenir es va analitzar amb el programa PHYML (Guindon i Gascuel, 2003), basat en el principi de màxima similitud en les posicions aminoacídiques (Jones et al., 1992). Es van fer 100 iteracions "bootstrap" i el programa PHYML.

2.23. TUNEL DE GLÀNDULA PROTORÀCICA

Els assajos de TUNEL es varen realitzar usant el kit de detecció de mort cel.lular mitjançant marcatge amb fluoresceïna (Roche). El protocol que vam seguir és essencialment l'indicat pel fabricant. Les glàndules protoràciques dissecades es fixaven en paraformaldèhid diluït al 4% en PBS, durant 30 min i a temperatura ambient. Seguidament, les mostres es rentaven amb PBST (0.1% Tritó-PBS) i es permeabilitzaven durant 30 min a temperatura ambient incubant-les en 0.1% citrat sòdic-0.1% Tritó-PBS. Posteriorment, tornàvem a rentar amb PBS i es procedia a realitzar la reacció de TUNEL mantenint les mostres 1 h a 37°C amb els components de la reacció. Finalment es montaven les mostres amb Mowiol 4-88 (Calbiochem) i s'analitzaven al microscopi confocal.

**3. CLONATGE I CHARACTERITZACIÓ
DEL RECEPTOR NUCLEAR BgE75**

3.1. ANTECEDENTS

L'objectiu experimental d'aquest capítol va ser el clonatge del receptor E75 a *B. germanica*, un receptor nuclear implicat en la resposta a la 20E que fins ara només s'havia descrit en insectes holometàbols i en els crustacis *Metapenaeus ensis* i *Gecarcinus lateralis* (Taula 3-1 i referències).

E75 va ser identificat per primera vegada com un dels gens activats directament per la 20E a *D. melanogaster* (Feigl *et al.*, 1989; Segraves i Hogness, 1990), i posteriorment a *M. sexta* (Segraves i Woldin, 1993). Fins al moment, s'han descrit quatre isoformes d'E75 a *D. melanogaster*, *M. sexta* i, més recentment, a *A. mellifera*. En la resta d'espècies se'n han descrit entre una i tres (Taula 3-1 i referències). La nomenclatura per a cada isoforma, denominades E75A, -B, -C i -D, s'ha basat en el criteri establert per a *D. melanogaster* i *M. sexta*.

Les diferents isoformes d'E75 d'aquestes espècies difereixen en el domini A/B, específic per a cadascuna d'elles, i en el DBD. En les tres espècies on s'ha descrit quatre isoformes, tan sols E75A i E75C tenen sencer el DBD i, per tant, tenen els cinc dominis estructurals característics de la superfamília dels receptors nuclears (King-Jones i Thummel, 2005). Per contra, E75B no té el primer dit de zinc del DBD, i a E75D li manca completament aquest domini. El nostre objectiu és veure si un insecte hemimetàbol, com és *B. germanica*, té variants d'aquest receptor i quines similituds podem trobar amb allò que s'ha descrit sobretot a dípters i lepidòpters.

S'ha vist que els homòlegs d'E75 en vertebrats són els receptors nuclears PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) i Rev-erb (King-Jones i Thummel, 2005). Els PPARs estan implicats en l'homeostàsis dels lípids i de la glucosa (Chawla *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006) i se'ls relaciona molt directament amb la obesitat (Evans *et al.*, 2004), la resistència a la insulina (Lee *et al.*, 2006) i altres malalties metabòliques (Kersten *et al.*, 2000). D'altra banda, el receptor nuclear Rev-erb està implicat tant en la resposta com en el control dels ritmes circadians (Guillaumond *et al.*, 2005; Ramakrishnan i Muscat, 2006). També es coneix la implicació dels Rev-erb en processos relacionats amb el metabolisme de lípids (Ramakrishnan i Muscat, 2006).

En el nostre estudi volem veure també el grau de semblança entre els E75 d'artròpodes i aquests homòlegs de vertebrats.

Taula 3-1. Isoformes del receptor nuclear E75 descrites. S'indiquen els respectius números d'accés al Genbank i referència en el cas que hagi estat publicat en un article. aa=número d'aminoàcids de la seqüència si està incompleta. En els crustacis l'única isoforma descrita no es correspon amb cap de les descrites en insectes.

Espècie	Ordre	Isoformes	Número d'accés i Referència/es
Insectes			
<i>Tribolium castaneum</i>	<i>Coleoptera</i>	A	XP_971362
<i>Apis mellifera</i>	<i>Hymenoptera</i>	A, B, D, E	BAF44088 (36aa), BAF44090 (87aa), BAF44091 (21aa), BAF43600 (900aa) (Paul <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bombyx mori</i>	<i>Lepidoptera</i>	A, B, C	BAA89262, BAA89263, AAL57048 (Swevers <i>et al.</i> , 2002a) (Matsuoka i Fujiwara, 2000)
<i>Choristoneura fumiferana</i>	<i>Lepidoptera</i>	A	AAB52717 (Palli <i>et al.</i> , 1997)
<i>Galleria melonella</i>	<i>Lepidoptera</i>	A,B	AAA19579 (E75A) (Jindra <i>et al.</i> , 1994)
<i>Manduca sexta</i>	<i>Lepidoptera</i>	A, B, C, D	Q08893, AAC60499, AAT98633 (256aa), AY602191 (109aa) (Segraves i Woldin, 1993) (Zhou <i>et al.</i> , 1998) (Dubrovskaya <i>et al.</i> , 2004)
<i>Plodia interpunctella</i>	<i>Lepidoptera</i>	A, B	AAS79101 (123aa), AAS75597 (Siaussat <i>et al.</i> , 2004)
<i>Aedes aegypti</i>	<i>Dyptera</i>	A, B, C	CAL36974, CAL36973, CAL36975 (Pierceall <i>et al.</i> , 1999)
<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Dyptera</i>	D	XP_320316
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Dyptera</i>	A, B, C, D	P17671, P13055, NP_730322, NP_730323 (Feigl <i>et al.</i> , 1989) (Segraves i Hogness, 1990) (Dubrovskaya <i>et al.</i> , 2004)
Crustacis			
<i>Metapenaeus ensis</i>	<i>Decapoda</i>	A?	O77245 (Chan, 1998)
<i>Gecarcinus lateralis</i>	<i>Decapoda</i>	A?	AAY89587 Kim 05

3.2. RESULTATS

3.2.1. Clonatge de cinc cDNAs corresponents a cinc isoformes del receptor nuclear E75 a *B. germanica*

El clonatge de l'homòleg d'E75 a *B. germanica* es va dur a terme mitjançant la tècnica d'RT-PCR utilitzant oligonucleòtids degenerats dissenyats en el DBD. Es va escollir aquesta regió perquè es va veure que era la més conservada en totes les seqüències del receptor nuclear E75 de les espècies d'artròpodes on s'havia descrit aquest receptor. Així doncs, es va clonar un primer fragment de 198 parells de bases que, un cop analitzat, va permetre concloure que es tractava de l'homòleg d'E75 a *B. germanica*.

Les seqüències es van completar combinant les tècniques de 5' i 3'RACE, tal i com es descriu a l'apartat 2.5.2. Així, vam aconseguir clonar cinc cDNAs sencers que corresponien a cinc isoformes diferents del receptor nuclear E75 de *B. germanica* (Fig. 3.1 i 3.2). Aquestes isoformes es van denominar BgE75A, -B, -C, i -D (per homologia amb les isoformes descrites a *D. melanogaster*), i BgE75E per a una nova isoforma que no havia estat descrita en cap altre espècie. La grandària d'aquests cDNAs era de 2.859 nucleòtids (que codificaven per una proteïna de 953 aminoàcids) en el cas de BgE75A, 2.721 nucleòtids (907 aminoàcids) per BgE75B, 2.952 nucleòtids (984 aminoàcids) per BgE75C, 2.559 nucleòtids (853 aminoàcids) per BgE75D, i 2.832 nucleòtids (944 aminoàcids) per BgE75E (Fig. 3.2).

Les cinc isoformes presentaven els dominis funcionals característics de la superfamília dels receptors nuclears, tal i com es pot observar en la figura 3.1. Cada isoforma tenia un domini amino terminal característic, anomenat domini A/B o domini de transactivació independent de lligand, seguit d'una regió comuna diferenciada en quatre dominis, el DBD, la regió frontissa, el LBD, i la regió F. Aquests quatre dominis eren compartits total o parcialment per les cinc isoformes. Així, BgE75A, -C, i -E presentaven una regió A/B característica de grandària variable (Fig. 3.2), i una regió comuna de 2.706 nucleòtids (902 aminoàcids) dividida en quatre dominis. El DBD, de 211 nucleòtids (67 aminoàcids), tenia una estructura característica de dos dits de zinc

(aminoàcids 52-118 en Fig. 3.2A), que dóna la capacitat a aquest receptor per reconèixer i unir-se a seqüències de DNA específiques en promotors de gens diana (Umesono i Evans, 1989; Mangelsdorf *et al.*, 1995). En el DBD, cal destacar la presència de la caixa-p i la caixa-d (indicades en negreta a la figura 3.2A), responsables de la unió a DNA i de la capacitat de dimerització del receptor, respectivament. A continuació trobem la regió frontissa de 214 nucleòtids (68 aminoàcids), que serviria per afavorir la conformació tridimensional de la proteïna, i que estaria situada entre el DBD i el LBD. També s'ha demostrat que la regió frontissa pot interaccionar amb corepressors (Horlein *et al.*, 1995). El tercer domini en la regió comú era el LBD, que tenia 651 nucleòtids (217 aminoàcids). Aquest domini seria la regió responsable d'unir el lligand, i també contribuiria a la dimerització amb altres receptors. Finalment, a l'extrem carboxi terminal, trobem la regió F que tenia 1.650 nucleòtids (550 aminoàcids). Les altres dues isoformes d'E75, BgE75B i BgE75D (Fig. 3.1 i 3.2), presentaven la peculiaritat que els faltava tot el DBD (BgE75D) o el primer dit de zinc d'aquest domini (en el cas de BgE75B). Per això, el DBD de BgE75B tenia tant sols 132 nucleòtids (44 aminoàcids).

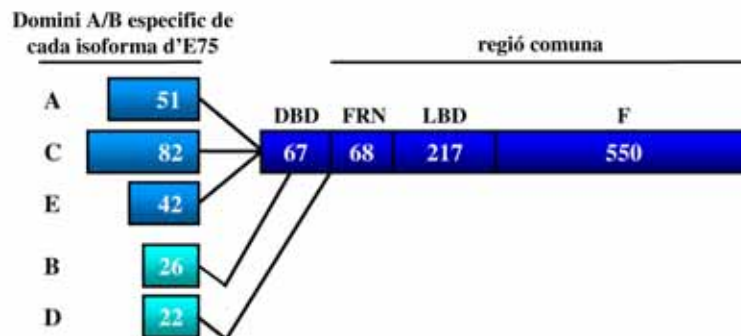


Figura 3.1.- Representació esquemàtica de les cinc isoformes d'E75 trobades a *B. germanica*. Els dominis funcionals s'indiquen en negreta i els números representen el nombre total d'aminoàcids que té cada domini.

A BgE75A

1 ACTATCCATTGTGCTTCGCTCGGAAGAGGTAGTGTGCTGTTTTAGTGTAGTGCAATGTGCTATTGAGTGTGCGCATGA
1 M I
81 TTGTGACAGAAAGTGCCCCGTACGAAATGATGCAGGAGCATCTTCAACTCCCAGGATCTACCACTCCAGGGATCATGATG
3 V T E S A P Y E M M Q E H L Q L P E S T T P G I M M

DBD

161 GACAACACTGTCACTTCGGTCCATCGGGAACAGAACTTAAATAGAGTTCGATGGGACGACCGTTTTGTCGGAGTGTG
29 D N T V T S V H R E P E L K I E F D G T T V L C R V C
241 TGGGACAAGGCTCCGGTTCCACTATGGCGTGCATTCTTGCAGGGTTGCAAGGATTCTCCGGCGCAGCATCCAGC
56 G D K A S G F H Y G V H S C E G C K G F F R R S I Q Q
321 AGAAAATCCAATACCGCCCTGTACCAAGAACAACAGTCTCCATCCTTCGGATCAACAGGAACCGGTGCCAATATTGT
83 K I Q Y R P C T K N Q Q C S I L R I N R N R C Q Y C
401 AGGTCAGAAGTGCATCGCTGTGGGAATGAGTAGAGATGCGGTGCGGTTCGGGCGTGTGCCAAACGCGAAAAGGCGCG
109 R L K K C I A V G M S R D A V R F G R V P K R E K A R
481 AATCTTAGCGCGATGCAACAGAGCTCGAACTCACGGTCTCAGGAGAAGGCAGTGGCGCGGAGTTGGAAGATGAGCAGA
136 I L A A M Q Q S S N S R S Q E K A V A A E L E D E Q R

LBD

561 GGCTTTTGGACGCGTGGTGCCTGCGCACCTGGATACGTGCGATTTTACGCGGGAAAAAGTTGAGCCTATGTTGGCTCGA
163 L L S T V V R A H L D T C D F T R E K V E P M L A R
641 GCCCGGACCAACCTTCGTATACAGCCTGCCCGCAACTCTGGCATGCCCTGAATCCAACCACCAACCTCTAACAGG
189 A R D Q P S Y T A C P P T L A C P L N P N P Q P L T G
721 TCAACAAGAGCTTTTACAAGACTTCTCTAAGAGATTCTCTCAGCCATTCTGGTGTAGTGGAGTTCGCCAAGCGCATCC
216 Q Q E L L Q D F S K R F S P A I R G V V E F A K R I P
801 CAGGATTTGCGTACTTCCCAGGATGACCAAGTCACACTGCTAAAAGCTGGTGTGTTGAAGTACTCCTGGTTCGTCTT
243 G F A L L P Q D D Q V T L L K A G V F E V L L V R L
881 GCCTGCATGTCGATGCACAGACGAACAGCATGATTGCCTGAATGGGCAAGTGCTCAAACGAGAGGCCATCCATAATAG
269 A C M F D A Q T N S M I C L N G Q V L K R E A I H N S
961 TTCCAATGCTCGGTTCTCATGGACTCGATGTTGACTTCGCCGAGAGGCTGAACACTAAGACTGTCCAGCCTGAAG
296 S N A R F L M D S M F D F A E R L N S L R L S D A E V
1041 TGGGCTGTTCTGCTCAGTAGTAGTATTGCACCCGACCGTCTGGCCTGCGAAAATACGGAGCTCATTGAACGTATGCAG
323 G L F C S V V V I A P D R P G L R N T E L I E R M Q
1121 GGAAAGCTGAAGGCAGCGCTGCAAAATGGTGGTGAAGCAAAACCACCTGGCCATGCCAACATTTGCCATGAACATCATGAA
349 G K L K A A L Q M V V S Q N H P G H A N I C H E L M K
1201 GAAGATCCCTGACCTGCGAACGCTCAATACGCTGCATCTGAAAAACTTCTGGCCTTCAAGATGACAGAACAACAACAGT
376 K I P D L R T L N T L H S E K L L A F K M T E O O O L
1281 TACAACAGCAGCAACAGCAACAGCACCTCTGGGAACTTCTCCTGAGGAGGAAAGCAACAGCAAAAAGTCCAGCAGGTTCT
403 Q Q Q Q Q Q H L W S T S P E E E S N S K S P A G S
1361 TCTTCTGGTCATCGTCATGATGTCACAATGGATGAAGCTGTTAAAAGCCCACTGGTTCAGTATCAAGTACAGAATC
429 S S W S S S S D V T M D E A V K S P L G S V S S T E S
1441 CGTCTGTTCTGGCGAGGTAGCTTCTGACCGAGTACCAGCCAACACCATCCAGTCAGCCATCAGGCATCAAGTGCAC
456 V C S L E V A S L T E Y P N H H P V S H Q A S S A P
1521 CTCTTCTGACGCCACACTAGCAGGTGGAATCTGCCACATCGCCACAGAGCCAATCTGGTTC AACCTCAGGAGATGAT
483 L L A A T L A G G I C P H R H R A N S G S T S G D D
1601 GACATGTCTGGACTCCCACATCATTCTCATGTGGCTGACCATCACCGCGTCAACCTCCATCCCAGCAACACCCCT
509 D M S G L P H H S H L A K S G L M E S P R M T I T A V N P P S R Q P L
1681 CATGCCACAACACCACAGATCCAGAGGAAACTGGACTACCAAGTATTCTGGTATTGAGTCTGGTACCGAGAAAC
536 M P Q H H H R F Q R K L D S P S D S G I E S G T E K L
1761 TGGACAACTCAAGTGGTGGTGAAGTACTGGAAGTGTCTTACATCAGTCTGTTCCAGTCCAAGGTCGTCGTTGGAA
563 D K L T S G G G S T G S A P T S V C S S P R S S L E
1841 GATAAAGATGAGGAGAAACATCACACGGTAGTTCGGGAAGCAGTCAATAGATGATATGCCAGTGTGAAACGCGTGTCT
589 D K D E E K H H N G S S G S S H I D D M P V L K R V L
1921 GCAAGCTCCTCCCTTATGACACAAAATCCCTCATGGATGAGGCGTACAAAACCGCACAGAAGTTCGCGCTTGGCGCA
616 Q A P P L Y D T N S L M D E A Y K P H K K F R A C R N
2001 ACAAGGATTCGAGAAGCAGAGCCATGATAGTTCATGTATCGCCACCTCCTCCTCCTCACCGGTCGCCCTCAGCAT
643 K D S A E A E P M I V H V S P P P P S H P V P P Q H
2081 CATTCTTACCACAACCTTCCCTGCATCTCACATCAAAATACCAATCCCAGTCTCAACCTTCTACATCCTCGTC
669 H S S P Q L H L H L T S N N H Q S Q S S T S S T S S S
2161 ACTGTCAAGCACACATTCGACCCCTCGCCAAATCGCTCATGGAGAGTCTCGAATGACCGCAGAGCAACTCAAAGGACAG
696 L S S T H S T L A K S G L M E S P R M T A E Q L K R T D
2241 ACATAATTCATAATTATATCATGCTGCTGATAGTCCGAATCCTGTACAGATTGAATTTCCCTTACAGCCCTTCTCCA
723 I I H N Y I M R A D S P N P V T I E F P P S A P S P
2321 TCAGCTAATCCGCTCGACAACATCAACCTCCAGTTACAAAATGAACAGTGGGAACCTCCTGTGTGTCAAAACCTCAAC
749 S A N S A S T T S T S S Y K M N S G N L L V C A N S T
2401 TCCAGTACTGGGTACCACTACATTCCTCAAATCAACCACAACAACAGCAACAACAGTCTCGGACGGTGGCAGG
776 P S T G H Y I P Q I P Q Q Q Q Q Q T V V G R W Q G
2481 GTTCGCGGGCTTCAAGTAAAGTGGTGCATCATCAACACCGGGTTCGTAACCCACACCTCAACAACATATGTC
803 S P G F S N G A S V I T T T G R N P T P Q Q T Y V

2561 TTGTTGCAAAAACAGTACCAATATCAGTCCCCGGTCCATCAGCAGAAATGCAACAGAGTGAGTTCTCCAGAATCTACTT
829 L L Q N S T N I S P P V H H A E M Q Q S E F S R I Y F
 2641 CCATCCTGGGAATGCAGTATCACCACACCATGCGGCAGCCTCTTCGTCAACGTCGCCATCTCCTCTCCCCATTCCCATC
856 H P G N A V S P H H A A A S S S T S P S P L P I P H R
 2721 GGAAAACCCCTCCCGCAGTAGCATCTGTCCCCCTTCTCCATCGTCCAGTGGCGTCACGCCAATAGTCATCTCCTCTCCC
883 K T P P A V A S C P P S P S S S G V T P I V I S S P
 2801 AAAATGATGGAAGTCCAGGTTGATATTGCCGATTCTCAGCAACCTCTCAATCTGTCCAAAAATCCCCCTCCCCTTCGCC
909 K M M E L Q V D I A D S Q Q P L N L S K K S P S P S P
 2881 TCACCAATGGCGTCTCCTGCGCAGCAGTGACACACAAAAGTGTGTGCTAGAGGTTGAGCCGCCCGTAACGGGCACA
936 H P M A S P A T T V T H K V V S L E A *
 2961 TGGACGACCGATGAAGTGGTCCACAGATTCATCACCACCGACTGGGTGATAGTACAAAAGCTAATCTTGAACCCACTG
 3041 TGACACAAACCTCAACGCAAACCTTGTGTTTCTGTGACACCGTGCACCAAGTATGGGACTTATCTGTGGAAAAGTGGTATG
 3121 GACGAAGCTTAAAGCTTTGTGAACGGGAAATTGCAATGGTGTGACGCTTGAAGCAGATGGACGGATGACGGAAACAAA
 3201 CCAGCAAGTGTGATGCGATAACCTGAAGAA

B BgE75B

1 CTAACCGTCCGCAATCCAGTTCAACTCAGTCCGACTCTAGCCTCCGTGATGCCTGTGTGAGTGTGTGTTCAAGTACT
 81 CGATAACATGACCTACACAGAATCTTTGATCCGTGAACATTTGGAGAGCTCACCACCTCAAGTACTGCACCTTCTTCTAATT
1 M T Y T E S L I G E H W R A H H S S D C T S S N S
 161 CACAGGATTCTTCCGGCGCAGCATCCAGCAGAAAATCCAATACCGCCCTGTACCAAGAACCAACAG
26 Q G F F R R S I Q Q K I Q Y R P C T K N Q Q...

C BgE75C

1 ATGACCGATACTAAGGACTTCAGGATCCGACGTCGGTGTGCGCCCTCCGCCCCCTCGTGTGTCGTCGACCTGTTTCGCC
1 M T D T K D F R I P T S V I A P P P L V S S S T C S P
 81 ACCGGGACGGCGTCTTCGACCATGCGTCCACCTCCACCGCTCCACCTCCGAAAAGCTCGCAGCAATGGCGTCCGGCGG
28 P G T A S S T M R P P P P P P P P K A R S N G V A G G
 161 GATGTGACGTCAAATCTGAGCGGAATCACCATGAAGAGCCATCTAGTTCATCCAGATCTCGAGTTCGATGGGACGACC
55 C D V K S E R N H H E E P S S S I P D L E F D G T T
 241 GTTTTGTGCCGAGTGTGTGGGACAAGGCTCCGGTTCCACTATGGCGTGCATTCTTGGCAGGGTTGCAAGGGA
81 V L C R V C G D K A S G F H Y G V H S C E G C K G...

D BgE75D

1 TCAGCGTGGCAGTCTTAGTGAGTAGTGACGCCGCTACTTGTGGATAAGTGTGTTAGTGACAGTGACAGTGTGATTAG
 81 TTAATATGGATGACGAACCTACTACTCAAAGGATCTTAAACGGCGATGTCAAGTACCATAACGCACCGGTGCGGTTT
1 M D D E L P I L K G I L N G D V K Y H N A P V R F
 161 GGGCGTGTGCCCAAACGCGAAAAGGCGCAATCTTAGCGCGATG
26 G R V P K R E K A R I L A A M...

E BgE75E

1 TGGCCACGGCTGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGAAAAATTTAGAACTGTGTTTTCTGTTATTTTTAACCGAA
 81 CTTTGTGTGGCTGGGATACTGTGATAAGGATATCAAAAATGACCGTGAAGGACTGCAAACCTGGGGATGCATCCTGCAC
1 M T V K D C K P G D A S C T
 161 CCAGGATATGGACCCTTCTTATCTCAGGATAGTGAAAATTTACTTGGGAGAGTCCTAGCAGAGTTCGATGGGACGACCG
15 Q D M D P F L S Q D S E N L L G R V L A E F D G T T V
 241 TTTTGTGCCGAGTGTGTGGGACAAGGCTCCGGTTCCACTATGGCGTGCATTCTTGGCAGGGTTGCAAGGGA
42 L C R V C G D K A S G F H Y G V H S C E G C K G...

Figura 3.2.- Seqüències nucleotídiques i aminoacídiques de les cinc isoformes del receptor nuclear E75 de *B. germanica*. (A) cDNA complet de la isoforma BgE75A amb les regions 5'UTR (específica de la isoforma A) i 3' UTR (comú a totes les isoformes). Els requadres indiquen el DBD i el LBD. El domini A/B es troba davant del DBD i la regió frontissa queda entre el DBD i el LBD. La regió F es troba situada després del LBD. En negreta, dins del DBD, s'indiquen la caixa-p i la caixa-d a continuació. Els dos dits de zinc que confereixen la capacitat d'unió al DNA comprenen els aminoàcids 52-108 en el DBD. El codó de parada s'indica mitjançant un asterisc. (B) Regió 5' UTR, i domini A/B de BgE75B. També s'inclouen 63 nucleòtids del DBD

3.2.2. Similituds entre les seqüències d'E75 d'artròpodes

Un cop completat el clonatge es va realitzar un estudi comparatiu per veure el grau de similitud dels diferents dominis del nostre receptor respecte els descrits en altres espècies d'artròpodes. Així doncs, es va comparar la seqüència aminoacídica de BgE75A amb la dels seus homòlegs en coleòpters, himenòpters, dípters i lepidòpters, i també en les dues espècies de crustacis on s'havia identificat E75, *M. ensis* i *G. lateralis*. A més, es va afegir a l'estudi el receptor nuclear d'*H. sapiens* PPAR γ , que és el PPAR més similar a BgE75A. Com es pot apreciar a la figura 3.3, les seqüències més similars a BgE75A van ser les del coleòpter *T. castaneum* i l'himenòpter *A. mellifera*. Així, el percentatge de similitud indicava que les regions més conservades eren el DBD i la regió frontissa, i després el LBD. Remarcablement, el DBD dels receptors E75 de totes les espècies comparades era idèntic en tots els casos avaluats. La regió frontissa, en canvi, era molt semblant a la de *T. castaneum* i *A. mellifera* (96% i 91% respectivament), però en la resta d'espècies la similitud era d'entre un 70 i un 76%. Al comparar el LBD es va veure de nou que el percentatge de similitud era molt alt entre *B. germanica* i *T. castaneum* (90%) o *A. mellifera* (88%). Sorprenentment, el LBD dels crustacis era més similar al de *B. germanica* (71-73%) que no pas al de dípters i lepidòpters (55-57% de similitud). D'altra banda, les regions menys similars eren la regió F i el domini A/B. De fet, el número d'aminoàcids d'aquestes regions era molt variable en funció de la espècie, la qual cosa feia difícil poder-les comparar.

(en doble subratllat). Es pot observar que a BgE75B li falten els primers 66 nucleòtids (22 aminoàcids) del DBD i per tant no té el primer dit de zinc. (C) Domini A/B corresponent a la isoforma BgE75C i els primers 69 nucleòtids (23 aminoàcids) del DBD. (D) Regió 5' UTR i domini A/B corresponent a la isoforma BgE75D. En aquest cas, el doble subratllat indica la regió frontissa que ja és compartida per totes les isoformes, ja que BgE75D no té DBD. (E) Regió 5' UTR i domini A/B corresponent a la isoforma BgE75E. El doble subratllat indica els primers 69 nucleòtids (23 aminoàcids) del DBD.

El grau de similitud en la regió F era molt baix (entre un 18 i un 35% en la majoria d'espècies), amb la excepció de *T. castaneum* amb un 47%, i *A. mellifera* amb un 42% de similitud. El mateix va succeir a l'observar el percentatge de similitud dins del domini A/B, que és el domini que identifica cada isoforma. La grandària d'aquesta regió era també molt variable, i el grau de similitud era molt baix, arribant com a màxim al 37%. Quan es van alinear les seqüències aminoacídiques de les regions A/B es va veure que tan sols presentaven 9 aminoàcids conservats, just al extrem 5' del DBD (motiu "IEFDGTTVL" en la Fig. 3.2).

Finalment, la comparació de BgE75A amb el receptor PPAR γ d'*H. sapiens* indicava una màxima similitud en el DBD (66%). La resta de regions presentaven un percentatge de similitud que, com a màxim, arribava al 28%. Una altra diferència important del PPAR γ respecte dels E75 era l'absència de regió F, una regió que, en tots els E75, tenia una grandària força important, d'entre 222 i 609 aminoàcids.

3.2.3.- Anàlisi filogenètica del receptor nuclear E75

Els dominis més característics d'un receptor nuclear són el DBD, que confereix la capacitat d'unió a DNA, i el LBD que permet al receptor unir el seu lligand i heterodimeritzar amb altres receptors. Així, es va fer un anàlisi filogenètica del LBD (vegeu capítol 2, apartat 2.22), ja que aquesta regió, tot i ser força diferent en les diferents espècies analitzades, presentava diversos dominis conservats. El DBD es va deixar al marge de l'estudi perquè la seva seqüència era idèntica en tots els artròpodes (Fig. 3.3). Com s'observa a la figura 3.4A, l'alineament mostrava una semblança més gran entre les espècies *B. germanica*, *T. castaneum*, *A. mellifera*, *M. ensis* i *G. lateralis*, respecte a la resta (dípters i lepidòpters, asteriscs en la Fig. 3.4A). D'altra banda, el LBD del receptor PPAR γ d'*H. sapiens* era el més diferent, però mantenia conservats els mateixos dominis que eren comuns en els artròpodes.

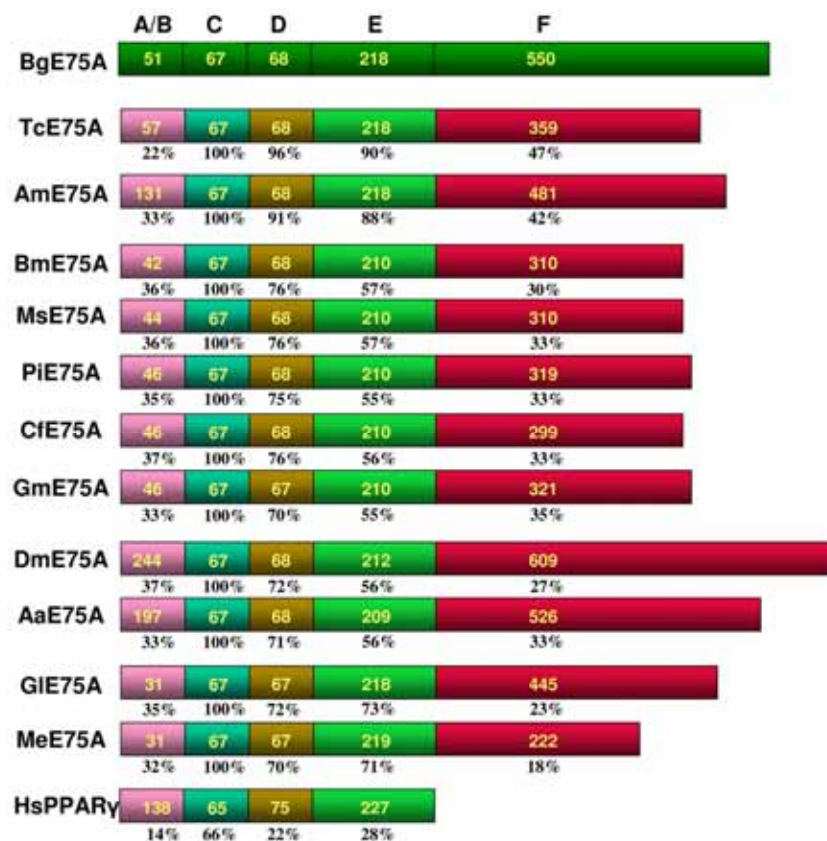
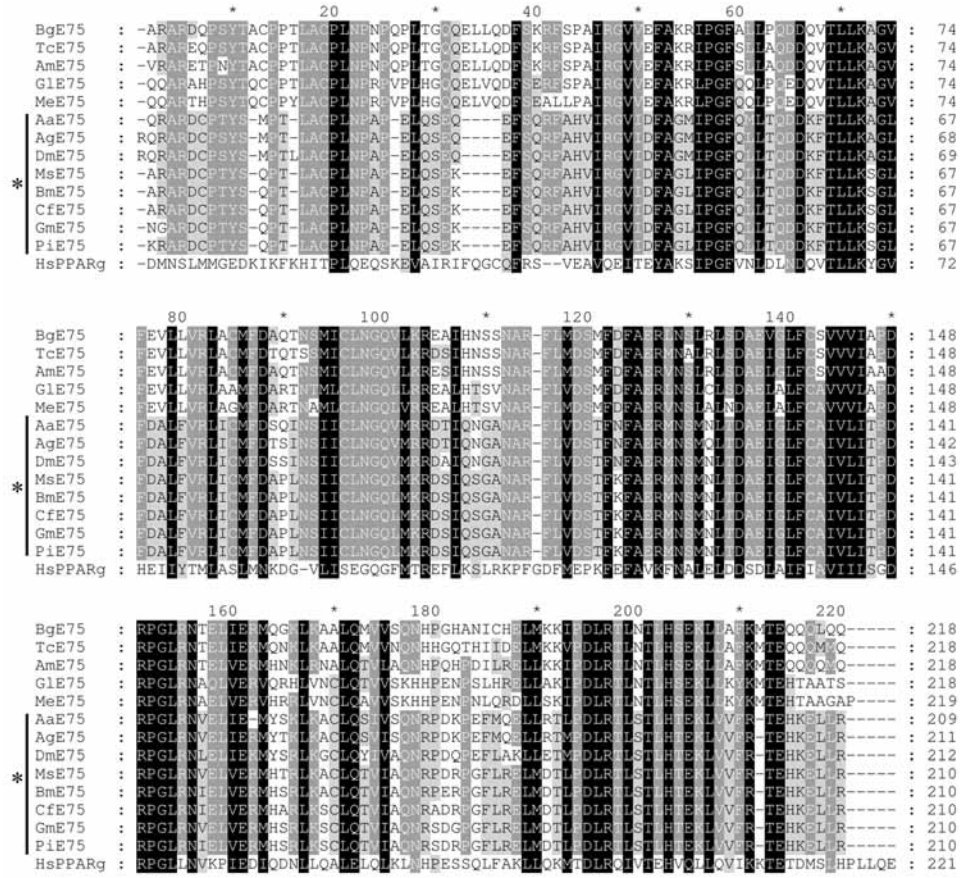
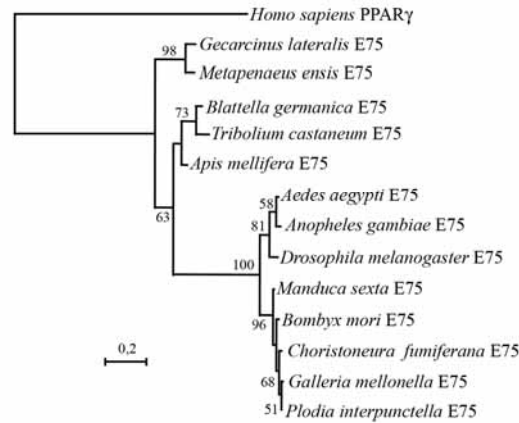


Figura 3.3.- Similitud dels dominis estructurals de la isoforma BgE75A respecte E75A d'altres espècies d'artròpodes i PPAR γ d'*H. sapiens*. Amb l'ajuda del Clustal X, es van alinear i calcular els percentatges de similitud, respecte BgE75A, de les seqüències aminoacídiques d'E75A de les espècies *Apis mellifera* (AmE75A), *Tribolium castaneum* (TcE75A), *Bombyx mori* (BmE75A), *Manduca sexta* (MsE75A), *Plodia interpunctella* (PiE75A), *Drosophila melanogaster* (DmE75A), *Aedes aegypti* (AaE75A), *Choristoneura fumiferana* (CfE75A), *Galleria mellonella* (GmE75A), *Metapenaeus ensis* (MeE75), *Gecarcinus lateralis* (GIE75) i PPAR γ d'*Homo sapiens* (HsPPAR γ , número d'accés BAA18949). Els percentatges indiquen el grau de similitud de cada domini estructural respecte al de BgE75A. Els números dins de cada requadre són els aminoàcids que té cada domini en cada espècie. Els diferents dominis estructurals s'indiquen al damunt de BgE75A. Els números d'accés de cada seqüència estàn especificats a la taula 3.1.

A



B



Per l'arbre filogenètic es va utilitzar com a grup extern l'Hs-PPAR γ . Com es pot veure a la figura 3.4B, l'arbre filogenètic obtingut separava els crustacis dels insectes i, dins d'aquests, els dípters i lepidòpters quedaven agrupats a part de les espècies *B. germanica*, *T. castaneum* i *A. mellifera*. Dues espècies d'holometàbols com eren *A. mellifera* i *T. castaneum* varen agrupar clarament més a prop d'una hemimètabola com era *B. germanica*. A més, la longitud de la branca que separava dípters i lepidòpters de la resta d'artròpodes indicaria un grau de divergència més gran en el LBD d'aquestes espècies.

3.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha descrit el clonatge i l'anàlisi estructural de cinc isoformes del receptor nuclear E75 de *B. germanica*, i s'ha realitzat un estudi de les similituds dels diferents dominis estructurals de BgE75 respecte els seus homòlegs descrits en altres espècies d'artròpodes. Finalment s'ha construït un arbre filogenètic de tots els E75 descrits fins ara basant-nos en la seqüència del LBD.

Per primera vegada s'han clonat cinc isoformes del receptor nuclear E75 en una mateixa espècie d'insecte. D'aquestes cinc isoformes, tant sols tres d'elles (BgE75A, -C, -E) mantenen completament la típica organització modular de la superfamília dels receptors nuclears, mentre que a dues d'elles (BgE75B i -D) els manca total o parcialment el domini d'unió al DNA (Fig. 3.1). També s'ha vist que les diferents isoformes difereixen bàsicament a la regió A/B.

Figura 3.4.- Alineament i arbre filogenètic del domini LBD del receptor nuclear E75 d'artròpodes i el de PPAR γ d'*H. sapiens*. (A) Alineament de les seqüències aminoacídiques dels LBDs mitjançant el programa Clustal X. La clau amb asterisc separa dípters i lepidòpters de la resta d'espècies comparades. La nomenclatura de cada espècie s'indica a la figura 3.3. (B) Arbre filogenètic dels LBDs obtingut utilitzant l'anàlisi de màxima versemblança. La longitud de les branques és proporcional al grau de divergència. La barra representa 0,2 substitucions per posició. Només s'indiquen els valors de bootstrap $\geq 50\%$.

L'estudi comparatiu de BgE75A amb les seqüències d'E75A d'altres espècies ha mostrat que el domini d'unió al DNA és el més conservat. Dins d'aquest domini trobem la caixa-p, que és una seqüència necessària per a que el receptor es pugui unir a DNA. Com les isoformes BgE75A, -C i -E de *B. germanica* tenen conservada aquesta caixa, és probable que aquestes isoformes de BgE75 s'uneixin també com a monòmer a l'element de resposta Ear-1 tal i com s'ha demostrat a *D. melanogaster* (Horner *et al.*, 1995) i *C. fumiferana* (Palli *et al.*, 1997). L'element de resposta Ear-1 conté la seqüència (A/G)GGTCA precedida per una regió rica en A i T, i és també un element de resposta típic dels receptors ROR α i Rev-erb de vertebrats (Giguere *et al.*, 1994; Harding i Lazar, 1995). No obstant, no sembla que la funció d'E75 passi únicament per unir-se a DNA i regular així la transcripció d'altres factors. A *B. mori*, per exemple, s'ha demostrat que BmE75 també pot actuar heterodimeritzant amb un altre receptor nuclear sense necessitat d'unir-se a DNA (Swevers *et al.*, 2002b). En aquest treball, dut a terme en *B. mori*, es demostra que la interacció de BmE75 amb un altre receptor nuclear (BmHR3) es produeix a través de la regió F d'E75. Com *B. germanica* també té una regió F molt gran, podria ser que la funció d'aquesta regió estigués conservada, tot i que en el nostre estudi comparatiu ja hem vist que el grau de similitud de la regió F entre les diferents espècies és molt variable.

Un altre domini important dels receptors nuclears és el LBD, ja que és la regió d'unió al lligand i d'heterodimerització. Com que la seqüència és suficientment variable, es va decidir fer un estudi filogenètic basat en la comparació d'aquesta regió. L'arbre filogenètic que es va obtenir mostrava que el LBD de BgE75 era menys semblant al de dípters i lepidòpters que no pas al de la resta d'espècies d'artròpodes comparades, incloent-hi les dues espècies de crustacis (Fig. 3.4A i B). Un resultat semblant també s'ha trobat en l'estudi filogenètic del LBD del receptor nuclear RXR de *B. germanica* (Maestro *et al.*, 2005). En el nostre treball es demostra que hi ha una taxa de divergència més gran en les seqüències de dípters i lepidòpters respecte la resta d'espècies, i que el LBD de *B. germanica* està filogenèticament més proper al d'himenòpters, coleòpters, crustacis i aràcnids, que no pas al de dípters i lepidòpters. No obstant, les possibles diferències funcionals entre aquestes molècules encara no han estat estudiades.

D'altra banda, cal dir que E75 està considerat un receptor orfe pel fet que no es coneix el seu lligand. No obstant, recentment s'ha descobert que en el LBD de DmE75 hi ha un grup hemo fortament unit, i es coneix que els grups hemo són necessaris per al control d'una gran varietat de processos biològics com, per exemple, el metabolisme dels lípids, el control de ritmes circadians, el transport de gasos, i molts d'altres (Reinking *et al.*, 2005). El fet que E75 sempre tingui el grup hemo unit, però, indicaria que aquest grup no actuaria realment com el lligand d'E75 i que la funció d'aquest grup hemo estaria més aviat relacionada amb l'estabilitat i la conformació d'E75. El que s'ha vist en el treball esmentat, és que el grup hemo pot ser oxidat i reduït de manera reversible, la qual cosa afecta la capacitat de DmE75 per unir els missatgers CO i NO, gasos diatòmics implicats en un gran nombre de processos, com són la divisió cel.lular, la mort cel.lular o la pressió sanguínea entre d'altres (Reinking *et al.*, 2005). Com exemple, els autors demostren que quan el grup hemo està en la seva forma reduïda, DmE75 pot unir-se a DmHR3 i reprimir-lo, mentre que si el missatger NO s'uneix a DmE75 actuaria de forma antagonica, evitant l'acció de DmE75 sobre DmHR3 (Reinking *et al.*, 2005). Reinking i els seus col.laboradors demostren que per a la unió del grup hemo al LBD de DmE75 hi ha dos aminoàcids claus. A *B. germanica* aquests dos residus claus per a la unió estan conservats (H-171 i H-387, vegeu la Fig. 3.2), la qual cosa indicaria que el LBD de BgE75 també podria unir un grup hemo.

Els homòlegs d'E75 en vertebrats són les famílies de receptors nuclears PPAR i Rev-Erb. Els PPAR poden actuar com a repressors o com activadors de la transcripció (Tan *et al.*, 2005), mentre que els Rev-Erb actuen com a potents repressors (Downes *et al.*, 1996; Renaud *et al.*, 2000). La capacitat activadora dels PPAR, sembla residir en un domini d'activació depenent de lligand (denominat AF-2) situat a l'hèlix 12, a l'extrem 3' del LBD, que permet al receptor reclutar coactivadors (Danielian *et al.*, 1992; Warnmark *et al.*, 2003). Allò que s'ha observat és que només la família dels PPAR té aquest domini AF-2, mentre que els Rev-erb i els E75 d'insectes no el tenen. D'altra banda, s'ha vist que la conservació de la seqüència "FAKxxxxFxxLxxxDQxxLL" en el LBD de *B. germanica* (F-52 a L-71, vegeu la Fig. 3.4A) pot conferir capacitat repressora al receptor (Burke *et al.*, 1996). El LBD de BgE75, al igual que en crustacis, en *T. castaneum* i en *A. mellifera*, no presenten domini AF-2, i a més, mantenen conservada

la seqüència capaç de conferir activitat repressora. Aquests dos punts suggeririen que BgE75 tindria activitat repressora.

En insectes holometàbols, E75 ha estat descrit com un factor repressor de la transcripció (White *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2000; Swevers *et al.*, 2002b; Hiruma i Riddiford, 2004). A *D. melanogaster*, per exemple, la sobreexpressió de DmE75A o DmE75B és suficient per reprimir l'expressió de l'inhibidor d'apoptosis DIAP-2 (Jiang *et al.*, 2000). Un segon exemple el trobem a *M. sexta*, on l'expressió de MsE75A en línia cel.lular reprimeix l'activació del promotor del receptor nuclear MSHR3 (Hiruma i Riddiford, 2004).

**4. CARACTERITZACIÓ DELS
PATRONS D'EXPRESSIÓ I
REGULACIÓ HORMONAL DE
BgE75**

4.1. ANTECEDENTS

En aquest capítol es descriu l'expressió en termes de mRNA, de les isoformes del receptor nuclear E75 al llarg de l'embriogènesi, i en tres teixits diferents durant les dues darreres fases nimfals de *B. germanica*. Els teixits escollits han estat la glàndula protoràcica, que és l'òrgan on es sintetitzen els ecdisteroides durant les fases nimfals, l'epidermis que s'encarrega de produir la nova cutícula al final de cada fase nimfal i, per últim, el cos gras, que ve a ser l'equivalent del fetge i el teixit adipós dels vertebrats, i on es sintetitzen un gran nombre de proteïnes. Durant l'embriogènesi, i controlat per pulsos de 20E i HJ, es produeix la morfogènesi que dóna lloc a la pronimfa (Fig. 4.1I). Aquesta pronimfa, encara dins l'ooteca, sintetitza una nova cutícula que li permet mudar, per donar lloc a una nimfa de primera fase que serà la que finalment eclosionarà.

D'altra banda, les dues darreres fases nimfals es situen en dos marcs endocrins molt diferents. A la cinquena fase, el pic de 20E que marca la transició a la següent fase, es dóna en presència d'HJ. En canvi, a la sisena fase nimfal, el pic de 20E es dóna en absència d'HJ, la qual cosa determina la muda imaginal (Riddiford *et al.*, 2003; Cruz, 2006).

Fins al moment, la informació disponible referent a l'expressió d'E75 en les etapes prèvies a la fase adulta només es coneix en insectes holometàbols, i es centra en dues espècies d'insectes de metamorfosi completa, *D. melanogaster* i *M. sexta* (Sullivan i Thummel, 2003; Keshan *et al.*, 2006).

Un segon objectiu d'aquest capítol és comprobar si, tal i com s'ha descrit en insectes holometàbols, E75 està controlat per la 20E. A més, també volem veure si hi ha diferències quan a la capacitat de resposta a la 20E de les diferents isoformes. Per dur a terme tot això, utilitzarem tècniques d'incubació *in vitro* de cossos grassos de femelles de sisena fase nimfal.

4.2. RESULTATS

4.2.1. Patrons d'expressió de BgE75 durant l'embriogenèsi

L'embriogenèsi de *B. germanica* ha estat caracteritzada en els treballs de Cruz (2006) i Tanaka (1976). En les nostres condicions de manteniment de la colònia, l'embriogenèsi dura 17 dies, durant els quals es donen dos pics de 20E (Fig. 4.1A) El primer d'ells es produeix en absència d'HJ al voltant del sisè dia, just abans que s'acabi el tancament dorsal de l'embrió i quan es disposa la cutícula pronimfal. El segon pic de 20E s'observa entre els dies 12 i 14 de l'embriogenèsi, i té lloc en presència d'HJ (Treiblmayr *et al.*, 2006).

En primer lloc, es van analitzar els patrons d'expressió de BgE75 per RT-PCR/Southern Blot a partir d'embrions que s'havien recolectat a intervals de 24h. D'aquesta manera es va poder veure que les isoformes de BgE75 s'expressaven de manera diferent durant aquest període (Fig 4.1A). Així, el missatger de BgE75A presentava tres pics d'expressió. Dos d'ells, els de dia 5-6 i dia 12-14, es correlacionaven bé amb els pics de 20E, mentre que hi havia un tercer pic d'expressió a dia 2, quan es forma la banda germinal i els nivells de 20E son baixos. BgE75B presentava dos pics d'expressió coincidint amb els pics de 20E. D'altra banda, el missatger de BgE75C es detectava en embrions de dia 0, suggerint un origen matern. A més, BgE75C també s'expressava des del dia 6, quan es dona el tancament dorsal de l'embrió, i fins el dia 13, quan es dona el segon pic de 20E. Finalment, BgE75D s'expressava just després dels dos pics de 20E, mentre que BgE75E només es detectava coincidint amb el segon pic, entre els dies 12 i 15 de l'embriogenèsi.

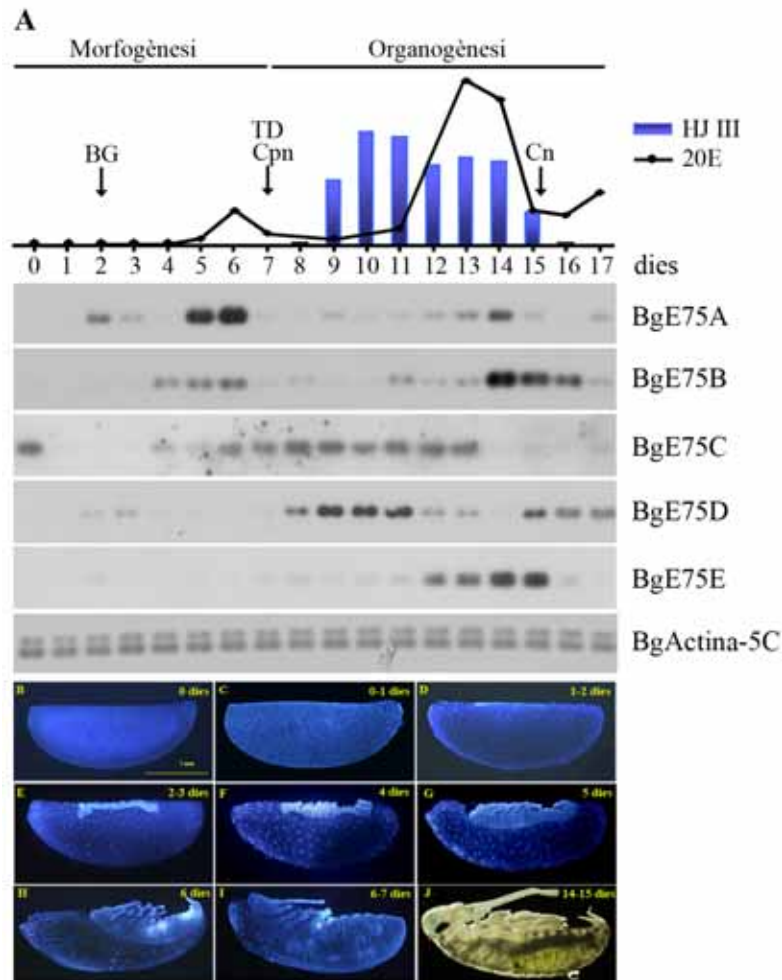


Figura 4.1.- Patrons d'expressió de les isoformes del receptor BgE75 durant l'embriogènesi de *B. germanica*. L'amplificació de cada transcrit es va realitzar mitjançant RT-PCR/Southern Blot a partir de la mateixa quantitat d'RNA que es va extreure dels ous de les ooteques a les edats indicades. Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C. Els Southern/blots són representatius de dues rèpliques. En la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E (línia) i d'HJ (barres) segons (Treiblmayr *et al.*, 2006). S'indica el moment de formació de la banda germinal (BG), tancament dorsal (TD), deposició de la cutícula pronimfal (Cpn), i cutícula nimfal (Cn), segons Cruz (2006). (B-I) Imatges d'embrions mitjançant tinció DAPI representatives de diferents períodes de l'embriogènesi de *B. germanica*. (J) Embrió de 14-15 dies d'edat vist al camp clar. Al haver depositat la cutícula no és possible fer la mateixa tinció que per els embrions més joves. Adaptat de Cruz (2006). En totes les imatges dels embrions, la regió ventral està a dalt i la regió cefàlica està a l'esquerra. Escala: 1mm.

4.2.2. Patrons d'expressió de BgE75 durant les dues darreres fases nimfals

A continuació, es van analitzar els patrons de BgE75 en diferents teixits durant les dues darreres fases nimfals de *B. germanica*, que són les que marquen les transicions nimfa-nimfa i nimfa-adult en aquest insecte. Els teixits escollits van ser la glàndula protoràcica, l'epidermis i el cos gras.

L'expressió de cadascuna de les cinc isoformes de BgE75 era força similar en tots els teixits (Fig. 4.2.). BgE75D s'expressava sobretot durant les transicions d'una fase a la següent i els seus nivells disminuïen durant els primers dies de cada fase nimfal. BgE75C començava a detectar-se a l'inici de cada fase, arribant als seus nivells de màxima expressió just abans de què augmentessin els nivells de 20E. Després, la seva expressió davallava fins pràcticament desaparèixer, al final de cada fase. Finalment, BgE75A, -B, i -E, s'expressaven de forma seqüencial a partir de la segona meitat de cada fase, i coincidien amb l'augment de ecdisteroides circulants a la hemolimfa que s'observava a cada fase nimfal (Fig. 4.2.).

4.2.3. Efecte de la 20E sobre l'expressió de BgE75 *in vitro*

Els patrons d'expressió de les diferents isoformes de BgE75 suggerien que la 20E podia estar implicada en la regulació de BgE75 a nivell transcripcional. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, es va estudiar la resposta de BgE75 a la 20E en incubacions de cos gras *in vitro*. Aquest sistema ja s'ha utilitzat prèviament per demostrar la regulació per 20E d'altres receptors nuclears a *B. germanica* (Cruz *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007). En aquests experiments s'incubaven cossos grassos de femelles d'un dia d'edat de sisena fase nimfal durant 1, 3 i 10h en presència de 20E (20E 5×10^{-6} M), de l'inhibidor reversible de síntesi proteica cicloheximida (Chx 10^{-4} M), o bé ambdós alhora (20E+Chx), i s'analitzava per RT-PCR/Southern Blot la resposta de les diferents isoformes de BgE75.

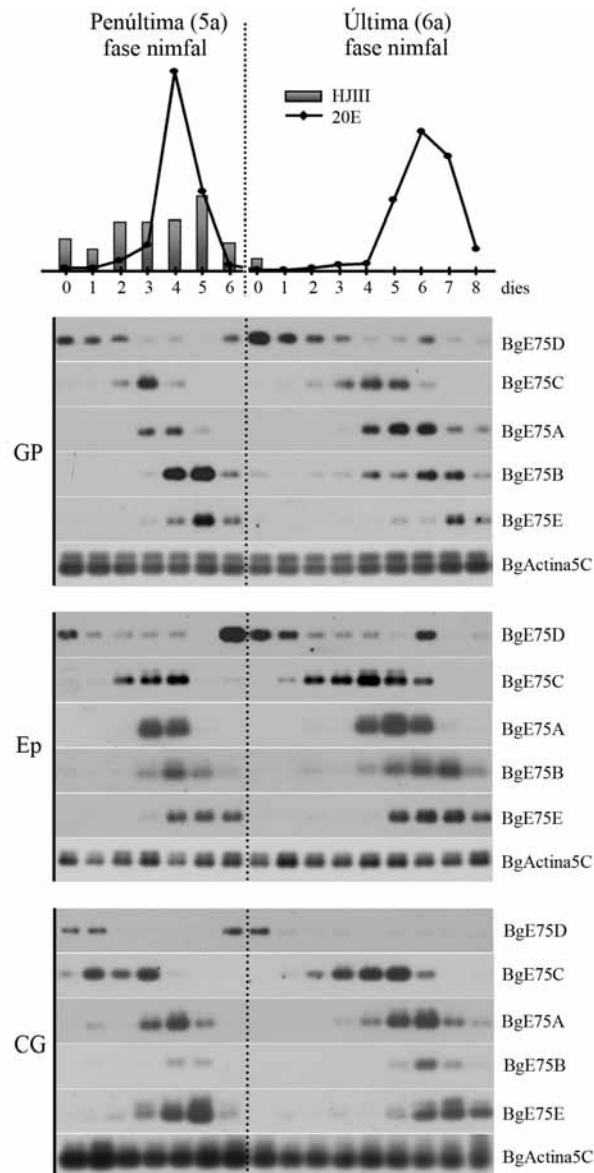


Figura 4.2.- Patrons d'expressió de les isoformes del receptor BgE75 en diferents teixits durant les dues últimes fases nimfals de *B. germanica*. L'amplificació de cada transcrit es va realitzar mitjançant RT-PCR/Southern Blot a partir de la mateixa quantitat d'RNA que es va extreure de glàndules protoràciques (GP), epidermis dorsal (EP) o cos gras (CG). Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C en cada teixit. Els Southern/blots són representatius de dues rèpliques. En la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E (línia) i d'HJ (barres) segons (Cruz *et al.*, 2003).

Com s'observa en la figura 4.3, mentre que el tractament sense 20E no afectava l'expressió de cap dels trànscrips al llarg de les 10 h d'incubació, la presència de 20E provocava un clar increment en els nivells d'expressió dels trànscrips de les isoformes BgE75A, -B, -C, i -E. A més, les induccions per 20E encara eren més marcades en presència de Chx, la qual cosa indicava que aquestes quatre isoformes s'activaven directament per aquesta hormona. Per contra, els nivells de missatger de BgE75D no es veien afectats per la 20E, però sí que augmentaven si les incubacions es feien amb Chx o amb 20E i Chx alhora. Aquest resultat suggeriria que BgE75D estaria regulat per un repressor no dependent de 20E.

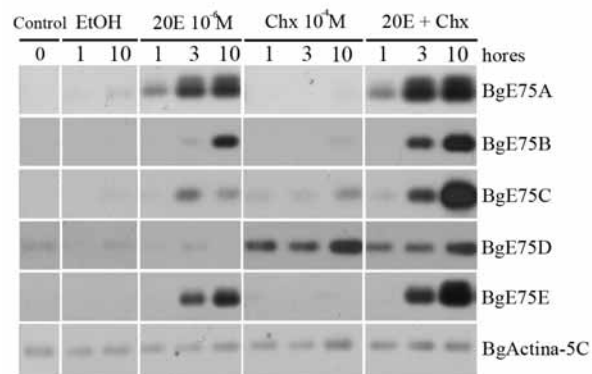


Figura 4.3.- Efecte de la 20E i la cicloheximida (Chx) en els nivells d'expressió de les cinc isoformes de BgE75 en incubacions *in vitro* de cossos grassos de nimfes de *B. germanica*. Es van incubar cossos grassos procedents de nimfes recién emergides de sisena fase nimfal amb 20E (5×10^{-6} M), chx (10^{-4} M) o ambdós a la vegada durant els períodes de temps indicats. Els cossos grassos incubats es van analitzar per RT-PCR/Southern Blot a partir de la retrotranscripció de la mateixa quantitat d'RNA. Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C. Els Southern blots són representatius de dues rèpliques.

4.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'han analitzat els patrons d'expressió de BgE75 durant l'embriogènesi i les dues darreres fases nimfals de *B. germanica*. A més, s'ha estudiat la capacitat de resposta de les diferents isoformes d'aquest receptor nuclear a la 20E en incubacions de cos gras *in vitro*.

4.3.1. Expressió de BgE75 durant l'embriogènesi

A *B. germanica*, s'ha demostrat que la cascada gènica de resposta a la 20E està activa durant l'embriogènesi (Maestro *et al.*, 2005; Cruz, 2006). Ara, hem caracteritzat l'expressió de cinc isoformes del factor E75 durant la embriogènesi d'aquest insecte hemimetàbol i hem vist que les seves diferents isoformes presenten un patró d'expressió característic durant aquest període (Fig. 4.1).

Fins al moment, només s'han publicat estudis d'E75 relacionats amb l'embriogènesi a *D. melanogaster* (Bilder i Scott, 1995; Sullivan i Thummel, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2004). En aquests treballs es descriu l'expressió de només dues isoformes d'E75, DmE75A i DmE75B, i es demostra també que DmE75 és necessari durant l'embriogènesi donat que el mutant, que no expressa cap de les isoformes, és letal durant aquest període (Bilder i Scott, 1995; Bialecki *et al.*, 2002). L'embriogènesi d'aquest insecte holometàbol no obstant, és molt diferent a la d'un hemimetàbol com és *B. germanica*. A *D. melanogaster*, l'embriogènesi dura 24h i presenta un sol pic de 20E en presència d'HJ, al voltant del 25-50% del desenvolupament embrionari (per revisió sobre embriogènesi d'insectes holometàbols vegeu Truman i Riddiford, 2002). Durant aquest període s'expressen seqüencialment les isoformes DmE75A i DmE75B coincidint amb el pic de 20E, mentre que DmE75C no es detecta (Sullivan i Thummel, 2003). Aquest únic pic de 20E s'ha relacionat amb la retracció de la banda germinal, la involució cefàlica i la deposició de la cutícula, tres processos indispensables per a la

correcta morfogènesi de l'embrió (Kozlova i Thummel, 2003). Es probable, per tant, que DmE75 estigui relacionat d'alguna manera amb aquests processos, sigui directament, o bé indirectament a través del seu efecte sobre la síntesi d'ecdisteroides tal i com succeeix durant els períodes post-embriònaris (Bialecki *et al.*, 2002).

Per contra, l'embriogènesi de *B. germanica* dura 17 dies i té dos pics clars de 20E, el primer al 30-40% del desenvolupament i el segon, que es dona en presència d'HJ, al 65-90% del desenvolupament (Treiblmayr *et al.*, 2006). El primer pic coincideix amb el tancament dorsal de l'embrió i la deposició de la cutícula pronimfal (Fig. 4.1I), de manera que als 7 dies d'edat, l'embrió, anomenat ara pronimfa, ja té l'aspecte d'un individu adult (Cruz, 2006). El segon pic de 20E coincideix amb el final de la organogènesi i la deposició de la cutícula nimfal (Fig. 4.1J; (Cruz, 2006). A *B. germanica*, BgE75A s'expressa en primer lloc a dia 2, quan es forma la banda germinal i es diferencien l'àmnion i la serosa, les dues membranes que envolten i protegeixen la banda germinal durant el desenvolupament (Cruz, 2006). Remarcablement, aquest primer pic d'expressió de transcrit, que també s'ha observat en d'altres receptors nuclears com ara BgHR3 (Cruz, 2006), es dona sense variacions aparents dels nivells de 20E, com ja s'ha suggerit prèviament (Cruz, 2006). Aquesta activació de la cascada de resposta a la 20E podria ser deguda a que BgE75A estigués controlat per altres tipus de hormones o ecdisteroides, indetectables amb l'assaig enzimàtic que es va utilitzar. Una altra possibilitat fóra que els ecdisteroides materns estiguessin conjugats i inactius en el vitel, i només s'activessin a través d'enzims presents també en el vitel que els posarien a disposició del receptor d'ecdisona perquè fóssin utilitzats ràpidament en els moments inicials de la embriogènesi (Cruz, 2006). Aquest fenomen ja ha estat descrit en altres insectes, com per exemple *B. mori* (Sonobe i Yamada, 2004). Els altres dos pics d'expressió de BgE75A, que coincideixen amb els dos únics pics de la isoforma BgE75B, es corresponen bé amb els dos pics de 20E que es donen en la embriogènesi de *B. germanica*, i pel període en què s'expressen podrien estar relacionats amb el control de la síntesi de 20E, o bé amb els processos de deposició de la cutícula, tan pronimfal com nimfal, de manera semblant a com s'ha descrit a *D. melanogaster* per la deposició de la cutícula larvària (Chavez *et al.*, 2000; Bialecki *et al.*, 2002). Referint-nos a BgE75C es deposita de forma materna i s'expressa durant l'organogènesi quan els

nivells de 20E són baixos. Això suggereix que podria ser necessari per l'inici de la formació de la banda germinal i també que podria tenir algun paper en el desenvolupament dels teixits durant l'organogènesi. La isoforma BgE75D s'expressa després de cadascun dels pics de 20E, la qual cosa suggereix que podria estar implicat en la organogènesi i en la deposició de la cutícula nimfal. Finalment, BgE75E és la isoforma que s'expressa únicament durant el pic de 20E que es dona en presència d'HJ, al final de l'embriogènesi, i per tant la seva funció podria estar relacionada amb processos com ara l'eclosió o la deposició de la cutícula nimfal.

En resum, podem concloure que no es pot homologar l'embriogènesi de *D. melanogaster* amb la de *B. germanica*, ja que els patrons d'expressió, els pics d'ecdisona i HJ, i els processos que tenen lloc durant l'embriogènesi no semblen equivalents. De fet ja es pot observar externament que la nimfa d'un insecte hemimetàbol com *B. germanica* al ecllosionar ja és molt semblant a un adult, mentre que l'embrió d'un insecte holometàbol forma directament la larva de primera fase, que és més simple morfològicament i és completament diferent a l'adult al qual donarà lloc.

4.3.2. Expressió de BgE75 durant les dues últimes fases ninfals

De la mateixa manera que en l'embriogènesi, fins al moment, tampoc no s'havia descrit l'expressió del receptor nuclear E75 en fases ninfals de cap insecte que no fós holometàbol. Ara hem vist que les diferents isoformes d'E75 de *B. germanica* s'expressen de manera seqüencial durant les dues darreres fases ninfals, i que aquests patrons són bastant similars en els tres teixits analitzats (Fig. 4.2). Així, BgE75A, -B, i -E s'expressen simultàniament amb el pic de 20E que es dona durant la segona meitat de cada fase nimfal, BgE75C s'expressa durant l'inici del pic, quan els nivells de 20E són baixos, i BgE75D ho fa en les transicions d'una fase nimfal a la següent. Aquests patrons semblen suggerir una implicació de BgE75 en els processos de resposta a la 20E i/o en els de control de la síntesis de la hormona. En cap cas sembla que la presència d'HJ durant la cinquena fase nimfal afecti l'expressió de BgE75 a nivell de mRNA, ja que els patrons d'expressió són similars en ambdues fases.

En insectes holometàbols, i durant les fases prèvies a l'adult, només s'ha descrit l'expressió d'E75A, -B, i -C en les espècies *D. melanogaster* i *A. aegypti* (Sullivan i Thummel, 2003; Margam *et al.*, 2006). A *M. sexta*, a més, també s'ha descrit l'expressió de la isoforma MsE75D (Keshan *et al.*, 2006). En tots els casos les diferents isoformes semblen expressar-se coincidint amb els nivells més elevats de 20E, en concordança amb el fet que E75 és un receptor nuclear induïble per aquesta hormona (Karim i Thummel, 1992; Zhou *et al.*, 1998; Pierceall *et al.*, 1999; Dubrovsky *et al.*, 2004). Tot i això hi ha algunes excepcions, com és el cas de DmE75C que només s'expressa durant les fases de prepupa i pupa (Sullivan i Thummel, 2003).

Si comparem els patrons d'expressió d'aquests insectes holometàbols amb els d'un hemimetàbol com és *B. germanica*, observem que en cap cas la seqüència d'activació que sembla repetir-se en cada fase de *B. germanica* està conservada en els holometàbols. Aquest fet encaixa amb el concepte que en un insecte primitiu, com és *B. germanica*, el creixement i la maduració són dos processos que es donen alhora, a través de successives fases nimfals amb patrons hormonals molt repetitius, mentre que en els insectes de metamorfosi completa, com són dípters i lepidòpters, els processos de creixement (fases larvàries), i els de maduració (fase de pupa) estan separats en el temps. Per tant, en aquests insectes l'expressió dels gens implicats en la resposta hormonal i els propis patrons hormonals difereixen dels d'insectes més basals (Truman i Riddiford, 1999, 2002). Per últim, és important remarcar que només en el cas de *M. sexta* es descriuen els nivells d'expressió per E75 en un teixit concret com és la epidermis abdominal, mentre que per *D. melanogaster* i *A. aegypti* es descriuen els patrons a partir d'extractes d'RNA totals, la qual cosa podria emascarar patrons específics d'un teixit.

4.3.3. Efecte de la 20E sobre l'expressió de BgE75 *in vitro*

La influència de la 20E sobre l'expressió de BgE75 es va estudiar mitjançant la incubació de cossos grassos *in vitro* de femelles de sisena fase nimfal. L'objectiu era comprovar si la 20E induïa l'expressió de les diferents isoformes d'aquest receptor i de

quina manera ho feia, ja que la bibliografia consultada i els patrons d'expressió de les isoformes d'E75 a *B. germanica* així ho suggerien. Els resultats obtinguts van demostrar que les isoformes BgE75A, -B, -C i -E s'activaven directament per 20E a les poques hores d'incubació, mentre que l'expressió de BgE75D no es veia afectada per aquesta hormona (Fig. 4.3). També vam veure que, en les nostres condicions d'incubació, BgE75A s'activava més ràpidament que BgE75B i -E, mentre que BgE75C semblava activar-se molt poc (Fig. 4.3). D'altra banda, el tractament conjunt amb 20E i chx provocava una activació més gran i més ràpida d'aquests quatre trànscrits, la qual cosa suggereix que la 20E els activa de forma directa. A més, aquest patró d'hiperactivació degut al tractament amb 20E i chx, implica l'existència d'un factor depenent de síntesi proteica que seria l'encarregat de controlar l'expressió d'aquestes isoformes, reprimint-les. En treballs previs s'ha descrit que el propi factor sol ser qui pot inhibir-se a ell mateix limitant així, la seva pròpia expressió (Thummel, 1995; Dubrovsky *et al.*, 2004).

Fins al moment, només s'han publicat estudis de regulació hormonal del factor E75 en insectes holometàbols. Mitjançant incubacions de teixits o amb l'ús de línies cel.lulars en aquestes espècies s'ha demostrat que E75 s'activa per 20E a les poques hores del tractament, però que cada isoforma en cada espècie presenta una regulació característica que no sempre coincideix amb les observades en el nostre insecte.

Així, E75A és la isoforma que en tots els insectes estudiats, incloent-hi *B. germanica*, s'activa per 20E, i que en la majoria dels casos ho fa de forma ràpida i directa (Karim i Thummel, 1992; Jindra *et al.*, 1994; Palli *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998; Pierceall *et al.*, 1999; Swevers *et al.*, 2002; Dubrovsky *et al.*, 2004). Això encaixaria amb el fet que E75A s'expressi coincidint amb els pics de 20E que trobem al llarg del desenvolupament dels insectes, tant holometàbols com hemimetàbols. Cal remarcar que en la línia cel.lular S2 de *D. melanogaster*, DmE75A, i també DmE75D, s'activen tant amb 20E com amb metoprè, un dels anàlegs de l'HJ (Dubrovskaya *et al.*, 2004; Dubrovsky *et al.*, 2004). Aquests són els únics treballs on es descriu una activació directa d'E75 per part d'un anàleg de la HJ. D'altra banda, mitjançant incubacions d'epidermis a *M. sexta* s'ha observat un efecte sinèrgic de la HJ en la inducció d'E75A per 20E (Zhou *et al.*, 1998). Nosaltres no hem estudiat aquest possible efecte a *B.*

germanica, però en els patrons d'expressió que es van obtenir sembla que aquest transcrit respònd principalment a la 20E (Fig. 4.2).

Pel que fa a la isoforma E75B, s'ha demostrat que s'indueix directament per 20E a *D. melanogaster* i *A. aegypti*, de manera semblant a allò que s'observa a *B. germanica* (Karim i Thummel, 1992; Pierceall *et al.*, 1999; Dubrovsky *et al.*, 2004). D'altra banda, una de les isoformes que sembla respondre pitjor a la 20E és E75C. Aquesta isoforma mostra poca o nula activació per la 20E en funció del model estudiat (Karim i Thummel, 1992; Pierceall *et al.*, 1999; Swevers *et al.*, 2002; Dubrovskaya *et al.*, 2004; Dubrovsky *et al.*, 2004). S'ha vist que E75C només s'activa per 20E en cultius d'òrgans a *D. melanogaster* (Karim i Thummel, 1992), mentre que a *A. aegypti*, *B. mori* i *M. sexta* no s'activa. Aquest resultat sembla indicar que E75C en holometàbols i hemimetàbols no tindria les mateixes funcions, i encaixaria amb el fet que en aquests dos grans grups d'insectes els patrons d'expressió d'E75C són diferents. Així, a *B. germanica* E75C s'expressa en totes les fases quan els nivells de 20E són baixos i abans que BgE75A, i la seva activació sembla estar bloquejada per algun factor depenent de síntesi proteica o per dosis de 20E molt elevades (Figs. 4.2 i 4.3).

D'altra banda, la isoforma E75D fins ara només s'havia estudiat en dues espècies de holometàbols, i la seva regulació hormonal no està clara. Mentre que a *D. melanogaster* DmE75D s'activa per 20E i per metoprè, a *M. sexta* passa el contrari (Dubrovskaya *et al.*, 2004). Però en un altre treball fet amb incubacions d'epidermis de *M. sexta* in vitro, sembla que E75D només s'activa per 20E i en canvi no s'activa per HJ (Keshan *et al.*, 2006). Els nostres resultats indicarien que al nostre insecte i en les nostres condicions d'incubació, aquesta isoforma no s'activa per 20E i que estaria reprimida directament per algún factor no depenent d'aquesta hormona (Fig. 4.3). Finalment, val a dir que la regulació hormonal de la isoforma E75E no havia estat estudiada en cap insecte. Nosaltres hem vist que la seva regulació és molt semblant a l'observada en les isoformes BgE75A, i BgE75B, és a dir s'activa directament per ecdisona.

**5. ANÀLISI FUNCIONAL DEL
RECEPTOR NUCLEAR BgE75
MITJANÇANT RNAi *in vivo***

5.1. ANTECEDENTS

Aquest capítol descriu els estudis funcionals del receptor nuclear BgE75, utilitzant la tècnica de RNAi *in vivo*. El treball es centra en estudiar el paper de BgE75 durant la sisena fase nimfal i la transició a la fase adulta del nostre insecte model, ja que és l'únic moment on es produeixen canvis metamòrfics semblants als que tenen lloc en la fase de pupa dels insectes holometàbols.

Durant la sisena fase nimfal, que a *B. germanica* dura 8 dies, els nivells de 20E regulen molt precisament els processos que permeten la muda a la fase adulta. Així, la nimfa recentment emergida a la sisena fase comença a alimentar-se i a produir 20E a uns nivells basals. Cap al cinquè dia de la fase nimfal els nivells de 20E augmenten ràpidament, la qual cosa provoca que la nimfa deixi d'alimentar-se i s'iniciï la síntesi de la cutícula adulta. Coincidint amb els nivells màxims de 20E, al sisè dia, es dona la apòlisi de la cutícula nimfal, i un dia més tard aquesta cutícula és digerida. Finalment, i coincidint amb la caiguda dels nivells d'ecdisteroides es dona la ècdisi, que ve acompanyada d'una sèrie de moviments que permeten a la nimfa despendre's de la exuvia nimfal (Zitnan i Adams, 2005). A *B. germanica*, l'entrada a la fase adulta determina també el canvi de programa genètic i s'inicien una sèrie de processos que són exclusius d'aquesta fase. Un dels més importants és la vitel·logènesi, que a *B. germanica* està regulada per l'HJ (Martin *et al.*, 1998; Comas *et al.*, 2001).

En capítols previs hem demostrat que *BgE75* és un gen que s'expressa durant la sisena fase nimfal i que, a més és induït directament per la 20E i el seu receptor (Cruz *et al.*, 2006). Així, el següent pas és estudiar els processos en els que pot estar implicat aquest receptor nuclear, amb atenció especial al procés de muda, ja que en el nostre grup d'investigació ja hem demostrat la implicació dels receptors nuclears BgEcR-A, BgRXR, BgHR3 i BgFTZ-F1 en aquest procés (Cruz, 2006; Cruz *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007).

Fins al moment, només s'ha descrit el mutant d'E75 a *D. melanogaster* i s'ha vist que l'absència d'aquest factor determina retards tan en el desenvolupament embrionari com durant les diferents fases larvàries (Bilder i Scott, 1995; Bialecki *et al.*, 2002). Per

últim, s'ha implicat a DmE75A i DmE75B en el control de la mort de les cèl·lules nodridores de l'òcit de *D. melanogaster* (Terashima i Bownes, 2006).

5.2. RESULTATS

5.2.1. La interferència de RNA redueix els nivells de missatger de BgE75 en diferents teixits de *B. germanica*

Per estudiar la funció de BgE75 durant el desenvolupament nimfal de *B. germanica* es van reduir específicament els nivells de missatger de BgE75 mitjançant RNAi *in vivo*. Aquesta tècnica ha estat prèviament posada a punt i utilitzada en l'estudi funcional dels dos components del receptor d'ecdisona, BgEcR-A i BgRXR (Cruz *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006), i en el receptor nuclear BgHR3 (Cruz *et al.*, 2007).

Així, es va sintetitzar un RNA de doble cadena (dsRNA) de 612 parells de bases (denominat dsBgE75-1, vegeu fig. 5.1A) que corresponien a la regió frontissa i al LBD de BgE75. Aquest fragment era comú a totes les isoformes i, per tant, hauria de ser capaç de silenciar-les totes a l'hora.

En els primers experiments s'injectava 1 µg de dsBgE75-1 a femelles de sisena fase recentment emergides, i s'analitzaven, mitjançant RT-PCR/Southern Blot, els nivells de BgE75 sis dies més tard. Els teixits on s'estudiava l'efecte de la interferència van ser la glàndula protoràcica i l'epidermis dorsal amb el seu corresponent cos gras adherit. Com a control negatiu s'injectava 1 µg de RNA de doble cadena inespecífic (dsControl) tal i com es descriu en el capítol de material i mètodes (apartat 2.18). Com s'observa a la figura 5.1B, els nivells de BgE75 es reduïen clarament en tots els teixits estudiats ens les nimfes tractades amb dsBgE75-1, en comparació amb les dsControl. També es van poder estudiar els nivells de BgRXR i de BgEcR-A, i el que es va observar és que aquests pràcticament no canviaven.

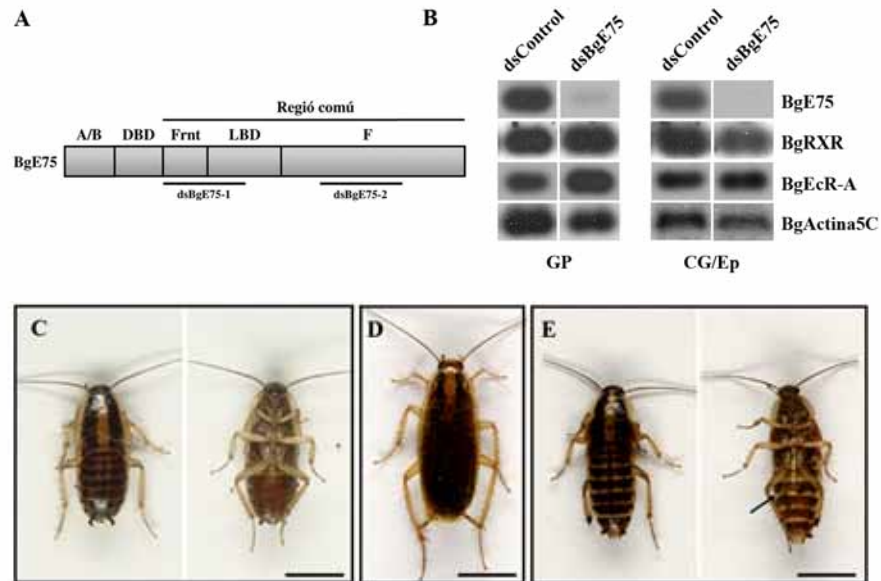


Figura 5.1.- Interferència del receptor nuclear BgE75 mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo* en femelles de sisena fase nimfal de *B. germanica*. (A) Esquema de BgE75 on es mostren les regions utilitzades per preparar els dsRNAs. (B) Efecte del tractament amb dsBgE75-1 sobre els nivells de mRNA de BgE75, BgRXR, BgEcR-A i BgActina5C. S'injectava 1 μ g de dsBgE75-1, o bé dsControl com a control negatiu, a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides i es mesuraven els nivells de mRNA sis dies després per RT-PCR/Southern Blot a la glàndula protoràcica (GP) i a l'epidermis amb el seu cos gras adherit (CG/Ep). Els nivells de BgActina5C es van mesurar com a referència. Els Southern/Blots són representatius d'almenys 10 individus diferents. (C-E) Fenotip que resulta del tractament amb dsBgE75-1. S'injectava 1 μ g de dsBgE75-1, o bé dsControl com a control negatiu, a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides. Al cap de 8 dies, les nimfes injectades amb dsControl (C) mudaven a adult (D), mentre que les nimfes tractades amb dsBgE75-1 no mudaven, restant com a nimfes de sisena fase. A (E) es pot observar l'aspecte d'una nimfa tractada amb dsBgE75-1, 14 dies després de la injecció on destaca l'abdomen clarament expandit (fletxa). Escala: 0,5 mm.

5.2.2. Anàlisi fenotípica de les nimfes de sisena fase interferides per BgE75

Un cop demostrada l'efectivitat del silenciament de l'expressió del receptor BgE75 mitjançant la tècnica de RNAi *in vivo*, es varen estudiar les seves funcions mitjançant la injecció d'1 µg de dsBgE75-1 o 1 µg de dsControl a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides. Així, les nimfes tractades amb dsBgE75-1 progressaven normalment al llarg dels 8-9 dies que dura la sisena fase. No obstant, al final de la fase, el 92% de les nimfes tractades amb dsBgE75-1 (n= 412) no mudaven a adult i seguien vivint perfectament com a nimfes fins a 80-110 dies, abans de morir.

Per confirmar aquest resultat es va dur a terme el mateix experiment utilitzant un segon fragment de dsRNA per a la interferència de BgE75. En aquest cas, es tractava del fragment BgE75-2 (Fig 5.1A), de 613 parells de bases dins la regió F d'aquest receptor nuclear. Els resultats obtinguts van ser molt similars, amb un 95% (n= 82) de les nimfes tractades que no mudaven a adult i es mantenien com a nimfes durant més de 80 dies. D'altra banda, el 100% de les nimfes tractades amb dsControl mudaven a adult al vuitè dia després del tractament (n= 252). A la figura 5.1 es compara l'aspecte de una nimfa tractada amb dsBgE75-1 de 14 dies d'edat (Fig. 5.1E), amb el d'una nimfa dsControl de 8 dies unes hores abans de mudar a adult (Fig. 5.1C), i una femella adulta dsControl de 3 dies d'edat (Fig. 5.1D). Com es pot observar, l'aspecte extern de les nimfes dsBgE75-1 era més semblant al d'una nimfa de sisena fase, que no pas al d'una femella adulta, com li podria correspondre cronològicament. Les nimfes interferides amb dsBgE75-1 es mantenien com a nimfes de sisena fase, amb la diferència que tenien l'abdomen molt més inflat (Fig 5.1E, fletxa), i les ales, que estaven sense desplegar, eren de color més fosc que les de les nimfes dsControl. Una característica de les nimfes tractades amb dsBgE75-1 era que seguien alimentant-se durant més dies que les nimfes dsControl, les quals deixaven de menjar aproximadament al cinquè dia de sisena fase nimfal, per preparar-se per la muda imaginal.

El següent pas fou la caracterització en més detall del fenotip obtingut. En primer lloc es van obtenir talls histològics de la cutícula i l'epidermis de femelles dsBgE75-1 o dsControl de 8 dies d'edat. Es va escollir aquest dia perquè és el punt en què les nimfes de sisena fase de *B. germanica* completen l'ècdisi. Com s'aprecia en la

figura 5.2A i 5.2B, les nimfes dsControl tenien la cutícula adulta, amb la corresponent endocutícula i exocutícula perfectament formades per sota de la nimfal. Per contra, les nimfes tractades amb dsBgE75-1 no presentaven cap indicatiu de deposició de la cutícula adulta, i només es podia diferenciar la cutícula nimfal que no havia estat digerida (Fig 5.2B).

Seguidament, es va examinar la proliferació de les cèl·lules fol·liculars que envolten els oòcits basals. A *B. germanica*, la proliferació d'aquestes cèl·lules durant la darrera fase nimfal es correlaciona bé amb l'increment d'ecdisteroides circulants (Cruz *et al.*, 2006). A l'entrada de la sisena fase, el número de cèl·lules fol·liculars està al voltant de 500 a l'oòcit basal. Al cap de 3 dies, aquest número és lleugerament superior, al voltant de 650, però coincidint amb el pic d'ecdisona que és dona entre els dies 5 i 7, el número de cèl·lules fol·liculars augmenta dràsticament fins a unes 4000 cèl·lules al final de la fase (Fig. 5.2C). Es va estudiar el número de cèl·lules fol·liculars dels oòcits basals de les nimfes tractades amb dsBgE75-1 al vuitè dia de la sisena fase, respecte les nimfes dsControl de la mateixa edat. Es va poder comprovar que les nimfes dsBgE75-1 tenien, significativament, menys cèl·lules fol·liculars al voltant de l'oòcit basal respecte les dsControl (Fig 5.2D i E), la qual cosa feia que els oòcits de les nimfes dsBgE75-1 fossin clarament més petits (número de cèl·lules a l'oòcit basal de les nimfes dsControl $N_{6d8} = 3240 \pm 170$, $n=6$; dsE75-1 $N_{6d8} = 1651 \pm 136$, $n=10$. $t\text{-test} \leq 1,4372 \times 10^{-5}$).

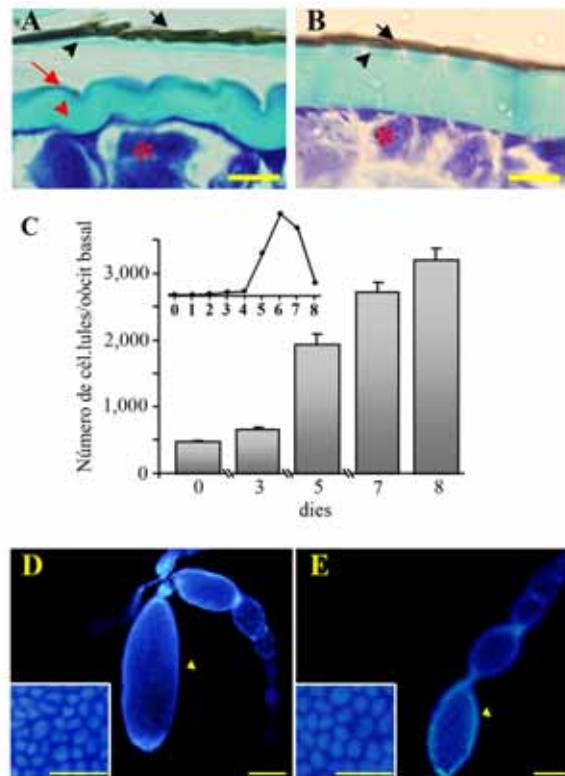


Figura 5.2.- Efecte de la interferència de BgE75 sobre l'estructura de l'epidermis i l'epiteli fol·licular de l'òcit basal de *B. germanica*. S'injectava 1 µg de dsBgE75-1 o dsControl a femelles recentment emergides de sisena fase nimfal. Al cap de 8 dies es van preparar seccions histològiques de les cutícules dels individus dsControl (A) i dels dsBgE75-1 (B). A les fotos s'indica la epicutícula (fletxes), endocutícula (triangles), i epidermis (asteriscs). Les fletxes i triangles negres indiquen epicutícula i endocutícula nimfals. (C) Número de cèl.lules fol·liculars en l'òcit basal de nimfes de sisena fase tractades amb 1 µg de dsControl. Es determinava el número de cèl.lules fol·liculars a l'òcit basal d'aquestes nimfes a diferents edats. El gràfic inserit indica els nivells d'ecdisteroides hemolimfàtics durant aquesta fase. (D) Tinció DAPI d'un ovariol d'una nimfa de sisena fase de 8 dies d'edat de *B. germanica* tractada amb 1 µg de dsControl (D) o dsBgE75-1 (E). Els triangles de color groc indiquen l'òcit basal. Als requadres petits inferiors es mostren en detall les cel·lules fol·liculars que envolten l'òcit basal. Escales: imatges A i B, 10 µm; imatges D i E, 100 µm; detalls en D i E, 25 µm.

5.2.3. Nivells d'ecdisteroides en les nimfes de sisena fase interferides per BgE75

Tots els processos afectats per la reducció de la funció de BgE75 que hem descrit (muda, síntesi de nova cutícula i proliferació de l'epiteli fol·licular) són processos que, a *B. germanica*, estan regulats per l'increment de 20E que es dona al final de la sisena fase nimfal (Cruz *et al.*, 2006). Aquests resultats suggeririen doncs, que l'absència de BgE75 en les nimfes interferides podria provocar una deficiència en els nivells d'ecdisteroides circulants. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, es va mesurar i comparar mitjançant ELISA els nivells d'ecdisteroides hemolimfàtics entre els dies 4 i 8 de la sisena fase nimfal de les nimfes dsControl i les dsBgE75-1. Aquest interval és el període durant el qual es dona l'increment d'ecdisteroides circulants (Cruz *et al.*, 2003).

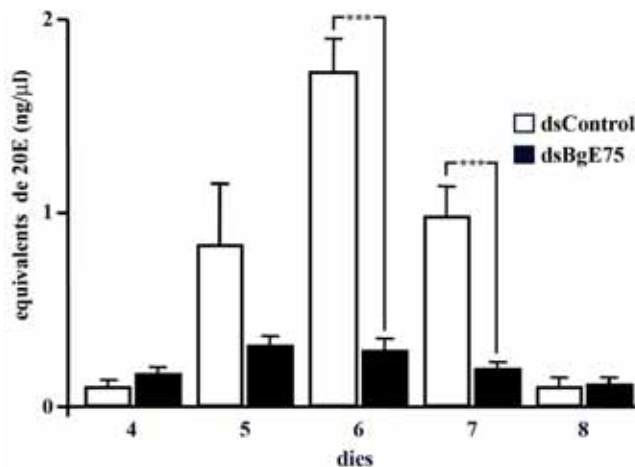


Figura 5.3.- Efecte de la interferència de BgE75 sobre els nivells d'ecdisteroides durant la sisena fase nimfal a *B. germanica*. Es va recollir l' hemolimfa de les nimfes de sisena fase tractades amb 1 μg de dsControl o dsBgE75-1 durant el període de temps indicat i es van mesurar els ecdisteroides circulants mitjançant ELISA. Els resultats s'expressen com a equivalents de 20-hidroxicdisona (20E). Les barres verticals indiquen la SEM (n= 6-21). Els asteriscs indiquen diferències significatives estadísticament (test-*t*, $p \leq 0.0001$).

La figura 5.3 il·lustra aquests resultats; mentre els nivells d'ecdisteroides hemolimfàtics en les nimfes dsControl seguien el patró característic que es dona a la sisena fase, amb un pic màxim el dia 6, les nimfes tractades amb dsBgE75-1 presentaven uns nivells d'ecdisteroides circulants molt baixos al llarg de tota la fase

Si la reducció d'ecdisteroides circulants era la raó per la qual les nimfes tractades amb dsBgE75 no mudaven, potser es podria corregir aquest fenotip mitjançant la injecció de 20E. Per comprovar aquesta hipòtesi vam dissenyar un experiment en el qual injectàvem diferents dosis de 20E a nimfes de sisena fase de sis dies d'edat, interferides amb dsBgE75-1. Vam injectar la 20E aquest dia perquè és quan els nivells d'ecdisteroides en hemolímfa són màxims a les nimfes dsControl. Tal i com s'aprecia a la figura 5.4, cap de les nimfes dsBgE75-1 tractades amb 1 i 5 µg de 20E presentaven cap signe evident de muda, i restaven com a nimfes de sisena fase. En canvi, el 50% de les nimfes dsBgE75-1 tractades amb 10 µg de 20E, i el 100% de les tractades amb 20 µg de 20E, aturaven el desenvolupament el vuitè dia de sisena fase nimfal. Aquestes nimfes es caracteritzaven per no poder desplaçar-se, i perquè presentaven duplicació de totes les estructures d'origen ectodèrmic com, per exemple, dobles tràquees (Fig. 5.4B), dobles mandíbules (Fig. 5.4C), o doble cutícula. Finalment, aquests insectes morien a les poques hores després d'haver duplicat les estructures.

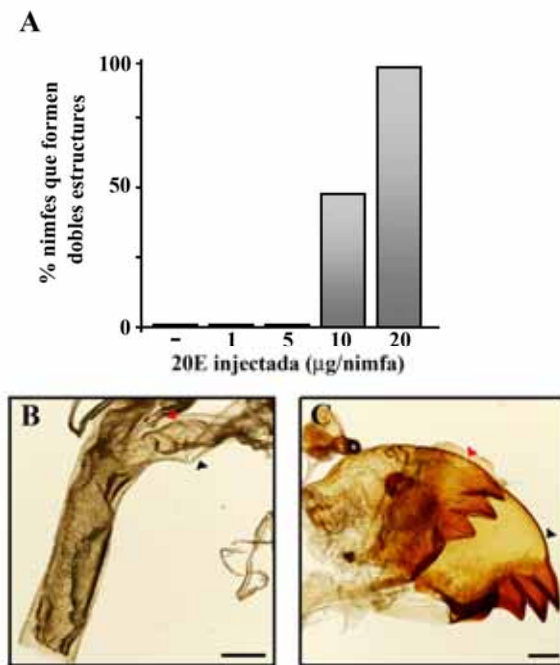


Figura 5.4.- Efecte de la injecció de 20-hidroxiectidisona (20E) sobre nimfes de *B. germanica* tractades amb dsBgE75. Es va injectar 1 μg de dsBgE75-1 a femelles de sisena fase acabades d'emergir. Cinc dies després, se'ls injectava 1, 5, 10 o 20 μg de 20E, o 10% d'etanol com a control negatiu. (A) Percentatge de nimfes dsBgE75 que aturaven el desenvolupament en la transició nimfa-adult formant dobles estructures, després de la injecció de 20E o 10% d'etanol. Per cada dosi es van usar de 10 a 20 insectes. (B i C) Les nimfes tractades amb dsBgE75 presentaven duplicació de les estructures d'origen ectodèrmic, com ara les tràquees (B) i les mandíbules (C). Els triangles de color negre indiquen les estructures nimfals, mentre que els de color vermell indiquen les tràquees i les mandíbules adultes. Escala: 100 μm .

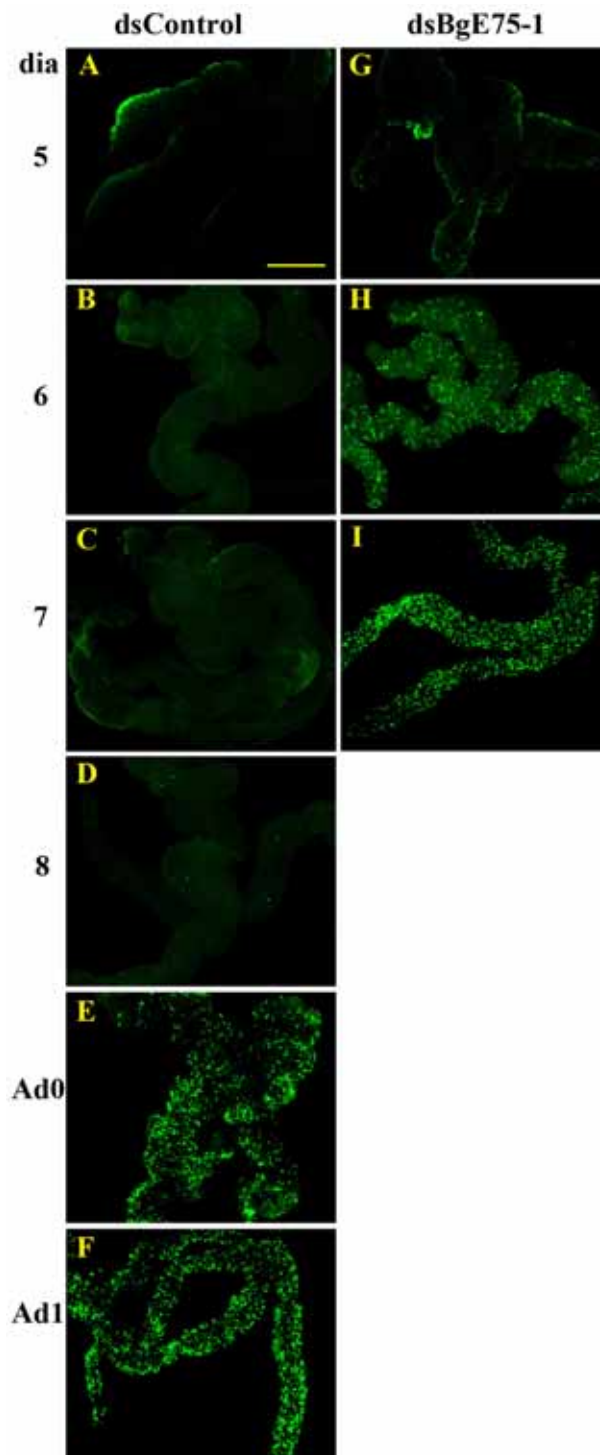
5.2.4. BgE75 regula la degeneració de la glàndula protoràcica en la transició nimfa-adult

Per intentar descobrir el motiu pel qual els insectes tractats amb dsBgE75 presentaven uns nivells tant baixos d'ecdisteroides circulants, vam examinar la morfologia de les glàndules protoràciques, responsables de la síntesi d'ecdisteroides al final de la sisena fase nimfal. Remarcablement, les glàndules de les nimfes tractades amb dsBgE75 semblaven degenerades, eren molt menys turgents que les glàndules dels insectes dsControl de la mateixa edat i, a més, la densitat cel.lular era menor. Per analitzar-ho en més detall, vam tenyir aquestes glàndules protoràciques amb l'assaig TUNEL. Aquest assaig permet detectar la mort cel.lular, perquè marca amb fluorescència la fragmentació del DNA característica d'aquest procés. Per aquest experiment vam utilitzar nimfes de sisena fase tractades amb 1 µg de dsBgE75 o dsControl a l'inici de la fase, i s'analitzava per TUNEL la glàndula protoràcica a partir del cinquè dia. Com era d'esperar, les glàndules dsControl no presentaven marcatge per TUNEL en tota la sisena fase nimfal (Fig. 5.5A-D), i només quan mudaven a adult les seves glàndules presentaven un marcatge fort i uniforme, i aquesta quedava totalment degenerada 24 h més tard (Fig. 5.5E i F). Per contra, les glàndules protoràciques de les nimfes tractades amb dsBgE75 tenien un marcatge fort a partir del dia 6 de la sisena fase nimfal, és a dir, 72 h abans que en els dsControl (Fig. 5.5G-I). Aquest resultat mostren clarament que en absència de BgE75, la glàndula protoràcica degenera de forma prematura, coincidint amb el moment que aquesta glàndula hauria d'estar produint ecdisteroides massivament.

5.2.5. Les nimfes de sisena fase interferides per BgE75 inicien el programa genètic d'adult, tot i no fer la muda imaginal

Durant la fase adulta de la femella de *B. germanica* tenen lloc processos relacionats amb la reproducció, que tant sols es donen en aquest estadi del desenvolupament (Comas *et al.*, 2001). Així, durant la fase adulta, el cos gras de la femella de *B. germanica* sintetitza una gran quantitat de vitellogenina, que és alliberada a l'hemolimfa i que és incorporada posteriorment a l'òcit en creixement, on s'emmagatzema per a ser usada per l'embrió (Martin *et al.*, 1995). En aquest context, es va dissenyar un experiment per veure si el cos gras de les nimfes interferides amb dsBgE75-1 expressava el gen de la vitellogenina (*BgVg*) quan aquestes nimfes tenien 14 dies d'edat, és a dir, allò que correspondria a una femella adulta de 5 dies d'edat. Tal i com mostra la figura 5.6A, el missatger de la *BgVg* és indetectable en una nimfa dsControl de 8 dies d'edat, i es comença a expressar 24 h després de la muda imaginal (Fig 5.6A, carrils N6d8 i Ad-d1), mentre que les nimfes tractades amb dsBgE75-1 de 14 dies d'edat tenien nivells de mRNA de *BgVg* similars als que es troben en una femella adulta dsControl de 3 dies d'edat (Fig 5.6A, comparar carrils Ad-d3 i N6d14). A més, la proteïna *BgVg* es detectava igualment a l'hemolimfa i als ovaris d'aquestes nimfes dsBgE75-1, de la mateixa manera que la podíem detectar en femelles adultes dsControl (Fig 5.6B, C i D).

Figura 5.5.- Efecte de la interferència de BgE75 sobre la degeneració de la glàndula protoràcica a *B. germanica*. Es va injectar 1 µg de dsBgE75-1 o dsControl a femelles de sisena fase acabades d'emergir. A partir del cinquè dia, la glàndula protoràcica es sotmetia a l'assaig TUNEL per determinar el grau de mort cel·lular associada a fragmentació del DNA nuclear. Marcatge per TUNEL de glàndules protoràciques de nimfes i femelles adultes tractades amb dsControl (A-F), o tractades amb dsBgE75-1 (G-I). Escala: 200 µm.



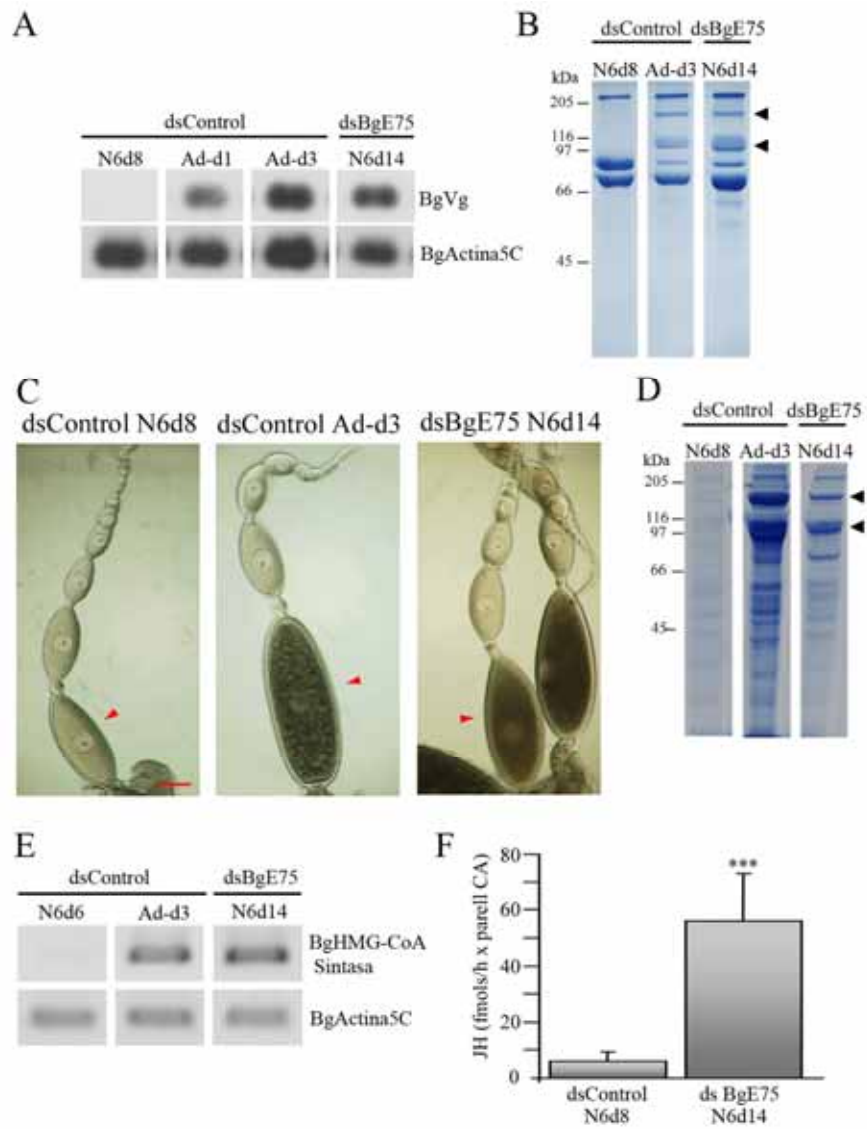
El segon procés que vam estudiar va ser la producció d'HJ en els *corpora allata*, que són glàndules retrocerebrals que s'encarreguen de produir aquesta hormona. L'HJ és el senyal que permet a la femella de *B. germanica* iniciar la vitel·logènesi un cop ha entrat a la fase adulta (Comas *et al.*, 1999, , 2001). Concretament, l'HJ determina l'activació del gen de la *BgVg* i llur incorporació als oòcits en creixement. Un dels enzims claus en la síntesi de l'HJ és la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzim-A sintasa (HMG-CoA sintasa) (Casals *et al.*, 2001; Bellés *et al.*, 2005). Així, per confirmar que les nimfes dsBgE75 de 14 dies d'edat havien entrat en programa genètic adult vam fer incubacions de *corpora allata* per veure si produïen HJ i també vam mesurar els nivells d'HMG-CoA sintasa per RT-PCR/Southern blot. Amb aquests propòsits, vam injectar 1µg de dsControl o dsBgE75-1 a nimfes de sisena fase recentment emergides, i vam dissecar els *corpora allata* després d'alguns dies per tal d'analitzar-los. Com es pot veure en la figura 5.6E, els nivells de mRNA de la HMG-CoA sintasa eren alts a les nimfes tractades amb BgE75-1, similars als que té una femella adulta dsControl de 3 dies. En canvi, en una nimfa de sisena fase tractada amb dsControl els nivells d'aquest enzim són indetectables, en concordància amb el fet que les nimfes de sisena fase no produeixen HJ. Tal i com s'esperava, les incubacions dels *corpora allata* d'aquests insectes van confirmar que produïen HJ a unes taxes comparables a les que produeix una femella adulta de entre 1 i 3 dies d'edat (Maestro i Belles, 2006), mentre que una nimfa dsControl de sisena fase no en produïa pas (Fig 5.6F).

5.2.6. La interferència específica de cadascuna de les isoformes del receptor BgE75 indica que són redundants

Com s'ha vist en capítols previs, el receptor nuclear E75 de *B. germanica* té 5 isoformes que s'expressen diferencialment al llarg del desenvolupament post-embriònic. Mitjançant la tècnica de RNAi *in vivo*, també hem vist que la manca del receptor BgE75 provoca la degeneració prematura de la glàndula protoràcica, la qual cosa impedeix la síntesi d'ecdisteroides, de manera que la nimfa no pot fer la muda

imaginal. Però aquests experiments s'han portat a terme mitjançant la interferència de totes les isoformes a l'hora, amb un dsRNA dissenyat a una zona comuna a totes elles (Fig. 5.1A).

Figura 5.6.- Inici del programa genètic propi de la fase adulta en nimfes de sisena fase de *B. germanica* tractades amb dsBgE75. Es va injectar 1 µg de dsBgE75-1 a femelles de sisena fase acabades d'emergir. Catorze dies després de la injecció (N6d14) s'analitzava l'expressió de marcadors específics de la etapa adulta. Aquestes nimfes es comparaven amb femelles de sisena fase nimfal de 8 dies d'edat que s'havien tractat amb 1 µg de dsControl com a control negatiu (N6d8), o bé amb femelles adultes de 3 dies d'edat dsControl com a control positiu (Ad-d3). (A) Nivells de mRNA de vitellogenina (BgVg) en el cos gras de les nimfes dsBgE75-1. S'extreia l'RNA a les edats indicades per cada tractament i s'analitzaven mitjançant RT-PCR/Southern Blot amb sondes específiques per la BgVg. Els resultats que es mostren són representatius de 8 individus diferents. (B) SDS-PAGE d'hemolimfa de nimfes dsControl de sisena fase de 8 dies (N6d8), femelles adultes dsControl de 3 dies (Ad-d3) i nimfes dsBgE75-1 de 14 dies. Els triangles negres indiquen les diferents subunitats de la BgVg. (C i D) Els ovaris de les nimfes interferides per BgE75 incorporen BgVg als oòcits basals. En l'apartat C es poden observar els ovaris dels insectes de l'apartat B montats en glicerol al 50%. Els triangles indiquen l'oòcit basal. Escala: 250 µm. (D) SDS-PAGE de 0.25 equivalents d'ovari dels mateixos individus que en els apartats B i C. En aquest cas, els triangles negres indiquen les subunitats de la vitel.lina. (E) Nivells de BgHMG-CoA sintasa en els *corpora allata* dels mateixos insectes. S'extreia el RNA corresponent a un parell de *corpora allata* dels individus indicats i s'analitzaven per RT-PCR/Southern Blot utilitzant una sonda específica per a BgHMG-CoA sintasa. Com a referència es van mesurar els nivells de BgActina5C. (F) Comparació de la HJ produïda pels *corpora allata* de les nimfes dsBgE75-1 de 14 dies d'edat i les femelles de sisena fase nimfal dsControl de sis dies d'edat com a control negatiu (N6d6). Es van fer sis mesures per cada tractament.



Per tal d'esbrinar quina de les isoformes era responsable d'aquest fenotip, o bé si actuaven de manera redundant en aquesta funció es van dissenyar dsRNAs contra les regions A/B dels receptors per tal de silenciar-los individualment. En primer lloc es va injectar 1-5 µg de dsRNA a nimfes de sisena fase recentment emergides per comprovar que la interferència era efectiva. Per fer-ho, es mesuraven els nivells de la isoforma silenciada a la glàndula protoràcica el dia que aquella isoforma presentava una expressió màxima. La figura 5.7 mostra com la interferència era efectiva en tots els casos i que podíem silenciar cadascuna de les isoformes específicament. En segon lloc vam estudiar quin era l'efecte individual d'aquests dsRNAs sobre la muda. Així, es van fer diferents experiments on s'injectaven d'1 a 5 µg de dsRNA a nimfes de sisena fase recentment emergides per tal de veure si el silenciament d'una sola isoforma afectava la muda. En tots els casos les nimfes mudaven a la fase adulta sense problemes aparents (n= 95 per dsBgE75A; n= 57 per dsBgE75B; n= 87 per dsBgE75C; n= 44 per dsBgE75D; n=50 per dsBgE75E), la qual cosa suggeria que aquestes isoformes actuaven de manera redundant durant aquesta fase nimfal.

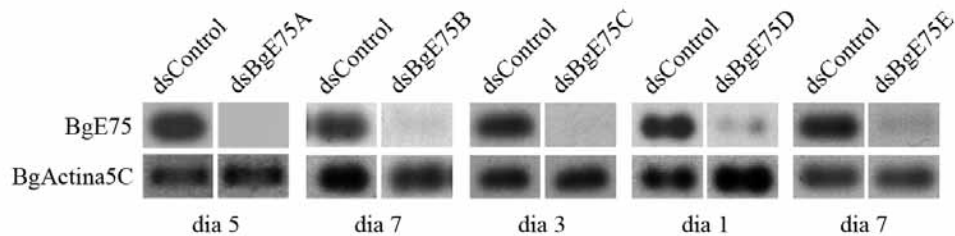


Figura 5.7.- Interferència específica de cadascuna de les isoformes del receptor BgE75 en la glàndula protoràcica de *B. germanica*. Es van seleccionar femelles de sisena fase nimfal acabades d'emergir i se'ls va injectar 1 µg de dsControl o 1 µg de dsRNA específic per una de les 5 isoformes de BgE75 (dsBgE75A, dsBgE75B, dsBgE75C, dsBgE75D o dsBgE75E). Per cada isoforma s'analitzaven els nivells de mRNA per RT-PCR/Southern Blot el dia de màxima expressió de la isoforma interferida. Com a referència es van mesurar els nivells de BgActina5C. Els resultats són representatius d'entre 5 i 8 individus per cadascun dels tractaments.

Per últim, ens vam centrar en estudiar els efectes del silenciament de la isoforma E75A perquè és la que té una expressió més semblant a la del pic de 20E i, a més en un dels pocs treballs publicats fins ara sobre mutants d'E75, aquesta isoforma és la única que afecta la muda (Bialecki *et al.*, 2002). En el següent experiment doncs, vam injectar 1 µg de dsBgE75A o dsControl a nimfes de sisena fase recentment emergides i vam analitzar els nivells de les 5 isoformes del receptor BgE75 als 5 dies de l'injecció, és a dir, quan els nivells d'expressió de BgE75A són màxims. Com s'observa a la figura 5.8, en interferir BgE75A es donava un increment moderat en els nivells de BgE75B i molt acusat de BgE75C, mentre que les altres dues isoformes de BgE75 no semblaven veure's afectades per la interferència específica. De la mateixa manera tampoc es veia afectada l'expressió de BgRXR i BgActina5C.

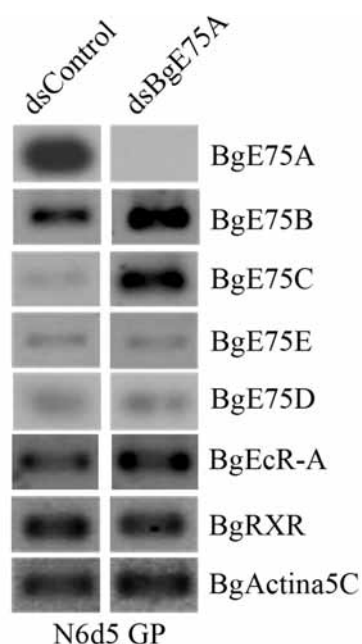


Figura 5.8.- Efecte de la interferència específica de la isoforma BgE75A en la glàndula protoràcica sobre l'expressió de les altres isoformes a *B. germanica*. Es van seleccionar femelles de sisena fase nimfal acabades d'emergir i se'ls va injectar 1 µg de dsControl o 1 µg de dsBgE75A. Al cap de 5 dies es van dissecar les glàndules protoràciques i es van mesurar per RT-PCR/Southern Blot els nivells de totes les isoformes de BgE75 així com els dels receptors BgRXR i BgEcR-A. Com a referència es van mesurar els nivells de BgActina5C. Els resultats són representatius d'entre 6 i 10 individus per cadascun dels tractaments.

5.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha estudiat en profunditat la funció del receptor BgE75 durant la darrera fase nimfal de *B. germanica*, mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*. Gràcies a aquesta tècnica, i mitjançant l'ús d'un dsRNA dissenyat contra una regió comuna a totes les isoformes, s'han pogut disminuir notablement els nivells de mRNA de BgE75. Del silenciament de BgE75 durant aquesta fase nimfal n'ha resultat un fenotip molt acusat en el sentit que les nimfes tractades amb dsBgE75 no muden a la fase adulta i, a més, poden seguir vivint com a nimfes fins a 100 dies abans de morir. En analitzar detalladament aquests insectes, hem vist que presenten uns nivells remarcablement baixos d'ecdisteroides circulants. Després hem demostrat que la causa d'aquesta deficiència és una degeneració prematura de la glàndula protoràcica. D'altra banda, hem constatat que aquestes nimfes de sisena fase, tot i no mudar, inicien el programa genètic adult. Mesurant diferents marcadors en les nimfes interferides hem vist que s'havien iniciat processos relacionats amb la reproducció, que són exclusius de la fase adulta d'aquesta espècie. Finalment, hem vist que les diferents isoformes d'aquest receptor nuclear actuen de manera redundant, ja que el silenciament individual de les isoformes no afecta la muda imaginal.

En resum, podem dir que en la transició nimfa-adult, el receptor nuclear BgE75 està implicat en la muda de manera indirecta, perquè la seva funció és la regulació de la degeneració de la glàndula protoràcica.

5.3.1. La interferència de BgE75 provoca un dèficit d'ecdisteroides que impedeix la muda imaginal i afecta el creixement de l'epiteli fol·licular

Al nostre grup de recerca, s'està utilitzant la tècnica del RNAi *in vivo* a *B. germanica* per tal d'aprofundir en l'estudi de la cascada gènica de resposta a la 20E en aquest insecte basal. De fet, ja hi ha una sèrie de treballs publicats en què s'han caracteritzat les funcions de diferents receptors nuclears, com són ara BgEcR-A, BgRXR i BgHR3 (Cruz *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007). En aquesta tesi mostrem que aquesta tècnica també és efectiva per interferir específicament BgE75,

la qual cosa ens ha permès estudiar la seva funció. Hem demostrat que el silenciament d'aquest receptor nuclear durant la darrera fase nimfal fa que aquests insectes no mudin a adults i restin com a nimfes durant 80-100 dies abans de morir. També hem vist que aquest efecte és pot corregir mitjançant la injecció de 20E, la qual cosa demostra que el fenotip obtingut és causat per una deficiència en ecdisteroides (Fig. 5.4). Aquest fenotip és similar a l'únic mutant d'E75 descrit fins ara a *D. melanogaster* (Bialecki *et al.*, 2002). En aquest insecte, el mutant que no expressa cap de les isoformes de DmE75 es manté com a larva de primera fase durant dies abans de morir, de manera similar a allò observat a les nimfes de *B. germanica* interferides amb dsBgE75-1. En canvi, els mutants específics per cadascuna de les isoformes de DmE75 mostren diferents fenotips. Així, els mutants per DmE75B són viables i fèrtils, mentre que els mutants de DmE75C tenen certs problemes de locomoció i moren en entrar a la fase adulta. D'altra banda, els mutants de DmE75A moren al llarg de les diferents fases larvàries, mostrant problemes de muda i en entrar a la fase de pupa. A més, el 20% dels mutants de DmE75A tenen un fenotip especial, en el sentit que poden pupar directament de la segona fase larvària, sense passar per la tercera. Analitzant en detall aquests mutants, els autors demostren que el fenotip és degut a una deficiència en ecdisteroides (Bialecki *et al.*, 2002). En els nostres experiments, la interferència específica de cadascuna de les 5 isoformes de BgE75 no ha afectat el procés de muda en cap cas, la qual cosa indica que molt probablement les diferents isoformes d'aquest factor actuen de manera redundant (Fig 5.7 i 5.8).

Existeixen molts altres mutants a *D. melanogaster* que també tenen problemes de muda i retards en el desenvolupament similars a allò que passa en interferir E75. Això no obstant, cap d'aquests fenotips sembla estar relacionat amb la degeneració prematura de la glàndula protoràcica com passa en el nostre cas (Fig. 5.5). Un exemple és *neverland*, que és un gen que està implicat en la mobilització del colesterol intracel·lular o bé en la conversió del colesterol a 7-dehidro-colesterol, que és el primer pas de la síntesi de 20E. Els mutants de *neverland* es mantenen com a larva de primera fase durant més de quatre dies abans de morir (Yoshiyama *et al.*, 2006). Un segon exemple el tenim en els mutants de *molting defective*, els quals resten com a larves de primera fase sense mudar durant 4 ó 5 dies (Neubueser *et al.*, 2005). Segons s'ha

descobert recentment, *molting defective* regula la transcripció del gen *spookier*, que codifica per un dels citocroms P450 de la via de síntesi de la 20E (Ono *et al.*, 2006). Un tercer cas són els mutants del factor de transcripció *without children*, on les larves mutants per aquest gen no poden pupar i moren com a larves de tercera fase després de més de 3 setmanes de vida larvària (Wismar *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2001). En aquest cas, la deficiència en ecdisteroides ve donada per problemes en el transport del colesterol cap al mitocondri (Jin *et al.*, 2005).

D'altra banda també hem demostrat que la degeneració prematura de la glàndula protoràcica provocada per la interferència del receptor BgE75, afecta al creixement. En concret hem descrit una disminució de la proliferació cel.lular en l'epiteli fol.licular i hem demostrat que en no produir ecdisteroides, les nimfes tractades amb dsBgE75 no feien l'apòlisi (Fig. 5.2). Que la proliferació cel.lular en l'epiteli fol.licular depèn d'ecdisteroides, ja ha estat demostrat a *B. germanica* quan s'interfereix el receptor nuclear BgEcR-A (Cruz *et al.*, 2006). D'altra banda, la síntesi de cutícula també és un procés que depèn de l'increment de 20E, com s'ha vist en molts mutants deficients en producció de 20E. Entre aquests, podem destacar els gens de la família *halloween*, que codifiquen per enzims de la família del citocrom P450 necessaris per a la síntesi d'ecdisteroides (Gilbert *et al.*, 2002). Els mutants embrionaris de tots aquests gens són deficients en la producció d'ecdisteroides i no sintetitzen la cutícula, la qual cosa els fa inviàbles (Neubueser *et al.*, 2005).

Finalment, un altre aspecte molt interessant observat en interferir BgE75 és que els insectes afectats segueixen menjant ininterrompudament, a diferència de les nimfes dsControl que, al final de la fase nimfal deixen d'alimentar-se i buiden el tracte digestiu en preparació per a la muda. En insectes holometàbols s'ha descrit que els increments de 20E al final de les fases larvàries senyalitzen la finalització del període d'ingesta i preparen l'insecte per a la muda (King-Jones i Thummel, 2005). Sembla que el mecanisme a través del qual es produeix aquest efecte, passa per la via d'insulina i hi ha diferents teixits implicats, entre els quals la glàndula protoràcica i el cos gras (Colombani *et al.*, 2005).

5.3.2. El receptor nuclear BgE75 regula la degeneració de la glàndula protoràcica en la transició nimfa-adult

Hem descobert que la raó principal per la qual les nimfes tractades amb dsBgE75 no produeixen ecdisteroides al final de la sisena fase nimfal és que la glàndula protoràcica degenera prematurament (Fig 5.5). A *B. germanica*, la degeneració de la glàndula protoràcica depèn del receptor d'ecdisona, BgEcR-A. Així, quan s'atenuen els nivells de BgEcR-A mitjançant RNAi es pot observar que les glàndules protoràciques d'aquests insectes no degeneren, inclús set dies després de la muda imaginal (Cruz *et al.*, 2006). Amb els experiments presentats en aquest capítol hem anat un pas més enllà, i hem demostrat que el receptor nuclear BgE75 és qui s'encarrega de controlar el moment de la degeneració de la glàndula, evitant-ne la seva mort prematura. BgE75 s'encarrega de reprimir els factors responsables de la degeneració de la glàndula protoràcica durant la segona meitat de l'última fase nimfal de *B. germanica*. A més, hem vist que en silenciar BgE75 la degeneració de la glàndula protoràcica pot donar-se inclús amb nivells molt baixos d'ecdisteroides circulants.

Hi ha només dos casos a *D. melanogaster* on s'ha relacionat E75 amb processos de mort cel.lular. En el primer, les isoformes DmE75A i DmE75B han estat implicades en la regulació de l'apoptòsi de les cèl.lules nodradores de l'òcit quan l'insecte està en situació de dejuni, la qual cosa li permet reduir el número de cambres ovàriques a desenvolupar. Així, s'observa que sota el control del gen *Broad-Complex*, que és un gen que s'activa directament per 20E, DmE75A indueix la mort cel.lular, mentre que DmE75B fa el contrari (Terashima i Bownes, 2006). En el segon cas s'ha vist que l'activació de DmE75A i DmE75B durant la mort de la glàndula salival de *D. melanogaster* reprimeix l'inhibidor d'apoptosis *diap2* (Jiang *et al.*, 2000). No obstant, s'acaba de veure que *diap2*, per ell mateix, no té cap efecte directe sobre mort cel.lular de cap teixit durant tot el desenvolupament de *D. melanogaster* (Yin i Thummel, 2004; Huh *et al.*, 2007).

5.3.3. La muda no senyalitza la transició a la fase adulta a *B. germanica*

Un dels resultats més importants d'aquest capítol ha estat la demostració que les nimfes tractades amb dsBgE75 que no muden inicien el programa genètic d'adult (Fig 5.6). Aquesta afirmació es basa principalment en tres observacions. En primer lloc, els *corpora allata* de les nimfes tractades amb dsBgE75 activen l'expressió d'un enzim de la via de síntesi de l'HJ, l'HMG-CoA sintasa, i a més, comencen a produir quantitats significatives d'HJ. En segon lloc, el cos gras d'aquests insectes respòn a l'HJ ja que s'activa l'expressió del gen de la vitellogenina. En tercer lloc, els oòcits basals incorporen vitellogenina i comencen a créixer i a madurar com en una femella adulta. Així, aquests resultats mostren que les nimfes tractades amb dsBgE75 passen a la següent fase del desenvolupament sense haver passat pel pic de 20E característic del final de la fase nimfal, la qual cosa indica que la muda no senyalitza la transició ninf-adult. En aquest sentit, la muda es pot interpretar únicament com un canvi de cutícula que permet créixer a l'insecte.

Aquest resultat té una certa similitud amb els obtinguts amb els mutants de la isoforma E75A de *D. melanogaster*. Bialecki i els seus col.laboradors descriuen que el 20% de les larves mutants per DmE75A poden romandre com a larves de segona fase durant dies, expressar gens característics de la tercera fase larvària i després pupar sense cap muda. És a dir, aquests mutants desacoblen el creixement dels processos de maduració ja que inicien la metamorfosi sense mudar (Bialecki *et al.*, 2002). Això no obstant, i a diferència de les nimfes de *B. germanica* interferides amb dsBgE75, a *D. melanogaster* la glàndula anular, que és el teixit encarregat de produir ecdisteroides, no està degenerada. Els autors impliquen E75A en el manteniment dels nivells d'ecdisteroides durant el desenvolupament d'aquest insecte, i proposen que E75A tindria una funció de retroalimentació positiva sobre la producció de 20E.

**6. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ
FUNCIONAL DEL RECEPTOR
NUCLEAR BgHR4**

1. ANTECEDENTS

L'estudi dels receptors nuclears E75, HR3, HR4 i FTZ-F1 a *M. sexta*, *D. melanogaster* i *T. molitor*, ha posat de manifest que aquests factors s'expressen de manera seqüencial al llarg del desenvolupament (Fig. 6.1), la qual cosa suggereix que constitueixen un eix regulador que coordinaria diferents processos al llarg del desenvolupament embrionari i post-embrionari d'aquests insectes (Bayer *et al.*, 2003; Riddiford *et al.*, 2003; Sullivan i Thummel, 2003; King-Jones *et al.*, 2005). A *B. germanica*, l'activació de BgE75 (vegeu capítol 4), BgHR3 i BgFTZ-F1 (Cruz, 2006; Cruz *et al.*, 2007) també és seqüencial durant el final de les dues darreres fases nimfals, però HR4 encara no s'ha caracteritzat en aquest insecte. Així, després de caracteritzar BgE75, vam proposar-nos clonar i estudiar HR4, per tal d'estudiar després la seva relació amb els altres factors esmentats en el context del desenvolupament nimfal de *B. germanica*.

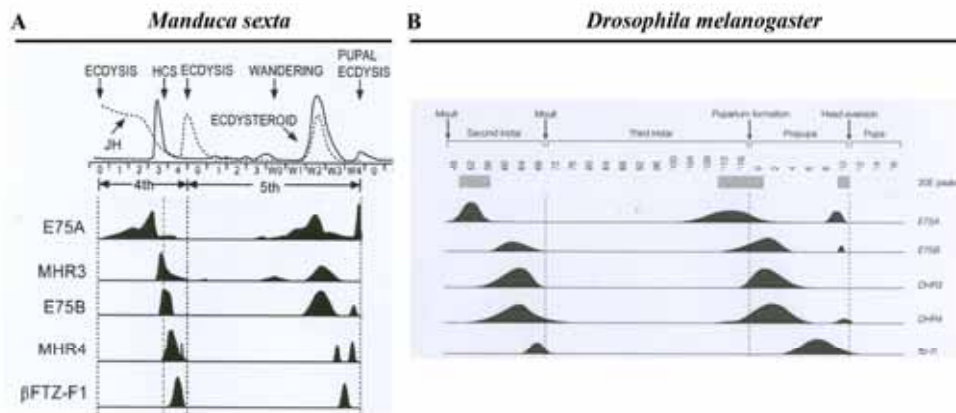


Figura 6.1.- Patrons d'expressió dels receptors nuclears que conformen l'eix regulador E75-HR3-HR4-FTZ-F1 durant les dues darreres fases larvàries de *M. sexta* i de *D. melanogaster*. (A) Adaptat de Riddiford *et al.*, (2003) (B) Adaptat de King-Jones i Thummel (2005).

HR4 és un receptor nuclear poc estudiat en insectes, que només s'ha clonat i caracteritzat a *D. melanogaster*, *M. sexta*, *B. mori* i *T. molitor*. Així, s'ha vist que HR4 s'activa per 20E i que la seva expressió sol estar limitada als moments corresponents als pics de 20E que es donen al llarg del desenvolupament d'aquests quatre insectes (Charles *et al.*, 1999; Mouillet *et al.*, 1999; Hiruma i Riddiford, 2001; Weller *et al.*, 2001; King-Jones *et al.*, 2005). D'altra banda, els estudis funcionals d'HR4 només s'han portat a terme a *D. melanogaster*, i s'ha vist que actua com a repressor transcripcional (King-Jones *et al.*, 2005; Palanker *et al.*, 2006). Així, el mutant d'HR4 a *D. melanogaster* no coordina correctament el final del creixement durant la darrera fase larvària i en iniciar l'estadi pupal. A més, també s'ha demostrat que DmHR4 és un potent repressor dels gens primerencs (vegeu el model d'Ashburner al capítol 1), a la vegada que és un factor necessari per a l'activació de DmFTZ-F1 (King-Jones *et al.*, 2005).

Finalment cal esmentar que l'homòleg de HR4 en vertebrats és el receptor nuclear "Germ Cell Nuclear Factor" (GCNF), un potent repressor de la transcripció que és essencial durant l'embriogènesi i el desenvolupament (Fuhrmann *et al.*, 2001; Hummelke i Cooney, 2001). El receptor GCNF està implicat, per exemple, en la diferenciació de les cèl.lules mare que donaran lloc a les cèl.lules germinals, tot reprimint l'expressió d'Oct-4, un factor encarregat de mantenir la pluripotència de les cèl.lules mare. Així, quan s'inicia la gastrulació i s'expressa GCNF, aquest inhibeix l'expressió d'Oct-4, la qual cosa permet que es puguin iniciar els processos de diferenciació cel.lular (Fuhrmann *et al.*, 2001; Zhang i Dufau, 2004).

El nostre objectiu, doncs, és clonar i caracteritzar funcionalment l'homòleg d'HR4 al nostre insecte model, *B. germanica*. En el present capítol demostrarem per primera vegada l'existència d'aquest factor en un insecte primitiu, estudiarem la seva expressió i la seva regulació, i finalment veurem la seva funció durant el desenvolupament nimfal mitjançant la tècnica de RNAi *in vivo*.

6.2. RESULTATS

6.2.1. Clonatge i caracterització estructural del receptor nuclear BgHR4

El clonatge de BgHR4 es va realitzar mitjançant la tècnica d'RT-PCR utilitzant oligonucleòtids degenerats dissenyats a partir de les seqüències del DBD dels seus homòlegs en altres insectes. En primer lloc, es va clonar un primer fragment de 189 parells de bases que, en analitzar-lo, va permetre concloure que es tractava d'un fragment del DBD del homòleg d'HR4 a *B. germanica*.

La seqüència d'aquest receptor nuclear es va intentar completar combinant les tècniques de 5' i 3'RACE, tal i com es descriu a l'apartat 2.5. Malgrat les diferents condicions assajades, no es va poder aconseguir arribar a l'extrem 5' de la mol.lecula. Així, en total es va obtenir un cDNA de 2187 nucleòtids (que codificaria per una proteïna de 730 aminoàcids, Fig. 6.2). Mitjançant alineaments de seqüències de les regions A/B dels altres homòlegs d'HR4 es va estimar que faltarien entre 350 i 1500 nucleòtids per completar el cDNA. Aquest marge tant ample era degut a que la regió A/B del receptor nuclear HR4 és la més variable en tamany i la menys conservada entre totes les espècies d'insectes (Fig. 6.3).

L'anàlisi estructural de BgHR4 ens mostrà l'existència dels dominis funcionals característics de la superfamília dels receptors nuclears (Figs. 6.2 i 6.3). A *B. germanica*, aquest receptor nuclear es caracteritzava per tenir una regió A/B molt gran (tot i no haver-la completat, la seqüència obtinguda ja era casi tan gran com a la resta de les espècies), i un DBD molt conservat. Al DBD vam identificar la caixa-p que confereix la capacitat d'unió a DNA (Fig 6.2, en negreta dins del DBD). Adjacent al DBD, vam localitzar la caixa CTE, també anomenada extensió carboxi-terminal (subrallat a la figura 6.2), constituïda per 32 aminoàcids implicats en l'estabilització de la unió entre el receptor nuclear i el seu element de resposta en el DNA (Charles *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2001). Entre el DBD i el LBD hi havia la regió frontissa, de 50 aminoàcids, que facilita la conformació tridimensional del receptor i que, a més, s'ha descrit que podria interaccionar amb co-repressors (Horlein *et al.*, 1995). A continuació de la regió frontissa hi havia el LBD, que constava de 249 aminoàcids. El LBD d'HR4

permet que el receptor pugui dimeritzar (Harding i Lazar, 1995; Charles *et al.*, 1999), però es desconeix si aquesta regió uneix cap lligand, motiu pel qual HR4 està considerat un receptor nuclear orfe (King-Jones *et al.*, 2005). Una característica molt important del LBD és que li falta la darrera de les 12 hèlixs en què acostuma a organitzar-se aquest domini dels receptors nuclears. Precisament, a l'extrem carboxi terminal d'aquesta hèlix és on es sol localitzar el domini d'activació AF-2, que confereix capacitat transactivadora als receptors nuclears que la tenen (King-Jones i Thummel, 2005). Com que a BgHR4 li manca aquesta hèlix, és possible que aquest factor no actui com a transactivador sinó com a repressor. L'homòleg d'HR4 en vertebrats, GCNF, té l'hèlix 12 però sense el domini AF-2 i per això té capacitat repressora (Fig. 6.3; (Fuhrmann *et al.*, 2001). Finalment, cal comentar que alguns autors classifiquen els darrers 14 aminoàcids del receptor com la regió F, mentre que d'altres els inclouen com la part final del LBD.

Figura 6.2.- Seqüència nucleotídica i aminoacídica del receptor nuclear BgHR4 de *B. germanica*. Els requadres indiquen els dominis DBD i LBD. A l'extrem 3' del DBD s'indica la caixa CTE (subratllada). El domini A/B precedeix el DBD, i la regió frontissa queda entre el DBD i el LBD. En negreta, dins del DBD, s'indica la caixa-p. El codó de parada s'indica mitjançant un asterisc.

BgHR4

1 GAGCCCCAACACCATCCTCAACAGCAACAGCAACCAACAACACCAGCAACAGCAGCAGCAACGCGCGAACGTAGTTGT
1 E P Q H H P Q Q Q Q H Q Q Q Q H Q Q Q Q Q Q R A N V V V
81 AACAAAGTCCGGGCGCCATGATCCCTCCTCCGGCTTCTGGGTGACTCCTAATTCACCCTCTGTCCGATAAACGGAGTCC
28 T S P G A M I P P P A F W V T P N S P S C R I N G V
161 GCCCGAGCTGATCGGAGGGGTGGCGTCAACTTCAACCCAGCAGCAGGCGGGCATCCGCCAGCAGCATACTTAC
54 R P E L I G G G G V N F N P Q Q Q A A A S A T S I L H
241 CATGAAATGAAACCTCTGTGACGCGCGCAGTCGACGTCCAGAACCCCGGTGTCTCCGACTGCACCCACTGTAT
81 H E M K P P V T R A Q S T S R T P G V L R T A P T V I
321 CATGGGGAGGCGCGAGGTGTAAGGACGATGATCTGGTCGCAACCCAGCGCTGTATCCCACTACGTTAGAGCCCAAC
108 M G E A G G V R T M I W S Q P S A V I P T T L E P Q
401 ACCATCCTCAACAGCAACAGCACCACAACAACACCAGCAACAGCAGCAACAGCAGCAACCAACAACAGCAACAA
135 H H P Q Q Q Q H Q Q Q H Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q
481 CAACAACAATCTCCTCAACAGCATCATCAATGTTAGCGGGGCGATCGACATCATCGTCTGCTGGTCTCATTACCTTC
162 Q Q Q S P Q Q H H Q L L A G A S T S S S C W S S S P S
561 ATCCGCCTCCAGCGCGCGGCGAGGCAAGCAACGAAGCGGGCTCAGATCCTCCTCAATCTTGGGCAGGGACAACAGC
189 S A S S G A G S G S G S N E E A A Q I L L N L G Q Q Q
641 AACACCATCATATGCAGACAGCAGCCACCCTTCCAGGCCAGCACAGTTTCCCTCCACCTCTAACATGGAACGGGTATGG
215 Q H H H M Q T A A T P S R P A Q F P P P L N M E R L W
721 GCAGGAGACTTGACGCAACTGCCCGCATGTCAACAGCAGCAAATGCAAGCCCTCAACCTTACCTTGCAGCGCATCTGC
242 A G D L T Q L P A C Q Q Q Q M Q A L N L T S A A A S A
801 TACCAGTCTCCACTCCCTTGGACGAGGAAATGGAGAAATGGAGATCAAAAACCTTTTACCCCTGGTATGACCGTCT
269 T S A P L P W T Q R N G G N G D Q K L L P P G M T V

DBD

881 TAGGCTCGACGGGGAAACACCACCAATGGTACACCCTCAGGAAGACCAGGAGGAAGAAGAACACCCATGATCTGCATG
295 L G S T G E H H P M V H P Q E D Q E E E Q P M I C M
961 ATTTGTGAGGATAAGGCTACAGGTCTGCACCTACGGCATTACCTGTGAAGGATGTAAGGTTTCTTCAAACGACGGT
322 I C E D K A T G L H Y G I I T C E G C K G F F K R T V
1041 TCAGAACAGACGTGTATACATGCGTCCGCGATGGCAACTGTGAGATAACTAAGGCGCAACGCAACAGATGTCAGTATT
349 Q N R R V Y T C V A D G N C E I T K A Q R N R C Q Y
1121 GTGCTTCAAGAAATGATTGAGCAGGGCATGTGCTCCAAGCTGTTGAGAGGACAGGATGCCTGGTGACGCAACTCT
375 C R F K K C I E Q G M V L Q A V R E D R M P G G R N S

1201 GGAGCTGTTTAACTTGTACAAGGTTAAATACAAAAGCACAAGAAGAATCCAAAAACGGGCAAGTAAAGGTCAGGC
402 G A V Y N L Y K V K Y K K H K K N P K N G Q V K G Q A
1281 GGAGAAGAGGGGATAGTTACAGCAGAACATGGGATCCCGCTCACCTGTGAACGGTACCATTCTAAGACCGCTCTCA
429 E K K G I V T A E H G I P P H L V N G T I L K T A L

LBD

1361 CCAACCCAGTGAAGTGGTCCATTACGTCAACGACTCTGATAATGCTGTAAGTTCATCAGGATCGAACATATTCCCC
455 T N P S E V V H L R Q R L D N A V S S S R D R T S F P
1441 ATTTGAAGGCGCTTACCTATGATCCAGACTTCATAGACTGTGATGAATCCAGGACATTGCTACTCTAGGAATCTGGA
482 I E A A L P M I Q T L I D C D E F Q D I A T L R N L D
1521 TGAGTTGTTAGACCACAAGTCTGATCTCTCAGACAACTGTGCCAGATAGGGGACTCCATAGTCTACAAGTTGGTTAGT
509 E L L D H K S D L S D K L C Q I G D S I V Y K L V Q
1601 GGACAAAGAGATTACCTTTCTACTTGGAGTTACCTGTGGAGGTGCACACAAGATTATTAACGCACAAGTGGCAGGACTG
535 W T K R L P F Y L E L P V E V H T R L L T H K W H E L
1681 TTGGTGTGACAACGTCAGCATATCAGGCGATCCATGGCAGCAATAAATTTGGGTAGCACCAGCAGCGATGGTACTGAGG
562 L V L T T S A Y Q A I H G T N K L G S T S S D G T E A
1761 AGACTTTACACAAGAGGTCTCCAATAACCTTGTGACGTTCAACATGCCTCACATCGATGATGGGGCGACCGATCTCGA
589 D F T Q E V S N N L V T L Q T C L T S M M G R P I S
1841 TTGACCAGCTACGACAGGGTGTGGTCAAATGGTAGAAAAGATAACACATGTGACGCTCATGTTTACAGCGGATAAGCTG
615 I D Q L R Q G V G Q M V E K I T H V T L M F R R I K L
1921 TGCAATGGAAGAAATATGTGCTCCTCAAAGTCATTACCATGCTCAACCAAGGTAACAGCAAGGTCGAACAGGTCCAAATGA
642 C M E E Y V C L K V I T M L N Q G N S Q G R T G P N E
2001 ACTTGAAAACGATTCAAGAAAGGTACATGAGGTGTCTAAGAAGTTTGAAGAACACCACTTTCCCGCAACACCGCGTT
669 L E T I Q E R Y M R C L R S F E E H H F P Q Q T S R
2081 ACCATGATCTGCTAGTCCGACTGCCTGAAGTTCAATCAGCAGCTTCGTTGCTCCTAGAGAGTAAATGTTTTACGTTCCG
695 Y H D L L V R L P E V Q S A A S L L L E S K M F Y V P
2161 TTCTGCTGAATTCAGTATCCAGAGATAGTACATCGATTCACTCGGTAGCGACCTACCAACGGTTAAGATGGAAGT
722 F L L N S A I Q R *
2241 TGACAATCGTAGGCGCAAAATGGGATTTTGACAGCACGGTGTATCATAGCGTTGTGATTGAGGAGACATATAGCTATAAT
2321 TTGGACTTAATCCATCCCGTCTGCTTCTAAAGAGGCTTGAAGAAGTGTATCTACCAAGATGTGATATTGCTGCCTAAT
2401 GCAAGAAATTTCAATCGGTGTTTTCTCAAAGTCTGTTTAGGTCATGAAGAAAGATTAAGTGCATCATGGTATGAGAGA
2481 ATGGATCAGTTACCATTACCAATCTGTTGGAGGCAAAATGTTGGGAACAAGTAGAAAGTCTGGGCCGAGATCAATTGC
2561 ACTACAAG

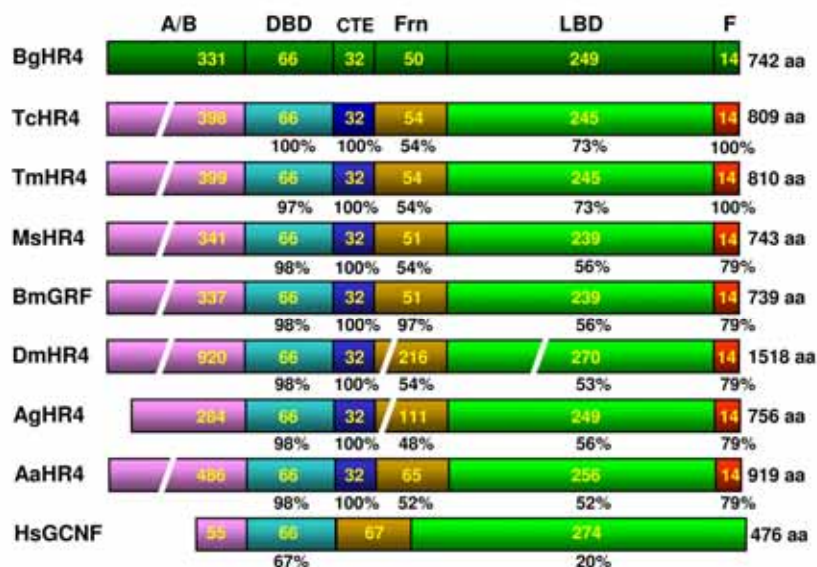


Figura 6.3.- Percentatge de similitud dels dominis estructurals de BgHR4 respecte els seus homòlegs d'altres espècies d'insectes i el GCNF d'*H. sapiens*. Amb l'ajuda del Clustal X, es van alinear i calcular els percentatges de similitud, respecte de BgHR4, de les seqüències aminoacídiques d'HR4 de les espècies *Apis mellifera* (AmHR4), *Tribolium castaneum* (TcHR4), *Bombyx mori* (BmGRF), *Manduca sexta* (MsHR4), *Drosophila melanogaster* (DmHR4), *Aedes aegypti* (AaHR4), i GCNF d'*Homo sapiens* (GCNF). Els percentatges indiquen el grau de similitud de cada domini estructural respecte al de BgHR4. Els números dins de cada domini indiquen els aminoàcids que té el mateix. Els diferents dominis estructurals s'indiquen al damunt de BgHR4. Frn: Domini frontissa. CTE: extensió carboxi terminal.

6.2.2. Similituds entre BgHR4 i els seus homòlegs en insectes i en *H. sapiens*.

Fins al present, es coneixia la seqüència del receptor nuclear HR4 en set espècies d'insectes, però tant sols s'han publicat estudis d'aquest receptor a *D. melanogaster* (King-Jones *et al.*, 2005), *T. molitor* (Mouillet *et al.*, 1999), *B. mori* (Charles *et al.*, 1999) i *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001). Per veure el grau de similitud d'aquestes seqüències amb la de *B. germanica*, es va fer un estudi comparatiu de cadascun dels dominis estructurals en què s'organitzen en aquestes espècies. A més, es va afegir a l'estudi un homòleg en vertebrats, el receptor nuclear GCNF d'*H. sapiens*. Tal i com es

mostra a la figura 6.3, el DBD i la regió CTE estaven molt conservades entre totes les espècies d'insectes (97-100% de similitud). Els altres dominis que presentaven més similitud eren el LBD, sobretot el de *T. castaneum* i el de *T. molitor* (73%), i la regió F, que constava de tant sols 14 aminoàcids però que estaven molt conservats entre tots els insectes (79-100%). D'altra banda, la regió frontissa estava relativament poc conservada en gairebé tots els insectes comparats (al voltant del 54%, Fig. 6.3). Pel que fa a les regions A/B, aquestes eren tan variables en tamany i seqüència que no es van poder comparar. Per últim, cal remarcar que l'homòleg en *H. sapiens*, GCNF, presentava una similitud del 67% en el DBD i molt baixa, només d'un 20%, en el LBD. Quant a la resta de dominis, la similitud era extremadament baixa.

6.2.3. Anàlisi filogenètica del receptor nuclear HR4

De la mateixa manera que vàrem fer pel receptor nuclear E75, i basant-nos en les seqüències del LBD vam construir un arbre filogenètic per al receptor nuclear HR4. En primer lloc vam alinear les seqüències aminoacídiques amb l'ajuda del programa Clustal X. Tal i com s'observa a la figura 6.4A, el LBD de *B. germanica* és més similar al dels coleòpters que al de la resta d'espècies. A més, al llarg de tot el LBD hi ha zones força conservades inclús amb el receptor GCNF d'*H. sapiens* (Fig. 6.4A). En general, aquestes zones coincideixen amb les hèlixs α característiques dels LBD dels receptors nuclears. A la figura 6.4A també s'aprecia com només el receptor GCNF té l'hèlix-12 completa (H-12). D'entre totes les seqüències, les de dípters i lepidòpters es semblen més entre elles que a la resta d'insectes, i el factor GCNF era clarament el que presentava un grau de similitud més baix.

L'arbre filogenètic resultant del LBD d'HR4 agrupava consistentment dípters i lepidòpters en un node a part de la resta d'espècies analitzades, i a més mostraven un grau de divergència més gran respecte les seqüències dels altres insectes (Fig 6.4B). D'altra banda, les dues seqüències de coleòpters i la de *B. germanica* eren més properes entre elles, tot i que l'arbre filogenètic resultant no coincidia amb la filogènia establerta per aquestes espècies, ja que col.locava la seqüència de *B. germanica* com a grup germà de dípters + lepidòpters, i deixava els coleòpters com un grup més basal (Fig. 6.4B).

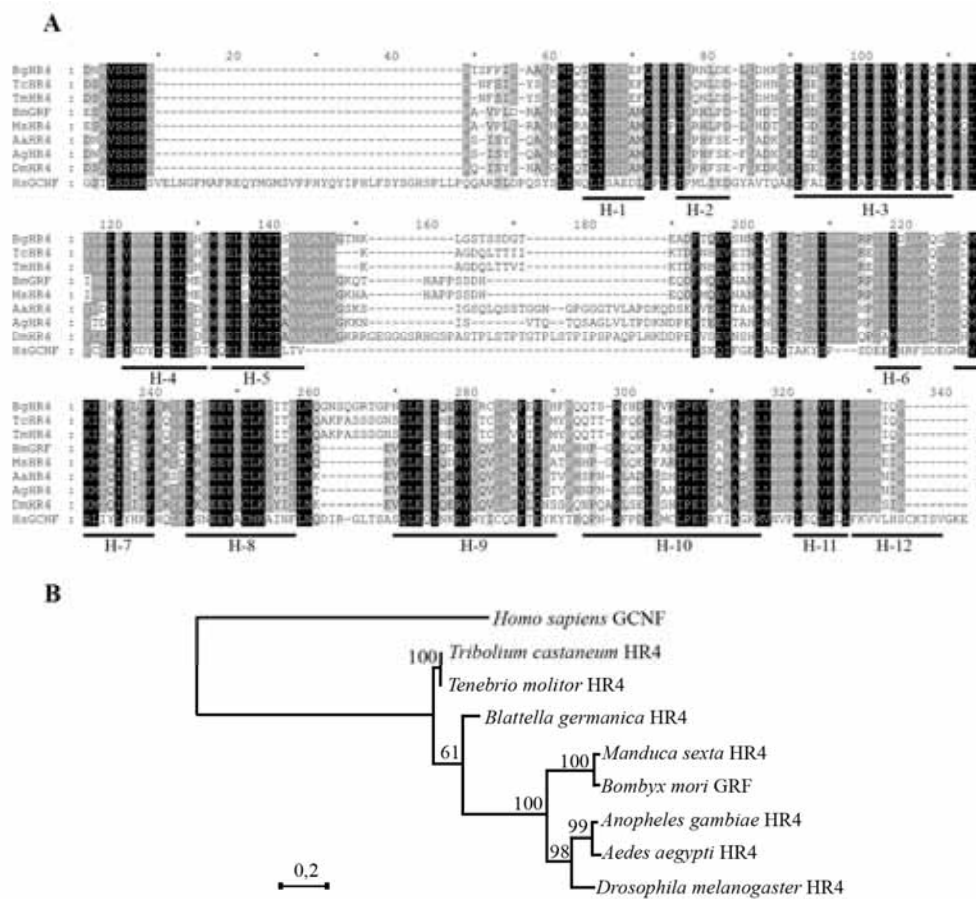


Figura 6.4.- Alineament i arbre filogenètic dels LBDs dels receptors nuclears HR4 d'insectes i el seu ortòleg GCNF d'*H. sapiens*. (A) Alineament de les seqüències aminoacídiques dels LBDs mitjançant el programa Clustal X. S'indica la posició de les hèlixs- α característiques del LBD de GCNF segons Greschik *et al.*, (1999) (B) Arbre filogenètic dels LBDs obtingut utilitzant l'anàlisi de màxima versemblança. La longitud de les branques és proporcional al grau de divergència. La barra representa 0,2 substitucions per posició. L'arbre filogenètic s'ha construït fent 100 rèpliques de l'anàlisi mitjançant el programa PHYML. Només s'indiquen els valors de bootstrap ≥ 50 .

6.2.4. Patrons d'expressió de BgHR4 durant l'embriogènesi i les dues últimes fases nimfals de *B. germanica*

El següent pas va ser la caracterització dels patrons d'expressió d'HR4 al llarg de l'embriogènesi i les dues darreres fases nimfals, tal i com ho havíem fet pel receptor nuclear BgE75. En el cas de l'embriogènesi vam observar que BgHR4 s'expressava de manera molt acusada el dia 14, i després anava disminuint en els dies successius (Fig. 6.5). Aquest pic d'expressió es donava just quan els nivells de 20E començaven a decaure. També vam observar expressió de BgHR4, encara que en menor mesura, el dia 2 en absència de 20E, i entre els dies 6 i 7, coincidint amb el primer pic de 20E.

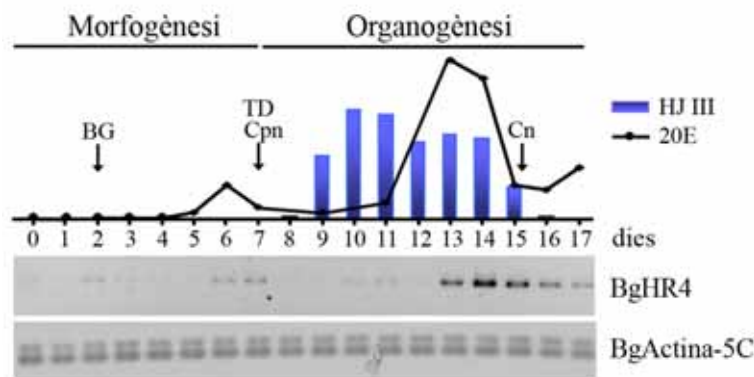


Figura 6.5.- Patrons d'expressió del receptor nuclear BgHR4 durant l'embriogènesi de *B. germanica*. L'amplificació de cada transcrit es va realitzar mitjançant RT-PCR/Southern Blot a partir de la mateixa quantitat d'RNA, la qual es va extreure d'ooteques de les edats indicades. Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C. En la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E (línia) i d'HJ (barres) segons (Treiblmayr *et al.*, 2006). S'indica el moment de formació de la banda germinal (BG), tancament dorsal (TD), deposició de la cutícula pronimfal (Cpn) i cutícula nimfal (Cn), segons Cruz (2006).

En segon lloc vam estudiar l'expressió de BgHR4 durant la cinquena i sisena fase nimfal en tres teixits diferents, la glàndula protoràctica, l'epidermis i el cos gras. Bàsicament, vam observar que BgHR4 s'expressava de manera similar en els tres

teixits, apareixent al final de cada fase nimfal. La seva activació màxima es donava quan hi havia el pic de 20E o bé un dia més tard, quan els nivells d'aquesta hormona començaven a davallar (Fig. 6.6).

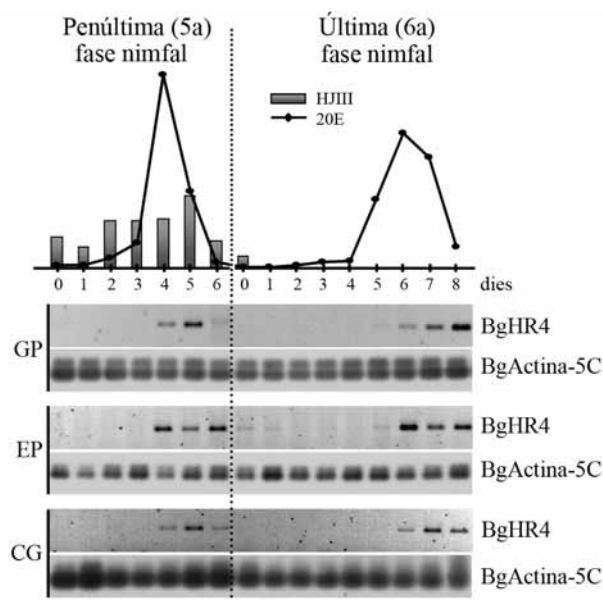


Figura 6.6.- Patrons d'expressió del receptor nuclear BgHR4 durant les dues darreres fases nimfals de *B. germanica*. L'amplificació de BgHR4 es va realitzar mitjançant RT-PCR/Southern Blot a partir de la mateixa quantitat d'RNA que es va extreure de glàndules protoràciques (GP), epidermis dorsal (EP) i cos gras (CG). Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C en cada teixit. A la part superior de la figura es representen els nivells circulants de 20E (línia) i d'HJ (barres), segons (Cruz *et al.*, 2003)).

6.2.5. Efecte de la 20E sobre l'expressió de BgHR4 *in vitro*

Atès que els patrons d'expressió obtinguts semblaven indicar que l'expressió de BgHR4 estava regulada per 20E, vam decidir fer els mateixos experiments d'incubacions de cossos grassos *in vitro* que havíem fet per a BgE75. Així, vam incubar cossos grassos de femelles d'un dia d'edat de sisena fase nimfal, que no expressen BgHR4, durant 1, 3 i 10 h en presència de 20E ($5 \times 10^{-6} M$), l'inhibidor reversible de

síntesi proteica Chx (10^{-4}M), o bé ambdós alhora (20E+Chx), i posteriorment s'analitzaven els nivells de BgHR4 per RT-PCR/Southern Blot. Com s'observa a la figura 6.7, ni el tractament control, ni el de Chx afectaven l'expressió de BgHR4 durant les 10 h d'incubació. El tractament amb 20E feia augmentar molt lleugerament els nivells de BgHR4 però aquests desapareixien ràpidament i ja no es detectaven a partir de les 3 h. En canvi, la presència de 20E i Chx alhora provocava un clar increment en els nivells d'expressió de BgHR4 a les 10 h. Aquest resultat indicava que BgHR4 s'activava directament per 20E però que la seva expressió estaria controlada per algún repressor dependent de 20E.

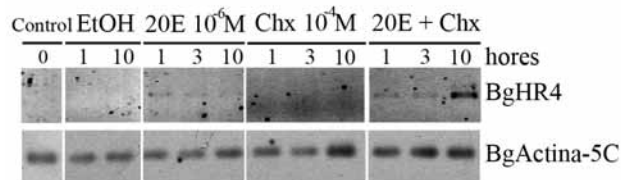


Figura 6.7.- Efecte de la 20E i la Chx en els nivells d'expressió de BgHR4 en incubacions *in vitro* de cossos grassos de nimfes de *B. germanica*. Es van incubar cossos grassos procedents de nimfes recentment emergides de sisena fase nimfal amb 20E (5×10^{-6}) o Chx (10^{-4}M), o ambdós a la vegada durant els períodes de temps indicats. Els cossos grassos incubats es van analitzar per RT-PCR/Southern Blot a partir de la retrotranscripció de la mateixa quantitat d'RNA. Com a referència es van determinar els nivells de BgActina5C. Els Southern/Blots mostrats són representatius de tres rèpliques.

6.2.6. Influència del factor BgHR3 sobre l'expressió de BgHR4

Un cop demostrat que la 20E activa BgHR4 vam voler estudiar quins factors podien estar implicats en el seu control. En concret vam analitzar mitjançant RNAi *in vivo* si el receptor nuclear BgHR3 estava involucrat en l'expressió de BgHR4. Els patrons d'expressió indicaven que BgHR4 s'expressava just després de BgHR3 i coincidint amb l'inici de la davallada dels ecdisteroides hemolimfàtics (Fig 6.8A), resultat que també s'ha constatat en altres espècies com, per exemple, *D. melanogaster* i

M. sexta (Weller *et al.*, 2001; King-Jones *et al.*, 2005). Per comprobar si BgHR3 és necessari per activar la transcripció de BgHR4 es va reduir l'expressió de BgHR3 injectant 1 µg de dsBgHR3 a femelles recent emergides a sisena fase nimfal. Vuit dies després, es va extreure la glàndula protoràcica per analitzar mitjançant RT-PCR/Southern Blot els nivells de diferents trànscrips. Tal i com es mostra a la figura 6.8B, en silenciar BgHR3 no s'activava BgHR4. Remarcablement, l'absència de BgHR3 (i de BgHR4) provocava, a més, una inhibició molt clara de l'expressió de BgFTZ-F1, mentre que l'expressió d'altres factors, com BgEcR-A o BgRXR, no es veia afectada (Fig. 6.8B).

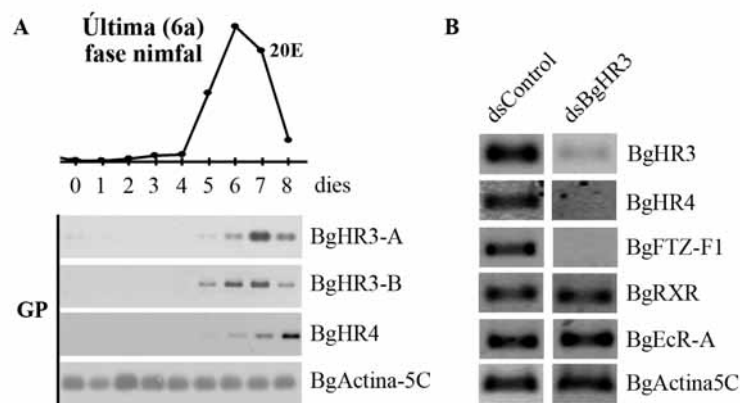


Figura 6.8.- Efecte del receptor nuclear BgHR3 sobre els nivells d'expressió de BgHR4. (A) BgHR3 i BgHR4 s'expressen seqüencialment a la glàndula protoràcica vers el final de la sisena fase nimfal. Els nivells d'expressió de BgHR3 provenen de Cruz *et al.* (2007). (B) Efecte de la interferència del receptor nuclear BgHR3 sobre els nivells d'expressió de BgHR4, BgEcR-A, BgRXR i BgFTZ-F1. Es van seleccionar femelles de sisena fase nimfal acabades d'emergir i se'ls hi injectà 1 µg de dsControl o 1 µg de dsBgHR3. Vuit dies després es van dissecar les glàndules protoràciques i es van mesurar els nivells de diferents trànscrips per RT-PCR/Southern Blot. Com a referència es van mesurar els nivells de BgActina5C. Els resultats mostrats són representatius de 8-15 individus.

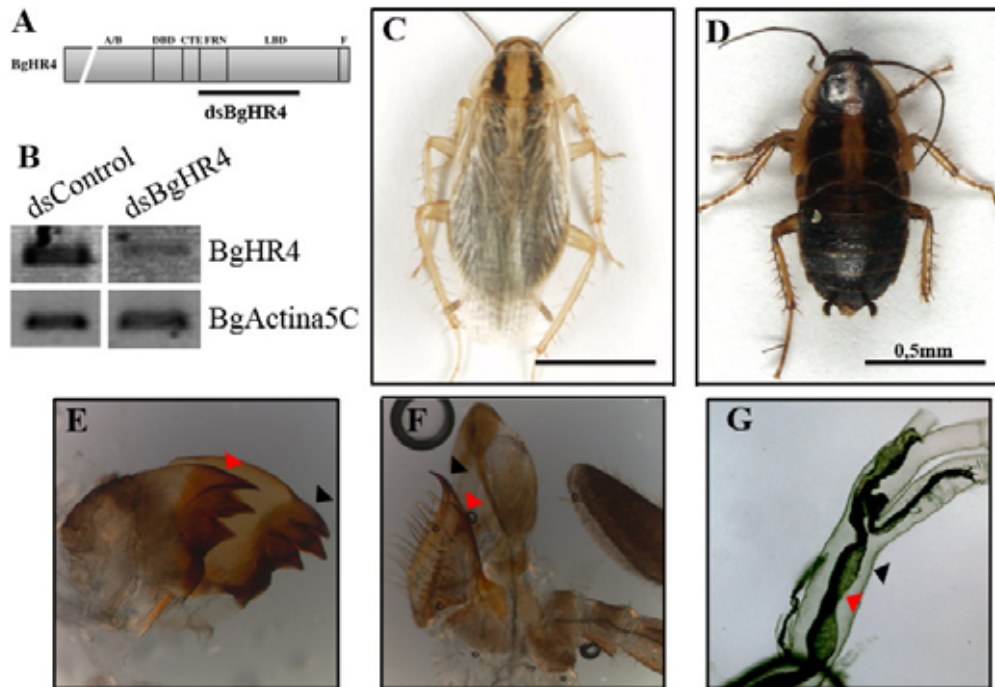


Figura 6.9.- Efectes fenotípics de la interferència del receptor nuclear BgHR4 amb RNAi en femelles de sisena fase nimfal de *B. germanica*. (A) Esquema de BgHR4 on es mostra la regió utilitzada per generar el dsRNA. (B) Eficiència de la interferència del receptor nuclear BgHR4. S'injectava 1 μ g de dsBgHR4, o bé dsControl com a control negatiu, a femelles de sisena fase nimfal recentment emergides i es mesuraven els nivells de mRNA vuit dies després per RT-PCR/Southern Blot a la glàndula protoràcica. Els nivells de BgActina5C es van mesurar com a referència. Els Southern/Blots són representatius d'almenys 10 individus. (C) Adult dsControl recentment mutat. (D) Nimfa dsBgHR4 de sisena fase de 8 dies d'edat que ha aturat el seu desenvolupament en la transició nimfa-adult, i que presenta duplicació de les estructures d'origen ectodèrmic, com són ara les mandíbules (E), les lacínies (F) o les tràquees (G).

6.2.7. Funcions de BgHR4 durant la cinquena i la sisena fase nimfal

Un cop caracteritzada l'expressió i la regulació hormonal de BgHR4, es va fer l'anàlisi funcional durant la cinquena i la sisena fase nimfal mitjançant RNAi *in vivo*. Primerament es va comprovar que la interferència de BgHR4 era efectiva i específica injectant a femelles recent emergides de sisena fase nimfal 1 µg de dsRNA dissenyat per a la regió frontissa i el LBD de BgHR4 (Fig. 6.9A). Com a control negatiu es va utilitzar el mateix fragment inespecífic (anomenat dsControl) que pels experiments d'RNAi *in vivo* de BgE75. Al cap de vuit dies es van dissecar les glàndules protoràciques de les nimfes dsControl i dsBgHR4, i es van mesurar els nivells de mRNA de BgHR4 per RT-PCR/Southern Blot. Es va escollir l'últim dia de la sisena fase nimfal perquè és el moment de màxima expressió de BgHR4 (Fig. 6.6). Així, vam constatar que la interferència funcionava correctament, ja que els nivells d'expressió de BgHR4 davallaven dràsticament en els insectes tractats amb dsBgHR4 (Fig. 6.9B).

Una vegada demostrada l'eficiència en la interferència de BgHR4, vam estudiar l'efecte de la manca d'aquest factor durant la sisena fase nimfal i la transició a adult. Per això, es va repetir l'experiment anterior però en aquest cas es deixaven els insectes per veure si eren capaços de completar la muda imaginal. Així, vuit o nou dies després del tractament amb dsBgHR4, el 97% (n= 73) de les nimfes interferides no podien mudar a adult (Fig. 6.9D), aturaven el seu desenvolupament, restaven in mòbils i morien 24-48 h més tard. Aquests individus, que eren incapaços de mudar, presentaven duplicació de les estructures d'origen ectodèrmic com les mandíbules, les lacínies o les tràquees (Fig. 6.9E-G). D'altra banda, el 100% de les nimfes dsControl (Fig. 6.9C) completaven la muda imaginal correctament (n= 35).

Per tal de comprovar si el fenotip obtingut era específic de la transició nimfa-adult o també es donava en les transicions nimfa-nimfa, es van repetir els experiments d'RNAi *in vivo* a nimfes de cinquena fase. Així, s'injectava 1 µg de dsControl o dsBgHR4 a nimfes recent emergides i s'observava si podien completar la següent ècdisi nimfal. De manera semblant a com passava en els tractaments realitzats en la sisena fase, mentre que el 100% (n= 15) de les nimfes dsControl mudaven normalment, el 100% (n=

20) de les nimfes de cinquena fase tractades amb dsBgHR4 aturaven el desenvolupament al voltant del sisè dia, presentaven duplicació de les estructures d'origen ectodèrmic, i morien al cap de 24-48 h.

6.2.8. Nivells d'ecdisteroides en les nimfes interferides amb dsBgHR4 durant la sisena fase nimfal

El fenotip observat en les nimfes interferides amb dsBgHR4, que eren incapaces de completar el procés de muda, suggeria que BgHR4 podria estar implicat en el control dels nivells de 20E durant la sisena fase nimfal, com s'havia descrit en l'estudi funcional del receptor BgEcR-A. Precisament, els problemes relacionats amb la muda en els insectes als quals s'ha interferit BgEcR-A, semblen correlacionar-se bé amb alteracions en el patró d'ecdisteroides hemolimfàtics (Cruz *et al.*, 2006). Per comprobar-ho, vam injectar 1 µg de dsControl o dsBgHR4 a femelles recent emergides a sisena fase nimfal i vam mesurar mitjançant ELISA els nivells circulants de 20E entre els dies 4 i 8, és a dir, quan apareix el pic de 20E. Els resultats obtinguts en l'estudi estadístic indicaven que no hi havia diferències significatives en cap dels dies analitzats, i els nivells d'ecdisteroides fluctuaven de la mateixa manera tant en els insectes dsControl com en els dsBgHR4 (Fig. 6.10).

6.2.9. Efecte de la interferència de BgHR4 sobre l'expressió d'altres receptors nuclears

Atès que la incapacitat per mudar de les nimfes a les quals s'havia interferit BgHR4 no era deguda a alteracions dels nivells d'ecdisteroides, vam analitzar l'expressió de diferents receptors nuclears en les nimfes interferides amb dsBgHR4 per comprobar si BgHR4 jugava algun paper en l'expressió de factors imprescindibles per la muda. Així, vam injectar 1 µg de dsControl o dsBgHR4 a femelles recentment emergides a sisena fase nimfal, i vuit dies després, quan els nivells d'expressió de

BgHR4 haurien de ser més elevats, s'extreia la glàndula protoràcica i s'examinaven els diferents trànscripats. Com s'observa a la figura 6.11, en absència de BgHR4 no s'activava BgFTZ-F1 mentre que els nivells dels gens primerencs BgE75A, BgE75B i BgE75E esdevenien molt elevats, en comparació amb els individus tractats amb dsControl. Finalment, els receptors BgHR3, BgEcR-A i BgRXR no es veien afectats per l'absència de BgHR4.

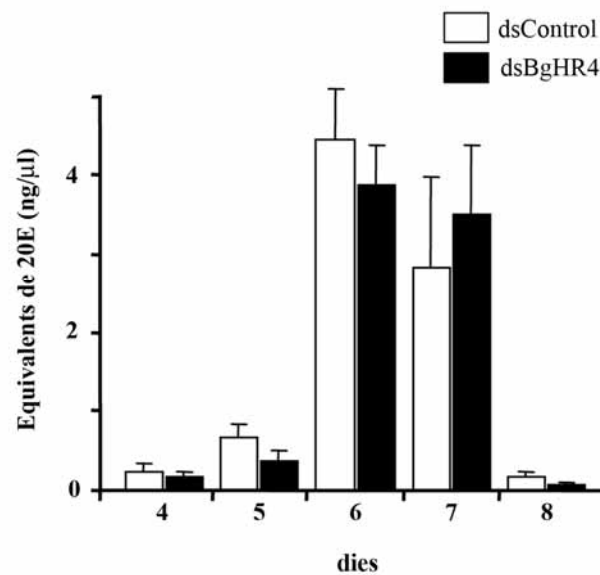


Figura 6.10.- Efecte de la interferència de BgHR4 sobre els nivells circulants de 20E durant la sisena fase nimfal a *B. germanica*. Nimfes de sisena fase van ser tractades amb 1 μg de dsControl o dsBgHR4 i es va recollir l'hemolimfa durant el període de temps indicat. Mitjançant la tècnica ELISA, es van determinar els nivells de 20E circulants. Els resultats s'expressen com a equivalents de ng de 20E per μl d'hemolimfa. Les barres verticals indiquen la SEM (n= 6-12).

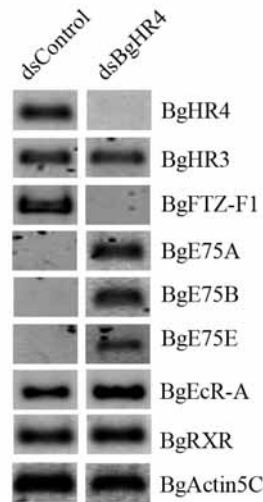


Figura 6.11.- Efecte de la interferència del receptor nuclear BgHR4 sobre els nivells d'expressió de diferents receptors nuclears de *B. germanica*. Es van seleccionar femelles de sisena fase nimfal acabades d'emergir i se'ls hi injectà 1 µg de dsControl o 1 µg de dsBghR4. Vuit dies després, es van dissecar les glàndules protoràciques i es van mesurar per RT-PCR/Southern Blot els nivells de diferents trànscrips de receptors nuclears implicats en el procés de muda. Com a referència es van mesurar els nivells de BgActina5C. Els resultats són representatius de 8-15 individus.

6.3. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha caracteritzat el receptor nuclear BgHR4 i s'ha estudiat la seva funció en la darrera fase nimfal de *B. germanica* mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*. D'aquesta manera hem completat la caracterització de l'eix funcional EcR/RXR-E75-HR3-HR4-FTZ-F1 al nostre insecte model, *B. germanica*. En els estudis fets fins al moment a *D. melanogaster*, *M. sexta*, *T. molitor* i *B. mori*, s'ha vist que HR4 s'expressa just després dels pics de 20E que es donen al llarg del desenvolupament post-embriònic d'aquests insectes (Charles *et al.*, 1999; Mouillet *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2001; King-Jones *et al.*, 2005). Remarcablement, en tots aquests insectes sembla que HR4 s'expressa sempre després que E75A i HR3 i abans que FTZ-F1 (veure, per exemple,

Sullivan i Thummel, 2003). Tanmateix, només a *D. melanogaster* s'ha caracteritzat funcionalment aquest factor, i s'ha vist que DmHR4 reprimeix els gens primerencs i, a més, és necessari per activar DmFTZ-F1 (King-Jones *et al.*, 2005). A més, aquests autors també demostren que DmHR4 és un factor determinant a l'hora de coordinar el creixement larvari i l'etapa de maduració, ja que els mutants per DmHR4 són més petits durant la darrera fase larvària i no són capaços de regular correctament el moment d'entrada a la fase de pupa.

Amb els nostres estudis hem pogut veure que BgHR4 s'expressa durant el pic de 20E al final de cada fase nimfal i que és necessari perquè la nimfa de *B. germanica* pugui completar l'ècdisi imaginal (Figs. 6.5, 6.6 i 6.7). En segon lloc, hem confirmat que els receptors BgE75, BgHR3, BgHR4 i BgFTZ-F1 estan estretament relacionats, atès que formen un eix regulador. Així, mitjançant RNAi *in vivo* hem demostrat que l'activació de la transcripció de BgHR4 depèn de l'acció de la 20E i, a més, del receptor nuclear BgHR3 (Fig. 6.7 i 6.8). Per altra banda, hem vist que BgHR4 és suficient per reprimir l'expressió de BgE75A, BgE75B i BgE75E al final de l'estadi nimfal, i també que BgHR4 és necessari per a l'activació de BgFTZ-F1 (Fig. 6.11). Així doncs, BgHR4 es situa com un receptor nuclear clau per coordinar la resposta a la 20E durant els dos darrers dies de la sisena fase nimfal de *B. germanica*, encarregant-se de reduir els nivells d'E75 i d'activar al seu torn l'expressió de BgFTZ-F1. En el següent capítol s'estudiarà més en profunditat com aquesta expressió altament coordinada entre tots aquests receptors nuclears resulta en la fina regulació, no només de la muda, sinó també d'altres processos com per exemple, la degeneració de la glàndula protoràcica, un dels processos de naturalesa metamòrfica en els insectes hemimetàbols.

6.3.1. Estructura del receptor nuclear BgHR4

BgHR4 presenta una seqüència molt conservada respecte d'altres insectes, sobretot en el DBD (98-100% de similitud) i en la caixa CTE (100%) (Fig. 6.3 i 6.4). Aquesta característica, que es conserva fins i tot en el receptor GCNF, fa que tots ells puguin reconèixer, i es puguin unir com a homodímers, als mateixos elements de

resposta en el DNA (Greschik i Schule, 1998; Charles *et al.*, 1999). El segon domini altament conservat és el LBD. El receptor nuclear HR4 d'insectes, al igual que el seu homòleg en vertebrats GCNF, actua com a repressor de la transcripció (Zhang i Dufau, 2004; King-Jones *et al.*, 2005; Palanker *et al.*, 2006). Es coneix que el receptor GCNF és un potent repressor degut a que no té el domini AF-2 dins de l'hèlix-12 del seu LBD (Zhang i Dufau, 2004). És probable doncs, que la manca de l'hèlix-12 en el LBD de BgHR4 li permeti actuar també com a repressor. Aquests dos arguments suggereixen doncs, que els mecanismes d'acció d'HR4 i de GCNF podrien ser similars, i que els dos funcionarien com a repressors. A més, i reforçant la idea que HR4 actua com a repressor, s'ha vist que DmHR4 no dóna cap patró d'activació en el sistema Gal4-LBD de *D. melanogaster* (Palanker *et al.*, 2006). En aquest sistema s'han fet línies transgèniques que expressen per una banda el LBD d'un receptor nuclear fusionat al DBD de Gal4 de llevat i dirigit per un promotor induïble per calor (hsp70); i per l'altra, un element de resposta per Gal4 amb un gen reportador. Quan es dóna el xoc de calor, a diferents moments del desenvolupament de la mosca, les cèl.lules que tinguin el lligand i/o el cofactor del receptor nuclear activaran el gen reportador. Aquesta activitat, indica en quin moment i en quin teixit durant el desenvolupament de la mosca s'activa un determinat receptor nuclear. Per contra, aquelles cèl.lules que expressin la proteïna de fusió però no tinguin activitat del gen reportador indicarà, com és el cas de DmHR4, que el receptor actuaria, probablement, com a repressor (Palanker *et al.*, 2006).

6.3.2. Patrons d'expressió i regulació hormonal de BgHR4

Els estudis d'expressió de BgHR4 durant l'embriogènesi i el desenvolupament post-embrionari van mostrar que aquest receptor té un màxim d'expressió just després de que s'hagi produït el pic de 20E (Figs. 6.5 i 6.6). A més, la seva expressió sempre va precedida per l'expressió de BgE75 i la de BgHR3, i abans que la de BgFTZ-F1 (Cruz, 2006). Remarcablement, aquest patró d'expressió seqüencial sembla estar molt conservat entre insectes, ja que també es troba en les altres quatre espècies on s'ha caracteritzat l'expressió d'HR4, *D. melanogaster* (Sullivan i Thummel, 2003), *M. sexta*

(Hiruma i Riddiford, 2001), *B. mori* (Charles *et al.*, 1999) i *T. molitor* (Mouillet *et al.*, 1999).

Pel que fa a la regulació hormonal de BgHR4, hem demostrat que aquest factor s'activa per 20E, sobretot si en el medi d'incubació hi ha present l'inhibidor de la síntesi proteïca Chx (Fig. 6.7), la qual cosa indica que hi ha un repressor dependent de 20E que retarda la seva activació. La regulació hormonal d'HR4 només s'ha estudiat en dos insectes: *M. sexta* i *D. melanogaster* (Hiruma i Riddiford, 2001; King-Jones *et al.*, 2005). A *D. melanogaster*, DmHR4 s'activa directament per 20E però, al contrari del que succeeix a *B. germanica*, la seva màxima expressió necessita d'algun factor dependent d'aquesta hormona (King-Jones *et al.*, 2005). D'altra banda, a *M. sexta*, quan es fan incubacions d'epidermis amb 20E, s'observa que l'activació de MsHR4 es dona al cap de 24 h, i a més, aquesta activació depèn del manteniment de dosis elevades de 20E en el medi d'incubació (Hiruma i Riddiford, 2001). En canvi, quan les mateixes incubacions es fan amb 20E i un inhibidor de la síntesi proteïca l'activació de MsHR4 és molt més ràpida. Això indica que MsHR4 s'activa per 20E i que la lentitud d'aquesta activació és deguda a que un factor activat per la pròpia 20E manté reprimint MsHR4 mentre augmenten els nivells de 20E. Aquests últims resultats són similars als obtinguts en les incubacions de cos gras fetes a *B. germanica* (Fig. 6.7). Tal i com veurem en el següent capítol, postulem que el factor que retarda l'expressió de BgHR4 és BgE75.

6.3.3. Estudi funcional del receptor BgHR4 mitjançant RNAi *in vivo*

Tal i com havíem fet amb BgE75, l'estudi funcional del receptor nuclear BgHR4 es va dur a terme mitjançant RNAi *in vivo* (Cruz, 2006; Martin *et al.*, 2006). Remarcablement, la interferència de BgHR4 impedia la muda imaginal del 97% de les nimfes de sisena fase. Aquests insectes aturaven el desenvolupament en la transició nimfa-adult, i presentaven duplicació d'estructures ectodèrmiques (Fig. 6.9). Aquest fenotip és molt semblant al que s'observa quan s'interfereixen els receptors BgRXR (Martin *et al.*, 2006), BgEcR-A (Cruz *et al.*, 2006), BgHR3 (Cruz *et al.*, 2007) i BgFTZ-F1 (Cruz, 2006). En el cas de BgEcR-A, el fenotip ve donat perquè les nimfes tenen els

nivells de 20E alterats (Cruz *et al.*, 2006). No obstant, els nivells hemolimfàtics de 20E de les nimfes interferides amb dsBgHR4 no eren significativament diferents respecte als de les nimfes tractades amb dsControl (Fig. 6.10), la qual cosa indica que BgHR4 estaria relacionat amb el control de gens implicats en la muda. Si analitzem en detall l'expressió dels diferents receptors nuclears en els insectes interferits amb dsBgHR4, veiem que BgHR4 és necessari per a l'expressió de BgFTZ-F1, un factor imprescindible perquè la nimfa completi l'ècdisi i pugui seguir el desenvolupament (Fig. 6.11; Cruz, 2006). A *D. melanogaster* també s'ha vist que DmHR4 controla l'expressió de DmFTZ-F1, i s'ha demostrat que DmHR4 coordina la transició entre les fases de creixement (fases larvàries) i de maduració (fase de pupa), ja que la seva presència és necessària únicament durant la transició de la tercera fase larvària a pupa (King-Jones *et al.*, 2005). Aquest resultat difereix de l'observat a *B. germanica*, ja que BgHR4 és necessari durant les transicions nimfa-nimfa i nimfa-adult (vegeu l'apartat 6.2.7). Aquestes diferències es poden atribuir a que els insectes holometàbols tenen separades les fases de creixement de la de maduració, mentre que els insectes hemimetàbols, com és ara *B. germanica*, atès que el creixement i la maduració van acoblats al llarg del desenvolupament nimfal, BgHR4 resulta necessari en cadascuna d'elles.

D'altra banda, els estudis a escala molecular fets a *D. melanogaster* han demostrat que DmHR4 és un potent repressor de diferents gens de resposta a la 20E com són ara *DmEcR*, *DmE74* i *DmE75* (King-Jones *et al.*, 2005). En el model d'Ashburner, es postulava que els gens primerencs es reprimeixen ells mateixos, però, a l'època, aquest aspecte del model no havia estat demostrat (vegeu el capítol 1). Segons el model, la capacitat dels gens primerencs d'autoreprimir-se explicaria perquè aquests s'expressen de manera tant puntual i també explicaria perquè la seva expressió disminueix inclús quan els nivells de 20E es mantenen alts (Fig 6.1). Ara, amb els treballs de King-Jones *et al.* (2005) s'ha demostrat que DmHR4 és un receptor nuclear capaç de reprimir la transcripció dels gens primerencs *DmEcR*, *DmE74* i *DmE75*, la qual cosa permet explicar com es dona la caiguda dels nivells d'expressió dels gens primerencs. En el cas de *B. germanica*, també hem vist que BgHR4 pot actuar com a repressor dels gens primerencs, ja que és necessari per inhibir l'expressió de BgE75 al final de la sisena fase nimfal (Fig. 6.11). Finalment, els nostres experiments han demostrat per primera vegada

que BgHR3 és necessari perquè s'expressi BgHR4 (Fig 6.8). Això situaria BgHR4 com un factor molt important en l'eix funcional format per BgEcR-A/BgRXR, BgE75, BgHR3 i BgFTZ-F1, ja que és necessari pel control de l'expressió de BgE75 i BgFTZ-F1 (Fig. 6.11). El control de BgHR4 sobre BgFTZ-F1 podria donar-se de dues maneres. La primera seria mitjançant una activació directa d'aquest receptor nuclear, mentre que la segona passaria per que BgHR4 actués com a repressor del factor que manté inhibit BgFTZ-F1. A la figura 6.12 hem representat en un esquema un resum de les relacions existents entre els diferents receptors nuclears que explicaria tan l'expressió seqüencial de tots aquests factors com el seu paper en la regulació de la muda.

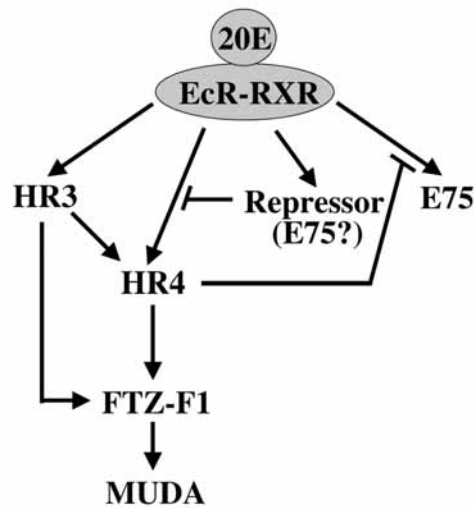


Figura 6.12.- Esquema integratiu de les relacions entre els diferents receptors nuclears que conformen l'eix funcional EcR/RXR-E75-HR3-HR4-FTZ-F1 durant la transició nimfa-adult a *B. germanica*.

**7. FUNCIO DELS RECEPTORS
NUCLEARS EN LA DEGENERACIO
DE LA GLANDULA PROTORACICA
DE *Blattella germanica***

7.1. ANTECEDENTS

En els darrers dos capítols hem demostrat que BgE75 regula la degeneració de la glàndula protoràcica al final de la darrera fase nimfal i que, al seu torn, BgHR4 regula l'expressió de BgE75 i BgFTZ-F1 en aquest teixit, determinant, així, un eix funcional format per BgE75, BgHR3, BgHR4 i BgFTZ-F1. Aquests resultats ens han portat a dissenyar un model de regulació per als gens implicats en aquest eix (Fig. 6.12).

En aquest capítol, l'objectiu és relacionar aquest eix transcripcional format pels receptors nuclears esmentats amb la degeneració de la glàndula protoràcica, la qual té lloc a la transició nimfa-adult. La degeneració de la glàndula protoràcica és un dels processos que tenen lloc en insectes hemimetàbols i que es poden considerar pròpiament metamòrfics, ja que només es dona en la transició entre el estadi nimfal i l'adult.

Com a model bàsic, doncs, per estudiar el procés de degeneració de la glàndula protoràcica utilitzarem nimfes de sisena fase interferides pel receptor nuclear BgE75, tal i com hem descrit al capítol 5.

A *D. melanogaster*, s'ha vist que la cascada gènica de resposta a la 20E està implicada en la degeneració de diferents teixits larvaris, com ara la glàndula salival, durant el estadi pupal (Jiang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). Així, per exemple, s'ha descrit que als mutants de *DmHR3* i *DmFTZ-F1*, la glàndula salival no degenera durant la prepupa (Broadus *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 1999). Des d'un punt de vista molecular, s'ha demostrat que la presència de *DmFTZ-F1*, just al començament de la prepupa, facilita l'acció dels gens *E74*, *BR-C* i *E93*, els quals indueixen la degeneració ràpida de la glàndula salival, mitjançant la inducció de l'expressió dels gens proapoptòtics *rpr* i *hid* (Jiang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Yin i Thummel, 2004; Cao *et al.*, 2007). No obstant, a *D. melanogaster* no s'ha pogut relacionar, *DmE75* o *DmHR4* amb la regulació de la mort cel·lular dels teixits ninfals (Jiang *et al.*, 2000; Terashima i Bownes, 2006). Els experiments basats en RNAi *in vivo* que presentem en el present capítol, demostren la implicació de BgE75 i BgHR4, així com de BgHR3 i BgFTZ-F1, en la degeneració de la glàndula protoràcica de *B. germanica* durant la transició entre la darrera fase nimfal i el estadi adult.

7.2. RESULTATS

7.2.1. Efecte de la interferència de BgE75 sobre l'expressió de BgHR3, BgHR4 i BgFTZ1

Al capítol 5 hem demostrat que la interferència de BgE75 durant la sisena fase nimfal provoca la degeneració de la glàndula protoràcica unes 72 h després (Fig 7.1A). En primer lloc, per estudiar aquest fenotip a escala molecular, i tenint en compte els patrons d'expressió dels diferents receptors nuclears que componen l'eix BgE75-BgHR3-BgHR4-BgFTZ-F1 a la glàndula protoràcica (Fig. 7.1B), es va comparar el patró d'expressió dels diferents receptors nuclears a la glàndula protoràcica, entre els dies 3 i 6 de la sisena fase nimfal. Per fer-ho, s'injectà 1 µg de dsControl o dsBgE75-1 a nimfes de sisena fase recentment emergides, i s'analitzà l'expressió dels receptors nuclears a les glàndules protoràciques a diferents dies d'edat per RT-PCR/Southern blot. Com s'observa a la figura 7.1C, la interferència de BgE75 provocava un clar avançament de l'expressió, primerament, de BgHR3, i després de BgHR4 i BgFTZ-F1. Cal remarcar que l'expressió del gen *BgActina5C* era molt baixa el dia 6 a les nimfes tractades amb dsBgE75-1, la qual cosa correlacionava perfectament amb el fet que aquestes glàndules protoràciques degeneraven a partir d'aquest dia (veieu Fig. 5.5). Per aquest motiu, els dos darrers dies de la sisena fase nimfal ja no es van poder incloure en l'estudi de expressió.

El següent pas va consistir en comprovar si l'avançament en l'expressió dels receptors nuclears esmentats podia ser responsable de la degeneració prematura de la glàndula protoràcica.

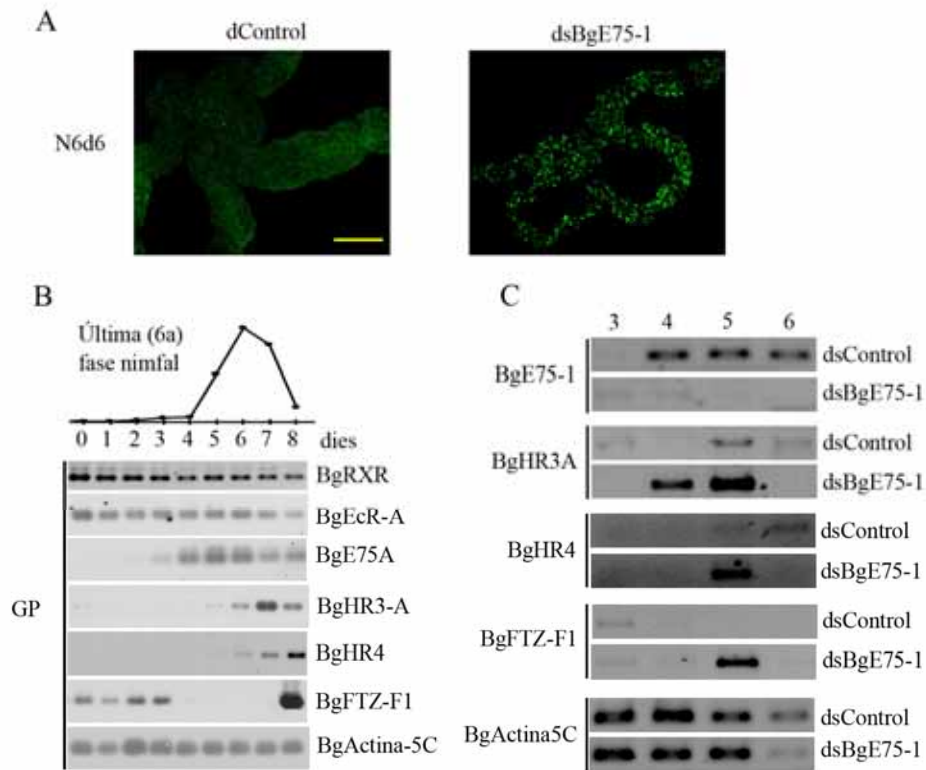


Figura 7.1.- Efecte de la interferència de BgE75 sobre l'expressió dels receptors nuclears BgHR3, BgHR4 i BgFTZ-F1 durant la sisena fase nimfal de *B. germanica*. (A) Tinció amb TUNEL d'una glàndula protoràtica d'una femella de sisena fase nimfal de set dies d'edat tractada amb 1 µg de dsControl, o amb 1 µg de dsBgE75-1. Es pot observar com la interferència de BgE75 provoca la degeneració prematura de la glàndula protoràtica. Escala: 200 µm. (B) Patrons d'expressió de diferents receptors nuclears en la glàndula protoràtica durant la sisena fase nimfal de *B. germanica*. Adaptat de Cruz (2006) i Martín *et al.*, (2005). (C) BgE75 regula l'expressió de BgHR3, BgHR4, BgFTZ-F1. Les femelles de sisena fase nimfal recentment emergides, eren tractades amb 1 µg de dsBgE75-1 o dsControl i es mesuraven els nivells de mRNA de diferents receptors nuclears mitjançant RT-PCR/Southern blot a la glàndula protoràtica, durant els dies indicats. Els nivells de BgActina5C es van mesurar com a referència. Els Southern/Blots són representatius d'almenys quatre individus diferents.

7.2.2. Efecte de la interferència de BgFTZ-F1 sobre la degeneració de la glàndula protoràtica

L'expressió de BgFTZ-F1 s'avança clarament en les nimfes tractades amb dsBgE75-1. BgFTZ-F1 és, doncs, un bon candidat per ser responsable de la inducció de la degeneració de la glàndula protoràtica a *B. germanica*. Aquesta hipòtesi es basa, a més, en els següents punts: (a) l'expressió del receptor nuclear BgFTZ-F1 és molt alta en la transició nimfa-adult, just coincidint amb el moment en què s'inicia la degeneració de la glàndula protoràtica, i (b) les femelles adultes a les quals se'ls havia interferit BgFTZ-F1 a la darrera fase nimfal, presentaven una glàndula protoràtica més gran i turgent que les de les femelles adultes tractades amb dsControl (Cruz, 2006). Aquests resultats ens van portar a postular que BgE75 regulava el moment en què degenera la glàndula protoràtica mitjançant el control de l'expressió de BgFTZ-F1. Per comprovar-ho, vam començar analitzant si, efectivament, l'absència de BgFTZ-F1 inhibia la degeneració de la glàndula protoràtica. Així, es va injectar 1 µg de un dsRNA dissenyat al LBD de BgFTZ-F1 (dsBgFTZ-F1) i, per tant, capaç d'interferir en l'expressió de totes les possibles isoformes d'aquest factor (o 1 µg de dsControl), a nimfes de sisena fase recentment emergides. Després de 8 o 9 dies, es seleccionaven les nimfes que havien mudat a adult (100 % de les nimfes tractades amb dsControl, i només 25 % de les tractades amb dsBgFTZ-F1, Cruz (2006)), se'ls extreia la glàndula protoràtica i s'observava el grau de degeneració mitjançant la tècnica de TUNEL. Com es pot comprovar a la figura 7.2, la glàndula protoràtica de les femelles adultes tractades amb dsControl degeneraven clarament, ja que mostraven un fort marcatge per TUNEL. Per contra, les glàndules protoràtiques dels adults tractats amb dsBgFTZ-F1 no mostraven cap símptoma de degeneració.

Una vegada confirmat el paper que juga BgFTZ-F1 en la degeneració de la glàndula protoràtica, vam voler comprovar si la sobreexpressió d'aquest factor a les nimfes interferides amb dsBgE75-1 era allò que provocava la degeneració prematura de la glàndula protoràtica. Per comprovar-ho, vam tractar nimfes recentment emergides a sisena fase amb 1 µg de dsBgE75-1 i 1 µg de dsBgFTZ-F1 alhora, i al cap de set dies es

va extreure la glàndula protoràtica per comprovar si havia degenerat, mitjançant la tècnica de TUNEL. Com a control, les nimfes es van tractar amb 1 µg de dsBgE75 i 1 µg de dsControl. Els resultats mostraven que, mentre la doble interferència amb dsBgE75-1 i dsControl provocava la degeneració de la glàndula (Fig. 7.3A), el tractament amb dsBgE75-dsBgFTZ-F1 resultava en una absència de marcatge per TUNEL, indicant que la glàndula protoràtica no degenerava (Fig. 7.3B). Aquest resultat confirmava que la mort prematura de la glàndula protoràtica de les nimfes tractades amb dsBgE75-1 és deguda a que l'expressió del receptor nuclear BgFTZ-F1 s'avança.

7.2.3. Efecte de la interferència de BgE75 sobre la degeneració de la glàndula protoràtica a la cinquena fase nimfal

Seguidament vam voler comprovar si la degeneració de la glàndula protoràtica provocada per la interferència de BgE75 era un procés que tenia lloc només a la transició nimfa-adult, o també passava a la transició nimfa-nimfa, ja que els patrons d'expressió dels diferents receptors nuclears a la glàndula protoràtica durant la cinquena fase nimfal eren similars als de la sisena (Fig. 4.2; Cruz, 2006; Maestro *et al.*, (2005)).

En primer lloc, vam analitzar el fenotip que s'obtenia al tractar amb 1 µg de dsBgE75-1 a nimfes de cinquena fase recentment emergides. Els resultats obtinguts van ser diferents als observats en la sisena fase nimfal. Així, mentre que el 100% de les nimfes dsControl mudaven a la sisena fase set dies després de la aplicació del dsRNA (Fig. 7.4A), el 53% (n= 68) de les nimfes tractades amb dsBgE75-1 van iniciar la muda nimfal, trencant la sutura dorsal però sense poder completar la muda, aturant el seu desenvolupament i morint sense poder acabar de desprendre's de l'exúvia, però mostrant duplicació de les estructures d'origen ectodèrmic (Fig 7.4B). L'altre 47% de nimfes tractades amb dsBgE75-1 restaven com nimfes de cinquena fase durant almenys 35 dies, i després morien, de manera molt similar a allò observat en interferir BgE75 durant la sisena fase.

Seguidament, es va analitzar el grau de degeneració de la glàndula protoràtica de les nimfes tractades amb dsControl i dsBgE75-1 durant els dos darrers dies de la cinquena fase nimfal. Per aixó, s'injectà 1 µg de dsBgE75 (o 1 µg de dsControl) a nimfes de cinquena fase recentment emergides i s'analitzà la glàndula protoràtica 5 o 6 dies després del tractament mitjançant la tècnica de TUNEL. Com es pot veure a la figura 7.5, en cap dels dos tractaments es va observar que la glàndula protoràtica degenerés (Fig 7.5A-D).

7.2.4. Paper de l'HJ en el manteniment de la glàndula protoràtica durant el desenvolupament nimfal

Després de demostrar que l'absència de BgE75 provoca la degeneració prematura de la glàndula protoràtica durant la darrera fase nimfal, però no a la penúltima, ens vam preguntar quin factor podia ser responsable d'aquest fet. La diferència més clara entre totes dues fases ninfals és la presència contínua d'HJ a l'hemolimfa de les nimfes de cinquena fase, i l'absència total d'aquesta hormona a la darrera fase nimfal. Per tal de comprovar si era l'HJ la responsable d'inhibir la degeneració de la glàndula protoràtica, vam aplicar metoprè, un potent i estable anàleg de l'HJ, a nimfes de sisena fase nimfal recentment emergides tractades amb 1 µg de dsBgE75-1 o 1 µg de dsControl. Així, vam aplicar 1 µg de metoprè a l'inici de la sisena fase nimfal i vam fer una segona aplicació 4 dies més tard. Al setè dia, es van extreure les glàndules protoràtiques de les nimfes així tractades, i es va examinar el grau de degeneració amb la tècnica de TUNEL. Confirmant els resultats obtinguts prèviament, mentre que la glàndula protoràtica de les nimfes tractades amb dsControl no donava marcatge (Fig. 7.6A), el tractament amb dsBgE75-1 provocava la degeneració prematura de la glàndula (Fig. 7.6B). Remarcablement, però, en aplicar metoprè a les nimfes interferides per BgE75, la glàndula protoràtica no mostava signes de degeneració, la qual cosa indicava clarament que la presència de l'anàleg de l'HJ prevenia la seva mort prematura (Fig. 7.6C).

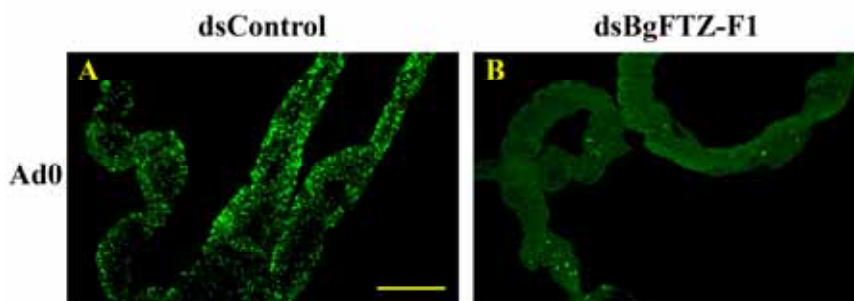


Figura 7.2.- Efecte de la interferència del receptor nuclear BgFTZ-F1 sobre la degeneració de la glàndula protoràcica de *B.germanica*. Femelles de sisena fase recentment emergides es van tractar amb 1 µg de dsControl (A) o 1 µg dsBgFTZ-F1 (B). Posteriorment es seleccionaven aquells insectes que havien completat la muda imaginal, se'ls extreia la glàndula protoràcica i s'analitzava amb la tècnica de TUNEL per detectar la degradació del DNA característica dels processos de mort cel·lular. Escala: 200 µm.

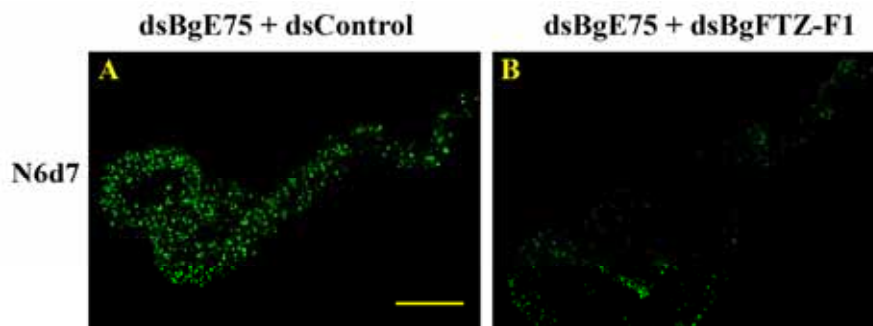


Figura 7.3.- Efecte de la doble interferència de BgE75 i BgFTZ-F1 sobre la degeneració de la glàndula protoràcica en la sisena fase nimfal de *B. germanica*. Femelles de sisena fase nimfal recentment emergides es van tractar amb dsBgE75 i dsControl a la mateixa femella (A) o dsBgE75 i dsBgFTZ-F1 (B) i al cap de set dies s'extreia la glàndula protoràcica i es detectava la seva degeneració mitjançant la tècnica de TUNEL. Escala: 200 µm.

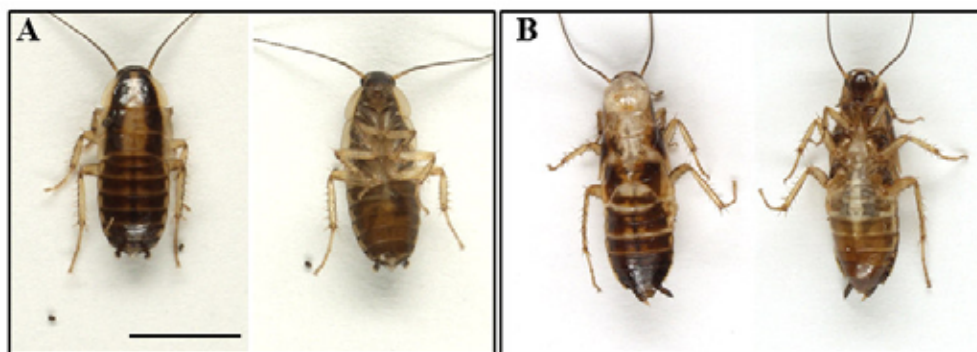


Figura 7.4.- Efecte de la interferència de BgE75 sobre la muda en nimfes de cinquena fase de *B. germanica*. Nimfes de cinquena fase recent emergides es van tractar amb 1 µg de dsControl, o 1 µg dsBgE75-1. Al cap de sis dies, s'observava l'efecte sobre la muda. Mentre que les nimfes tractades amb dsControl mudaven a nimfes de sisena fase (A), el 53% de les nimfes tractades amb dsBgE75-1 no completaven l'ècdisi i aturaven el desenvolupament en la transició a la sisena fase nimfal (B). Escala: 5 mm.

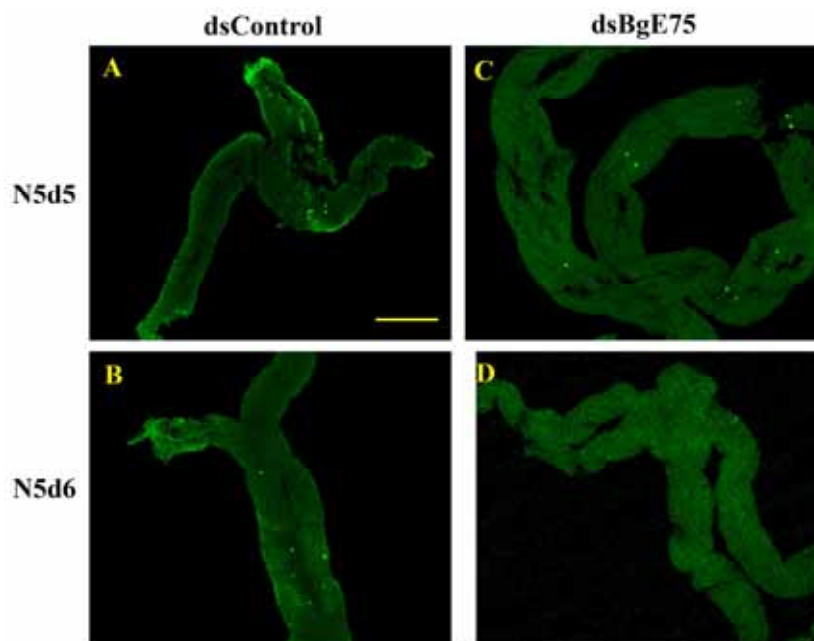


Figura 7.5.- Efecte de la interferència de BgE75 sobre la degeneració de la glàndula protoràtica de nimfes de cinquena fase de *B. germanica*. Femelles de cinquena fase nimfal recentment emergides es van tractar amb 1 µg de dsControl (A, B) o 1 µg dsBgE75-1 (C, D). El dia 5 o 6, s'extreia la glàndula protoràtica i s'examina mitjançant la tècnica de TUNEL. Escala: 200 µm.

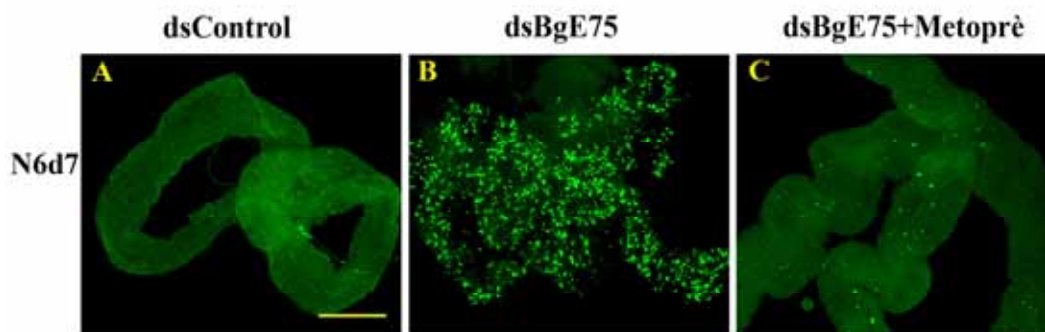


Figura 7.6.- Efecte de l'anàleg de l'HJ, metoprè, en el manteniment de la glàndula protoràcica en nimfes de sisena fase de *B. germanica*. Nimfes de sisena fase nimfal recentment emergides eren tractades amb 1 µg de dsControl (A), 1 µg dsBgE75-1 (B), o 1 µg dsBgE75-1 i 1 µg de metoprè (C). Al cap de set dies, s'examinava la glàndula protoràcica mitjançant la tècnica de TUNEL. Escala: 200 µm.

7.3. DISCUSSIÓ

En aquest darrer capítol de resultats hem demostrat que la degeneració de la glàndula protoràtica a *B. germanica* depèn de l'expressió de BgFTZ-F1 i que, per la seva banda, aquesta expressió està regulada per l'eix funcional BgE75-BgHR3-BgHR4 dependent de 20E (Fig. 6.12). Hem mostrat també, que les nimfes de sisena fase interferides per BgE75, no muden a adult perquè la glàndula protoràtica degenera prematurament i no es poden sintetitzar els ecdisteroides que calen per la muda. A més, hem demostrat que la presència d'HJ evita que BgFTZ-F1 indueixi la degeneració de la glàndula protoràtica, provocant que aquest procés només és dongui en la transició nimfa-adult, és a dir, quan els nivells de l'HJ a l'hemolinfa son indetectables. Finalment, hem comprovat que BgE75 té altres funcions, a més del control de la degeneració de la glàndula protoràtica, perquè les nimfes de cinquena fase interferides per BgE75, en les quals la glàndula protoràtica no degenera, aturen el desenvolupament sense poder completar la muda nimfal, o resten com nimfes de cinquena fase fins que moren (Fig. 7.4).

7.3.1. Funció dels receptors nuclears en la degeneració de la glàndula protoràtica durant la sisena fase nimfal de *B. germanica*

Prèviament, ja s'havia demostrat que la 20E està implicada en la degeneració de la glàndula protoràtica de *B. germanica*. La interferència de BgEcR-A evita la degeneració de la glàndula protoràtica de aquelles femelles que arriben a la fase adulta (Cruz *et al.*, 2006). Amb els resultats obtinguts en aquesta tesi, hem aprofundit en el mecanisme molecular a través del qual es regula la degeneració. Així, el model que proposem és el següent: el pic de 20E que apareix durant la segona meitat de la sisena fase nimfal activa en primer lloc BgE75 i posteriorment BgHR3 i BgHR4 (Fig. 7.1B i Cruz *et al.* 2007). El fet que en interferir l'expressió de BgE75 s'avanci notablement l'expressió de BgHR3 primer i de BgHR4 després, suggereix que en les nimfes normals, BgE75 reprimeix la inducció de BgHR3 i BgHR4 quan els nivells circulants de 20E

pujen (Fig. 7.1C). Més tard, quan els nivells de 20E són més alts, el dia 6, l'expressió de BgHR3 i de BgHR4 s'incrementa, la qual cosa té dues conseqüències. En primer lloc, BgHR4 inhibeix l'expressió de BgE75, tal i com hem demostrat en nimfes interferides per BgHR4 (vegeu la Fig. 6.11), i en segon lloc, els nivells alts de BgHR3 i BgHR4 induïxen l'activació de BgFTZ-F1, tal i com hem demostrat amb els experiments de interferència de BgHR3 i BgHR4 en nimfes de sisena fase (veieu Figs. 6.8 i 6.11). En resum, podríem considerar que aquest complex sistema de regulació de la expressió dels diferents receptors nuclears té com finalitat principal controlar molt finament l'expressió de BgFTZ-F1, factor clau pel control de la degeneració de la glàndula protoràcica a *B. germanica*.

La destrucció controlada per ecdisteroides de teixits larvaris, s'ha estudiat sobretot en relació a la degeneració de la glàndula salival de *D. melanogaster*, durant la metamorfosi. En aquest insecte, un pic de 20E marca el final de la tercera fase larvària i l'entrada a la fase de prepupa. Poques hores després, un segon pic de 20E, marca la transició de prepupa a pupa i és en aquest moment quan es destrueixen els teixits larvaris, entre ells la glàndula salival, i es formen els teixits adults a partir dels discs imaginals (Thummel, 2001; Yin i Thummel, 2005). A escala molecular, s'ha vist que la destrucció de la glàndula salival està induïda per determinats factors que conformen la cascada gènica de resposta a la 20E, i està inhibida per la presència de fork head, un factor de transcripció homòleg a HNF-3 de vertebrats (Lee *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2007). Així, en la fase de prepupa d'aquest insecte, just abans de que s'iniciï la degeneració de la glàndula salival, DmHR3 activa DmFTZ-F1 (Lavorgna *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1997). Al seu torn, DmFTZ-F1 actua com a factor de competència, facilitant l'activació de determinats factors que pertanyen a la cascada gènica de resposta a la 20E que, al seu torn, induïxen la degeneració de la glàndula salival. A *D. melanogaster*, aquests gens inductors de mort cel·lular són el propi receptor d'ecdisona (*DmEcR-DmUSP*), *E74A*, *BR-C* i *E93* (Woodard *et al.*, 1994; Broadus *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Lee i Baehrecke, 2001; Davis *et al.*, 2005). Aquests gens induïxen la degeneració de la glàndula salival en activar els factors pro-apoptòtics *rpr* i *hid* (Lee *et al.*, 2002; Yin i Thummel, 2004). Finalment, *rpr* i *hid* actuen sobre l'inhibidor d'apoptòsi *diap1*, de manera que impedeixen la seva funció i, per tant,

permeten la acció de les caspases efectores, com ara dronc, croquemort o ark, les quals destrueixen les cèl·lules del teixit (Cakouros *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Yin i Thummel, 2004), Fig. 7.7. D'altra banda, la presència continuada de fork head evita la mort prematura de la glàndula i no és fins que aquest factor deixa d'expressar-se que la glàndula comença a degenerar sota l'acció dels factors prèviament esmentats (Cao *et al.*, 2007).

Així, comparant el que succeeix a *D. melanogaster* i a *B. germanica*, veiem que tots dos insectes regulen la degeneració dels respectius teixits mitjançant la cascada gènica de resposta a la 20E. No obstant, a *B. germanica* BgE75 juga un paper principal, mentre que a *D. melanogaster* el paper d'E75 en la mort cel·lular de teixits larvaris no ha estat descrit. De fet, només s'ha descrit un cas on es demostra que DmE75A i DmE75B estan implicats, respectivament, en la inducció i la repressió de la mort cel·lular que afecta a les cèl·lules nodradores de les càmbrs ovàriques (Terashima i Bownes, 2006). D'altra banda, també s'ha descrit que DmE75 està implicat en el control de l'inhibidor d'apoptosi Diap2 (Jiang *et al.*, 2000), tot i que s'ha pogut demostrar que Diap2 no és necessari per evitar la mort de cap teixit durant tot el desenvolupament de la mosca (Yin i Thummel, 2004). En canvi, a *B. germanica* hem demostrat que BgE75 controla la degeneració de la glàndula protoràtica mitjançant la regulació del moment precís en què s'expressa BgHR3, BgHR4 i, com a conseqüència, BgFTZ-F1 (Fig. 7.7). Aquest resultat és significativament diferent a l'observat en els mutants de DmE75A de *D. melanogaster*, en els quals la manca d'aquest receptor no altera l'expressió de DmFTZ-F1 (Bialecki *et al.*, 2002). Això indica que el mecanisme de degeneració de teixits durant els períodes nimfals/larvaris és diferent en aquests dos insectes tot i que, en ambdós casos, la destrucció dels teixits es produeix a través de factors induïts pels ecditeroides (Fig. 7.7). D'altra banda, encara que hem demostrat que el receptors nuclears BgHR3 i BgHR4 són necessaris perquè s'expressi BgFTZ-F1 (Fig. 6.8 i 6.11) i, per tant, estan implicats en el control de la degeneració de la glàndula protoràtica, no hem pogut estudiar funcionalment aquesta possibilitat ja que les nimfes interferides per BgHR3 o BgHR4 aturen el desenvolupament en la transició nimfa-adult i no podíem obtenir adults interferits on analitzar l'estat de les glàndules protoràtiques.

Una característica comuna, tan a *B. germanica* com a *D. melanogaster*, respecte la degeneració dels teixits, és el paper del receptor FTZ-F1. Així, a *D. melanogaster* ha estat descrit àmpliament el paper d'aquest factor en la degeneració de la glàndula salival (Jiang *et al.*, 2000; Cakouros *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). En aquests treballs, s'ha vist que la sobreexpressió prematura de DmFTZ-F1, provoca la mort prematura de la glàndula salival, mentre que a mosques mutants, la glàndula salival no degenera i es pot visualitzar durant tot el desenvolupament pupal (Broadus *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002).

7.3.2. Paper de l'HJ en el manteniment de la glàndula protoràcica durant el desenvolupament nimfal

Durant el desenvolupament post-embriònic dels insectes, els pics successius de 20E que es donen al final de cada fase, desencadenen la muda. Per la seva banda, la presència o absència d'HJ determina la naturalesa d'aquesta muda (Riddiford, 1996). Així, quan els nivells d'HJ són alts, el pic de 20E determina una muda nimfa-nimfa (o larva-larva, en el cas dels insectes holometàbols), mentre que si el pic de 20E es dona en absència d'HJ, l'insecte muda a adult. En aquest sentit, s'ha demostrat en diferents insectes, que l'aplicació d'HJ en fases larvàries o ninfals que no presenten aquesta hormona, dona lloc a larves o ninfes supernumeràries. El mecanisme pel qual l'HJ és capaç de mantenir els caràcters juvenils i evitar la maduració de l'insecte encara no es coneix en detall.

En aquest capítol hem descrit el paper que exerceix l'HJ, tot impedit la degeneració de la glàndula protoràcica durant la sisena fase en ninfes interferides per BgE75 (Fig. 7.6). Fins ara, només s'ha descrit un efecte antiapoptòtic de l'HJ, impedit la degeneració de la glàndula protoràcica a *M. sexta*. En aquest treball es demostra que la injecció d'HJ en pupes de *M. sexta*, impedeix la degeneració de la glàndula protoràcica, i que aquesta manté llavors la capacitat de produir ecdisteroides (Dai i Gilbert, 1998). En canvi, a *D. melanogaster*, sembla que és el factor de transcripció fork head el que bloqueja la degeneració de la glàndula salival durant les diferents fases larvàries, de manera semblant a com ho fa l'HJ a *B. germanica* o a *M. sexta*. Així, *fork*

head està present al llarg de tot el desenvolupament de *D. melanogaster* i s'encarrega d'inhibir els factors apoptòtics *rpr* i *hid*. Coincidint amb el segon pic de 20E, durant la prepupa, *fork head* deixa d'expressar-se a la glàndula salival i, llavors, la glàndula salival degenera (Fig. 7.7); (Cao *et al.*, 2007; Thummel, 2007). Per contra, a *B. germanica*, la degeneració de la glàndula protoràcica està controlada per un únic pic de 20E, que es dona al final de sisena fase nimfal, el qual indueix BgFTZ-F1 mitjançant l'eix regulador BgE75-BgHR3-BgHR4 (Fig. 7.7). El mecanisme que quedaria pendent de determinar és com l'HJ evita la mort cel.lular i si aquesta hormona exerceix el seu paper inhibitor a través de modular la funció de BgFTZ-F1. Al mosquit *A. aegypti* s'ha demostrat que l'HJ indueix la traducció del ARNm de FTZ-F1 al cos gras durant el període previtel·logènic (Zhu *et al.*, 2003). En el nostre cas, però, sembla que l'efecte és més aviat el contrari, ja que en presència d'HJ, BgFTZ-F1 no és capaç d'induir la degeneració de la glàndula protoràcica.

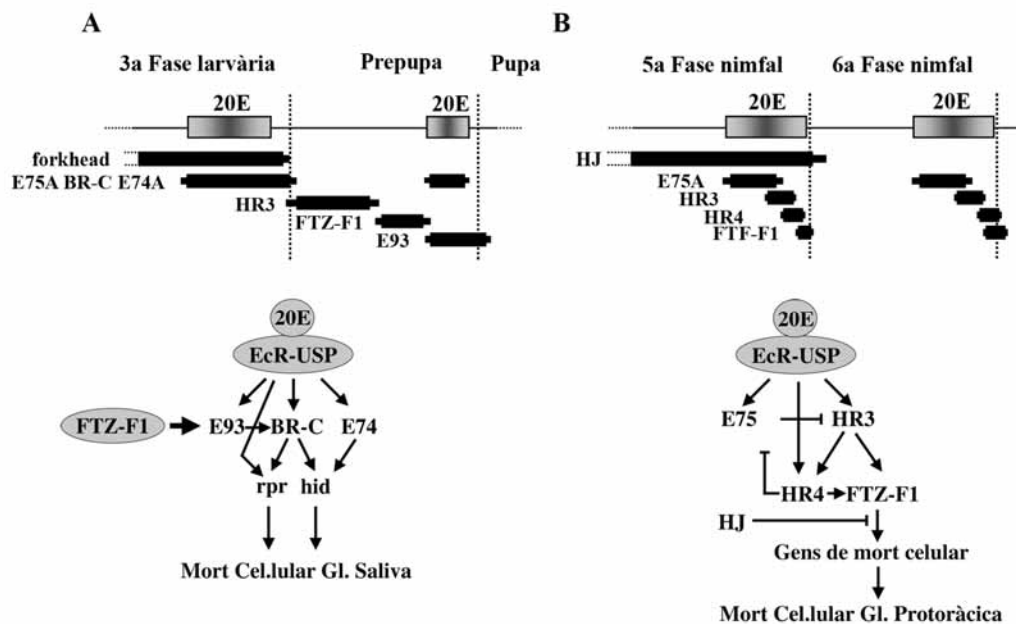


Figura 7.7.- Patrons d'expressió i diagrama del mecanisme d'acció dels gens implicats en (A) la degeneració de la glàndula salival de *D. melanogaster* i (B) la degeneració de la glàndula protoràcica de *B. germanica*.

7.3.3. Les múltiples funcions de BgE75 al llarg del desenvolupament nimfal

Finalment, és interessant destacar que la interferència de BgE75 en la penúltima fase nimfal provoca que el 53% de les nimfes interferides aturin el desenvolupament en mudar a sisena fase, a diferència d'allò que passava en les nimfes interferides de sisena fase, on pràcticament totes les nimfes es mantienien en aquest estadi. Aquest resultat indica clarament que BgE75 està implicat en d'altres processos, a més del control de la degeneració de la glàndula protoràtica. Una de les funcions en les quals el receptor nuclear BgE75 també està implicat és la de completar el procés de muda. El fet que BgE75 reguli l'expressió de BgHR3, BgHR4 i BgFTZ-F1 (Fig. 7.1C), juntament amb el fet que les nimfes interferides per aquest tres factors nuclears aturin el seu desenvolupament i siguin incapaces de completar la muda (Cruz *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007), de manera molt similar a l'observat a l'interferir BgE75 en la cinquena fase nimfal, indica que BgE75 és absolutament necessari pel procés de muda. Així, el paper de BgE75 en la muda s'hauria d'estudiar durant la cinquena fase nimfal, ja que la presència d'HJ en aquesta fase evita la mort prematura de la glàndula protoràtica que es solapa a l'efecte de BgE75 en l'ècdisi.

8. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts durant la realització del present treball, es poden deduir les conclusions següents:

- 1.- L'eix gènic format pels receptors nuclears BgE75, BgHR3, BgHR4 i BgFTZ-F1, descobert previament en insectes holometàbols, està conservat en els insectes hemimetàbols, ja que a més dels factors previament caracteritzats a *B. germanica*, BgHR3 i BgFTZ-F1, hem clonat 5 isoformes del receptor nuclear BgE75 i una de BgHR4. Totes les isoformes dels receptors nuclears que s'han clonat presenten uns patrons d'expressió característics i repetitius tant en l'embriogènesi com durant el desenvolupament nimfal.
- 2.- La 20E regula de forma directa l'expressió de BgHR4 i de totes les isoformes de BgE75, excepte BgE75D.
- 3.- La funció de BgE75 és indispensable per al desenvolupament nimfal de *B. germanica*. L'interferència d'aquest receptor nuclear durant la darrera fase nimfal, mitjançant la tècnica d'RNAi *in vivo*, resulta en la degeneració prematura de la glàndula protoràcica, teixit responsable de la síntesi d'ecdisteroides. La conseqüència d'aquesta degeneració prematura és la deficiència en els nivells d'ecdisteroides circulants a la nimfa, la qual cosa impedeix que es dugui a terme el procés de muda.
- 4.- Les diferents isoformes del receptor nuclear BgE75, actúen de manera redundant durant el desenvolupament nimfal.
- 5.- El pic de 20E que es dona al final de la sisena fase nimfal no senyalitza la transició a la fase adulta desde un punt de vista genètic, ja que les nimfes interferides per BgE75, les quals tenen uns nivells d'ecdisteroides hemolimfàtics molt baixos, inicien el programa genètic adult tot i romandre morfològicament com a nimfes.

6.- El receptor nuclear BgHR4, és necessari per el desenvolupament nimfal correcte de *B. germanica*, ja que és indispensable per a dur a terme el procés d'ècdisi al final de la cinquena i sisena fase ninfals. Aquest efecte el produeix en actuar a dos nivells: induint l'expressió del receptor nuclear BgFTZ-F1, i inhibint l'expressió de determinats gens primerencs regulats per la 20E, com és ara BgE75.

7.- L'HJ té un efecte antiapoptòtic durant el desenvolupament nimfal de *B. germanica*. Aquesta hormona cal que estigui totalment absent durant la última fase nimfal, per tal que l'eix gènic format pels receptors nuclears BgE75, BgHR3, BgHR4 i BgFTZ-F1 indueixi la degeneració de la glàndula protoràcica en la transició nimfa-adult.

9. BIBLIOGRAFIA

-
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Ashburner, M. (1973). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. I. Dependence upon ecdysone concentration. *Dev Biol* **35**, 47-61.
- Ashburner, M. (1974). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. The effects of inhibitors of protein synthesis. *Dev Biol* **39**, 141-157.
- Bayer, C., Zhou, X., Zhou, B., Riddiford, L.M. i von Kalm, L. (2003). Evolution of the *Drosophila* broad locus: the *Manduca sexta* broad Z4 isoform has biological activity in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **213**, 471-476.
- Bellés, X., Casas, J., Messeguer, A. i Piulachs, M.D. (1987). *in vitro* biosynthesis of JH III by the corpora allata of adult females of *Blattella germanica* (L.). *insect Biochem*, 1007-1010.
- Bellés, X., Martin, D. i Piulachs, M.D. (2005). The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol* **50**, 181-199.
- Bialecki, M., Shilton, A., Fichtenberg, C., Segraves, W.A. i Thummel, C.S. (2002). Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 209-220.
- Bilder, D. i Scott, M.P. (1995). Genomic regions required for morphogenesis of the *Drosophila* embryonic midgut. *Genetics* **141**, 1087-1100.
- Broadus, J., McCabe, J.R., Endrizzi, B., Thummel, C.S. i Woodard, C.T. (1999). The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol Cell* **3**, 143-149.
- Browder, M.H., D'Amico, L.J. i Nijhout, H.F. (2001). The role of low levels of juvenile hormone esterase in the metamorphosis of *Manduca sexta*. *J Insect Sci* **1**, 11.
- Burke, L., Downes, M., Carozzi, A., Giguere, V. i Muscat, G.E. (1996). Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb beta is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res* **24**, 3481-3489.

- Cakouros, D., Daish, T., Martin, D., Baehrecke, E.H. i Kumar, S. (2002). Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in *Drosophila* is regulated by Broad-Complex. *J Cell Biol* **157**, 985-995.
- Cao, C., Liu, Y. i Lehmann, M. (2007). Fork head controls the timing and tissue selectivity of steroid-induced developmental cell death. *J Cell Biol* **176**, 843-852.
- Casals, N., Buesa, C., Marrero, P.F., Belles, X. i Hegardt, F.G. (2001). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase-1 of *Blattella germanica* has structural and functional features of an active retrogene. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 425-433.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**, 540-552.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carre, C., Noselli, S. i Leopold, P. (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* **310**, 667-670.
- Comas, D., Piulachs, M.D. i Belles, X. (1999). Fast induction of vitellogenin gene expression by juvenile hormone III in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *Insect Biochem Mol Biol* **29**, 821-827.
- Comas, D., Piulachs, M.D. i Belles, X. (2001). Induction of vitellogenin gene transcription in vitro by juvenile hormone in *Blattella germanica*. *Mol Cell Endocrinol* **183**, 93-100.
- Cruz, J. (2006). Receptores nucleares implicados en la regulación endocrina en *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Caracterización de los genes BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1, *Universitat de Barcelona (UB) - Departamento de Fisiología, Barcelona*.
- Cruz, J., Mane-Padros, D., Belles, X. i Martin, D. (2006). Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Dev Biol* **297**, 158-171.
- Cruz, J., Martin, D. i Belles, X. (2007). Redundant ecdysis regulatory functions of three nuclear receptor HR3 isoforms in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Mech Dev* **124**, 180-189.
- Cruz, J., Martin, D., Pascual, N., Maestro, J.L., Piulachs, M.D. i Belles, X. (2003). Quantity does matter. Juvenile hormone and the onset of vitellogenesis in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 1219-1225.

- Chan, S.M. (1998). Cloning of a shrimp (*Metapanaeus ensis*) cDNA encoding a nuclear receptor superfamily member: an insect homologue of E75 gene. *FEBS Lett* **436**, 395-400.
- Charles, J.P., Shinoda, T. i Chinzei, Y. (1999). Characterization and DNA-binding properties of GRF, a novel monomeric binding orphan receptor related to GCNF and betaFTZ-F1. *Eur J Biochem* **266**, 181-190.
- Chavez, V.M., Marques, G., Delbecque, J.P., Kobayashi, K., Hollingsworth, M., Burr, J., Natzle, J.E. i O'Connor, M.B. (2000). The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* **127**, 4115-4126.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M. i Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**, 1866-1870.
- Dai, J.D. i Gilbert, L.I. (1991). Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland. *Dev Biol* **144**, 309-326.
- Dai, J.D. i Gilbert, L.I. (1998). Juvenile hormone prevents the onset of programmed cell death in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol* **109**, 155-165.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A. i Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* **11**, 1025-1033.
- Davis, M.B., Carney, G.E., Robertson, A.E. i Bender, M. (2005). Phenotypic analysis of EcR-A mutants suggests that EcR isoforms have unique functions during *Drosophila* development. *Dev Biol* **282**, 385-396.
- Downes, M., Burke, L.J. i Muscat, G.E. (1996). Transcriptional repression by Rev-erbA alpha is dependent on the signature motif and helix 5 in the ligand binding domain: silencing does not involve an interaction with N-CoR. *Nucleic Acids Res* **24**, 3490-3498.
- Dubrovskaya, V.A., Berger, E.M. i Dubrovsky, E.B. (2004). Juvenile hormone regulation of the E75 nuclear receptor is conserved in Diptera and Lepidoptera. *Gene* **340**, 171-177.
- Dubrovsky, E.B., Dubrovskaya, V.A. i Berger, E.M. (2004). Hormonal regulation and functional role of *Drosophila* E75A orphan nuclear receptor in the juvenile hormone signaling pathway. *Dev Biol* **268**, 258-270.

- Evans, R.M. (2005). The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol Endocrinol* **19**, 1429-1438.
- Evans, R.M., Barish, G.D. i Wang, Y.X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* **10**, 355-361.
- Feigl, G., Gram, M. i Pongs, O. (1989). A member of the steroid hormone receptor gene family is expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff 75B in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **17**, 7167-7178.
- Forthman, M.A., Dush, M.K. i Marti, G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8998-9002.
- Fuhrmann, G., Chung, A.C., Jackson, K.J., Hummelke, G., Baniahmad, A., Sutter, J., Sylvester, I., Scholer, H.R. i Cooney, A.J. (2001). Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor. *Dev Cell* **1**, 377-387.
- Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M. i Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* **8**, 538-553.
- Gilbert, L.I. (2004). Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* **215**, 1-10.
- Gilbert, L.I., Rybczynski, R. i Warren, J.T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol* **47**, 883-916.
- Gissendanner, C.R., Crossgrove, K., Kraus, K.A., Maina, C.V. i Sluder, A.E. (2004). Expression and function of conserved nuclear receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **266**, 399-416.
- Glass, C.K. i Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**, 121-141.
- Greschik, H. i Schule, R. (1998). Germ cell nuclear factor: an orphan receptor with unexpected properties. *J Mol Med* **76**, 800-810.
- Greschik, H., Wurtz, J.M., Hublitz, P., Kohler, F., Moras, D. i Schule, R. (1999). Characterization of the DNA-binding and dimerization properties of the nuclear orphan receptor germ cell nuclear factor. *Mol Cell Biol* **19**, 690-703.

- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V. i Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* **20**, 391-403.
- Guindon, S. i Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.
- Harding, H.P. i Lazar, M.A. (1995). The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol Cell Biol* **15**, 4791-4802.
- Hiruma, K. i Riddiford, L.M. (2001). Regulation of transcription factors MHR4 and betaFTZ-F1 by 20-hydroxyecdysone during a larval molt in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* **232**, 265-274.
- Hiruma, K. i Riddiford, L.M. (2004). Differential control of MHR3 promoter activity by isoforms of the ecdysone receptor and inhibitory effects of E75A and MHR3. *Dev Biol* **272**, 510-521.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404.
- Horner, M.A., Chen, T. i Thummel, C.S. (1995). Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Dev Biol* **168**, 490-502.
- Huh, J.R., Foe, I., Muro, I., Chen, C.H., Seol, J.H., Yoo, S.J., Guo, M., Park, J.M. i Hay, B.A. (2007). The *Drosophila* inhibitor of apoptosis (IAP) DIAP2 is dispensable for cell survival, required for the innate immune response to gram-negative bacterial infection, and can be negatively regulated by the reaper/hid/grim family of IAP-binding apoptosis inducers. *J Biol Chem* **282**, 2056-2068.
- Hummelke, G.C. i Cooney, A.J. (2001). Germ cell nuclear factor is a transcriptional repressor essential for embryonic development. *Front Biosci* **6**, D1186-1191.
- Jiang, C., Lamblin, A.F., Steller, H. i Thummel, C.S. (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol Cell* **5**, 445-455.
- Jin, X., Sun, X. i Song, Q. (2005). Woc gene mutation causes 20E-dependent alpha-tubulin deetyrosination in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol* **60**, 116-129.

- Jindra, M., Sehna, F. i Riddiford, L.M. (1994). Isolation, characterization and developmental expression of the ecdysteroid-induced E75 gene of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Biochem* **221**, 665-675.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. i Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**, 275-282.
- Kageyama, Y., Masuda, S., Hirose, S. i Ueda, H. (1997). Temporal regulation of the mid-prepupal gene FTZ-F1: DHR3 early late gene product is one of the plural positive regulators. *Genes Cells* **2**, 559-569.
- Karim, F.D. i Thummel, C.S. (1992). Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *Embo J* **11**, 4083-4093.
- Kersten, S., Desvergne, B. i Wahli, W. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**, 421-424.
- Keshan, B., Hiruma, K. i Riddiford, L.M. (2006). Developmental expression and hormonal regulation of different isoforms of the transcription factor E75 in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev Biol* **295**, 623-632.
- Kim, H.W., Lee, S.G. i Mykles, D.L. (2005). Ecdysteroid-responsive genes, RXR and E75, in the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: differential tissue expression of multiple RXR isoforms generated at three alternative splicing sites in the hinge and ligand-binding domains. *Mol Cell Endocrinol* **242**, 80-95.
- King-Jones, K., Charles, J.P., Lam, G. i Thummel, C.S. (2005). The ecdysone-induced DHR4 orphan nuclear receptor coordinates growth and maturation in *Drosophila*. *Cell* **121**, 773-784.
- King-Jones, K. i Thummel, C.S. (2005a). Developmental biology. Less steroids make bigger flies. *Science* **310**, 630-631.
- King-Jones, K. i Thummel, C.S. (2005b). Nuclear receptors--a perspective from *Drosophila*. *Nat Rev Genet* **6**, 311-323.
- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segreaves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P. i Hogness, D.S. (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**, 59-77.
- Kozlova, T. i Thummel, C.S. (2003). Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science* **301**, 1911-1914.
- Kurtti, T.J. i Brooks, M.A. (1977). Isolation of cell lines from embryos of the cockroach *Blattella germanica*. *in Vitro* **13**, 11-17.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J.T. i Rees, H. (2005). Ecdysteroid chemistry and biochemistry In: L. I. Gilbert, K. Iatrou i S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol 3, pp. 125-195. Elsevier, Oxford.
- Lam, G., Hall, B.L., Bender, M. i Thummel, C.S. (1999). DHR3 is required for the prepupal-pupal transition and differentiation of adult structures during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* **212**, 204-216.
- Lam, G.T., Jiang, C. i Thummel, C.S. (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**, 1757-1769.
- Laudet, V. i Bonneton, F. (2005). Evolution of nuclear receptors in insects(Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol 3, pp. 287-318 Elsevier, Oxford.
- Lavorgna, G., Karim, F.D., Thummel, C.S. i Wu, C. (1993). Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3004-3008.
- Lee, C.Y. i Baehrecke, E.H. (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* **128**, 1443-1455.
- Lee, C.Y., Simon, C.R., Woodard, C.T. i Baehrecke, E.H. (2002). Genetic mechanism for the stage- and tissue-specific regulation of steroid triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Dev Biol* **252**, 138-148.
- Lee, C.Y., Wendel, D.P., Reid, P., Lam, G., Thummel, C.S. i Baehrecke, E.H. (2000). E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Mol Cell* **6**, 433-443.
- Lee, C.H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., *et al.* (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3444-3449.
- Maestro, J.L. i Belles, X. (2006). Silencing allatostatin expression using double-stranded RNA targeted to preproallatostatin mRNA in the German cockroach. *Arch Insect Biochem Physiol* **62**, 73-79.
- Maestro, O., Cruz, J., Pascual, N., Martin, D. i Belles, X. (2005). Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the hemimetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Mol Cell Endocrinol* **238**, 27-37.

- Mangelsdorf, D.J. i Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., *et al.* (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- Margam, V.M., Gelman, D.B. i Palli, S.R. (2006). Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Insect Physiol* **52**, 558-568.
- Martin, D., Maestro, O., Cruz, J., Mane-Padros, D. i Belles, X. (2006). RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *J Insect Physiol* **52**, 410-416.
- Martin, D., Piulachs, M.D., Comas, D. i Belles, X. (1998). Isolation and sequence of a partial vitellogenin cDNA from the cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Diptoptera, Blattellidae), and characterization of the vitellogenin gene expression. *Arch Insect Biochem Physiol* **38**, 137-146.
- Martin, D., Piulachs, M.D. i X., B. (1995). Patterns of haemolymph vitellogenin and ovarian vitellin in the German cockroach, and the role of juvenile hormone. *Physiol. Entomol.* **20**, 59-65.
- Matsuoka, T. i Fujiwara, H. (2000). Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (fl) of *Bombyx mori*. *Dev Genes Evol* **210**, 120-128.
- Mouillet, J.F., Bousquet, F., Sedano, N., Alabouvette, J., Nicolai, M., Zelus, D., Laudet, V. i Delachambre, J. (1999). Cloning and characterization of new orphan nuclear receptors and their developmental profiles during *Tenebrio* metamorphosis. *Eur J Biochem* **265**, 972-981.
- Munderloh, U.G. i Kurtti, T.J. (1989). Formulation of medium for tick cell culture. *Experimental & Applied Acarology* **7**, 219-229.
- Neubueser, D., Warren, J.T., Gilbert, L.I. i Cohen, S.M. (2005). molting defective is required for ecdysone biosynthesis. *Dev Biol* **280**, 362-372.
- Nijhout, H. (1994). *Insect Hormones*, Princeton, NJ: Princeton Univ. Press.
- Ono, H., Rewitz, K.F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J.T., Marques, G., *et al.* (2006). Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev Biol* **298**, 555-570.

- Palanker, L., Necakov, A.S., Sampson, H.M., Ni, R., Hu, C., Thummel, C.S. i Krause, H.M. (2006). Dynamic regulation of *Drosophila* nuclear receptor activity in vivo. *Development* **133**, 3549-3562.
- Palli, S.R., Ladd, T.R., Ricci, A.R., Sohi, S.S. i Retnakaran, A. (1997). Cloning and development expression of *Choristoneura* hormone receptor 75: a homologue of the *Drosophila* E75A gene. *Dev Genet* **20**, 36-46.
- Pascual, N., Cerdà, X., Benito, B., Tomás, J., Piulachs, M.D. i Bellés, X. (1992). Ovarian ecdysteroids levels and basal oocyte development during maturation in the cockroach *Blattella germanica* (L.). *J Insect Physiol* **38**, 339-348.
- Paul, R.K., Takeuchi, H. i Kubo, T. (2006). Expression of Two Ecdysteroid-Regulated Genes, Broad-Complex and E75, in the Brain and Ovary of the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Zoolog Sci* **23**, 1085-1092.
- Petryk, A., Warren, J.T., Marques, G., Jarcho, M.P., Gilbert, L.I., Kahler, J., Parvy, J.P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C., *et al.* (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13773-13778.
- Pierceall, W.E., Li, C., Biran, A., Miura, K., Raikhel, A.S. i Segraves, W.A. (1999). E75 expression in mosquito ovary and fat body suggests reiterative use of ecdysone-regulated hierarchies in development and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* **150**, 73-89.
- Piulachs, M.D. (1987). Estudi morfològic i funcional dels *corpora allata* de *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae), *Universitat de Barcelona*.
- Plasterk, R.H. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science* **296**, 1263-1265.
- Porcheron, P., Morinière, N., Grassi, J. i Pradelles, P. (1989). Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetyl-cholinesterase as label. *Insect Biochem* **19**, 117-122.
- Pratt, G.E. i Tobe, S.S. (1977). Juvenile hormones radiobiosynthesised by corpora allata of adult female locusts in vitro. *Life Sci*. **14**, 575-586.
- Ramakrishnan, S.N. i Muscat, G. (2006). The orphan Rev-erb nuclear receptors: a link between metabolism, circadian rhythm and inflammation? *Nuclear Receptor Signaling*, e009.

- Reinking, J., Lam, M.M., Pardee, K., Sampson, H.M., Liu, S., Yang, P., Williams, S., White, W., Lajoie, G., *et al.* (2005). The *Drosophila* nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive. *Cell* **122**, 195-207.
- Renaud, J.P., Harris, J.M., Downes, M., Burke, L.J. i Muscat, G.E. (2000). Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Mol Endocrinol* **14**, 700-717.
- Rewitz, K.F., Rybczynski, R., Warren, J.T. i Gilbert, L.I. (2006a). The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem Soc Trans* **34**, 1256-1260.
- Rewitz, K.F., Rybczynski, R., Warren, J.T. i Gilbert, L.I. (2006b). Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysone biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* **36**, 188-199.
- Riddiford, L. (1978). Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **34**, 438-446.
- Riddiford, L.M. (1993). Hormones and *Drosophila* development. In the development of *Drosophila melanogaster*, Vol Volume II, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Riddiford, L.M. (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect. Physiol.*, 213-274.
- Riddiford, L.M. (1996a). Juvenile hormone: the status of its "status quo" action. *Arch Insect Biochem Physiol* **32**, 271-286.
- Riddiford, L.M. (1996b). Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis, Academic Press, San Diego.
- Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X. i Nelson, C.A. (2003). Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 1327-1338.
- Romañá, I., Pascual, N. i Bellés, X. (1995). The ovary is a source of circulating ecdysteroids in *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *Eur. J. Entomol.* **92**, 93-103.

- Rybczynski, R. (2005). Prothoracicotropic Hormone. In: L. I. Gilbert, K. Iatrou i S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol 3, pp. 61-123. Elsevier, Oxford.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schutze, N. (2004). siRNA technology. *Mol Cell Endocrinol* **213**, 115-119.
- Segraves, W.A. i Hogness, D.S. (1990). The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev* **4**, 204-219.
- Segraves, W.A. i Woldin, C. (1993). The E75 gene of *Manduca sexta* and comparison with its *Drosophila* homolog. *Insect Biochem Mol Biol* **23**, 91-97.
- Siaussat, D., Mottier, V., Bozzolan, F., Porcheron, P. i Debernard, S. (2004). Synchronization of *Plodia interpunctella* lepidopteran cells and effects of 20-hydroxyecdysone. *Insect Mol Biol* **13**, 179-187.
- Sonobe, H. i Yamada, R. (2004). Ecdysteroids during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: metabolism and functions. *Zoolog Sci* **21**, 503-516.
- Sullivan, A.A. i Thummel, C.S. (2003). Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol* **17**, 2125-2137.
- Swevers, L., Eystathiou, T. i Iatrou, K. (2002a). The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkworm *Bombyx mori*: hormonal control and ovarian expression. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1643-1652.
- Swevers, L., Ito, K. i Iatrou, K. (2002b). The BmE75 nuclear receptors function as dominant repressors of the nuclear receptor BmHR3A. *J Biol Chem* **277**, 41637-41644.
- Tan, N.S., Michalik, L., Desvergne, B. i Wahli, W. (2005). Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**, 99-105.
- Tanaka, A. (1976). Stages in the Embryonic Development of the german Cockroach, *Blattella germanica* LINNÉ (Blattaria, Blattellidae). *Entomological Society of Japan* **44**, 512-525.
- Terashima, J. i Bownes, M. (2006). E75A and E75B have opposite effects on the apoptosis/development choice of the *Drosophila* egg chamber. *Cell Death Differ* **13**, 454-464.

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. i Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Thummel, C.S. (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell* **83**, 871-877.
- Thummel, C.S. (2001). Steroid-triggered death by autophagy. *Bioessays* **23**, 677-682.
- Thummel, C.S. (2007). To die or not to die--a role for Fork head. *J Cell Biol* **176**, 737-739.
- Treiblmayr, K., Pascual, N., Piulachs, M.D., Keller, T. i Bellés, X. (2006). juvenile hormone titer versus juvenile hormone synthesis in female nymphs and adults of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Journal of Insect Science* **6**, 7pp.
- Truman, J.W. i Riddiford, L.M. (1999). The origins of insect metamorphosis. *Nature* **401**, 447-452.
- Truman, J.W. i Riddiford, L.M. (2002). Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annu Rev Entomol* **47**, 467-500.
- Umesono, K. i Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139-1146.
- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A.P. i Gustafsson, J.A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* **17**, 1901-1909.
- Warren, J.T., Wismar, J., Subrahmanyam, B. i Gilbert, L.I. (2001). Woc (without children) gene control of ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* **181**, 1-14.
- Weller, J., Sun, G.C., Zhou, B., Lan, Q., Hiruma, K. i Riddiford, L.M. (2001). Isolation and developmental expression of two nuclear receptors, MHR4 and betaFTZ-F1, in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 827-837.
- White, K.P., Hurban, P., Watanabe, T. i Hogness, D.S. (1997). Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* **276**, 114-117.
- Wismar, J., Habtemichael, N., Warren, J.T., Dai, J.D., Gilbert, L.I. i Gateff, E. (2000). The mutation without children(rgl) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **226**, 1-17.

-
- Woodard, C.T., Baehrecke, E.H. i Thummel, C.S. (1994). A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* **79**, 607-615.
- Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M. i Evans, R.M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**, 63-72.
- Yin, V.P. i Thummel, C.S. (2004). A balance between the diap1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid-triggered cell death in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8022-8027.
- Yin, V.P. i Thummel, C.S. (2005). Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 237-243.
- Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H. i Niwa, R. (2006). Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* **133**, 2565-2574.
- Zhang, Y. i Dufau, M.L. (2004). Gene silencing by nuclear orphan receptors. *Vitam Horm* **68**, 1-48.
- Zhou, B., Hiruma, K., Jindra, M., Shinoda, T., Segraves, W.A., Malone, F. i Riddiford, L.M. (1998). Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis. *Dev Biol* **193**, 127-138.
- Zhou, X. i Riddiford, L.M. (2002). Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* **129**, 2259-2269.
- Zhu, J., Chen, L. i Raikhel, A.S. (2003). Posttranscriptional control of the competence factor betaFTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13338-13343.
- Zitnan, D. i Adams, M. (2005). Neuroendocrine regulation of insect ecdysis(Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science* (ed. L.I. Gilbert, K. Iatrou and S.S. Gill), vol 3, pp. 1-60. Elsevier Pergamon.