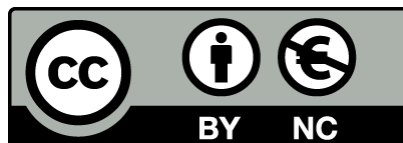




Identificació i caracterització dels enzims implicats en la biosíntesi i degradació de feromones en lepidòpters nocturns

Gerard Carot Sans

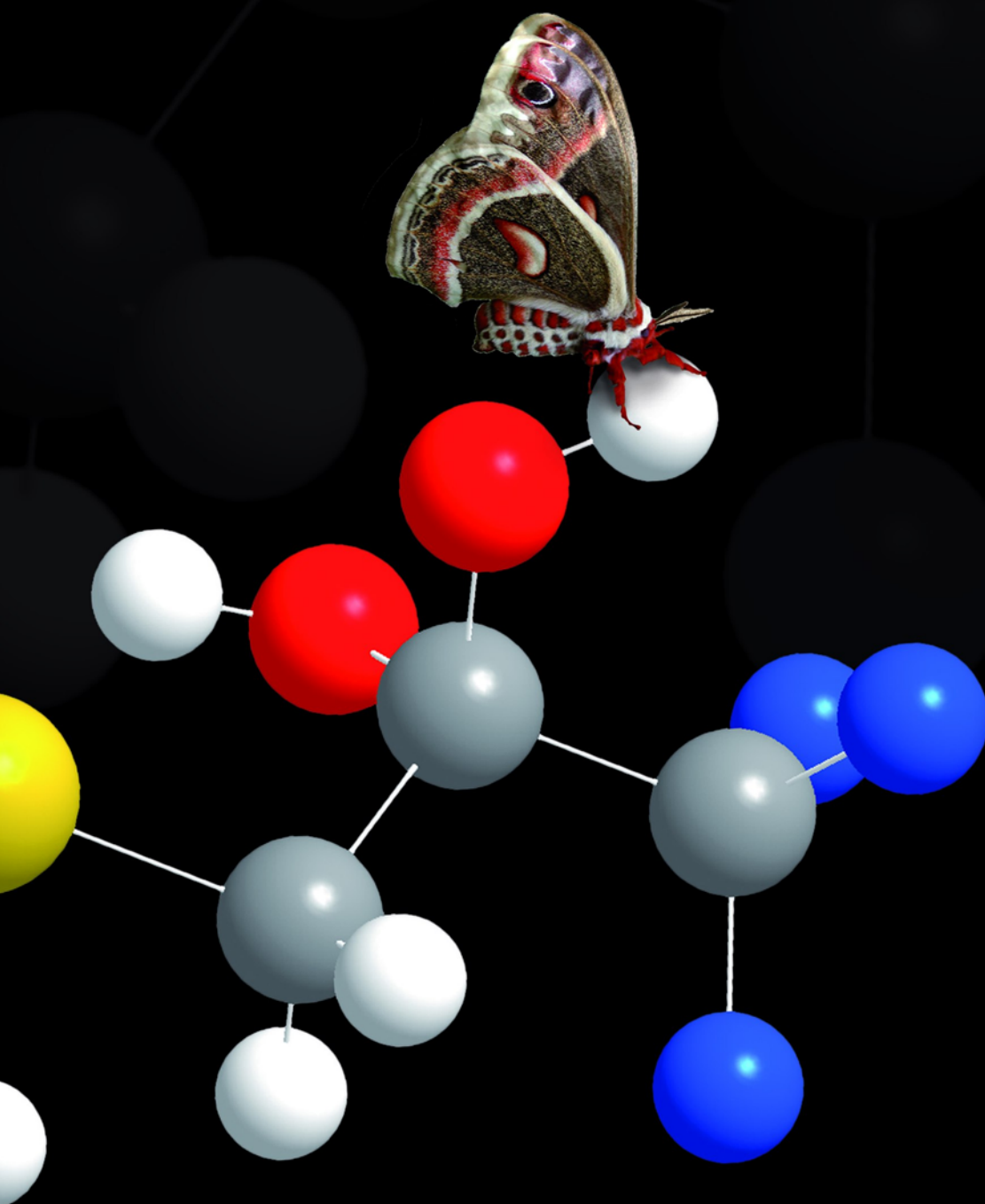


Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

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

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

Identificació i caracterització dels enzims implicats en la biosíntesi i degradació de feromones en lepidòpters nocturns



Gerard Carot Sans
Tesi doctoral 2011



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Programa de doctorat de Biotecnologia
Bienni 2010-2011

**IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ENZIMS IMPLICATS EN LA BIOSÍNTESI I
DEGRADACIÓ DE FEROMONES EN LEPIDÒPTERS NOCTURNS**

Memòria presentada per Gerard Carot Sans per optar al títol de doctor per la Universitat
de Barcelona

DIRECTORS:

Àngel Guerrero Pérez

Glòria Rosell Pellise

L'èxit és fill de mil errors

Edmond H. Fischer,
Bioquímic i Premi Nobel de Medicina 1992

Agraïments

El treball que presento a continuació és fruit de moltes hores de dedicació personal, plenes de decepcions i d'èxits. Però aquesta tesi, com quasi totes, no hauria estat possible sense la implicació i l'ajut desinteressat (i de vegades inconscient) de moltes altres persones que, si bé és possible que no l'arribin a llegir mai, són còmplices indiscutibles d'aquest treball.

Seguint un ordre més o menys cronològic, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Carles Ciudad i a la Dra. Verònica Noé per haver-me introduït al món de la recerca i haver propiciat la carambola que em va permetre iniciar el doctorat a la Unitat d'Ecologia Química del CSIC. Aquí no només hi he trobat els recursos necessaris per dur a terme aquesta tasca, sinó també un entorn humà en el qual m'hi he sentit còmode des del primer dia, i és per això que voldria agrair a tots i cadascun dels membres del grup haver-me atorgat la confiança necessària per formar part d'aquest equip. Més enllà d'un agraïment general, però, m'agradaria donar les gràcies a alguns membres de l'equip en particular per aspectes que recordaré de forma especial quan m'hagi acomiadat definitivament del CID:

A l'Àngel, per la infinita confiança que has dipositat en mi i pel teu tracte planer, gràcies al qual mai m'ha resultat difícil plantejar-te qualsevol discrepància; a la Glòria, perquè has mogut mar cel i terra tants cops com ha calgut per tal que els meus propòsits es poguessin fer realitat; a la Carme, perquè m'has ensenyat que també es pot fer ciència amb un somriure, fins i tot quan les coses no surten com un esperava; a la Patricia, que pusistes la alegria que le faltaba a los difíciles inicios en el 004; al Pep, perquè de tu vaig aprendre a no caure en la temptadora mediocritat epistemològica del "perquè sí, perquè sempre ha estat així"; a la Lourdes, por haber compartido estoicamente las dificultades (a menudo absurdas) del proyecto iCHEM; i finalment, al Ben, a la Nitachem i al Rafa perquè heu estat una autèntica bombolla d'oxigen al dia a dia del laboratori. No hem estat mai un grup exemplar, d'aquells que queden per sopar i sortir de festa, però sempre he fardat de tenir uns companys de laboratori amb qui es pot parlar de tot (por turbio que sea...).

De vegades, però, les fronteres del grup es dilueixen, i la taula de treball acaba quedant més a prop d'altres persones que, en el meu cas, també mereixen un lloc als agraïments. Mariana, gracias por enseñarme que el doctorado también es compatible con la vida personal (para muestra, un botón). Sara, ja t'ho he confessat més d'un cop, però sigui on sigui que acabi el meu futur professional, et trobaré a faltar. Anna, I know that some times the lab looks like a "fishmonger", but believe me, it's very unlikely to find a so nice work environment.

Si finalment el tribunal ho considera oportú, aquesta serà la primera tesi de bioquímica i biologia molecular que es presenti al grup. Aquest factor, que pot semblar una anècdota administrativa, representa en realitat la implicació de molts altres investigadors que, en forma de consells i orientacions, han esdevingut autèntics oracles en moments de dubtes i deriva. Em refereixo a les doctores Pepita Badia i Laura Baldomà, de la Facultat de Farmàcia; al Sami i a la Núria de l'IBMB; al doctor Jordi Bujons i a la ja doctora Montserrat Serra, de l'IQAC; al doctor Benjamí Piña, de l'IDAEA, i als doctors Xavier Bellés i Dolors Piulachs, de l'IBE. Però sens dubte, amb qui més en deute estic en l'aprenentatge de la genètica molecular és amb la Unité Physiologie de l'Inecte, Signalisation et communication (INRA-UPMC). Je vous remercie sincèrement à tous sans exception pour l'accueil et pour avoir été si sympa avec moi. Mais j'aimerais remercier spécialement Françoise pour m'avoir initié aux bonnes méthodes de travail; Nicolas, pour partager avec moi un sujet (les esterase) vraiment pas courant au jour d'aujourd'hui, et spécialement Martine, parce que avec toi j'ai appris non seulement le dessous de la "biomol", mais aussi les bonnes dynamiques de travail dans la recherche. Merci à tous. Sans vous, je l'aurais laissé tomber il y a long temps.

En el terreny més personal, no puc deixar d'agrair a la família que hagin entès que després de tant d'estudi i tanta carrera hagi decidit dedicar més hores que un rellotge a la recerca, una activitat amb la que segurament mai em faré ric. També entre les amistats hi ha qui s'ha guanyat un merescut lloc en aquests agraïments, com la Lucia i la Maria, que m'heu ajudat en els aspectes lingüístics i gràfics del treball, o el Ferran, que sense saber-ho em va fer addicte a la curiositat científica. Però segurament el mèrit més important (encara que també més subtil) l'he d'atribuir a la comunitat del fosfat: al Xexu, al GG, a la Txaro, a la Rúbia, a la Berta i al Frigo, que en el seu moment van fer germinar una passió, tant social com científica, per la bioquímica; i a la Rach, que no només ho vas permetre, sinó que vas contribuir a augmentar aquesta passió. Gràcies a tots.

I bé, em queda el que molt probablement és l'agraïment més important de tots. De sempre és sabut, i així queda reflectit als agraïments de moltes tesis, l'esforç de paciència i comprensió que ha de fer la parella d'un o una doctorand durant els anys (sempre excessius) que dura una tesi. Però en el meu cas aquest "agraïment-disculpa" pren una dimensió especial, doncs tenir una parella llicenciada en bioquímica m'ha fet prendre sovint la llibertat d'esquitxar encara amb més detalls les ventures i desventures del dia a dia del laboratori. Roser, tu diràs que no, però et mereixes un agraïment majúscul en aquesta tesi.

Preàmbul

El conjunt de treballs duts a terme en aquesta tesi tenen per objectiu aprofundir en els mecanismes bioquímics de la comunicació feromonal dels insectes, agafant com a model els lepidòpters nocturns i estudiant-ne tant els aspectes que concerneixen la biosíntesi de llurs feromones com els relacionats amb la seva detecció. Tot i que ambdós processos (biosíntesi i detecció) estan estretament relacionats, s'ha considerat convenient dividir la tesi en dos capítols diferenciats. Així, després d'una introducció general i un capítol de metodologia comú, es presenta un primer capítol destinat a l'estudi d'enzims biosintètics i un segon destinat a l'estudi dels enzims responsables del metabolisme de la feromona un cop aquesta ha activat el receptor olfactiu.

Els treballs duts a terme en el primer capítol formen part de la participació del grup en el projecte *Biosynthetic Infochemical Communication* (iCHEM, contracte EC: FP6-032275). L'objectiu del projecte era el disseny i implementació d'un dispositiu artificial capaç de mimetitzar la comunicació química dels insectes, agafant com a organisme model l'arna *S. littoralis*. La participació del nostre grup en el projecte es va centrar en el disseny i la implementació del dispositiu emissor, que pretenia reproduir una part de la ruta biosintètica de la feromona mitjançant la immobilització dels enzims biosintètics en un microreactor. Més enllà d'aquest propòsit, però, es va considerar interessant identificar els ortòlegs de l'insecte utilitzat com a model, la *S. littoralis*, i estudiar la seva influència en la proporció final dels compostos feromonals. Dels enzims de la ruta biosintètica que han estat postulats com a principals responsables de la proporció dels compostos feromonals, la reductasa d'àcids grassos i l'alcohol acetil transferasa no havien estat encara identificats en *S. littoralis* i se'n disposava d'escassa informació en altres insectes. Per aquest motiu es va considerar interessant centrar l'atenció en aquests dos enzims, que d'altra banda eren també els més rellevants per a l'assoliment dels objectius del projecte iCHEM.

En el segon capítol es descriuen els treballs duts a terme amb l'objectiu d'aprofundir en el coneixement de les esterases antenals de lepidòpters nocturns, potencialment implicades en la finalització de l'estímul provocat per la feromona. Per a la realització d'aquests estudis es van escollir dues arnes de la família *Noctuidae*. La primera d'elles, *S. nonagrioides*, constitueix una important plaga dels conreus del blat de moro. La utilització d'inhibidors d'esterases havia resultat prometedora en assajos *in vitro* utilitzant homogeneïtzats de l'antena, així com en assajos d'electrofisiologia duts a terme pel grup (Quero et al. 2003; Quero et al. 2004), però l'absència d'una major informació sobre els enzims diana limitava la millora i optimització d'aquestes molècules amb activitat inhibidora. Pel que fa a la segona espècie escollida (*S. littoralis*), a més de constituir una important plaga arreu del món, oferia l'avantatge de poder ésser criada fàcilment en captivitat, així com el fet de disposar d'abundant informació sobre la seva biologia. Les tasques d'identificació i caracterització d'esterases en les dues espècies es va dur a terme en paral·lel,

però degut a les diferències en la quantitat d'informació disponible sobre les dues arnes, es va considerar interessant utilitzar estratègies diferents per a cada insecte.

Taula de continguts

Agraïments	7
Preàmbul	9
Abreviatures	17
1. Introducció	21
1.2. La comunicació feromonal.....	21
1.2. Biologia de les espècies utilitzades en el treball.....	24
Spodoptera littoralis.....	24
Sesamia nonagrioides.....	26
2. Objectius	31
3. Material i mètodes	35
3.1. Material	35
3.1.1. Insectes.....	35
3.1.2. Vectors.....	35
Vectors de clonatge.....	35
Vectors d'expressió en <i>Escherichia coli</i>	36
Vectors d'expressió en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Vectors d'expressió en cèl·lules d'insecte.....	41
3.1.3. Línies cel·lulars.....	42
Soques de <i>E. coli</i>	42
Soques de <i>S. cerevisiae</i>	43
Línies de cèl·lules d'insecte.....	44
3.1.4. Solucions i medis de cultiu.....	44
Medis de cultiu microbiològic.....	44
Medis de cultiu de llevat.....	45
Medis de cultiu de cèl·lules d'insecte Sf21.....	47
3.2. Mètodes generals de biologia molecular	48
3.2.1. Mètodes bioinformàtics.....	48
3.2.2. Aïllament d'RNA.....	50
3.2.3. Transcripció reversa (RT).....	50
3.2.4. Amplificació dels extrems 3' i 5'.....	50
3.2.5. Electroforesi de DNA.....	51
3.2.6. Purificació de DNA a partir de gel d'agarosa.....	52
3.2.7. Clonatge de DNA.....	53
Clonatge de fragments de productes de PCR pel sistema TA.....	53
Subclonatge en vectors d'expressió.....	53

3.2.8. Transformació de plàsmids.....	54
Transformació en <i>E. coli</i>	54
Transformació de cèl·lules de llevat.....	56
3.2.9. Purificació de DNA plasmídic.....	56
Purificació a partir de cultius d' <i>E. coli</i>	56
Purificació a partir de cultius de llevat.....	57
Conservació del plàsmid.....	58
3.3. Identificació i obtenció de cDNAs.....	58
3.3.1. Consideracions generals.....	58
3.3.2. Condicions específiques per a cada gen.....	58
Identificació del cDNA de la reductasa Slit-FAR1	58
Intents d'amplificació del cDNA d'una alcohol acetil transferasa de <i>S. littoralis</i>	60
Identificació del cDNA de la carboxil esterasa Snon-EST1.....	61
Identificació del cDNA de la carboxil esterasa Snon-EST2p.....	61
Identificació del cDNA de la carboxil esterasa Snon-EST3p.....	62
Identificació de cDNAs de carboxil esterases de <i>S. littoralis</i>	63
3.4. Caracterització del cDNA.....	64
3.4.1. Anàlisi del transcrit per Northern blot.....	64
3.4.2. Anàlisi del transcrit per PCR semiquantitativa.....	64
3.5. Expressió recombinant de proteïnes.....	66
3.5.1. Expressió en <i>E. coli</i>	66
Expressió de la cera sintasa (ATF).....	66
Assajos d'expressió de la carboxil esterasa Snon-EST1.....	66
3.5.2. Expressió en <i>S. cerevisiae</i>	68
Expressió de la reductasa Slit-FAR1	68
Expressió de l'alcohol acetil transferasa CmAAT1.....	69
3.5.3. Expressió en cèl·lules Sf21 infectades amb baculovirus.....	69
Cultiu de les cèl·lules Sf21.....	70
Transfecció i expressió de proteïnes recombinants.....	70
3.6. Extracció i purificació de proteïnes.....	73
3.6.1. Extracció proteica dels teixits d'insecte.....	73
3.6.2. Extracció de proteïnes de <i>E. coli</i>	74
Extracció de proteïna soluble total.....	74
Extracció de la fracció periplasmàtica.....	75
3.6.3. Extracció de proteïnes del llevat <i>S. cerevisiae</i>	75
3.6.4. Extracció de proteïnes de cèl·lules Sf21.....	76
Proteïnes intracel·lulars.....	76
Proteïnes extracel·lulars.....	77
3.6.5. Quantificació de proteïnes pel mètode Bradford.....	77
3.6.6. Electroforesi de proteïnes.....	77

3.6.7. Isoelectroenfoc.....	78
3.6.8. Electroforesi bidimensional de proteïnes.....	79
A partir d'una electroforesi no desnaturalitzant.....	79
A partir d'un isoelectroenfoc no desnaturalitzant.....	80
Anàlisi per espectrometria de masses.....	80
3.6.9. Detecció de proteïnes en gel.....	81
Tinció de Blau de Coomassie.....	81
Tinció de nitrat de plata.....	81
Revelat per activitat carboxil esterasa.....	82
3.6.10. Cromatografia d'afinitat de proteïnes.....	82
3.6.11. Canvi de tampó.....	83
Diàlisi.....	83
Filtració.....	83
3.7. Assajos d'activitat enzimàtica.....	84
3.7.1. Metodologia general.....	84
Incubació i extracció.....	84
Derivatització.....	84
Anàlisi quantitativa.....	85
3.7.2. Condicions específiques per a cada reacció.....	85
Reductasa d'àcids grassos Slit-FAR1.....	85
Alcohol acetil transferasa CmAAT1.....	86
Cera sintasa ATF.....	87
Carboxil esterasa SICXE7.....	87
Carboxil esterasa SICXE10.....	88

IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'ENZIMS IMPLICATS EN LA BIOSÍNTESI FEROMONAL

4.1. La biosíntesi feromonal en lepidòpters.....	93
4.1.1. Biosíntesi de la feromona de l'arna <i>S. littoralis</i>	95
4.1.2. Enzims implicats en la biosíntesi feromonal.....	96
Enzims d'escurçament de cadena.....	96
Desaturases.....	96
Enzims de funcionalització del carbonil: Reductasa.....	97
Enzims de funcionalització del carbonil: Acetil transferasa.....	98
4.2. Resultats.....	103
4.2.1. Aïllament i caracterització de la reductasa d'àcids grassos de <i>S. littoralis</i>	103
Clonació del cDNA de Slit-FAR1.....	103
Caracterització del transcrit Slit-FAR1.....	106
4.2.2. Expressió recombinant de Slit-FAR1.....	108
4.2.3. Activitat de la proteïna Slit-FAR1 recombinant.....	109
4.2.4. Temptativa de clonatge de l'alcohol acetil transferasa de <i>S. littoralis</i>	115
4.2.5. Expressió recombinant i d'ortòlegs amb activitat acetil transferasa.....	118

Expressió i purificació de l'alcohol acetil transferasa CmAAT1 en <i>S. cerevisiae</i> ...	119
Expressió i purificació de la cera sintasa ATF en <i>E. coli</i>	120
4.2.6. Assajos d'activitat amb alcohol acetil transferases.....	121
Assajos amb l'alcohol acetil transferasa CmAAT1	121
Assajos amb la cera sintasa ATF.....	124
4.3. Discussió.....	127
4.3.1. Aïllament i caracterització del cDNA de la reductasa d'àcids grassos de <i>S. littoralis</i>	127
Aïllament del cDNA de Slit-FAR1.....	127
Caracterització.....	128
4.3.2. Expressió recombinant i activitat de la reductasa Slit-FAR1.....	129
4.3.3. Temptativa d'identificació d'una alcohol acetil transferasa de <i>S. littoralis</i>	132
4.3.4. Expressió recombinant i activitat d'alcohol acetil transferases.....	133

IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'ENZIMS IMPLICATS EN LA DEGRADACIÓ FEROMONAL

5.1. Percepció feromonal en lepidòpters.....	139
5.1.1. Aspectes moleculars de la percepció feromonal.....	141
Proteïnes de transport d'odorants.....	142
Receptors.....	142
Proteïnes sensorials de la membrana neuronal (SNMP).....	144
Enzims de degradació feromonal.....	144
5.2. Resultats.....	153
5.2.1. Identificació de proteïnes amb activitat esterasa en <i>S. littoralis</i> i <i>S. nonagrioides</i>	153
Electroforesi no desnaturalitzant.....	153
Isoelectroenfoc no desnaturalitzant.....	154
5.2.2. Aïllament i caracterització d'esterases de <i>S. nonagrioides</i>	155
Clonació del cDNA d'Snon-EST1.....	155
Caracterització del transcrit Snon-EST1.....	158
Aïllament d'esterases específiques de les antenes de <i>S. nonagrioides</i>	158
Caracterització dels transcrits Snon-EST2p i Snon-EST3p.....	165
5.2.3. Aïllament i caracterització d'esterases de l'espècie <i>S. littoralis</i>	165
Identificació d'esterases de <i>S. littoralis</i>	165
Especificitat tissular dels transcrits.....	166
Nivells del transcrit al llarg del desenvolupament.....	167
5.2.4. Caracterització filogenètica d'esterases antenals.....	168
5.2.5. Expressió recombinant de carboxil esterases antenals.....	171
Expressió en el bacteri <i>E.coli</i>	171
Assajos amb cèl·lules d'insecte en cultiu.....	175
5.2.6. Assajos d'activitat amb CEs antenals.....	177

Assajos amb SICXE7.....	177
Assajos amb SICXE10.....	181
5.3. Discussió.....	184
5.3.1. Identificació d'esterases en <i>S. nonagrioides</i> i <i>S. littoralis</i>	184
Electroforesi nativa.....	184
Isoelectroenfoc natiu.....	185
5.3.2. Aïllament i caracterització de cDNA d'esterases de <i>S. nonagrioides</i>	186
Aïllament i caracterització de Snon-EST1.....	186
Aïllament i caracterització de Snon-EST2p i Snon-EST3p.....	187
5.3.3. Identificació i caracterització de cDNAs de carboxil esterases de <i>S. littoralis</i> ...	189
5.3.4. Expressió recombinant de carboxil esterases antenals.....	192
Expressió en el bacteri <i>E. coli</i>	192
Expressió en cèl·lules d'insecte en cultiu.....	194
5.3.5. Assajos d'activitat amb carboxil esterases antenals recombinants.....	195
Carboxil esterasa SICXE7.....	195
Carboxil esterasa SICXE10.....	196
6. Conclusions.....	201
7. Bibliografia.....	204
Annex: Publicacions.....	217

Abreviatures

AAT	Alcohol acetil transferasa
BSTFA	bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
cDNA	DNA complementari
CE	Carboxil esterasa
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DO₆₀₀	Densitat òptica a 600 nm
EDTA	Àcid etilendiamina tetraacètic
EST	Marcador de seqüència expressada (de l'anglès, <i>Expression Sequence Tag</i>)
ESI-Q/TOF	Espectrometria de masses en tàndem, mitjançant ionització per electroesprai i anàlisi per quadrupol i temps de vol (de l'Anglès, <i>Electrospray Ionisation-Quadrupol/Time Of Flight</i>)
FAR	Reductasa d'àcids grassos (de l'Anglès, <i>Fatty Acyl Reductase</i>)
FBS	Sèrum fetal boví (de l'Anglès, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
GC	Cromatografia de gasos (de l'Anglès, <i>Gas Chromatography</i>)
GST	Glutatió S-transferasa
IEF	Isoelectroenfoque (de l'Anglès, <i>Isoelectric focusing</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosid
LiOAc	Acetat de liti
MBP	Proteïna d'unió a la maltosa (de l'Anglès, <i>Maltose Binding Protein</i>)
MOI	Multiplicitat d'infecció
mRNA	RNA missatge
MS	Espectrometria de masses (de l'Anglès, <i>Mass spectrometry</i>)
NTA	Àcid nitrilotriacètic
OBP	Proteïna d'unió a feromones (de l'Anglès, <i>Odorant Binding Protein</i>)
ODE	Enzím de degradació d'odorants (de l'Anglès, <i>Odorant Degrading Enzyme</i>)
OR	Receptor olfactiu (de l'Anglès, <i>Olfactory Receptor</i>)
ORF	Pauta oberta de l'ectura (de l'Anglès, <i>Open Reading Frame</i>)
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants
pb	Parells de bases
PBS	Tampó fosfat (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PBP	Proteïna d'unió a feromones (de l'Anglès, <i>Pheromone Binding Protein</i>)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDE	Enzím de degradació de feromones (de l'Anglès, <i>Pheromone Degrading Enzyme</i>)
PEG	Polietilen glicol
pfu	Unitats formadores de plaques virals (<i>Plate forming units</i>)

pl	Punt isoelèctric
RACE	Tècnica d'amplificació ràpida dels extrems de cDNA (de l'Anglès, <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	Transcripció reversa - PCR
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants
TFMC	Trifluorometil cetona
TMS	Trimetilsilil
UPM	Universal Primer Mix (Clontech)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranòsid

Compostos químics abreujats

De forma general, els compostos i precursors feromonal esmentats en aquest treball s'han abreujat utilitzant el següent criteri:

(Z,E)-9,11-14:OH	(9Z,11E)-tetradecadien-1-ol
(Z,E)-9,11-14:OAc	acetat de (9Z,11E)-tetradecadienil
(Z,E)-9,11-14:SCoA	Derivat acil-Coenzim A de l'àcid (9Z,11E)-tetradecadienoic

INTRODUCCIÓ

1. Introducció general

1.2. La comunicació feromonal

La facultat de percebre i processar estímuls de tipus químic presents en l'entorn és una funció estesa a totes les espècies animals del planeta. No obstant, és en els invertebrats on aquest procés d'intercanvi d'informació mitjançant compostos químics pren més rellevància i esdevé el principal mitjà de comunicació per interaccionar amb l'entorn (Ache & Young 2005). Per la seva propietat d'ésser portadors de senyal, els compostos químics produïts per éssers vius capaços de provocar una resposta en un altre ésser viu, reben el nom de semioquímics. Aquests compostos poden participar en una comunicació tant intraespecífica, com és el cas de les feromones, com interespecífica, com per exemple les cairomones produïdes per les plantes i que serveixen als insectes per trobar aliment o lloc d'oviposició. Les feromones són, doncs, semioquímics que provoquen un canvi en el comportament d'individus de la mateixa espècie. D'acord amb la seva funció, les feromones es classifiquen en feromones sexuals, d'agregació, d'alarma, etc.

L'evidència de que els insectes es comunicaven a través d'alguna substància alliberada a l'ambient es remunta cap al darrer terç del segle XIX. No obstant, no va ser fins l'any 1959 quan el químic alemany Adolf Butenandt va publicar la composició de la primera feromona sexual d'un insecte, el bombikol, produïda per la papallona de la seda, *Bombyx mori* (Butenandt et al. 1959). L'estudi, motivat per la cerca d'un sistema de control de plagues basat en l'atracció dels individus d'una espècie determinada, va durar més de vint anys i va requerir l'extracció amb dissolvents orgànics dels compostos presents en més de mig milió de femelles d'aquest lepidòpter. Des d'aleshores s'ha publicat la composició de més de 8.000 molècules diferents amb activitat sobre el comportament dels insectes (<http://www.pherobase.com>). Des d'un punt de vista químic, el ventall de compostos que formen aquestes mescles és molt ampli. No obstant, en el cas dels lepidòpters nocturns, es tracta habitualment de compostos alifàtics de cadena lineal, que varien en la longitud de la cadena, insaturacions (tant pel tipus, nombre, com la posició) i grup funcional. Aquestes funcionalitats són, en la major part dels casos, alcohols, aldehids o acetats (figura 1.1).

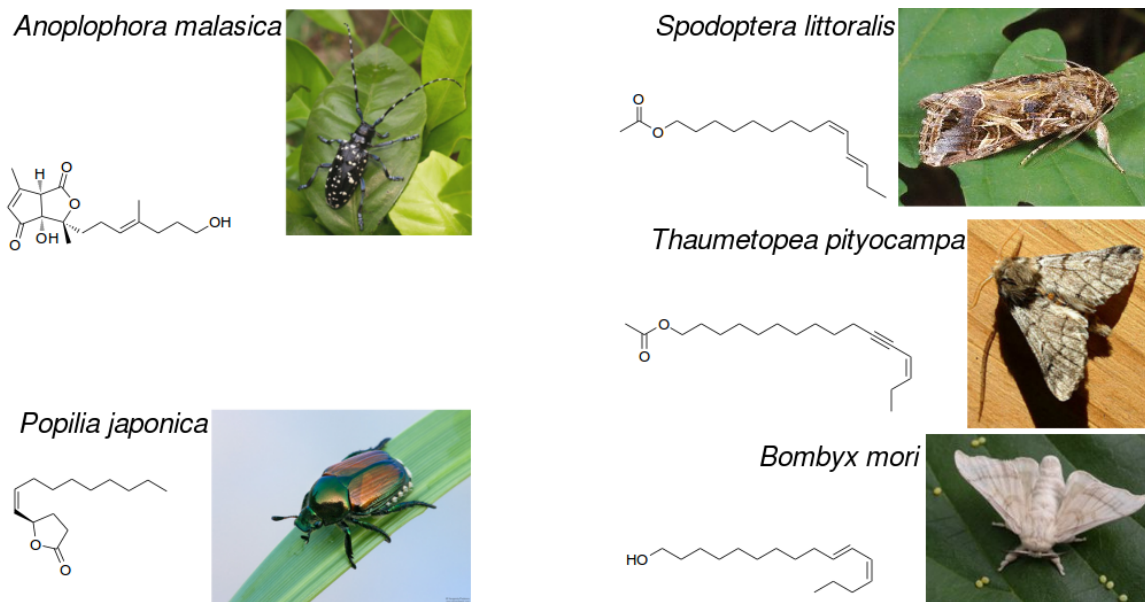


Figura 1.1. Exemple de la diversitat estructural de les feromones d'insecte. En el cas de les arnes, el motiu estructural més habitual és una cadena alifàtica insaturada amb un alcohol o acetat com a grup funcional.

Les feromones sexuals, generalment produïdes per la femella i detectades pel mascle, estan formades en la major part dels casos per mescles de diversos compostos químics volàtils, produïts per una glàndula feromonal i alliberats a l'ambient. Aquestes mescles es caracteritzen per ser altament específiques, fet que ha permès que nombroses espècies de lepidòpter convisquin en un mateix ecosistema sense que es produeixin reconeixements creuats de les seves feromones. La isomeria d'un doble enllaç (Cardé et al. 1978) o la diferència d'un sol carboni a la cadena carbonada (Mitchel & Doolittle, 1976 i Tabata et al., 2009) són modificacions suficients perquè una molècula sigui reconeguda per una espècie o una altra. En alguns casos, també s'ha observat com la feromona d'una espècie conté un component que resulta repel·lent per a una espècie veïna (Quero et al. 2004). Aquesta especificitat no depèn únicament de la naturalesa dels compostos que formen part de la feromona, sinó també de la seva proporció en la mescla feromonal. En el cas de l'espècie *Ostrinia nubilalis*, per exemple, s'han identificat dues races, Z i E, les feromones de les quals estan formades pels mateixos compostos, però en dues proporcions diferents. Una de les proporcions resulta atractiu per una raça i inactiva per l'altra, i viceversa (Cardé et al. 1978).

Una altra característica important de la comunicació feromonal és l'elevada sensibilitat de la seva detecció. La quantitat de feromona necessària per tal que es produeixi la comunicació entre dos individus és variable en funció de l'espècie, i han estat proposats diferents valors en funció del tipus d'estudi realitzat. No obstant això, i malgrat la gran variabilitat interindividual que sovint tenen aquests estudis, totes les dades obtingudes fins al moment coincideixen que la quantitat de

feromona present a l'ambient és extremadament baixa. En un estudi realitzat amb l'arna *Heliothis virescens*, per exemple, es va observar que una femella de l'insecte emetia entre 10 i 110 ng de feromona al llarg de tota l'escotofase (o fase nocturna) (Morse et al. 1982). D'altra banda, estudis empírics i teòrics sobre el límit de detecció duts a terme en el lepidòpter model *Bombyx mori* han conclòs que una concentració en l'aire de 3.000 molècules de feromona ($1,2 \times 10^{-3}$ fg) per mililitre és suficient per desencadenar una resposta en el comportament de l'insecte (Kaissling 2009).

Finalment, a l'elevada especificitat i sensibilitat cal afegir-hi una baixa toxicitat per part dels compostos integrants de les mescles feromonals que han estat avaluats (Rosa et al. 2006). Per totes aquestes característiques, l'interès en aplicar les feromones en el control biorracional de plagues ha estat creixent, aportant bons resultats tant en plagues forestals com agrícoles. La forma en que les feromones s'han utilitzat en el control de plagues és diversa i constitueix un camp de recerca encara obert. Fins al moment, les principals estratègies utilitzades són les següents:

- **Monitorització de la plaga**, en que les trapes feromonals són utilitzades per detectar el moment en que comencen a aparèixer els primers insectes. L'inici del tractament amb pesticides clàssics en el moment precís de l'aparició de la plaga pot reduir-ne les quantitats a utilitzar i, per tant, l'abast dels seus efectes nocius sobre el medi ambient i la salut humana (Cardé 1976).
- **Captura massiva**, en que la feromona és dipositada en trapes amb l'objectiu de capturar-ne una gran quantitat d'individus (Ridgway et al. 1990).
- **Confusió sexual**, que consisteix en l'aplicació d'una elevada quantitat de feromona per tal de dificultar la localització entre mascles i femelles (Witzgall et al. 2007).
- **Esterilització de l'insecte**, en que els mascles són atrets a una font d'agent esterilitzant amb la finalitat de que es produeixin postes d'ous no viables (Rossler et al. 2000).

1.2. Biologia de les espècies utilitzades en el treball

Spodoptera littoralis

L'arna *S. littoralis* (anomenada popularment "Rosquilla negra", degut al comportament de la larva, que s'enrosca amb ella mateixa i es deixa caure de la planta quan és agredida) és un lepidòpter de la família Noctuidae (subfamília Amphipyrinae) (figura 1.2). El seu origen és africà, i actualment colonitza, a més del continent africà, el Pròxim Orient i tota la conca mediterrània. Es tracta d'un insecte polífaq, que fins a dia d'avui ha causat danys en 87 espècies vegetals d'interès econòmic, com ara el cotó, la soja, el lli, el blat de moro, l'arròs i diferents plantes de la família de les lleguminoses. Degut a aquesta versatilitat per a la invasió de conreus d'espècies vegetals diferents, *S. littoralis* és considerada espècie de risc fitosanitari per l'Organització Europea i Mediterrània per la Protecció de les Plantes (EPPO).



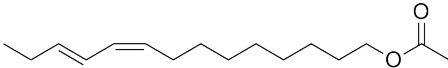
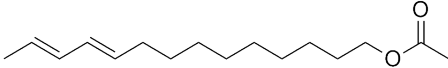
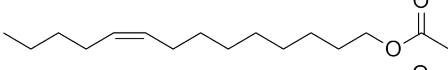
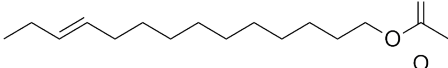
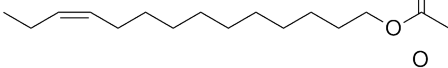
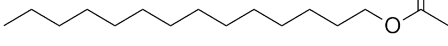
Figura 1.2. *S. littoralis* en les formes de larva (A), pupa (B) i adult (C).

L'insecte hiverna en forma de pupa, enterrada al terra. Els adults, que emergixen a la primavera, s'aparellen durant les cinc nits posteriors a l'emergència, tenint un màxim d'activitat durant la segona nit (o escotofase) i donant lloc a una posta, que serà dipositada a l'anvers de les fulles de la planta. Entre 4 i 12 dies després de la posta (depenent, essencialment, de la temperatura), es produeix l'eclosió dels ous. Les larves s'alimenten de les parts aèries de la planta durant 15 a 23 dies, quan s'enterren per entrar en l'estadi de pupa i donar lloc, després d'uns 11 a 13 dies, a una nova generació d'adults. El nombre de generacions anuals depèn essencialment de la temperatura, podent arribar fins a vuit en les regions més tropicals.

Des del primer estudi sobre la composició de la feromona de *S. littoralis* l'any 1973 (Nesbitt et al. 1973), nombrosos estudis han estat realitzats, aportant matisos importants a la composició d'aquesta mescla, que depenen tant de la raça de l'insecte com de la metodologia seguida per a la caracterització dels compostos (Muñoz et al. 2008). En total, han estat identificats vuit compostos diferents, sent en tots els casos majoritari l'acetat de (Z,E)-9,11-tetradecadienil ((Z,E)-9,11-

14:OAc). En el cas de la soca utilitzada en aquesta tesi, a més d'aquest acetat majoritari, s'han identificat els acetats de (*E,E*)-10,12-tetradecadienil ((*E,E*)-10,12-14:OAc), (*Z*)-9-tetradecenil ((*Z*)-9-14:OAc), (*E*)-11-tetradecenil ((*E*)-11-14:OAc), (*Z*)-11-tetradecenil ((*Z*)-11-14:OAc) i tetradecil (14:OAc), en una proporció 57:14:11:11:6:1 (taula 1.1).

Taula 1.1. Composició de la feromona de *S. littoralis*. Els valors que es mostren a la dreta de cada molècula corresponen a la proporció dels diferents compostos en la mescla feromonal (Muñoz et al. 2008).

Compostos	Estructura	%
(<i>Z,E</i>)-9,11-14:OAc		57
(<i>E,E</i>)-10,12-14:OAc		14
(<i>Z</i>)-9-14:OAc		11
(<i>E</i>)-11-14:OAc		11
(<i>Z</i>)-11-14:OAc		6
14:OAc		1

Tradicionalment, els mètodes de lluita contra aquest insecte s'havien basat en la utilització de pesticides clàssics, com el metil parathion. L'aparició de resistències, però, va obligar a ampliar el ventall de compostos utilitzats, incloent altres organofosforats i piretroids sintètics, que amb el temps també van donar lloc a soques resistents i, per tant, van perdre efectivitat (Abo-EI-Ghar et al. 1986; Issa et al. 1984). L'aparició d'aquestes resistències, juntament amb l'elevada toxicitat dels pesticides ha motivat la cerca d'alternatives menys nocives per a la salut humana i el medi ambient. En algunes regions, com la Índia, l'aplicació de repel·lents naturals com l'azadiractina o l'extracte de *neem* han tingut un efecte positiu en alguns conreus (<http://www.eppo.org> - A2 list). També ha estat utilitzada la lluita biològica amb predadors naturals, com ara paràsits, fongs o virus (Salama et al. 1989; Navon et al. 1983). Pel que fa a la utilització de feromones en el control de la plaga, una de les avantatges que presenta és que el component majoritari de la feromona ((*Z,E*)-9,11-14:OAc) en solitari té de per sí una elevada capacitat atraient al camp (Campion et al. 1974). D'altra banda, en un estudi de captura massiva, dut a terme amb trampes feromonals que contenien insecticida, es va observar que la reducció del nombre d'aparellaments degut a l'efecte de confusió per la feromona tenia una influència major en la reducció de la plaga, que la captura

de mascles pròpiament dita (Downham et al. 1995). No obstant, i malgrat aquests resultats siguin prometedors pel que fa a la utilització de feromones en el control d'aquesta plaga, el nombre d'estudis de camp realitzats en aquest insecte són escassos.

Més enllà de l'interès d'aquesta espècie com a plaga, *S. littoralis* ha estat utilitzada en nombrosos treballs com a espècie model en l'olfacció de lepidòpters plaga. La seva manipulació no presenta un risc directe per a la salut humana i la seva cria en condicions de laboratori està ben definida, podent donar lloc a una generació cada 5 setmanes. Gràcies a l'elecció d'aquest lepidòpter com a model per diversos grups de recerca, s'han dut a terme importants progressos en el coneixement de la biologia d'aquesta espècie, com ara la seqüenciació d'un banc de cDNA antenal (Legeai et al. 2011) o del genoma del gènere *Spodoptera* (Nègre et al. 2006), ambdós coordinats per Genoscope.

Sesamia nonagrioides

De la mateixa manera que *S. littoralis*, l'arna *S. nonagrioides* (o "Barrinador del blat de moro") pertany a la família Noctuidae (subfamília Amphipyrinae) (figura 1.3). Aquest barrinador habita tota l'àrea d'influència mediterrània, estenent-se per les regions on el blat de moro es cultiva de forma intensiva.

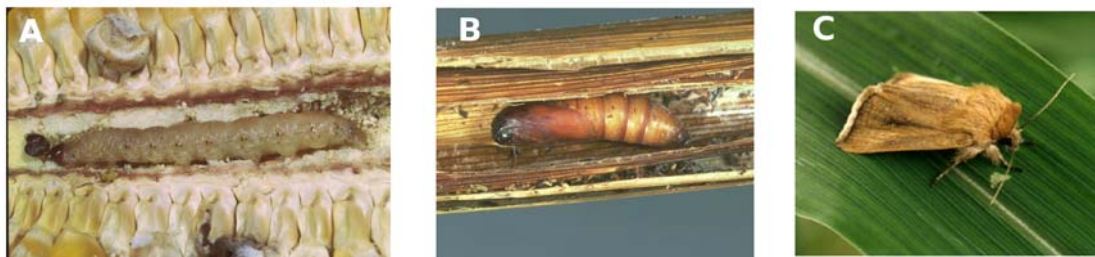


Figura 1.3. *S. nonagrioides* en les formes de larva (A), pupa (B) i adult (C).

L'insecte hiverna en forma de larva a l'interior de la canya. Arribada la primavera, es transforma en pupa, completant la metamorfosi fins a la forma adulta. Les femelles d'aquesta forma adulta, un cop fecundades, dipositen els ous a les baines de les fulles més joves de la planta per tal de donar lloc a una nova generació de larves, que perforaran de nou la canya per tal de completar un nou cicle biològic. El nombre de generacions que tenen lloc anualment depèn de la regió i pot variar entre dues al sud de França i nord de la Península, tres a la conca de l'Ebre i quatre al Marroc (Albajes et al. 2002).

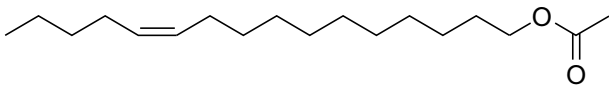
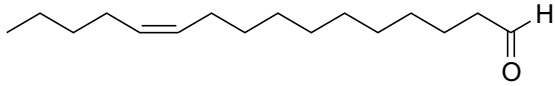
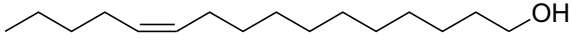
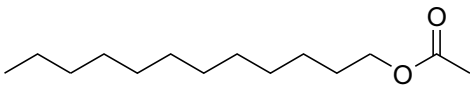
El primer aliment de les larves són les baines que protegeixen els ous dels que han eclosionat. Posteriorment, es dirigeixen al nus superior o a la zona de les arrels, creant galeries que

destrueixen el moll de la canya, debilitant la planta i desencadenant la caiguda de les panotxes.

L'aparellament de les formes adultes de l'insecte s'inicia la nit següent a la de l'emergència, té un màxim d'activitat durant la segona nit, i continuarà durant les nits següents en cas de no haver-hi fecundació (Babilis & Mazomenos 1992).

Tal i com es mostra a la taula 1.2, la composició feromonal de *S. nonagrioides* està formada per quatre compostos: L'acetat de (Z)-11-hexadecenil ((Z)-11-16:OAc), el (Z)-11-hexadecenal ((Z)-11-16:Ald), el (Z)-11-hexadecenol ((Z)-11-16:OH), i l'acetat de dodecil (12:OAc), en una proporció 69:8:8:15 segons Mazomenos (Mazomenos 1989) o 77:10:8:5, segons Sans i col. (Sans et al. 1997).

Taula 1.2. Composició de la feromona de *S. nonagrioides*. Els valors que es mostren a la dreta de cada molècula corresponen a la proporció dels diferents compostos en la mescla feromonal. Primera columna, composició segons Mazomenos (1989), i segona columna, composició segons Sans i col. (1997).

Compost	Estructura	%	
(Z)-11-16:OAc		69	77
(Z)-11-16:Ald		8	10
(Z)-11-16:OH		8	8
12:OAc		15	5

Una de les dificultats del control de l'insecte plaga *S. nonagrioides* és la invulnerabilitat de les larves durant el període d'hibernació. Així, l'aplicació de pesticides clàssics ha de tenir lloc durant les etapes d'alimentació de les larves, moment en el que aquestes es troben a les parts més externes de la planta. D'altra banda, el llarg període en que té lloc la fase de posta obliga a successives aplicacions de l'insecticida. La baixa efectivitat i els evidents inconvenients toxicològics d'aquesta pràctica han portat a la cerca d'alternatives per al control d'aquesta plaga en aquells cultius en que les mesures de tipus cultural (canvis en la data de sembra, rotació de cultius, etc.) resulten insuficients.

Una de les tecnologies que més bons resultat ha tingut en les plagues del blat de moro en general és la utilització de plantes transgèniques, que produeixen l'endotoxina del bacteri *Bacillus thuringiensis* (conegut popularment com "Blat de moro Bt") (Meeusen & Warren 1989).

Desenvolupada inicialment en la planta de tabac per tal de controlar la plaga produïda per les larves de *Manduca sexta* (Vaeck et al. 1987), aquesta tecnologia ha estat aplicada amb èxit en el control de diferents plagues del blat de moro (Musser & Shelton 2003; Donkin et al. 2003). No obstant, si bé el blat de moro Bt ha estat àmpliament implantat als EEUU, la seva utilització a Europa ha estat més limitada, degut, sobretot, al recel que els aliments transgènics generen en la població. Aquest motiu, juntament amb l'aparició dels primers insectes resistents a la toxina (McGaughey et al. 1999), va motivar la utilització de feromones i anàlegs de feromones per al control de l'insecte plaga del blat de moro *S. nonagrioides*.

El primer mètode utilitzat fou el de confusió sexual, que va consistir en l'aplicació de grans quantitats de feromona sintètica (una mescla de (Z)-11-16:OAc i (Z)-11-16:OH, en una proporció 90:10) amb l'objectiu de dificultar el contacte entre mascles i femelles, i evitar així la còpula (Albajes et al. 2002). Una segona estratègia utilitzada amb èxit ha estat l'aplicació d'anàlegs de la feromona de tipus trifluorometilcetona (TFMC) en dispensadors repartits pel camp de conreu. Aquests compostos han demostrat tenir una activitat inhibidora de les esterases responsables del catabolisme del component feromonal majoritari, saturant els receptors de feromona i provocant així un efecte de confusió. Els estudis realitzats fins al moment mostren una activitat prometedora d'aquests compostos en la lluita contra les plagues de blat de moro (Solé et al. 2008). No obstant, les quantitats de producte necessàries per a produir l'efecte són molt elevades en comparació amb la quantitat de feromona utilitzada en el sistema de trampeig, suggerint la necessitat d'una optimització d'aquest mètode.

OBJECTIUS

2. Objectius

El conjunt de treballs exposats en la present tesi doctoral tenien per objectiu aprofundir en el coneixement dels enzims que participen en el metabolisme feromonal. Els diferents enzims objecte d'estudi abasten tant els de les darreres etapes de la biosíntesi feromonal, com els enzims responsables de la degradació de la feromona després d'haver activat el receptor olfatiu.

A partir dels antecedents exposats a la introducció general i dels que s'exposen a les introduccions específiques (apartats 4.1 i 5.1 del treball), els objectius concrets plantejats van ser els següents:

1. Identificació, expressió recombinant i caracterització cinètica d'una reductasa d'àcids grassos de la glàndula feromonal de l'arna *S. littoralis*.
2. Identificació, expressió recombinant i caracterització cinètica d'una alcohol acetil transferasa de la glàndula feromonal de *S. littoralis*.
3. Identificació de proteïnes amb activitat carboxil esterasa en els lepidòpters *S. littoralis* i *S. nonagrioides*.
4. Aïllament del cDNA de carboxil esterases antenals dels lepidòpters *S. littoralis* i *S. nonagrioides*.
5. Expressió recombinant i caracterització cinètica de carboxil esterases antenals de lepidòpter.

MATERIAL I MÈTODES

3. Material i mètodes

3.1. Material

3.1.1. Insectes

Els individus de l'espècie *S. littoralis* van ser obtinguts mitjançant la cria i el manteniment d'una colònia en el propi laboratori (Fabriàs 1986).

En el cas del barrinador del blat de moro *S. nonagrioides*, els insectes van ser proporcionats en estadi de pupa per la UdL-IRTA (Lleida). Les pupes van ser separades en funció del sexe. Els adults emergits, separats per sexes, es van mantenir a 25°C en un 40-50% d'humitat fins el dia de la seva utilització.

3.1.2. Vectors

Vectors de clonatge

pCRII-TOPO

El vector pCRII (Invitrogen) està dissenyat per al clonatge de productes d'amplificació per PCR (figura 3.1). L'origen de replicació pUC permet obtenir un elevat nombre de còpies a l'interior de la cèl·lula. D'altra banda, el lloc de clonatge múltiple està integrat en el sí del gen de la subunitat α de la β -galactosidasa. Aquesta característica permet diferenciar fàcilment els clons que han incorporat un cDNA, dels que han estat tancats sobre ells mateixos. Per tal que la utilització d'aquest sistema de rastreig sigui possible, la línia cel·lular emprada ha de ser defectiva en la subunitat α de la β -galactosidasa. En cas que el vector transformat no hagi incorporat cap DNA extern, el gen *LacZ α* del vector es traduirà, proporcionant a la cèl·lula la subunitat de la β -galactosidasa que li manca i l'habilitarà per metabolitzar la galactosa i els seus derivats. En el cas contrari, el gen *LacZ α* serà interromput per aquest DNA inserit, evitant l'expressió d'aquesta subunitat, sense la qual la cèl·lula perdre l'activitat metabòlica front a la galactosa. L'addició del derivat de la galactosa 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid (X-Gal) al medi de cultiu, proporciona una coloració blava a aquelles colònies amb capacitat per a metabolitzar la molècula, indicant que l'activitat β -galactosidasa està intacta i que, per tant, cap fragment de DNA ha estat inserit al vector (Ullmann et al. 1967).

Per tal d'incorporar fragments de PCR el vector està linealitzat i conté una timidina (T) a l'extrem 3' de cadascuna de les cadenes. Aquesta T s'hibridarà amb l'adenosina (A) que la Taq DNA

polimerasa afegeix a l'extrem 3' del fragment de DNA al final de cada cicle d'elongació. Addicionalment, i per tal de facilitar la lligació, la versió pCRII-TOPO conté una topoisomerasa covalentment unida a l'extrem 3' de cada cadena. Un cop hibridat el fragment de DNA provinent de la PCR, la topoisomerasa catalitza la formació de l'enllaç d'èster fosfòric, alliberant el producte de lligació del vector i el producte de PCR (Shuman 1994).

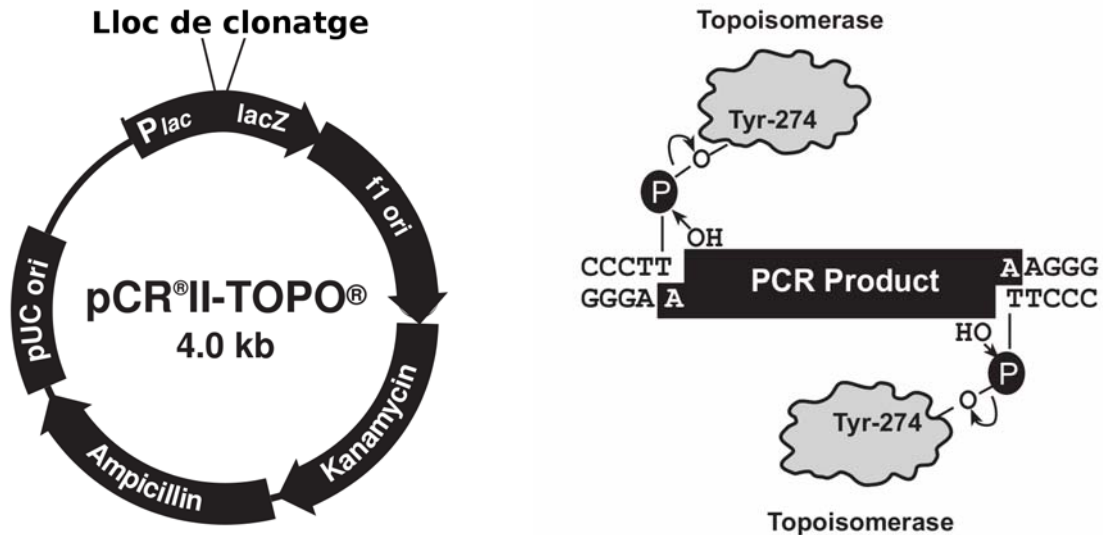


Figura 3.1. Mapa del vector pCRII (Invitrogen) (esquerra) i diagrama del sistema de lligació TOPO T/A, en que la responsable de catalitzar la formació de l'èster fosfòric és una topoisomerasa.

Vectors d'expressió en *E. coli*

Vector pGEX

El vector pGEX (en el cas d'aquest treball, pGEX-4T-2) està dissenyat per a l'expressió recombinant de proteïnes en *E. coli*, especialment per aquelles que han de ser posteriorment purificades. (figura 3.2). Conté una proteïna de fusió (en aquest cas, la glutatió S-transferasa, GST), el gen de la qual està situat a l'extrem 5' del gen de la proteïna d'interès, que haurà de ser inserit en la mateixa pauta de lectura. El resultat és l'expressió d'una proteïna de fusió formada per la GST i la proteïna recombinant d'interès. La GST no només afavoreix el correcte plegament i solubilització de la proteïna recombinant obtinguda, sinó que a més en permet la seva purificació mitjançant una cromatografia d'afinitat funcionalitzada amb una molècula mimètica al glutatió. L'expressió de la proteïna de fusió entre la GST i la proteïna recombinant d'interès està sota el control del promotor *tac*, induïble amb el galactòsid IPTG. A més, el vector expressa de forma constitutiva el repressor del promotor *tac* (*LacI^q*), evitant una expressió basal de la proteïna en absència d'IPTG.

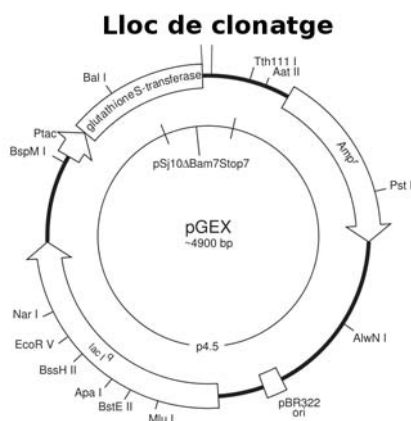


Figura 3.2. Mapa del vector pGEX (Amersham)

Vector pMAL

Es tracta d'un vector d'expressió en *E. coli* (figura 3.3). De la mateixa manera que el pGEX, el vector pMAL permet expressar la proteïna recombinant juntament amb una proteïna de fusió, que en permetrà el seu correcte plegament i en facilitarà la purificació. En aquest cas, la proteïna utilitzada és la proteïna d'unió a maltosa (MBP, de *Maltose-binding protein*), codificada pel gen *malE* sota el control del promotor *tac*. De la mateixa manera que altres vectors d'expressió, el plàsmid conté una còpia del repressor d'aquest promotor *LacI*^q. A més, el lloc de clonatge dels vectors pMAL està situat en el context del gen *LacZα*, permetent dur a terme una selecció de colònies equivalent a la del vector pCRII després dels processos de lligació i transformació.

Existeixen dos grans grups de vectors pMAL. El pMALc conté les característiques tal i com s'han descrit anteriorment i, per tant, expressa la proteïna de fusió entre la MBP i la proteïna d'interès al citosol cel·lular. Un segon grup de vectors (pMALp), però, conté un pèptid senyal de secreció, que dirigeix la proteïna formada a l'espai periplasmàtic. Aquesta característica permet que el plegament i la formació de ponts disulfur tingui lloc al periplasma cel·lular, augmentant les possibilitats de correcte plegament de la proteïna (Lauritzen et al. 1991).

Tant la versió d'expressió citosòlica, com la periplasmàtica van ser amablement cedides pel grup de les doctores J. Badia i L. Baldomà (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UB).

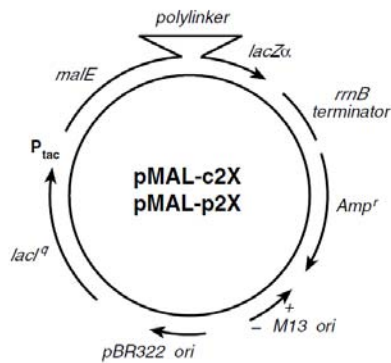


Figura 3.3. Mapa del vector pMAL (New England BioLabs)

Vector pET23a

A diferència dels vectors d'expressió anteriorment descrits, en el vector pET23a la proteïna clonada no està sota el control del promotor *tac*, sinó del promotor del bacteriòfag T7 (figura 3.4). Aquest promotor únicament és reconegut per la T7 RNA polimerasa, que transcriu un gran nombre de còpies del gen que està sota el control del promotor. La major part de soques bacterianes no contenen una còpia d'aquesta polimerasa al seu genoma. No obstant, aquelles que són lisògens del bacteriòfag T7 o derivats (com ara les que contenen el bacteriòfag DE3), contenen una còpia cromosomal del gel de la T7 RNA polimerasa, que està sota el control del promotor *lacUV5* i que és induïble per l'anàleg galactòsid IPTG. A més d'aquest sistema de control de l'expressió, comú en tots els vectors de la sèrie pET, el vector pET23a conté una seqüència de DNA que codifica per un fragment de 6 His, traduït a l'extrem C-terminal de la proteïna clonada en el vector. Aquesta cua d'histidines permet purificar la proteïna recombinant obtinguda mitjançant una cromatografia d'afinitat per metall.

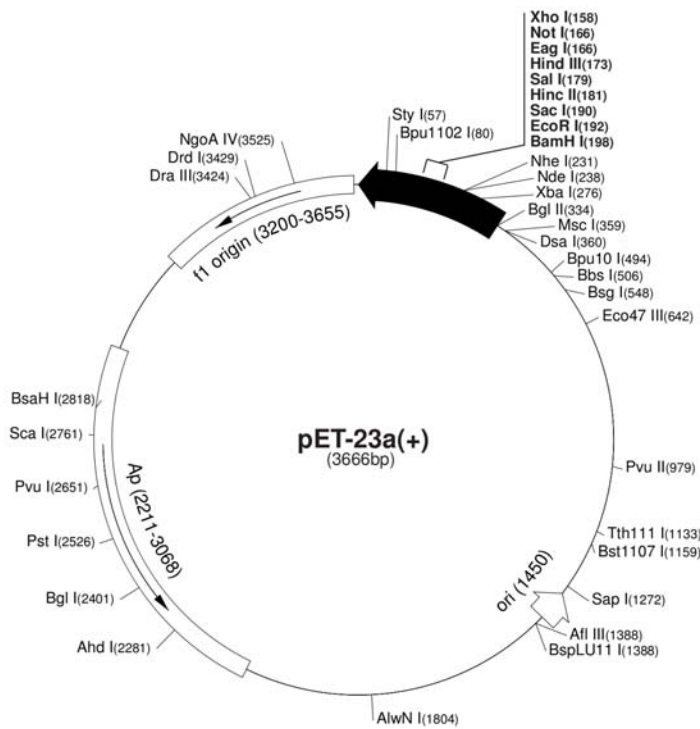


Figura 3.4. Mapa del vector pET23a (Novagen)

Vector pUBS-520

El vector pUBS-520 (figura 3.5) té com a finalitat proporcionar dos tRNAs corresponents a dos codons de baixa freqüència en *E. coli*, però força freqüents en proteïnes eucariotes: AGA i AGG, ambdós codificants per l'aminoàcid Arg. Aquests dos tRNAs estan codificats pel gen *dnaY* (figura 3,5) (Brinkmann et al. 1989).

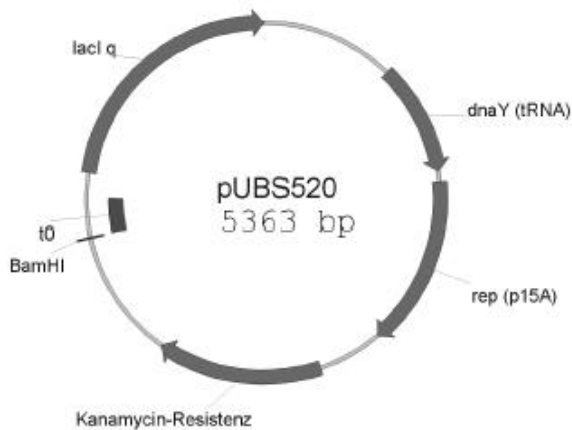


Figura 3.5. Mapa del vector pUBS520

Vectors d'expressió en *Saccharomyces cerevisiae*

Vector pESC-URA

Es tracta d'un vector d'expressió en cèl·lules de llevat (figura 3.6), tot i que es replica també a l'interior de les cèl·lules bacterianes (gràcies a l'origen de replicació pUC i al marcador de resistència a l'ampicil·lina), cosa que en permet la seva manipulació mitjançant tècniques clàssiques de biologia molecular.

Permet clonar el cDNA de la proteïna d'interès sota el control del promotor GAL1 o del promotor GAL10, depenent de les necessitats. Ambdós promotors són activats quan la galactosa és la font de carboni present en el medi de cultiu. La versió utilitzada en aquest treball conté un gen essencial per a la biosíntesi de l'uracil (*URA3*), permetent mantenir una pressió selectiva en aquelles soques de llevat que no són auxòtrofes per a aquest nucleòtid, i sempre i quan el medi no el contingui.

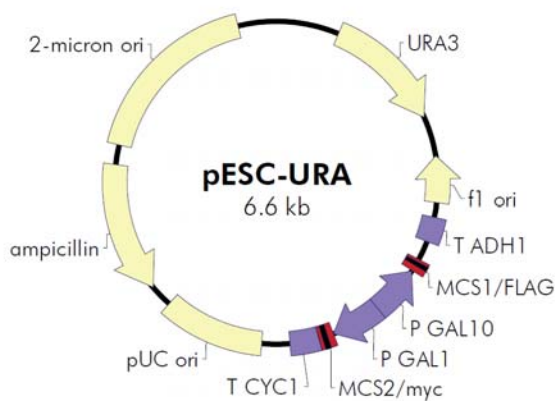


Figura 3.6. Mapa del vector pESC-URA (Stratagene)

Vector pYES/His

De la mateixa manera que el vector pESC, el pYES és un vector d'expressió recombinant en cèl·lules de llevat, replicable en *E. coli*, gràcies a l'origen de replicació pUC (figura 3.7). El marcador de selecció és igualment el gen *URA3*, que codifica per una proteïna responsable de la biosíntesi de l'uracil. El promotor que controla l'expressió del gen recombinant és GAL1, i permet incorporar una cua de 6 His a l'extrem C-terminal de la proteïna per a la seva posterior purificació en cromatografia d'afinitat per metall.

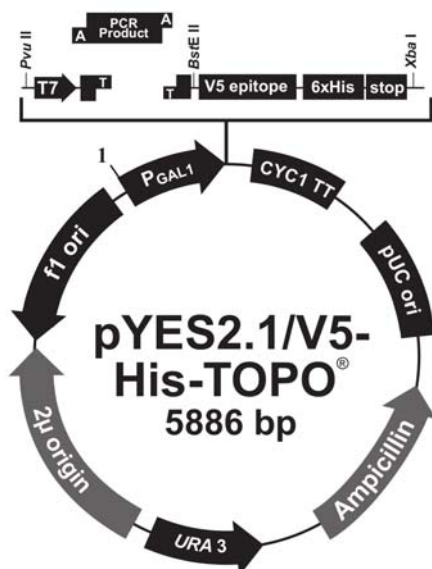


Figura 3.7. Mapa del vector pYES (Invitrogen)

Vectors d'expressió en cèl·lules d'insecte

Vector pBlueBac4,5/V5-His

Els vectors pBlueBac (Invitrogen) estan dissenyats per a l'expressió recombinant mitjançant baculovirus (figura 3.8). La presència de l'origen de replicació pUC i del gen de resistència a l'ampicil·lina permeten manipular aquest vector mitjançant el bacteri *E. coli*. Un cop duta a terme la construcció amb el DNA desitjat, el vector pot recombinar amb els virus Bac-N-Blue™ (Invitrogen) gràcies a dues regions homòlogues que envolten la regió de clonatge del DNA inserit. Addicionalment, una d'aquestes regions conté un fragment del gen de la β -galactosidasa (*LacZ*) i el seu promotor, que li manca al virus Bac-N-Blue. De la mateixa manera que en el sistema de selecció blanc/blau per a les colònies d'*E. coli*, els virus que hagin completat el procés de recombinació amb èxit expressaran la β -galactosidasa, donant a la cèl·lula hoste la capacitat per degradar el substrat cromogènic X-Gal. Finalment, el vector pBlueBac4.5/V5-His conté l'epítip V5, que permet detectar la proteïna recombinant mitjançant un anticòs, així com una seqüència de 6 His a l'extrem C-terminal per tal de purificar la proteïna recombinant obtinguda mitjançant una cromatografia d'afinitat per metall.

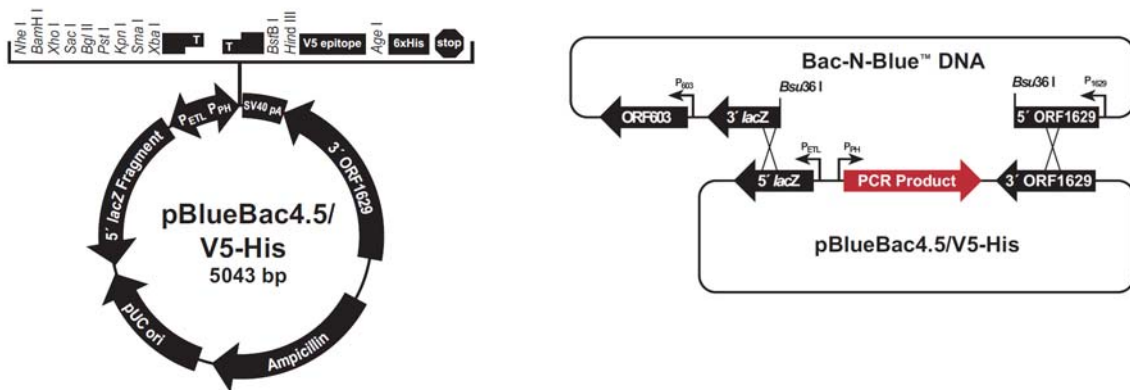


Figura 3.8. Mapa del vector pBlueBac4,5/V5-His (esquerra) i esquema de la recombinació amb el virus Bac-N-Blue (dreta).

3.1.3. Línies cel·lulars

Soques de *E. coli*

TOP10

La soca TOP10 (Invitrogen) d'*E. coli* està estretament relacionada amb DH10B i és especialment adequada per als processos de clonatge, seqüenciació, manteniment i escalat del plàsmid. Una de les característiques importants és la deficiència en endonucleases, com ara l'endonucleasa A1. Per contenir una delecció en el gen *LacZα* del profag φ80, la soca DH10B és apta per a la selecció de clons mitjançant el substrat cromogènic X-Gal.

Genotip F *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(St^R) *endA1* *nupG*

Aquesta soca d'*E. coli* va ser utilitzada per tots els clonatges i subclonatges, així com per a la conservació de les construccions utilitzades en totes les expressions.

BL21

La soca d'*E. coli* BL21, amablement cedida pel grup de les doctores J. Badia i L. Baldomà (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UB), és apta per a l'expressió de proteïnes recombinants. D'entre les seves característiques destaca la deficiència en la proteasa OmpT, que evita la possible degradació de la proteïna recombinant expressada durant el procés de purificació.

Genotip *E. coli* B F *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* *dcm*

Rosetta™(DE3)pLysS

Aquesta soca d'*E. coli* (Novagen) prové de la soca prèviament descrita BL21. Incorpora un plàsmid, amb un marcador de resistència al cloramfenicol, que codifica per diferents tRNAs de baixa freqüència en *E. coli* (AAG, AGA, AUA, CUA, CCC i GGA), per la qual cosa resulta molt apropiada per a l'expressió recombinant de proteïnes eucariotes. A més, conté còpia cromosomal del gen de la T7 RNA polimerasa (*LacUV5*) del profag λ . Aquesta característica permet a aquesta soca operar amb vectors del tipus pET (descrit anteriorment). Per tal d'evitar una expressió basal de la T7 RNA polimerasa abans de l'addició d'IPTG, la soca també conté el lisozim T7, que suprimeix l'expressió basal de la T7 RNA polimerasa abans de la inducció.

Genotip $F\ ompT\ hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal\ dcm$ (DE3) pLysSRARE (Cam^R)

Soques de *S. cerevisiae*INVSc1

INVSc1 (Invitrogen) és una soca del llevat *S. cerevisiae* dissenyada per a l'expressió de proteïnes recombinants. És diploide i, a més de no esporular, té un creixement ràpid. Les deleccions en gens implicats en la biosíntesi de determinats aminoàcids i nucleòtids (His, Leu, Trp i Uracil) permeten dur a terme una selecció per nutrients en aquells vectors que converteixin el llevat en auxotròfic per un d'aquests compostos.

Genotip MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52

YPH501

La soca de *S. cerevisiae* YPH501 (Stratagene) és de tipus diploide i de creixement ràpid. De la mateixa manera que la INVSc1, conté deleccions en gens responsables de la biosíntesi de determinats nutrients per tal de facilitar un mecanisme de selecció. En aquest cas, a més de His, Leu, Trp i Uracil, la soca no és auxòtrofa per a Lys i Adenina.

Genotip ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1

Línies de cèl·lules d'insecte

Sf21

La línia cel·lular Sf21 és, juntament amb la Sf9, una de les línies cel·lulars tradicionalment utilitzades pel laboratori de Patologies d'Insectes del Departament d'Agricultura dels EEUU. Ha estat modificada a partir de la línia cel·lular IPLBSF-21, provinent de l'ovari de la pupa de l'arna *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al. 1977), i actualment es considera molt apropiada per a l'expressió recombinant de proteïnes, ja que pot créixer tant en monocapa, com en cultiu en suspensió i és adaptable a un medi lliure de sèrum, facilitant-ne el procés de purificació i eliminació de potencials contaminants. Quan s'utilitza en combinació amb el sistema d'expressió de baculovirus, els nivells de proteïna recombinant obtinguts són alts. D'altra banda, el fet de ser una línia cel·lular eucariota, permet que la proteïna incorpori modificacions postraduccionals que no tenen lloc en el bacteri.

3.1.4. Solucions i medis de cultiu

Totes les solucions i medis de cultiu van ser preparades amb aigua ultrapura i es van esterilitzar per filtració en filtre de 0,22 µm o bé mitjançant un autoclau, durant 20 min a 120 °C.

Medis de cultiu microbiològic

Medi LB (Luria-Bertrani broth)

Medi àmpliament utilitzat en el cultiu rutinari d'*E. coli*. La composició és la següent:

Triptona	1%
Extracte de llevat	0,5%
NaCl	0,5%

El medi LB va ser complementat amb determinats casos amb els antibiòtics necessaris per tal de mantenir la selecció del plàsmid contingut a l'interior de les cèl·lules. La composició dels medis resultants d'aquesta addició és:

- LB-A: LB amb ampil·lina a una concentració de 100 µg/mL.
- LB-A50: LB amb ampil·lina a una concentració de 50 µg/mL.
- LB-AC: LB amb ampil·lina a una concentració de 100 µg/mL i cloramfenicol a una concentració de 64 µg/mL.
- LB-AK: LB amb ampil·lina a una concentració de 100 µg/mL i kanamicina a una concentració de 34 µg/mL.

Medi 2xTYA

Aquest medi és una modificació del medi LB que conté el doble d'extracte de llevat i un 60% més de triptona. És especialment apropiat per a l'expressió de proteïnes recombinants. En tots els treballs realitzats en aquesta tesi, l'antibiòtic utilitzat en combinació amb aquest medi va ser l'ampicil·lina a la concentració de 100 µg/mL.

Composició:

Triptona	1,6%
Extracte de llevat	1%
NaCl	0,5%

Medi SOC

Aquest medi de bacteri és més ric en salts i conté glucosa com a font de carboni. Es va utilitzar en els bacteris recent transformats, durant la incubació que precedeix al sembrat en placa, i té per objectiu permetre l'expressió dels enzims de resistència a antibiòtics presents en el vector.

Composició:

Triptona	2%
Extracte de llevat	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucosa	20 mM

Medis de cultiu de llevat

Medi selectiu SD-U

El medi SD (de *Synthetic Dextrose*) és un medi mínim de llevat utilitzat per al cultiu rutinari dels llevats transformats amb un plàsmid recombinant. Conté glucosa com a font de carboni per tal de no induir l'expressió de proteïnes el gen de les quals està sota el control del promotor GAL, i en el cas de la variant SD-U no conté uracil, exercint una pressió selectiva per a aquells llevats que estan transformats amb els vectors pESC-URA i pYES.

Material i mètodes

Composició del medi SD-U:

Base de nitrogen (Yeast Nitrogen Base, SIGMA)	0,67%
Glucosa	2 %
Casaminoacids (Bacto™ Casamino acids, BD)	0,1%
Sulfat d'adenina	40 mg/L
L-Trp	10 mg/L

Medi selectiu SG-U

El medi SG (*Synthetic Galactose*) té la mateixa finalitat que el medi SD, amb la única diferència d'utilitzar galactosa com a font de carboni. Aquest medi es va utilitzar per a la inducció de l'expressió de les proteïnes recombinants que estan sota el control del promotor GAL1.

Composició del medi SG-U:

Base de nitrogen (Yeast Nitrogen Base, SIGMA)	0,67%
Galactosa	2 %
Casaminoacids (Bacto™ Casamino acids, BD)	0,1%
Sulfat d'adenina	40 mg/L
L-Trp	10 mg/L

Medi YPAD

Consisteix en un medi ric, utilitzat per al creixement de llevats no transformats amb cap vector i que, per tant, no requereixen una pressió selectiva.

Composició del medi YPAD:

YEP (Autoclavat)	
<i>Extracte de llevat</i>	1%
<i>Peptona</i>	2%
Glucosa	2 %
Sulfat d'adenina	40 mg/L

Medis de cultiu de cèl·lules d'insecte Sf21

Medi incomplet

Es tracta del medi comercial Sf-900 II SFM (Gibco), adaptat per al creixement sense sèrum boví fetal (FBS, de *Fetal Bovine Serum*). L'objectiu d'aquest medi és evitar possibles interferències en el procés de transfecció i reduir el nombre de proteïnes presents en el sobrenedant cel·lular per tal de facilitar la purificació de les proteïnes recombinants obtingudes.

En el cas dels processos d'expressió, una mescla d'antibiòtics i antifúngics (10.000 unit/mL penicil·lina, 10 mg/mL estreptomina i 25 µg/mL d'amfotericina B, Sigma) va ser afegida a una concentració final de l'1%.

Medi complet

Per al medi complet, un 10% d'FBS (Gibco), tractat durant 1h a 56°C per tal d'inactivar les proteïnes de la cascada del complement, va ser afegit al medi incomplet.

Tot i que les cèl·lules Sf21 poden créixer correctament amb medi incomplet, el creixement en presència d'FBS millora les condicions generals del cultiu.

3.2. Mètodes generals de biologia molecular

3.2.1. Mètodes bioinformàtics

Cerca per alineament local

Per a la cerca de seqüències amb identitat respecte a les obtingudes, es va realitzar una "cerca per alineament local" (BLAST, de *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1990).

En el cas de la cerca amb la finalitat d'obtenir una idea preliminar de la identitat d'una seqüència total o parcial obtinguda, es va utilitzar la cerca *blastx*, que compara les sis possibles pautes de lectura de la seqüència de DNA amb una base de dades de proteïnes. En aquest cas, la base de dades utilitzada per a la cerca va ser la de proteïnes no redundants (nr).

Per a la selecció de seqüències per a la construcció d'anàlisis filogenètiques, es va utilitzar la cerca *blastp*, que compara una seqüència proteica donada, amb una base de dades de proteïnes. En aquests casos, la base de dades utilitzada va ser la de *Reference proteins* (refseq_protein). En la major part dels casos (indicat en cada resultat), la cerca va ser filtrada, o bé per insectes (taxid:50557), o bé per lepidòpters (taxid:7088).

Alineament de seqüències

Per a l'alineament de seqüències, tant de DNA, com de proteïnes, es va utilitzar el programa ClustalW, en alguna de les seves versions en línia (per exemple, Institut Pasteur, DNA data bank of Japan o Pôle informatique lyonnais). La matriu utilitzada en el cas de les proteïnes per definir el pes de les substitucions d'aminoàcids va ser BLOSUM (*BLOCKS of Amino Acid SUBstitution Matrix*), o derivada (Henikoff & Henikoff 1992). La resta de paràmetres (penalització per obertura de forats, penalització per extensió dels forats, etc.) van ser utilitzats tal i com es defineixen per defecte.

Reconstrucció d'arbres filogenètics

Per a la reconstrucció d'arbres filogenètics, el fitxer amb extensió *aln*, obtingut de l'alineament, va ser processat amb el programa MEGA 4 (Tamura et al. 2007). Les anàlisis filogenètiques es van construir amb el mètode *Neighbor-Joining* i considerant únicament els blocs amb residus similars. El test de robustesa realitzat per a l'anàlisi va ser de tipus *bootstrap*. Finalment, l'arbre obtingut va ser reordenat per tal de millorar-ne la visualització.

Anàlisi dels espectres de masses de proteïnes

Mascot. En una primera fase, els espectres de masses obtinguts es van analitzar mitjançant el

programa Mascot (Matrix science) (Perkins et al. 1999). Aquest programa no extreu directament la seqüència del pèptid fragmentat, sinó que compara el patró de fragmentació amb altres pèptids i proteïnes presents a les bases de dades de seqüències. Tot i que presenta algunes limitacions a l'hora de treballar en espècies poc estudiades i per a les quals hi ha poques seqüències teòriques a les bases de dades, permet fer una primera identificació del tipus de proteïna present a cada mostra. Aquest programa va ser utilitzat a la Plataforma de Proteòmica del Parc Científic de Barcelona, on es van dur a terme les anàlisis per espectrometria de masses en tàndem.

Peaks. El programa Peaks (Bioinformatics solutions) (Ma et al. 2003) incorpora la possibilitat de seqüenciar *de novo* a partir de l'espectre de masses obtingut de la fragmentació dels pèptids triptics (productes de la digestió amb tripsina). Un cop identificada una mostra d'interès mitjançant el programa anterior, la seqüència dels diferents pèptids analitzats va ser obtinguda mitjançant el programa Peaks, cedit en fase de proves per la pròpia empresa proveïdora.

Altres eines bioinformàtiques

Predicció de pèptids senyal. Donat que moltes de les proteïnes estudiades eren potencialment secretables, se'n va analitzar la presència de pèptids senyal d'excreció cel·lular mitjançant el programa SignalP (Bendtsen et al. 2004; Emanuelsson et al. 2007).

Predicció de fragments transmembrana. Donada la variabilitat en els resultats d'aquest tipus de prediccions, es van utilitzar diferents servidors per tal d'avaluar la robustesa de les prediccions obtingudes:

- **DAS - Transmembrane Prediction Server**, del Centre bioinformàtic d'Estocolm:
<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>
- **TMHMM Server v. 2.0**, del Centre d'anàlisi de seqüències biològiques (CBS) de Dinamarca: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>
- **TMpred**, de l'Institut de bioinformàtica de Suïssa:
http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

Predicció de glicosilacions. Els potencials punts de glicosilació de les seqüències obtingudes va ser estudiat amb el programa NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), que prediu residus potencialment glicosilables en el context Asn-X-Ser/Thr.

Punt isoelèctric i pes molecular. El punt isoelèctric i pes molecular teòrics de les seqüències primàries de les proteïnes obtingudes es van calcular mitjançant l'eina Compute pI/Mw (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

3.2.2. Aïllament d'RNA

Per a l'obtenció de l'RNA, els teixits d'individus de dos dies d'edat van ser disseccionats i conservats a -80 °C fins al dia de la seva utilització. Els teixits obtinguts es van triturar mecànicament en un bany de nitrogen líquid. Seguidament l'RNA total es va extreure amb el reactiu TriZol (Sigma), d'acord amb les indicacions del fabricant. El sediment d'RNA obtingut en la darrera etapa de precipitació es va resuspendre amb aigua ultra pura, tractada amb l'inhibidor d'RNases dietil pirocarbonat (DEPC) i autoclavada. El volum de resuspensió oscil·là en un rang de 10 a 20 µL, depenent del teixit extret. Les solucions d'RNA van ser conservades a -80 °C fins el moment de la seva utilització. Dilucions 1/10 i 1/100 de les solucions d'RNA obtingudes es van quantificar espectrofotomètricament a una longitud d'ona de 260 nm.

3.2.3. Transcripció reversa (RT)

La mostra d'RNA va ser sotmesa a un tractament amb DNasa per tal d'eliminar les possibles traces de DNA genòmic que podien haver estat coextretes amb el mètode anteriorment descrit.

Vuit µg d'RNA total van ser tractats amb 5 unitats de DNasa lliure d'RNases (Roche), en presència de 2,5 mM de MgCl₂ i tampó de la transcriptasa reversa. Després d'incubar la reacció durant 20 min a 37 °C, la DNasa va ser desactivada mitjançant l'addició d'EDTA a una concentració final de 2,8 mM, seguit d'un tractament tèrmic de 10 min a 75 °C.

Un cop lliure de DNA genòmic, la mostra va ser incubada en presència de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) durant 1 h a 42 °C, en presència de DTT, MgCl₂, Oligo(dT), dNTPs i l'inhibidor d'RNases RNaseOUT, a les concentracions indicades pel fabricant. Finalment, la transcriptasa reversa va ser inactivada tèrmicament a 70 °C durant 15 min.

3.2.4. Amplificació dels extrems 3' i 5'

Per a l'amplificació dels extrems 5' i 3' de les seqüències parcials obtingudes es va utilitzar la tècnica de RACE-PCR (de *Rapid Amplification of cDNA Ends-Polymerase Chain Reaction*). En el cas de les esterases antenals de *S. littoralis* es va utilitzar el set comercial SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), mentre que per a les esterases antenals de *S. nonagrioides* i la Reductasa de *S. littoralis*, es va utilitzar el set comercial FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion). Ambdós contenen els enzims i reactius necessaris per a dur a terme tot el procés, partint d'una mostra d'RNA. En tots dos casos, l'amplificació dels extrems s'obté mitjançant l'addició d'una seqüència coneguda en l'extrem 5' o 3' del cDNA. Un cop obtingut el cDNA modificat, aquest pot ser utilitzat de substrat per a una PCR amb un oligonucleòtid específic del gen i un altre que s'hibridarà a l'extrem 3' o 5' de tots els cDNAs de la mostra.

L'estratègia que els dos sets utilitzen per a l'obtenció del cDNA modificat en 3' (3'RACE-cDNA) és la mateixa, i consisteix en utilitzar com a encebador de la transcripció reversa un oligonucleòtid que s'hibrida a la regió poliA de l'extrem 3', i al mateix temps contingui la seqüència que serà incorporada al cDNA. D'altra banda, l'estratègia seguida per a la síntesi del 5'RACE-cDNA (un cDNA modificat en 5') difereix entre les cases comercials. Tal i com es mostra a la figura 3.9, el set de Clontech aprofita l'activitat transferasa de la transcriptasa reversa del virus de la leucèmia murina (MLV-RT, de *Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase*), que afegeix entre 3 i 5 citidines al finalitzar la seqüència, per tal d'hibridar-hi l'oligonucleòtid que conté la seqüència a insertar. Per la seva banda, el set d'Ambion utilitza la pirofosfatasa àcida del tabac (TAP, de *Tobacco Acid Pyrophosphatase*) per hidrolitzar la molècula de trifosfat de guanosina (GTP, de *Guanosine triphosphate*) metilada que conté l'RNA missatger madur, deixant un RNA amb un sol grup fosfat a l'extrem 5'. A aquest RNA s'hi afegeix llavors l'oligonucleòtid de la seqüència desitjada, que és lligat a l'RNA mitjançant una RNA lligasa.

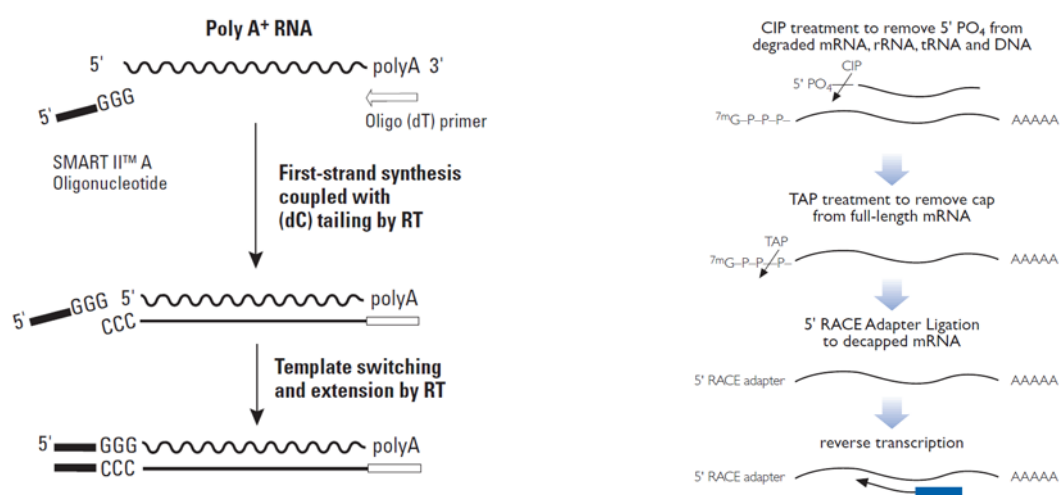


Figura 3.9. Esquema de funcionament dels sistemes de Clontech (esquerra) i Ambion (dreta) per a l'insertió d'una seqüència coneguda a l'extrem 5' del cDNA.

3.2.5. Electroforesi de DNA

Per tal de separar els fragments de DNA resultants dels processos de digestió enzimàtica i PCR, les mostres van ser carregades en un gel d'agarosa diluïda en tampó TAE (4 mM Tris-AcOH i 0,1 mM d'EDTA, ajustat a pH 8,3). La concentració de l'agarosa va dependre de la longitud dels fragments que s'esperaven obtenir, oscil·lant entre un 1% per als fragments més llargs i un 2% per als fragments més curts. Un cop barrejada l'agarosa amb el tampó, la suspensió va ser escalfada i agitada fins obtenir una solució clara. Un cop reduïda la temperatura de la solució, l'agent intercalant d'àcids nucleics SybrSafe (Invitrogen) va ser afegit amb una proporció 1:10.000 (v:v) i

la solució va ser dipositada en un motlle fins a la seva solidificació.

Les mostres de DNA van ser mesclades amb un tampó de càrrega (6x DNA Loading Dye, Fermentas) a una concentració final de 1,6 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,005% de blau de bromofenol, 0,005% de "xylene cyanol FF", 10% de glicerol i 10 mM d'EDTA. Un cop dipositades les mostres al gel, l'electroforesi es va dur a terme a 90 V fins que els indicadors de color van mostrar la distància de migració desitjada. El resultat del DNA separat va ser visualitzat sota un llum UV.

3.2.6. Purificació de DNA a partir de gel d'agarosa

Per a la purificació de fragments de DNA posteriorment a la separació per electroforesi en gel d'agarosa, es van utilitzar dues tècniques diferents en funció de la finalitat. En el cas del clonatge per seqüenciació i identificació de fragments de PCR (utilitzant el sistema de la topoisomerasa del vector pCRII-TOPO), es va optar per un mètode en que la mostra final de DNA queda més concentrada, si bé conté també més impureses. En el cas del subclonatge en vectors d'expressió (utilitzant la T4 DNA lligasa), en canvi, es va optar per un mètode en que la concentració final del DNA era més baixa, però la mostra també estava més lliure de contaminants. El motiu d'aquesta doble metodologia és que les amplificacions mitjançant oligonucleòtids degenerats i/o les amplificacions dels extrems 3' i 5' donen lloc sovint a bandes molt febles, mentre que en els processos de subclonatge les quantitats de DNA obtingudes poden ser majors. D'altra banda, la T4 DNA lligasa ha demostrat ser força sensible als contaminants (Hyone-Myong 1996; Raae et al. 1975), reduint l'eficàcia de la lligació quan la mostra no és prou pura, mentre que la topoisomerasa no sembla presentar problemes d'aquest tipus.

Purificació per a clonatge amb el sistema pCRII-TOPO

Per al clonatge amb el sistema pCRII-TOPO, les bandes d'interès van ser tallades amb un bisturí estèril i extretes per filtració en llana de vidre mitjançant les columnes GenElute (Sigma), d'acord amb les especificacions del fabricant. El DNA obtingut va ser precipitat per addició de NaOAc-AcOH 3 M pH 5,2 a una concentració final de 0,3 M, i EtOH absolut a una concentració final del 70%. El sediment de DNA obtingut es va rentar amb 500 µL d'EtOH 70%, assecat en una corrent d'aire i resuspès finalment en 10 µL d'aigua ultra-pura autoclavada.

Purificació per a subclonatge amb la T4 DNA lligasa

En el cas de les bandes de DNA destinades al subclonatge (ja fossin productes de digestió enzimàtica, o amplificacions per PCR a partir de vector), es va utilitzar el set QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen). Tal i com indica el fabricant, les bandes van ser tallades amb un bisturí estèril, l'agarosa va ser desfeta i diluïda en tampó i el DNA es va purificar mitjançant una columna

de sílica (Quiagen). Després de diversos rentats amb tampons d'alta concentració salina, el DNA va ser eluït amb 30-50 µL d'aigua ultra-pura autoclavada, depenent de la intensitat de la banda.

3.2.7. Clonatge de DNA

Clonatge de fragments de productes de PCR pel sistema TA

Entre 2 i 4 µL de la reacció de lligació van ser clonats en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen) i transformats en cèl·lules competents DH5α (TOP 10, Invitrogen), d'acord amb les indicacions del fabricant. Una fracció de 50 µL i una altra de 250 µL d'aquesta transformació van ser sembrats en dues plaques d'agar amb medi LB-A50, tractades prèviament amb 40 µL d'una solució de 20 mg/mL de X-GAL. Els clons obtinguts van ser explorats per PCR sobre colònia (posant en contacte una punta de pipeta estèril amb la colònia d'interès i posteriorment amb la mescla de reacció de PCR) o per doble digestió del plàsmid purificat.

Aquest sistema va ser utilitzat també en el clonatge de cDNA en el vector pBlueBac. En aquest cas, però, l'exploració dels clons es va realitzar únicament per PCR, amb un oligonucleòtid del DNA inserit i un del vector, per tal de poder verificar la correcta orientació del DNA inserit en el vector.

Subclonatge en vectors d'expressió

Un cop escollides les dianes de restricció adequades per a la inserció del gen d'interès en el vector d'expressió es van dissenyar els oligonucleòtids apropiats per tal d'introduir-les als extrems 5' i 3' de la seqüència. Amb aquests encebadors es va dur a terme una PCR, utilitzant com a substrat el vector de clonatge on havia estat inserit el gen aïllat. Després d'analitzar el producte de PCR mitjançant un gel d'agarosa, la banda corresponent al DNA d'interès (en tots els casos l'única banda observada en el gel) va ser extreta.

Tant el producte de PCR purificat com el vector destí van ser doble digerits en una sola reacció, utilitzant les condicions suggerides pel fabricant (Fermentas) per a cadascuna de les combinacions d'enzims. El producte de digestió del DNA inserit va ser purificat mitjançant un gel d'agarosa, mentre que el vector doblement digerit es va purificar utilitzant la columna de sílica del set QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), però ometent l'etapa de separació del gel d'agarosa per tal de minimitzar-ne les pèrdues. Un cop digerits i purificats, tant el DNA a inserir com el vector van ser quantificats.

Per a la reacció de lligació es van utilitzar 90 fmols d'insert i 30 fmols de vector en presència d'una unitat de T4 DNA Lligasa (Invitrogen) i els tampons proporcionats pel fabricant. La reacció es

dugué a terme en 100 cicles, que van consistir en 30 s a 10 °C seguit de 30 s a 30 °C. Aquestes condicions són un compromís entre les baixes temperatures d'hibridació dels extrems cohesius i la temperatura òptima de funcionament de la T4 DNA Lligasa (Lund et al. 1996).

3.2.8. Transformació de plàsmids

Transformació en *E. coli*

Transformació per mètodes químics

Per a transformar químicament els bacteris *E. coli* es va optar pel mètode del CaCl_2 (Ausubel et al. 1991), un dels diferents mètodes que utilitzen cations divalents (en aquest cas, el Ca^{2+}), per tal d'obrir porus en la membrana dels bacteris, que permeten l'acceptació de plàsmids en sotmetre les cèl·lules a un xoc tèrmic.

Obtenció de les cèl·lules competents

Cent mL de medi LB fresc van ser inoculats amb 1 mL d'un cultiu saturat amb la soca d'elecció i el cultiu es va incubar a 37 °C i 250 rpm fins assolir una DO_{600} de 0,4. Arribat aquest punt, el creixement va ser aturat incubant el cultiu en gel durant 10 min (a partir d'aquest moment, totes les etapes es van dur a terme en fred) i les cèl·lules van ser recollides per centrifugació a 3.500 g durant 10'. Descartat el sobrenedant, el sediment cel·lular va ser resuspès en 20 mL d'una solució de 10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 60 mM CaCl_2 i 15% glicerol (filtrada amb un diàmetre de porus de 0,22 μm i atemperada a 4°C). El cultiu va ser centrifugat durant 5 min a 2.500 g i el sediment cel·lular obtingut va ser resuspès de nou en 20 mL de la dissolució anterior. Transcorreguts 30 min d'incubació en gel, la suspensió cel·lular va ser centrifugada de nou durant 5 min a 2.500 g i el sediment cel·lular va ser resuspès en 4 mL de la solució de CaCl_2 , incubant-se durant 1 h en gel. Finalment, la suspensió va ser repartida en fraccions alíquotes de 200 μL i conservada a -80 °C fins el moment de la seva utilització.

Transformació per xoc tèrmic

Per al xoc tèrmic amb cèl·lules competents de CaCl_2 preparades al laboratori, entre 2 i 5 μL de plàsmid van ser afegits a la solució de cèl·lules competents i incubats durant 30 min en gel. Transcorregut aquest temps es va procedir al xoc tèrmic, que va consistir en una incubació de 3 min a 42 °C (o 5 min a 37 °C), seguida d'una incubació de 2 min en gel. Finalitzat el xoc tèrmic, es van addicionar 800 μL de medi LB i el cultiu va ser incubat durant 1 h a 37 °C. Finalment, el cultiu va ser sembrat en dues plaques de medi LB en agar (100 μL i 900 μL , respectivament), que van ser incubades tota la nit a 37 °C.

Per al xoc tèrmic amb les cèl·lules TOP10 (Invitrogen) químicament competents, es va seguir el mateix procediment, però en aquest cas el tractament tèrmic va ser de 30 s a 42 °C. Per a la incubació d'1 h a 37 °C, 250 µL de medi SOC van ser afegits als 50 µL de cèl·lules recent transformades.

Transformació per electroporació

L'electroporació és una tècnica de transformació basat en principis físics. Un elevat potencial elèctric en el sí de la suspensió cel·lular provoca l'obertura de porus a la paret cel·lular, permetent l'entrada del plàsmid a l'interior de la cèl·lula. En la majoria dels casos, l'eficiència d'aquesta tècnica és superior a la de la transformació per mètodes químics. És per aquest motiu que l'electroporació es va utilitzar en casos en que la concentració del plàsmid era inferior a l'obtinguda mitjançant una preparació de plàsmid convencional.

Obtenció de cèl·lules elèctricament competents

L'objectiu final en l'obtenció de cèl·lules elèctricament competents és tenir una suspensió cel·lular altament concentrada, lliure de salts i amb presència de glicerol que protegirà les membranes en el procés de congelació.

Per a l'obtenció de les cèl·lules, 500 mL de medi LB van ser inoculats amb 10 mL d'un cultiu saturat de la soca desitjada i incubats a 37 °C i 250 rpm. Quan el cultiu va assolir una DO_{600} d'entre 0,5 i 0,7, el creixement es va aturar per incubació en gel durant 10 min (a partir d'aquest moment, totes les etapes es van dur a terme en fred). El sediment cel·lular, obtingut per centrifugació a 3.500 g durant 10 min, va ser resuspès en 150 mL d'una solució de glicerol al 10% (prèviament filtrada amb un porus de 0,22 µm). Aquest procés va ser repetit consecutivament amb volums de resuspensió decreixents (50 mL, 25 mL i 0,5 mL). La suspensió finalment obtinguda va ser repartida en fraccions alíquotes de 50 µL, que van ser congelades en un bany de metanol i neu carbònica. Les cèl·lules congelades van ser conservades a -80 °C fins el dia de la seva utilització.

Transformació per electroporació

Per a la transformació pròpiament dita, una de les fraccions anteriors va ser mesclada amb 5 µL de la solució de plàsmid i introduïda en una cel·la d'electroporació prèviament refrigerada. Aquesta mescla va ser sotmesa a un corrent elèctric amb les següents condicions: 1,7 kV de potencial, 200 Ω de resistència i 25 µF de capacítància. A continuació 500 µL de medi SOC van ser afegits a la mescla de plàsmid i cèl·lules, i la solució resultant va ser incubada durant 1 h a 37 °C. Finalment, el cultiu es va sembrar en plaques d'agar amb medi LB, en presència de l'antibiòtic

corresponent al plàsmid transformat.

Transformació de cèl·lules de llevat

Per a transformar les cèl·lules de llevat es va utilitzar el mètode de l'acetat de liti (LiOAc), tal i com es descriu en el manual de l'usuari del vector pESC (Stratagene).

Preparació de cèl·lules de llevat competents

Per a l'obtenció de cèl·lules de llevat competents, 50 mL de medi YPAD van ser inoculats amb 2,5 mL d'un cultiu saturat de la soca desitjada i el cultiu es va incubar a 30 °C i 250 rpm fins a assolir una DO_{600} propera a 1,0. El sediment cel·lular, obtingut per centrifugació a 1.000 g durant 5 min, va ser resuspès en 10 mL de tampó LTE (0,1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 10 mM EDTA). Aquesta etapa es va repetir, resuspenent el sediment obtingut en 0,5 mL de tampó LTE. La suspensió obtinguda es va repartir en fraccions alíquotes de 50 µL i es va mantenir a 4 °C fins al moment de la transformació (no més de 3 dies).

Transformació

Per a la transformació, entre 1 i 3 µg de plàsmid van ser mesclats amb una de les fraccions anteriorment obtingudes, i a la mescla s'hi van afegir 300 µL d'una solució de transformació (40% de PEG 3350, en solució LTE). La solució resultant es va incubar durant 30 min a 30 °C, seguida d'una incubació de 15 min a 42 °C. Finalment, el cultiu es va sembrar en plaques d'agar amb medi SD-U i aquestes van ser incubades a 30 °C fins a l'aparició de colònies (2 o 3 dies).

3.2.9. Purificació de DNA plasmídic

Purificació a partir de cultius d'*E. coli*

El procediment utilitzat per a l'extracció de DNA plasmídic a partir d'un cultiu d'*E. coli* està basat en el mètode de lisi alcalina (Birnboim & Doly 1979). En aquest procediment, les membranes cel·lulars són trencades per acció d'un tampó alcalí (generalment amb NaOH), que conté també dodecil sulfat sòdic (SDS). El resultat d'aquesta lisi és la formació d'un agregat de l'SDS amb les membranes, proteïnes i DNA cromosòmic, que precipita en intercanviar els ions Na^+ per K^+ (Ish-Horowicz & Burke 1981), presents a la solució de neutralització en forma d'acetat potàssic. En el mètode utilitzat en aquesta tesi, el DNA circular present en el sobrenedant de la lisi va ser purificat mitjançant una resina d'intercanvi aniònic, que uneix el DNA en presència d'hidroclorat de guanidina (present també a la solució de neutralització), i a pH àcid. Després de diversos rentats amb tampons d'alta concentració salina, el DNA plasmídic és eluït per addició d'aigua ultrapura autoclavada.

En el decurs d'aquesta tesi es van utilitzar tres sets diferents que utilitzen aquest mateix principi. El *Quiagen Plasmid Mini Kit* (Quiagen) i el *High Pure Plasmid Isolation* (Roche) van ser utilitzats per a la purificació de DNA plasmídic provinent d'un petit volum de cultiu (5-8 mL), obtenint-se generalment entre 8 i 10 µg de plàsmid. Aquestes quantitats van ser suficients per als processos de seqüenciació, transformació i subclonatge. Addicionalment, el set *Quiagen Plasmid Maxi Kit* (Quiagen) es va utilitzar per a la obtenció de plàsmid per a transfecció en cèl·lules d'insecte. Aquest set utilitza el mateix principi que els anteriors, si bé substitueix els processos de centrifugació posteriors a la lisi per filtracions. Utilitzant aquest sistema a partir de sediments cel·lulars provinents de 150 mL de cultiu, es van obtenir 0,5 mg de plàsmid a una concentració d'aproximadament 1 µg/µL.

Purificació a partir de cultius de llevat

L'extracció de DNA circular provinent de cèl·lules de *Sacharomyces cerevisiae* presenta dos dificultats si es compara amb el mateix procediment aplicat a les cèl·lules bacterianes d'*E. coli*. En primer lloc, la paret cel·lular del llevat fa la cèl·lula més resistent a la lisi. En segon lloc, la quantitat de DNA plasmídic obtinguda a partir d'un cultiu de llevat és inferior a l'obtinguda a partir d'un cultiu d'*E. coli*. És per això que la majoria de protocols aconsellen transformar en *E. coli* el plàsmid obtingut a partir del llevat, per tal d'obtenir-ne quantitats majors i poder-lo manipular. El procediment utilitzat en aquesta tesi és una adaptació d'un protocol prèviament descrit a la literatura (Robzyk & Kassir 1992).

La colònia corresponent va ser inoculada en 5 mL de medi selectiu i el llevat es va fer créixer durant 24 h a 30 °C. El sediment cel·lular, recollit per centrifugació a 10.000 g durant 2 min, va ser resuspès en 100 µL de la solució STET (8% sacarosa, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA i 5% Tritó X-100). A la suspensió cel·lular s'hi van afegir 200 µL de boles de vidre (GlassBeads 425-600 µm, Sigma) i es va agitar durant 5 min a temperatura ambient amb l'ajut d'un *vortex*. A la mescla s'hi van afegir 100 µL addicionals de solució STET i va ser escalfada durant 3 min a 95°C, seguit d'una incubació de 5 min en gel.

Les membranes, proteïnes i DNA genòmic d'aquesta solució lisada van ser extrets amb 200 µL d'una solució de Fenol:Cloroform:Alcohol isoamílic (25:24:1), saturada amb Tris-HCl 100 mM (pH 8), que es va agitar vigorosament fins formar una emulsió. Les fases aquosa i orgànica es van separar per centrifugació a 12.000 g durant 5 min, i la fase aquosa es va transvasar a un nou tub. Aquesta fase aquosa va ser rentada amb 150 µL de Cloroform, seguint el mateix procediment que per a l'extracció anterior.

Finalment, a la fracció aquosa obtinguda s'hi van afegir 150 µL del tampó Binding Buffer del set de

purificació de DNA plasmídic *High Pure Plasmid Isolation* (Roche) i la mescla resultant va ser carregada en una columna amb resina d'intercanvi iònic del mateix set (Roche). Després dels rentats indicats pel fabricant, el DNA va ser eluït amb 100 µL d'aigua ultrapura autoclavada. Finalment, 5 µL d'aquesta solució van ser transformats en 50 µL de cèl·lules electrocompetents, i el plàsmid es va extreure segons el procediment indicat anteriorment.

Conservació del plàsmid

Tant en el cas del bacteri com en el cas del llevat, els cultius obtinguts per a l'extracció de plàsmids van ser congelats i emmagatzemats a -80 °C (Sambrook & Russell 2001).

En el cas dels cultius d'*E. coli*, 600 µL del cultiu saturat va ser mesclat amb 200 µL d'una solució de glicerol al 60%, filtrada amb un tamany de porus de 0,22 µm. La solució resultant, amb una concentració final de glicerol del 15%, va ser congelada a -80 °C.

En el cas dels cultius de *S. cerevisiae*, 0,5 mL de cultiu en fase estacionària van ser mesclats amb 0,5 mL d'una solució de glicerol al 30%, filtrada amb un tamany de porus de 0,22 µm. La solució resultant (que contenia una concentració final de glicerol del 15%) va ser congelada a -80 °C .

3.3. Identificació i obtenció de cDNAs

3.3.1. Consideracions generals

La metodologia utilitzada per a la identificació de noves seqüències de cDNA va dependre de l'espècie i el tipus de seqüència cercada. En el cas de l'arna *S. littoralis*, un banc de cDNA obtingut prèviament pel grup de les doctores Emmanuelle Jacquin-Joly i Martine Maïbèche-Coisne (UMR 1272, UPMC-INRA, France) va proporcionar la seqüència completa de la major part de les CEs estudiades, sent necessària únicament la finalització dels extrems 5' i/o 3' en alguna de les seqüències.

En la resta de casos, les noves seqüències van ser identificades seguint una estratègia de PCR amb oligonucleòtids degenerats. Aquests es van dissenyar a partir de l'alineament de seqüències homòlogues, a excepció feta de les seqüències parcials Snon-EST2p i Snon-EST3p, en que van ser dissenyats a partir de seqüències peptídiques obtingudes directament de la proteïna.

3.3.2. Condicions específiques per a cada gen

Identificació del cDNA de la reductasa Slit-FAR1

Els oligonucleòtids degenerats FARfor i FARrev (taula 3.1) van ser obtinguts a partir de dues

regions conservades, identificades en un alineament de les FARs conegudes fins al moment. El cDNA de la glàndula de *S. littoralis* va ser utilitzat de motlle en una PCR amb aquests dos oligonucleòtids i les següents condicions de temperatura i temps: 3 min de desnaturalització inicial a 94 °C, seguit de 40 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 45 °C i 2 min a 72 °C, amb una extensió final de 10 min a 72 °C. El fragment de 294 pb obtingut en separar electroforèticament el producte de la PCR va ser purificat i clonat en el vector pCRII.

Un cop confirmada la homologia de la seqüència obtinguda amb la família de les FARs, aquesta va ser utilitzada per al disseny de dos oligonucleòtids específics per a l'amplificació dels extrems 5' i 3' (5'SIsFAR i 3'SIsFAR, respectivament). Per a l'amplificació de l'extrem 5', l'oligonucleòtid 5'SIsFAR es va utilitzar en combinació amb el 5'Outer (Ambion) en una PCR amb les següents condicions de temperatura i temps: 3 min de desnaturalització inicial a 94 °C; 10 cicles de 30 s a 94 °C, 30 min a 60 °C i 1 min a 72 °C; 35 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C i 1 min a 72 °C; elongació final de 10 min a 72 °C. La banda de 849 pb obtinguda en l'electroforesi en gel d'agarosa va ser purificada i clonada en el vector pCRII per a la seva seqüenciació.

L'amplificació de l'extrem 3' es va dur a terme mitjançant dues PCRs consecutives. En la primera es va utilitzar l'oligonucleòtid 3'SIsFAR en combinació amb el 3'Outer (Ambion). Un cop observada una banda de 600 pb (tènue i amb molt soroll de fons) en el gel d'electroforesi, una petita mostra d'aquesta va ser utilitzada per a una segona amplificació, aquest cop combinant els oligonucleòtids 3'SIsFAR i 3'Inner (Ambion). Les condicions de temps i temperatura d'aquestes dues PCRs van ser les següents: 3 min a 94 °C, seguit de 36 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C i 2 min a 72 °C, i una extensió final de 10 min a 72 °C.

La banda de 812 pb obtinguda finalment en l'electroforesi en gel d'agarosa va ser purificada i clonada en el vector pCRII per a la seva seqüenciació.

Un cop confirmat que els diferents fragments obtinguts donaven lloc a un mateix cDNA, la seqüència completa es va amplificar amb una *Pfu* DNA polimerasa, utilitzant els oligonucleòtids específics SlitFAR1for i SlitFAR1rev, i amb les següents condicions de temperatura i temps de PCR: 2 min de desnaturalització a 94 °C, seguits de 40 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 48 °C i 4 min a 72 °C, i 10 min d'extensió final a 72 °C. La única banda observada en l'electroforesi en gel d'agarosa va ser purificada i clonada en el vector pCRII per a la seva seqüenciació i anàlisi.

Taula 3.1. Oligonucleòtids utilitzats en la identificació de la reductasa SlitFAR1

Nom	Seqüència
FARfor	5'-TA[CT][AG]C[I]TACAC[AC]AA[AG]GC[ACG]TTGG[GC]AGA-3'
FARrev	5'-TTGAC[AG]AC[AT][I][CT]TCTAC[ACT]GG-3'
5'SlsFAR	5'-ACGATAGAAGGTCTGACGATGATA-3'
3'SlsFAR	5'-ACTATCATCGTCAGACCTTCTATCGTG-3'
SlitFAR1for	5'-TTAATATTCGTGTCAAAGTGAAG-3'
SlitFAR1rev	5'-AGTGAGCACCAGCCTTAG-3'

Intents d'amplificació del cDNA d'una alcohol acetil transferasa de *S. littoralis*

Per als assajos d'amplificació d'un possible cDNA codificant per a l'alcohol acetil transferasa de *S. littoralis*, es van escollir dues regions conservades en acetil transferases d'insecte, a partir de les quals es van dissenyar els oligonucleòtids degenerats AATUp i AATDo (ambdós d'orientació directa i de seqüències AA[CT] CG[CT] TGG TT[CT] GAC AA i GA[AG] CA[CT] TCC [CT][GC][I] TCC GA[ACT] G respectivament).

Inicialment es va dur a terme una 3'RACE-PCR amb AATUp i 3'Outer (Ambion), utilitzant el 3'RACE-cDNA de la glàndula de *S. littoralis* i amb les següents condicions de temperatura:

1. Tres min de desnaturalització a 94 °C
2. Tres blocs consecutius de cicles de temperatura d'hibridació decreixent:

5x	30 s a 94 °C	5x	30 s a 94 °C	34x	30 s a 94 °C
	30 s a 60 °C		30 s a 58 °C		30 s a 56 °C
	2 min a 72 °C		2 min a 72 °C		2 min a 72 °C
3. Elongació final de 10 min a 72 °C

La separació per electroforesi d'aquesta PCR va donar lloc a una banda majoritària (d'aproximadament 600 pb) amb molt soroll de fons. La banda va ser estreta i el DNA utilitzat com a substrat en una segona PCR, aquest cop amb els oligonucleòtids AATUp i 3'Inner (Ambion), amb les mateixes condicions de temperatura, però únicament 30 cicles en el tercer bloc d'amplificacions. La banda d'aproximadament 600 pb obtinguda a partir d'aquesta PCR va ser clonada en un vector pCRII i seqüenciada.

Alternativament, l'oligonucleòtid AATDo va ser combinat amb el 3'Outer (Ambion), amb les següents condicions de temperatura: 3 min a 94 °C, seguit de 36 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 60

°C i 1 min a 72 °C, amb una extensió final de 10 min a 72 °C. L'electroforesi va mostrar una banda feble a aproximadament 500 pb, que va ser purificada i el DNA va ser clonat en el vector pCRII per a la seva seqüenciació.

Identificació del cDNA de la carboxil esterasa Snon-EST1

L'oligonucleòtid degenerat 3'ESTSnUp (5'-AAC TTT GG[AC] CT[AGCT] AA[AG] GA[CT] CA-3'), corresponent a la seqüència d'aminoàcids NQGLKDQI, dissenyat a partir de l'alineament d'altres esterases (Merlin et al. 2007), va ser utilitzat en una 3'RACE-PCR en combinació amb l'oligonucleòtid UPM (Clontech) i utilitzant 3'RACE-cDNA de l'antena de *S. nonagrioides* com a motlle. Les condicions de temperatura i temps per a la PCR van ser les següents:

1. Cinc min de desnaturalització a 94°C
2. Cicles quatre blocs consecutius de cicles de temperatura d'hibridació decreixent:

3x	30 s a 94 °C	3x	30 s a 94 °C	3x	30 s a 94 °C	3x	30 s a 94 °C
	30 s a 60 °C		30 s a 57 °C		30 s a 54 °C		30 s a 50 °C
	30 s a 72 °C		30 s a 72 °C		30 s a 72 °C		30 s a 72 °C
3. Elongació final de 10 s a 72 °C

El producte de la reacció de PCR va ser separat en una electroforesi en gel d'agarosa, i la seqüència de 1340 pb va ser purificada i clonada en el vector pCRII per a la seva seqüenciació i anàlisi. Un cop verificada la identitat de la seqüència, la regió 5' d'aquesta va ser amplificada mitjançant l'oligonucleòtid específic 5'ESTSnDo (TGC CCC ACC ACC ATA GCT TTC GCC AG) i l'oligonucleòtid UPM (Clontech), amb les següents condicions de temperatura:

1. Un min de desnaturalització a 94 °C
2. Tres blocs consecutius de cicles de temperatura d'hibridació decreixent:

5x	30 s a 94 °C	5x	30 s a 94 °C	25x	30 s a 94 °C
	3 min a 72 °C		30 s a 70 °C		30 s a 68 °C
			3 min a 72 °C		3 min a 72 °C
3. Elongació final de 10 min a 72 °C

Finalment la seqüència completa va ser amplificada amb els oligonucleòtids específics SnESTUp (ATG ATT GGC TAC AAT AGT AAA GAA GAC TTT) i SnESTDo (TGT CTT TTC AGG CGT TGG GTT CCC), mitjançant una PCR amb les següents condicions: 1 min a 94 °C; 35 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C i 2 min a 72 °C; una extensió final de 10 min a 72 °C.

Identificació del cDNA de la carboxil esterasa Snon-EST2p

La identificació de la seqüència parcial Snon-EST2p es va dur a terme a partir de l'oligonucleòtid

degenerat pep1_3RACE (TA[CT] GC[I] CA[AG] CC[I] CC[AT] GT[CT] GG[I] AA), dissenyat a partir de la seqüència d'aminoàcids obtinguda en l'aïllament d'una esterasa de *S. nonagrioides* (GIPYAQPPVGK). Aquest oligonucleòtid va ser combinat amb l'UPM (Clontech) en una 3'RACE-PCR a partir de 3'RACE-cDNA de l'antena de *S. nonagrioides*, i amb les següents condicions de temperatura i temps de PCR:

1. Un min de desnaturalització a 94 °C

2. Quatre blocs consecutius de cicles de temperatura d'hibridació decreixent:

3x	30 s a 94 °C	3x	30 s a 94 °C	3x	30 s a 94 °C	3x	30 s a 94 °C
	30 s a 65 °C		30 s a 62 °C		30 s a 59 °C		30 s a 55 °C
	3 min a 72 °C		3 min a 72 °C		3 min a 72 °C		3 min a 72 °C

3. Elongació final de 10 min a 72°C

Després de separar per electroforesi en gel d'agarosa el producte de la PCR, la banda majoritària (però no única) de 1600 pb va ser purificada i clonada en el vector pCRII. Deu clons van ser seleccionats analitzats per doble digestió i tres d'ells seqüenciats.

Identificació del cDNA de la carboxil esterasa Snon-EST3p

Per a l'obtenció de la seqüència parcial Snon-EST3p, el producte de purificació de la banda de 1600 pb, obtinguda en la PCR descrita anteriorment, va ser utilitzat com a DNA motlle per a una segona amplificació. Per aquesta segona amplificació es va utilitzar l'oligonucleòtid pep1_3RACE (utilitzat en l'obtenció de Snon-EST2p) en combinació amb l'oligonucleòtid degenerat EstRev (TC[CT] TT[CT] AG[GT] CC[AT] GC[AG] TT[GT] CC), dissenyat a partir d'una regió conservada observada en l'alineament de diverses esterases.

Després d'un minut de desnaturalització inicial a 94 °C, es van dur a terme 35 cicles de 30 s de desnaturalització a 94 °C, 30 s d'hibridació a 45 °C i 30 s d'extensió a 72 °C. Finalment, després d'una darrera extensió de 10 min a 72 °C, el producte de PCR va ser separat per electroforesi en gel d'agarosa i la banda de 400 pb obtinguda va ser purificada i clonada en el vector pCRII.

L'oligonucleòtid SnEST3_3RACE (CAA TAC GAC ATG CTC ACA AAT ACT GGA AGA G) va permetre estendre la seqüència en sentit 3', obtenint-se una seqüència parcial anomenada Snon-EST3p. Les condicions de temperatura utilitzades en aquesta PCR van ser:

1. Un min de desnaturalització a 94 °C

2. Tres blocs consecutius de cicles de temperatura d'hibridació decreixent:

5x	30 s a 94 °C	5x	30 s a 94 °C	25x	30 s a 94 °C
	3 min a 72 °C		30 s a 70 °C		30 s a 68 °C
			3 min a 72 °C		3 min a 72 °C

3. Elongació final de 10 min a 72°C

Identificació de cDNAs de carboxil esterases de *S. littoralis*

Per a la identificació de cDNAs amb possible activitat esterasa, es va partir del banc de cDNA antenal de *Spodoptera littoralis*, obtingut recentment pel diferents grups de recerca sota la coordinació de Genoscope (França) (Legeai et al. 2011). Per a l'anàlisi bioinformàtica de les seqüències, duta a terme pel grup de les doctores Emmanuelle Jaquin-Joly i Martine Maïbèche-Coisne (UMR 1272, UPMC-INRA, França) es va utilitzar una anàlisi TblastN, a partir de la seqüència prèviament obtinguda Slit-EST (Merlin et al. 2007). Un cop seqüenciats els clons identificats pel mètode bioinformàtic, les seqüències dels extrems 5' i 3' d'algunes de les esterases van ser completats segons el procediment descrit anteriorment. Els oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació dels extrems 5' i 3' de les seqüències es mostren a la taula 3.2.

Taula 3.2. Oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació dels extrems 5' i/o 3' de les seqüències d'esterases que van aparèixer incompletes en el banc de cDNA antenal.

Nom	Seqüència
SICXE2-3'	CCGCATCACCAGAACCGAATCCGAACCC
SICXE7-5'	ATTCAGTTGAAGTTCGCGAAATGGGAACACCGG
SICXE7-3'	CCGGTGTTCCTTTCCCGAACTTCAACTGAAT
SICXE8-3'	GCTTACGTTCTTGAAATGGAGGAAAAATGGTCATAGGA
SICXE9-5'	ACAATTACCCGGTGCTGTAAAGTCATTGAT
SICXE9-3'	GTTCTATTTGGGTGGTGAAGAACACCTAACGGCAGAG
SICXE20-3'	TGCAAGTCGGCTGGCTCAAGAAATG

Les condicions de temperatura utilitzades per a la PCR van ser en tots els casos les mateixes:

1. Un min de desnaturalització a 94 °C
2. Tres blocs consecutius de cicles de temperatura d'hibridació decreixent:

5x	30 s a 94 °C	5x	30 s a 94 °C	25x	30 s a 94 °C
	3 min a 72 °C		30 s a 70 °C		30 s a 68 °C
			3 min a 72 °C		3 min a 72 °C
3. Elongació final de 10 min a 72°C

3.4. Caracterització del cDNA

3.4.1. Anàlisi del transcrit per *Northern blot*

Per a l'anàlisi per *Northern blot*, es va sintetitzar una sonda de DNA de 540 pb, marcada amb digoxigenina gràcies a la utilització de la mescla de nucleòtids *Dig-DNA labelling mix* (Roche). Per a la síntesi d'aquesta sonda es va dur a terme una PCR a partir de cDNA total de l'antena de *S. noagrioides* amb els oligonucleòtids SnESTUp (ATG ATT GGC TAC AAT AGT AAA GAA GAC TTT) i SnESTDo (TGT CTT TTC AGG CGT TGG GTT CCC). De la mateixa manera, els oligonucleòtids rpL8Up (GAG TCA TCC GAG CTC A[AG][AC] G[AGCT]A A[AG]G G) i rpL8Do (CCA GCA GTT TCG CTT [AGCT]AC [CT]TT [AG]TA) van ser utilitzats per a la síntesi d'una sonda control (508pb), dirigida contra la proteïna ribosomal rpL8, d'expressió ubiqua i constitutiva (Ruhf & Meister 1999). Adues sondes van ser quantificades espectrofotomètricament a 260 nm i la seva puresa va ser verificada mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa.

Vint micrograms d'RNA de cadascun dels teixits assajats van ser separats per electroforesi en gel d'agarosa que contenia un 1% de formaldehid. La separació de bandes resultant va ser transferida a una membrana de niló de càrrega positiva. La transferència va ser verificada per visualització sota la llum UV de l'RNA ribosomal, tant en el gel, com en la membrana, abans i després de la transferència. Les dues sondes van ser incubades simultàniament amb la membrana que contenia l'RNA durant tota la nit a 45 °C. Finalment la membrana va ser incubada amb un anticòs antidigoxigenina acoblat a una fosfatasa alcalina. La detecció de la presència de l'RNA es va dur a terme per quimioluminiscència, incubant la membrana amb el reactiu CSPD (Roche) que per acció de la fosfatasa alcalina dóna lloc a un compost inestable, que es descomposa, emetent llum a una longitud d'ona de 477 nm. Aquesta emissió va ser detectada per contacte amb una pel·lícula fotogràfica.

3.4.2. Anàlisi del transcrit per PCR semiquantitativa

Per a la caracterització de l'abundància relativa de transcrit en diferents teixits o condicions del cicle biològic de l'insecte es va dur a terme una amplificació del gen d'interès mitjançant la tècnica de la PCR, però utilitzant un nombre de cicles de la reacció en que les diferències d'amplificació tinguessin una relació lineal.

Com a teixit referència per tal d'establir el nombre de cicles, es va utilitzar l'antena en el cas de les esterases i la glàndula feromonal en el cas de la reductasa d'*S. littoralis*. Diverses PCRs es van dur a terme utilitzant un nombre de cicles creixent. Després de separar els productes de PCR mitjançant un gel d'agarosa, les bandes obtingudes es van escanejar i la seva intensitat es va

quantificar mitjançant el programa informàtic ImageJ (National Institute of Health).

Un cop establertes les condicions d'amplificació, aquestes es van utilitzar per a amplificar el gen objecte d'estudi a partir de les pertinents mostres de cDNA. Com a control es va dur a terme el mateix procediment amb el gen de la proteïna ribosomal rpL8, d'expressió ubiqua i constitutiva (Ruhf & Meister 1999).

La taula 3.3 mostra les condicions de PCR i els oligonucleòtids utilitzats per a cadascun dels gens.

Taula 3.3. Oligonucleòtids utilitzats en els estudis de distribució tissular dels transcrits obtinguts. **T:** Temperatura d'hibridació utilitzada (en graus centígrads). **C:** Nombre de cicles de la PCR.

Nom	Oligonucleòtids		T	C
	Directe	Revers		
<i>REDUCTASA DE S. LITTORALIS</i>				
SisFAR1	CAGTGGTCATTCATTCAGCA	GATGAGGTCCACCACATGAT	54	26
<i>ESTERASES DE S. NONAGRIOIDES</i>				
SnCXE2	AGGTCTCAGTCACAGTATTT	TGAATAGACCCTTAGACATC	56	34
SnCXE3	CGTCACTCAGACCGCTTGTA	GCAGTGGTATCAACGCAGAG	49	29
rpL8	GAGTCATCCGAGCTCA[AG] [AC]G[AGCT]AA[AG]GG	CCAGCAGTTTCGCTT[AGCT]AC[CT]TT[AG]TA	50	35
<i>ESTERASES DE S. LITTORALIS</i>				
SICXE2	GAGGGACGGGAAGGGGCC	GGGCAAGTTGTCTGAAGAA	57	32
SICXE3	ATGGTGGAAGTTAAAGTGGAACAAGG A	GCCGTGTGGGACCAGGAAGTC	55	28
SICXE4	ATGCAGTGGCAGACGTGTGTGTTA	GATCATGTCTTTTGTGTCCAACAG	55	30
SICXE5	ATGTTGTACGCGCTGCTGTGTGCA	TGCATATCGTATCCCGCGGTAAGC	60	27
SICXE6	ATTCCTTGGTCCCTATG	CAGCGATGGTGATTTGATTG	57	29
SICXE7	CCGGTGTTCCTATTTCCCGAA	ATAAATATTATCTACGTTAGTAAAGTTAAG TTGTCGAGC	60	30
SICXE8	TGTGGTAAAAAGTAGTTTTATTTACGCT CTTC	TTTCCTCCATTTCCAAGAACGTAAGC	57	39
SICXE9	ATCAATGACTTTACAGCACCGGGTAAT TGT	AAGAAATCGAGGTTGACCTTCAAACCTCA AC	60	35
SICXE10	CGGACGACCGGTCAGTTGTA	TACCAGGGACCAGCGTGTG	65	35
SICXE11	CACTGGGCTCATAAGATAG	AGGTGCATTATGTTTGGAAA	50	30
SICXE12	GAATTTTTTGGTGCGATC	CTCCAATTCGCAAGTTTTTC	50	30
SICXE13	ATGGACTGCCTCAAGTATAGGCC	CATCAAGTTGGACAGACTGG	50	30
SICXE14	AAAAAAAAGAGACCCTGTGGAGGTT	CTTTATGCGTTATATTTTTACCATCCA	50	30
SICXE15	ACTCCAAGATCCCTGG	AATCCGACCCAAAATATCAATGTATA	50	30
SICXE16	CGCCACCAGCGCCAC	GGACTGCCGCGCCGC	50	30
SICXE17	AACATGATCTTCTACGGCCCG	CTTTCTCCAGCAGCTCG	50	30

Continuació **taula 3.3**

Nom	Oligonucleòtid directe	Oligonucleòtid revers	T	C
SICXE18	ACTAGGAACGTTAGGGTTTCTTTGC	CATCCCTTCTTTACTAGTTGTTCCATA	50	35
SICXE19	ATGATCCGTGTGTTTGTATTGTTATTG	GATATCTGCAAGAATAATTTCTTCTCTCAT	45	35
SICXE20	GCTCCTGACGGCACGTACCTA	TCTGGCCGATGGTCTCCATT	65	35
PROTEÏNA RIBOSOMAL L8				
rpL8	GAGTCATCCGAGCTCA[AG] [AC]G[AGCT]AA[AG]GG	CCAGCAGTTTCGCTT[AGCT]AC[CT]TT[A G]TA	50	35

3.5. Expressió recombinant de proteïnes

3.5.1. Expressió en *E. coli*

Expressió de la cera sintasa (ATF)

La construcció del gen de la cera sintasa (anomenada pels autors *ATF*, de *acyl transferase*) en el vector pET23a va ser amablement cedida pel Dr. Alexander Steinbüchel (Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster). Per a la seva expressió, el plàsmid (anomenat pels autors pET23a::5'*His₆atf*) (Uthoff et al. 2005) va ser transformat en cèl·lules de la soca Rosetta(DE3)pLysS.

El procés d'expressió es va iniciar amb la inoculació de 10 mL de medi LB-AC amb la colònia d'interès. Després de 12-16 h de creixement a 37 °C i 250 rpm, 3 mL d'aquest cultiu es van inocular en 500 mL de medi LB-AC fresc i el cultiu es va fer créixer fins a assolir una DO₆₀₀ d'entre 0,5 i 0,7. En aquest punt l'inductor IPTG va ser afegit a una concentració final d'1 mM i el cultiu va ser incubat en les mateixes condicions durant 3 h addicionals. Transcorregut aquest temps, el sediment cel·lular va ser recollit per centrifugació a 10.000 g durant 15 min (4°C) i rentat amb 20 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,3. Un cop eliminat el sobrenedant per centrifugació, el sediment cel·lular va ser congelat a -80 °C i conservat a aquesta temperatura fins al moment de l'extracció proteica.

Assajos d'expressió de la carboxil esterasa Snon-EST1

Els assajos d'expressió recombinant amb aquest sistema d'expressió es van dur a terme amb el cDNA de l'esterasa Snon-EST1. Donat que aquesta esterasa conté un pèptid senyal de secreció extracel·lular, per a l'expressió amb *E. coli* aquest pèptid va ser eliminat (residus 1 a 19, ambdós

inclosos) i únicament la regió que codificava per la forma final de l'enzim (bases 58 a 1593, ambdues incloses) va ser clonada en els corresponents vectors d'expressió.

Assajos amb el vector pGEX

El cDNA codificant per l'esterasa Snon-EST1 va ser clonada en el vector pGEX entre les dianes de restricció EcoRI i XhoI, que van ser introduïdes a la seqüència mitjançant una PCR amb els oligonucleòtids SnESTpGEXfor (5'-CC **GGA ATT CCC** GTG TCC GAG AAT GTG ACT GTT GAA ACA-3') i SnESTpGEXrev (5'-CCG **CTC GAG** TTA ATT GGA CAT CTT CTT ACA TGA ACT CTT TGT-3').

L'expressió es va iniciar amb la inoculació de 2 mL de medi 2xYTA amb una colònia de la soca BL21 d'*E. coli*, transformada amb el vector pGEX-SnonEST1. Després de 12-16h de creixement a 37°C i 250 rpm, 100 µL d'aquest cultiu van ser inoculats en 10 mL de medi LBA fresc, i es va continuar el creixement en les mateixes condicions fins assolir una DO₆₀₀ d'entre 0,6 i 0,8. En aquest punt s'hi va addicionar IPTG a una concentració final de 0,5 mM i es va continuar la incubació. Per tal d'assajar diferents condicions d'expressió, aquest període d'inducció va ser dut a terme a 37 °C (2, 4 i 6 h), a 30 °C (6 h), a 25 °C (16 h) i a 20 °C (16 h). Transcorregut aquest temps, el cultiu va ser centrifugat durant 10 min a 7.000 g i, un cop retirat el sobrenedant, el sediment cel·lular va ser conservat a -80 °C fins el moment de l'extracció proteica.

Alternativament, el vector pUBS-520 va ser cotransformat en la soca BL21 d'*E. coli*, juntament amb la construcció pGEX-SnonEST1. El procés d'expressió que es va seguir va ser el mateix, però en aquest cas el medi contenia, a més d'ampicil·lina, kanamicina a una concentració de 34 µg/mL, i únicament es va dur a terme un assaig d'inducció a 20 °C durant 12h.

Assajos amb el vector pMAL

El cDNA codificant per l'esterasa Snon-EST1 va ser clonada en els vectors pMAL entre les dianes de restricció XbaI i HindIII, que van ser introduïdes a la seqüència mitjançant una PCR amb els oligonucleòtids SnESTpMALfor (5'-TTT GAA **GTC TAG AGT** GTC CGA GAA TGT GAC TGT TGA AAC A-3') i SnESTpMALrev (5'-TAT **AAG CTT** TTA ATT GGA CAT CTT CTT ACA TGA ACT CTT CGT-3').

Tant el vector pMALc2x-SnonEST1, com el pMALp2x-SnonEST1 van ser transformats en cèl·lules d'*E. coli* de la soca BL21. La colònia seleccionada va ser incubada durant 12-16 h a 37 °C i 250 rpm en 2 mL de medi LBA, i 100 µL d'aquest cultiu van ser reinoculats en 10 mL de medi fresc. Quan el nou cultiu va assolir una DO₆₀₀ d'entre 0,5 i 0,7, l'anàleg galactòsid IPTG va ser afegit a una concentració final de 0,3 mM i el cultiu es va continuar incubant durant 3 h addicionals en les

mateixes condicions. Finalitzat aquest temps d'incubació, les cèl·lules van ser recollides per centrifugació a 5.000 g durant 10 min i, un cop retirat el sobrenedant, el sediment cel·lular va ser conservat a -20 °C fins el moment de l'extracció proteica.

En el cas del vector pMALp2x-SnonEST1, es va dur a terme un assaig alternatiu, utilitzant la soca d'*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. L'assaig es va dur a terme seguint el mateix procediment, però afegint l'antibiòtic cloramfenicol en el medi de cultiu.

3.5.2. Expressió en *S. cerevisiae*

Expressió de la reductasa Slit-FAR1

El DNA codificant per la reductasa Slit-FAR1 va ser clonat en el vector pESC-URA entre les dianes de restricció BamHI i HindIII, que van ser introduïdes a la seqüència mitjançant una PCR amb els oligonucleòtids SlisFARpESCfor (5'-ACT TCA AAG **GAT CCT** AAA ATG GTT GTG TTG ACT TCG AAA GAA AAA TCA-3') i SlisFARpESCrev (5'-ATG ATT GTA **AAG CTT** TTA TTT TAT CTT TTC CAA AAA CTG TCG TAC TCC-3'). El vector pESC-SlitFAR1 va ser transformat en el llevat *S. cerevisiae* (soca YPH501) i aquest va ser inoculat en 50 mL de medi SD-U i incubat durant aproximadament 48 h a 30 °C i 250 rpm. Transcorregut aquest temps, la DO₆₀₀ va ser mesurada i es va calcular el volum de cultiu necessari per a obtenir una solució de 500 mL amb una DO₆₀₀ de 0,1, segons l'equació següent:

$$\frac{0,1 \cdot 500}{DO_{600} \text{ precultiu}} = \text{Volum de precultiu (mL)}$$

La fracció de cultiu enretirada va ser centrifugada durant 10 min a 7.000 g i el sediment cel·lular obtingut va ser resuspès en 10 mL de medi SG-U. Aquesta operació va ser repetida dues vegades més per tal d'eliminar el màxim possible la glucosa residual. Finalment, la suspensió de 10 mL de cultiu en medi SG-U va ser inoculada en 490 mL de medi SG-U fresc i incubat a 30 °C i 250 rpm fins assolir una DO₆₀₀ d'entre 1,1 i 1,3 (24-26 h, aproximadament).

Assolida aquesta densitat òptica, el creixement es va aturar incubant el cultiu en gel durant 10 min i el sediment cel·lular va ser recuperat mitjançant una centrifugació de 15 min a 7.000 g. El sediment obtingut va ser rentat amb 10 mL de tampó Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) i, un cop centrifugat de nou, i eliminat el sobrenedant, va ser congelat a -80 °C i conservat a aquesta temperatura fins al moment de l'extracció proteica.

Expressió de l'alcohol acetil transferasa CmAAT1

El llevat *S. cerevisiae* (soca INV2.1) que contenia el plàsmid pYES-CmAAT1 va ser amablement cedit pel Dr. Jean-Claude Pech (Genomique et biotechnologie des fruits INRA/INPT-ENSAT), que va fer arribar el llevat en una placa d'agar amb medi selectiu. Un cop obtingudes les mostres per a la conservació del cultiu a -80 °C, es va dur a terme l'expressió de la proteïna recombinant CmAAT1 tal i com s'indica en la publicació sobre la caracterització de l'enzim (Yahyaoui et al. 2002), però utilitzant un temps de creixement menor, degut als motius exposats als apartats de Resultats (4.2.5) i Discussió (4.3.4).

Una colònia de llevat provinent d'una placa d'agar amb medi SD-U va ser inoculada en 50 mL de medi fresc i incubat durant aproximadament 48 h a 30 °C i 250 rpm. Transcorregut aquest temps, la DO₆₀₀ va ser mesurada i es va calcular el volum de cultiu necessari per a obtenir una solució de 500 mL amb una DO₆₀₀ de 0,2, igual que en el cas de l'expressió de la reductasa SlitFAR1.

La fracció de cultiu enretirada va ser centrifugada durant 10 min a 7.000 g i el sediment cel·lular obtingut va ser resuspès en 10 mL de medi SG-U. Aquesta operació va ser repetida dues vegades més per tal d'eliminar el màxim possible la glucosa residual. Finalment, la suspensió de 10 mL de cultiu en medi SG-U va ser inoculada en 490 mL de medi SG-U fresc i incubat a 30 °C i 250 rpm fins assolir una DO₆₀₀ d'entre 1,1 i 1,3 (24-26h, aproximadament). Assolida aquesta densitat òptica, el creixement es va aturar incubant el cultiu en gel durant 10 min i el sediment cel·lular va ser recuperat mitjançant una centrifugació de 15 min a 7.000 g. El sediment obtingut va ser rentat amb 10 mL de tampó Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) i, un cop centrifugat de nou i eliminat el sobrenedant, va ser congelat a -80 °C i conservat a aquesta temperatura fins al moment de l'extracció proteica.

3.5.3. Expressió en cèl·lules Sf21 infectades amb baculovirus

Aquest sistema d'expressió recombinant es basa en la infecció de cèl·lules d'insecte Sf21 o Sf9 amb un baculovirus recombinant, en que el gen de la polihedrina ha estat substituït pel DNA de la proteïna d'interès. En el cicle natural d'aquest virus, la polihedrina s'expressa en grans quantitats i s'acumula a l'interior del citosol en forma de cossos d'inclusió, provocant la ruptura de la cèl·lula i permetent la sortida dels virions. Aquesta proteïna, però, no és necessària per a la transmissió del virus entre les cèl·lules quan aquestes es troben en un cultiu.

Tal i com s'explica a l'apartat de material d'aquest capítol, el sistema escollit per a aquest tipus d'expressió (Bac-N-Blue) permet diferenciar els virus recombinants dels no recombinants per addició d'un substrat cromogènic al medi.

Aquest sistema es va utilitzar per a l'expressió recombinant de les esterases SlitEST7 i SlitEST10

Cultiu de les cèl·lules Sf21

Les cèl·lules de la línia Sf21 van ser cultivades rutinàriament en flascons de 25 cm² i 5 mL de medi complet. Els flascons van ser sembrats amb 0,5-0,75 x10⁶ cèl·lules i incubats a 27 °C fins a la confluència del cultiu en monocapa (4-5 dies). Finalitzat aquest temps, el medi va ser enretirat per aspiració i les cèl·lules van ser resuspeses en 5 mL de medi fresc, amb l'ajut d'un raspador cel·lular. La densitat cel·lular es va mesurar manualment amb una cambra de comptatge de Bürker (Brand) i un microscopi invertit, i el volum necessari per a la sembra d'un nou flascó va ser diluït en medi complet fins a un volum final de 5 mL, que es van dipositar en el nou flascó.

Per a la conservació a llarg terme de les cèl·lules, la suspensió cel·lular d'un cultiu confluent va ser centrifugada durant 10 min a 500 g i el sediment cel·lular es va resuspendre en medi complet (que contenia un 10% de DMSO) per tal d'assolir una densitat de 10⁷ cèl·lules/mL. Un mL d'aquesta suspensió es va transferir a un criovial estèril i aquest va ser congelat a -20 °C durant 1 h, transferit a -80 °C durant 24 h i finalment emmagatzemat en N₂ líquid.

Transfecció i expressió de proteïnes recombinants

Transfecció

La primera etapa del procés d'expressió consisteix en cotransfectar el vector pBlueBac amb el DNA de la proteïna d'interès inserit, juntament amb el virus linealitzat. Aquest procés es va dur a terme mitjançant l'agent lipòfil Cellfectin (Invitrogen), que forma un liposoma que engloba el virus lineal i el plàsmid. Aquest liposoma es fusiona amb la membrana cel·lular, alliberant el DNA víric i plasmídic al citosol.

Per a la transfecció, 2 mL de medi complet que contenia 10⁶ cèl·lules Sf21/mL es va sembrar en una placa de 60 mm i es va incubar durant 30-45 min a 27 °C per tal que les cèl·lules s'adherissin. Paral·lelament es va preparar la mescla de transfecció, que va consistir en 0,5 µg de DNA viral, 1 mL de medi incomplet, i 4 µL de solució de vector d'1 µg/µL. Un cop homogeneïtzada per inversió, la solució va ser incubada durant 15 min a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, el medi complet de les cèl·lules va ser retirat i, després d'un rentat amb medi incomplet, s'hi va addicionar la solució de transfecció gota a gota. Les cèl·lules van ser incubades durant 4h en un agitador basculant (2-4 rpm) i finalment es van incubar durant 72 h a 27 °C, introduïdes dins d'una bossa de plàstic segellada per tal d'evitar l'evaporació excessiva del medi. El medi retirat després d'aquesta incubació (anomenat P0) contenia la primera generació de virus (mescla de virus recombinants i no recombinants). Les cèl·lules van ser reincubades amb 3 mL de medi complet durant 48 h addicionals i el medi retirat després d'aquest temps va ser unit a l'estoc P0.

Selecció dels virus recombinants

Per tal d'aïllar un clon recombinant d'entre la mescla de virus continguda en l'estoc P0, es va dur a terme un assaig de placa. Aquest assaig consisteix a immobilitzar una monocapa de cèl·lules infectades mitjançant un recobriment d'agarosa a baixa concentració. Aquest recobriment evita que els virus emergits d'una cèl·lula lisada es puguin desplaçar pel medi, i dona com a resultat la formació de plaques d'infecció virals localitzades al voltant de la cèl·lula originalment infectada (figura 3.10).

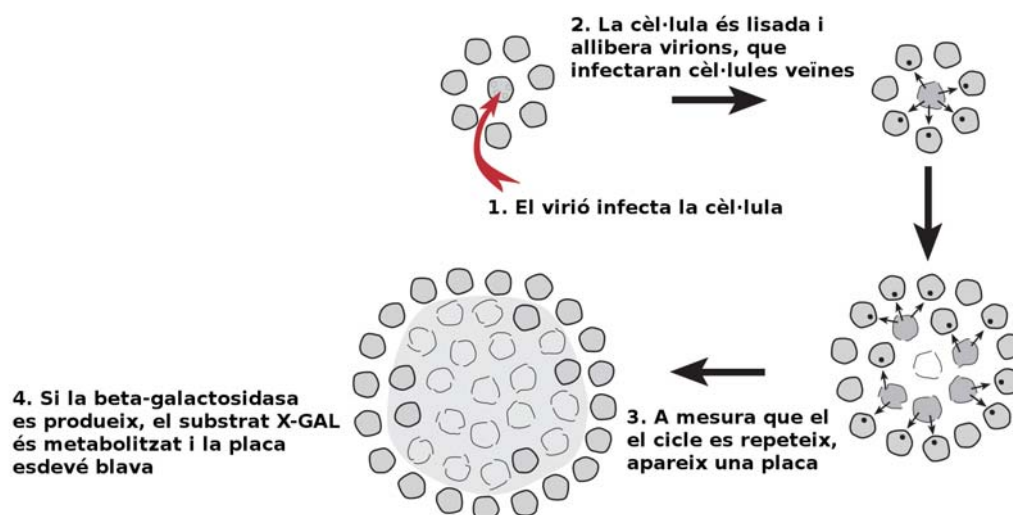


Figura 3.10. Procés de formació d'una placa viral en la monocapa del cultiu.

Per a dur a terme aquest procés, les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 100 mm de diàmetre i incubades durant 1 h amb dilucions de l'estoc viral P0 (de 10^{-4} a 10^{-7} per duplicat) en un agitador orbital. Transcorregut aquest temps, el medi va ser retirat i una solució d'agarosa 0,875% i X-Gal 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medi complet va ser abocada damunt la monocapa de cèl·lules. Un cop solidificada l'agarosa, les plaques van ser tancades dins d'un envoltori de plàstic i incubades durant 7 dies a 27 °C. Un cop formades les plaques d'infecció viral, els virus van ser recuperats mitjançant aspiració amb una pipeta en el centre de la placa d'infecció. El virus extret d'aquesta manera va ser mesclat amb 2 mL de medi complet que contenia $2,5 \times 10^5$ cèl·lules/mL. Aquest procediment es va dur a terme tant amb una placa d'infecció blava (virus recombinant), com incolora (virus no recombinant) per a futurs controls negatius.

Verificació per PCR del DNA viral

Per tal de comprovar la presència de virus recombinant en les mostres extretes de les plaques blaves, es va dur a terme una purificació del virus, seguida d'una amplificació per PCR. Després

de tres dies de creixement, 750 µL del medi de les cèl·lules infectades en l'etapa anterior van ser centrifugats 3 min a 5.000 g per tal d'eliminar les restes cel·lulars i al sobrenedant s'hi van afegir 750 µL d'una solució al 20% de polietilenglicol 8.000 (PEG) i 1 M NaCl (autoclavada i atemperada a 4 °C), es va agitar per inversió i la mescla es va incubar durant 30 min a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, la mescla va ser centrifugada durant 10 min a 20.000 g i el sobrenedant va ser enretirat. El sediment, que contenia els virus encapsidats, va ser resuspès en 100 µL d'aigua estèril i incubat durant 1 h a 50 °C en presència d'1 µg/µL de proteinasa K (Roche). El DNA alliberat per la digestió de les proteïnes de la càpside va ser extret amb 110 µL de fenol:cloroform (1:1) i centrifugant 5 min a 12.000 g per a la separació de les fases. La fracció aquosa va ser transvasada a un nou tub i el DNA va ser precipitat afegint 1/10 del volum d'acetat sòdic 3 M, 2 volums d'etanol absolut i 5 µL d'una solució de glicogen 2 mg/mL. Després d'una incubació de 30 min a -20 °C, el DNA precipitat va ser recollit per centrifugació a 16.000 g durant 15 min a 4 °C, es va rentar amb etanol al 70% i, després d'evaporar l'etanol, el DNA es va resuspendre amb 10 µL d'aigua estèril. Una PCR (25 µL volum total), duta a terme amb els oligonucleòtids *Polyhedrin For* i *Polyhedrin Rev* (Invitrogen) sobre 2,5 µL d'aquest DNA va permetre posar de manifest la presència de virus no recombinant (800 pb aprox.) o virus recombinant (2300 pb aprox.). Els sobrenedants que van mostrar presència de virus recombinant van ser recollits i emmagatzemats com a estoc P1.

Amplificació del virus i estudi de l'expressió

La generació d'un estoc viral concentrat (P2) es va dur a terme infectant 5 mL de cèl·lules (4×10^5 cèl·lules/mL) amb 20 µL de la solució estoc P1 i recollint-ne el sobrenedant després d'onze dies d'infecció. Una fracció de 0,5 mL d'aquest estoc P2 va ser emmagatzemada a -80 °C, mentre que la resta va ser conservada a 4 °C per a l'expressió. La concentració viral present en l'estoc P2 va ser quantificada mitjançant un assaig de placa equivalent al descrit anteriorment per a la purificació del virus. Un cop comptades el nombre de plaques virals blaves, la concentració del virus va ser expressada en unitats formadores de plaques (pfu, de *plate forming units*) per mL, segons la relació següent:

$$pfu/mL = \frac{\text{nombre de plaques}}{\text{factor de dilució} \times \text{mL d' inòcul}}$$

La multiplicitat d'infecció (MOI, de *Multiplicity of infection*), definida com la relació entre el nombre de pfu utilitzades per la infecció i el nombre de cèl·lules a infectar és un dels paràmetres clau per a l'expressió d'una proteïna recombinant amb aquest sistema. Una MOI excessivament baixa pot donar lloc a un rendiment baix de recuperació de la proteïna, mentre que una MOI excessivament

alta pot produir una mort cel·lular molt elevada i ràpida i evitar així que les cèl·lules produeixin grans quantitats de la proteïna recombinant. La MOI que es va utilitzar en les expressions dutes a terme en aquesta tesi es va fixar en 20 pfu/cèl·lula.

Un altre paràmetre a tenir en compte per a l'optimització de l'expressió és el temps d'incubació per a la recuperació de la proteïna recombinant. La determinació d'aquest temps d'incubació es va dur a terme mitjançant assajos d'expressió cada 24 h entre 24 i 96 h. Finalitzat el temps d'incubació, tant el sobrenedant com les cèl·lules (recollides amb tampó de mostres d'electroforesi 1x), van ser analitzats per electroforesi.

Escollit el temps òptim d'expressió, els assajos per a la producció i purificació de proteïna es van dur a terme en flascons de 25 cm², on s'hi van sembrar 25x10⁵ cèl·lules i es van incubar amb 5 mL de medi incomplet. Un cop adherides les cèl·lules, el cultiu es va infectar amb una MOI de 20 pfu/cèl·lula.

3.6. Extracció i purificació de proteïnes

3.6.1. Extracció proteica dels teixits d'insecte

Els teixits disseccionats i conservats a -80 °C van ser triturats mecànicament en un bany de nitrogen líquid amb l'ajut d'un pistó. Un cop obtinguda una pols homogènia, els tubs van ser retirats del bany i homogeneïtzats en presència de tampó fosfat 20 mM (pH 7,4), a diferents volums, depenent de l'espècie i el tipus de teixit (taula 3.4). La suspensió obtinguda va ser sotmesa durant 10 min a un bany d'ultrasons refrigerat a 10-15 °C. Finalment, la fracció insoluble va ser separada mitjançant dues centrifugacions de 15 min cadascuna, a 18.500 g i 4 °C.

Taula 3.4. Volums de tampó utilitzats en l'extracció (per unitat de teixit).

	<i>S. nonagrioides</i>	<i>S. littoralis</i>
Antena	1,1 µL	1-2 µL
Cervell	1,5 µL	4 µL
Espiritrompa	-	2µL
Pota	2,2 µL	5 µL
Tòrax	100 µL	200 µL
Abdomen	200 µL	500 µL
Ala	5 µL	7 µL

3.6.2. Extracció de proteïnes de *E. coli*

Extracció de proteïna soluble total

Sonicació

El sediment provinent d'un cultiu de 10 mL es va resuspendre en tampó fosfat 100 mM (pH 7,3), a una relació de 4 mL per cada gram de sediment humit. La suspensió es va mantenir en un bany de gel i NaCl i es va sotmetre a polsos de 15 s de sonicació i 1 min d'atemperament (sonicador Branson 250 W i punta de 3 mm de Ø). Després de 3-4 cicles en aquestes condicions, les fases solubles i insolubles es van separar per centrifugació a 18.000 g durant 10 min a 4 °C. Del sobrenedant resultant, se'n van separar 21 µL per a analitzar mitjançant SDS-PAGE. El sediment de membranes i proteïnes insolubles va ser resuspès amb 3 mL de tampó fosfat 100 mM (pH 7,3) per cada gram de sediment insoluble. D'aquesta suspensió, 2 µL van ser analitzats per SDS-PAGE.

Disrupció cel·lular

El disruptor cel·lular (també anomenat "premsa francesa") provoca el trencament de les cèl·lules exercint una elevada pressió sobre la suspensió cel·lular, que passa a través d'un petit conducte i impacta sobre una peça d'acer inoxidable (figura 3.11). Aquest impacte té com a resultat la lisi de les membranes cel·lulars.

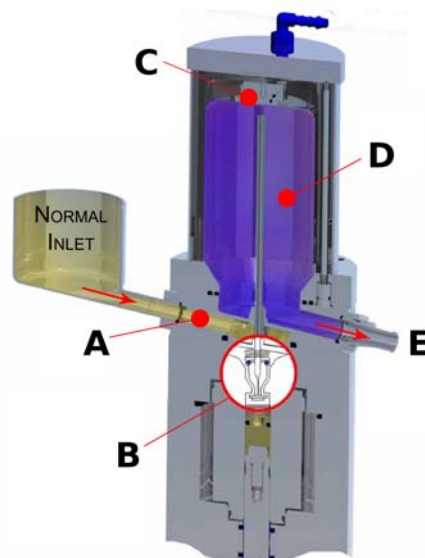


Figura 3.11. Esquema del capçal d'un disruptor cel·lular. **A:** entrada de la mostra, **B:** pistó i vàlvula, **C:** zona d'impacte, **D:** camisa col·lectora, **E:** sortida de la mostra.

Per a la lisi de les cèl·lules d'*E. coli* mitjançant aquest sistema, el sediment cel·lular provinent de 500 mL de cultiu d'*E. coli* es va resuspendre en 35 mL de tampó de resuspensió per a cromatografia de metall (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM Imidazole, pH 7,9) i s'hi van afegir 350 µL d'una mescla d'inhibidors de proteases (Protease inhibitor cocktail, Sigma). La suspensió cel·lular es va processar mitjançant un disruptor cel·lular a una pressió d'1,4 kbars. Finalment, per tal de separar-ne les fraccions solubles i insolubles, es van dur a terme dues centrifugacions consecutives (de 15 i 30 min, respectivament) a 18.000 g i 4 °C. Del sobrenedant resultant, se'n van separar 21 µL per a anilitzar mitjançant SDS-PAGE. El sediment de membranes i proteïnes insolubles va ser resuspès amb 3 mL de tampó Tris-HCl 10 mM (pH 7,3) per cada gram de sediment insoluble. Dos µL d'aquesta suspensió van ser analitzats per SDS-PAGE.

Extracció de la fracció periplasmàtica

Per a l'extracció periplasmàtica es va utilitzar la tècnica del xoc osmòtic (Neu & Heppel 1965), que es basa en incubar les cèl·lules en presència de sacarosa i EDTA, i sotmetre-les a un ràpid refredament en presència de MgSO₄. Amb aquest procediment, s'aconsegueix alliberar una fracció important de les proteïnes presents en el periplasma del bacteri gram negatiu *E. coli*.

El sediment cel·lular provinent de 10 mL de cultiu d'*E. coli* va ser resuspès en 1,25 mL de tampó 30 mM Tris-HCl i 20% de sacarosa, pH 8,0. A la suspensió resultant s'hi van afegir 8 µL de solució d'EDTA 0,25 M i es va agitar durant 10 min a temperatura ambient. El sediment cel·lular, obtingut per centrifugació a 9.000 g durant 5 min, va ser resuspès en una solució de MgSO₄ 5 mM prèviament refredada, a una relació de 2,2 µL per cada mg de sediment. La nova suspensió obtinguda es va agitar enèrgicament durant 10 min a 4 °C i finalment es va centrifugar durant 5 min a 8.000 g. El sobrenedant obtingut corresponia a la fracció periplasmàtica.

3.6.3. Extracció de proteïnes del llevat *S. cerevisiae*

Per a l'obtenció d'un extracte proteic total a partir d'un cultiu de *S. cerevisiae*, el sediment cel·lular procedent de 500 mL de cultiu va ser resuspès en 35 mL de tampó de resuspensió, que varià en funció de si el llevat recombinant utilitzat era el que expressava l'acetil transferasa de meló (llevat ScINV + pUC-CmAAT1) o la reductasa d'àcids grassos d'*S. littoralis* (llevat YPH501 + pESC-SlitFAR1) (taula 3.5).

Taula 3.5. Composició dels tampons de lisi per als diferents llevats utilitzats.

Composició	Concentració final	
	SciNV + pUC-CmAAT1	YPH501 + pESC-SlitFAR1
Tris-HCl	20 mM pH 7,9	20 mM pH 7,3
Inhibidor de proteases (Protease inhibitor cocktail, Sigma)	0,3%	1%
β-mercaptoetanol	2 mM	-
Imidazole	5 mM	-
NaCl	1 M	-

Per a la lisi de les cèl·lules, la suspensió cel·lular es va processar mitjançant un disruptor cel·lular (Constant Systems) a una pressió d'1,86 kbars. Finalment, per tal de separar-ne les fraccions solubles i insolubles, es van dur a terme dues centrifugacions consecutives, de 15 i 30 min respectivament, a 18.000 g i 4 °C.

En el cas del llevat recombinant que expressava la CmAAT1, l'extracte proteic va ser conservat en gel fins al moment de la purificació per cromatografia d'afinitat. En el cas del llevat que expressava la SlitFAR1, es va afegir glicerol a una concentració final del 10% i la solució resultant va ser fraccionada en alíquotes. Les fraccions alíquotes van ser congelades i conservades a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

3.6.4. Extracció de proteïnes de cèl·lules Sf21

Per a l'extracció de proteïnes produïdes utilitzant les cèl·lules d'insecte Sf21 es van utilitzar dos mètodes, depenent de si la proteïna contenia el pèptid d'excreció cel·lular i era, per tant, secretada al medi de cultiu, o en canvi era produïda a l'interior del citosol.

Proteïnes intracel·lulars

Finalitzat el temps d'expressió, el medi va ser enretirat i les cèl·lules van ser rentades dues vegades amb tampó PBS (1 mM KH₂PO₄, 155 mM NaCl, 3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4, Gibco). Durant el segon rentat, les cèl·lules van ser resuspeses per acció mecànica i centrifugades. El sediment cel·lular va ser resuspès en un tampó de lisi (1% Nonidet P40, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8). Després d'una incubació de 10 min a 4 °C, les restes cel·lulars van ser recollides per centrifugació a 10.000 rpm durant 10 min a 4 °C, i el sobrenedant va ser purificat mitjançant una cromatografia d'afinitat per metall.

Proteïnes extracel·lulars

Un cop finalitzat el temps d'expressió, el sobrenedant va ser recollit i s'hi va afegir un 10% de tampó 500 mM NaH₂PO₄ i 300 mM NaCl (pH 8). Les proteïnes recombinants presents en aquesta solució van ser purificades mitjançant cromatografia d'afinitat per metall.

3.6.5. Quantificació de proteïnes pel mètode Bradford

En tots els casos, la quantificació de proteïnes es va dur a terme amb el reactiu Bradford protein assay reagent (Bio-Rad), basat en el mètode Bradford (Bradford 1976). Aquest mètode utilitza la capacitat del reactiu Blau de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250) per unir-se als residus alcalins i aromàtics de les proteïnes, canviant la seva forma catiònica (vermella) per una forma aniònica (blava). La intensitat del color blau (mesurable espectrofotomètricament amb un màxim d'absorbància a 595 nm) és proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra.

Per a la mesura de la concentració, un volum de mostra d'entre 1 µL i 10 µL (depenent del tipus de mostra) es va dissoldre en aigua ultra-pura fins a un volum de 160 µL. A aquesta solució s'hi van afegir 40 µL del reactiu anteriorment esmentat i, després d'un període d'incubació d'entre 5 i 45 min, se'n va mesurar l'absorbància a 595 nm. Com a recta de calibratge per a la interpolació de les mesures d'absorbància es va utilitzar un banc de dilucions d'albumina sèrica bovina (BSA) de 8 concentracions finals diferents (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 10 i 12 µg/mL), preparats a partir d'una mateixa solució mare de 0,2 mg/mL.

3.6.6. Electroforesi de proteïnes

El gel de poliacrilamida s'obté a partir d'una dissolució dels reactius mostrats a la taula 3.6, afegint dodecil sulfat sòdic (SDS) únicament als gels utilitzats per a l'electroforesi en condicions desnaturalitzants.

Taula 3.6. Composició del gel de poliacrilamida utilitzat en l'electroforesi de proteïnes.

	Concentracions finals	
	GEL SEPARADOR	GEL APILADOR
Tris-HCl	375 mM pH 8,8	125 mM pH 6,8
Acrilamida/Bisacrilamida	10% / 0,3%	4% / 0,1%
Persulfat amònic	0,1%	0,1 %
TEMED	0,02% (v/v)	0,03%

Per a l'electroforesi en condicions no desnaturalitzants, els extractes proteics van ser mesclats amb un tampó de càrrega que contenia glicerol per a una concentració final del 10% i Blau de Bromofenol per a una concentració final del 0,001%. Un cop mesclades suaument, les diferents mostres van ser carregades en un gel de poliacrilamida al 10%, polimeritzat sense presència d' SDS. La migració de les proteïnes es va dur a terme sotmetent el gel a una potència de 30 V durant 15 min, seguida de 200 V, en presència de tampó d'electroforesi (25 mM Tris-HCl i 192 mM glicina). L'electroforesi es va aturar posteriorment a la sortida del blau de bromofenol, concretament un cop transcorregut el 50% del temps necessari per a la sortida d'aquest en les condicions utilitzades.

Per a l'electroforesi en condicions desnaturalitzants, les mostres van ser barrejades en una proporció 3:1 amb un tampó de mostres que contenia 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8), 20% de glicerol, 10% de dodecil sulfat sòdic (SDS), 0,05% de 2-mercaptoetanol i 0,005% de Blau de Bromofenol. Un cop homogeneïtzada, la barreja de mostra amb el tampó de càrrega era sotmesa a un tractament tèrmic de 5 min a 95 °C. Les mostres tractades eren carregades en un gel de poliacrilamida de mateixa composició que el natiu descrit anteriorment, però polimeritzat en presència d'un 0,1% d' SDS. L'electroforesi es va dur a terme en presència d'un tampó d'electroforesi d'igual composició que la del gel natiu, però amb un 0,1% d' SDS. Les condicions elèctriques eren d'una potència inicial de 90 V, seguida d'una potència de 120 V un cop les mostres entraven al gel. L'electroforesi es va aturar quan el Blau de Bromofenol o el marcador pretenyit desitjat assolía la base del gel.

3.6.7. Isoelectroenfoc

L'isoelectroenfoc (IEF, de l'Anglès *Isoelectric Focusing*) és una tècnica de separació de proteïnes basada en el punt isoelèctric d'aquestes. Si bé es pot realitzar tant en forma desnaturalitzant com no desnaturalitzant, en el cas d'aquest treball tots els IEF van ser duts a terme en condicions no desnaturalitzants. En aquest tipus de separació, les proteïnes es desplacen del càtode a l'ànode mogudes per la seva pròpia càrrega global. Aquesta càrrega va canviant a mesura que les proteïnes migren a través del gradient de pH del gel, immobilitzat gràcies a les amfolites, molècules amb una elevada capacitat tamponadora local, que es troben ancorades a la xarxa de poliacrilamida. Quan les proteïnes assoleixen la regió del gel en que el pH local coincideix amb el punt isoelèctric, la càrrega global esdevé nul·la i la proteïna atura la seva migració. Per als IEF duts a terme en aquest treball es van utilitzar els gels prepolimeritzats *Ready precast gel* (pH 3-10,

Biorad).

Les mostres van ser mesclades a parts iguals amb un tampó de càrrega que contenia 40 mM de Lys, 40 mM d'Arg i un 50% de glicerol. Un cop omplerta la cel·la de la cubeta corresponent al càtode amb tampó de càtode (20 mM de Lys i 20 mM d'Arg), les mostres van ser carregades en els pous corresponents. La part de la cubeta corresponent a l'ànode va ser omplerta amb 600 mL de tampó d'ànode (7 mM d'àcid fosfòric) i l'isoelectroenfoc es va dur a terme amb les següents condicions elèctriques: 60 min a 100 V, 60 min a 250 V i 30 min a 500 V.

Un cop aturat l'isoelectroenfoc, el gel es va treure del motlle i va ser processat segons la finalitat de cada experiment.

3.6.8. Electroforesi bidimensional de proteïnes

Per tal de separar les diferents esterases observades en les antenes de mascle de l'insecte *S. nonagrioides*, es van utilitzar dues tècniques diferents d'electroforesi bidimensional, segons si la primera dimensió era una electroforesi, o un isoelectroenfoc.

A partir d'una electroforesi no desnaturalitzant

El gel obingut va ser dividit en dos i una d'aquestes parts va ser tenyida mitjançant el mètode d'activitat d'esterases. Agafant com a referència la part tenyida del gel, la porció de gel que contenia la proteïna d'interès en la part no tenyida va ser tallada amb un bisturí estèril (figura 3.12). La porció de gel va ser introduïda en un vial i incubada durant 15 min en un tampó que contenia 2% SDS, 2% 2-mercaptoetanol, 0,02% Blau de Bromofenol, 20 mM Tris-HCl (pH 8). Transcorregut aquest temps, el vial que contenia la porció de gel va ser sotmès a un tractament tèrmic de 5 min a 95 °C, seguit d'un refredament en gel. La porció de gel va ser introduïda entre dos vidres que contenien la part separadora d'un gel de poliacrilamida i, sense que aquesta toqués al gel ja polimeritzat, s'hi va afegir la solució d'acrilamida del gel apilador, de manera que, en polimeritzar, incorporés la porció de gel que contenia la proteïna d'interès desnaturalitzada. Un cop polimeritzat, l'electroforesi en condicions desnaturalitzants es va dur a terme seguint el procediment habitual, descrit anteriorment.

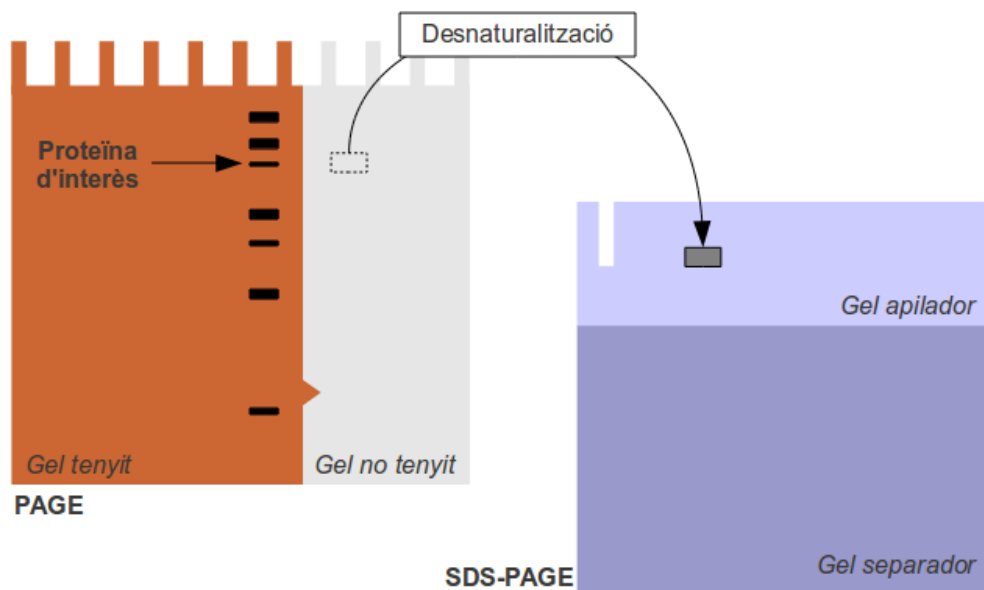


Figura 3.12. Diagrama de l'electroforesi bidimensional a partir d'una electroforesi en condicions no desnaturalitzants.

A partir d'un isoelectroenfoc no desnaturalitzant

Un cop finalitzat l'isoelectroenfoc, el gel va ser rentat breument amb aigua ultrapura i incubat durant 30 min en una solució de fixació, composta per àcid tricloroacètic al 12%. Transcorregut aquest temps, el gel va ser incubat durant 10 min en una solució d'etanol al 20% i una porció del carril on es trobava la proteïna d'interès va ser tallada amb un bisturí estèril. Aquesta porció de gel va ser incubada durant 5 min en tampó de mostres (63 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 2% SDS, 0,0025% Blau de Bromofenol) al qual se li va afegir (al moment) etanol absolut a una proporció 1/4. Transcorregut aquest temps, la solució va ser retirada i el fragment de gel es va deixar en tampó d'electroforesi desnaturalitzant fins al moment d'iniciar l'electroforesi. La tira va ser muntada a la part superior d'un gel (SDS-PAGE) separador evitant la presència de bombolles d'aire entre la tira de gel d'IEF i el gel separador. Després de dipositar un paper de filtre amb 5 µL de marcador de pesos moleculars, el sistema va ser recobert amb una solució d'1% d'agarosa i 0,0025% de Blau de Bromofenol en tampó d'electroforesi. Un cop solidificada l'agarosa es va dur a terme l'electroforesi segons el procediment habitual, descrit anteriorment.

Anàlisi per espectrometria de masses

Per a l'anàlisi de seqüència, les proteïnes d'interès van ser tallades del gel amb un bisturí estèril i traslladades a la Plataforma de Proteòmica del Parc Científic de Barcelona. Un cop allà, les proteïnes van ser digerides amb tripsina i analitzades per espectroscòpia de masses pel personal

responsable del Servei.

L'espectròmetre de masses utilitzat tenia un ionitzador d'electrosprai (ESI, de *ElectroSpray Ionisation*) i dos analitzadors en tàndem, el primer un quadrupol (Q) i el segon un analitzador de temps de vol (TOF, de l'anglès *Time of flight*).

3.6.9. Detecció de proteïnes en gel

Tinció de Blau de Coomassie

Aquest mètode, emprat inicialment per a la coloració de teixits, utilitza el reactiu Coomassie Brilliant Blue, que s'uneix als residus aromàtics i alcalins, donant a la proteïna una coloració blava, i permetent la visualització de proteïnes amb un límit de detecció de 30-100 ng, depenent del procediment utilitzat (Simpson 2003).

Un cop finalitzada l'electroforesi, el gel va ser retirat del suport i incubat durant 2 min en agitació en presència d'una dissolució del 5% de metanol i 7,5% d'àcid acètic. La solució va ser retirada i el gel va ser incubat durant 15 min i en agitació amb la solució de tenyit (40% metanol, 7% àcid acètic i 0,25 g/L Coomassie Brilliant Blue R, Bio-Rad). Finalment, la solució de tinció va ser enretirada i el gel es va deixar en agitació amb la solució de 5% de metanol i 7,5% d'àcid acètic, que es va anar renovant a mesura que quedava tenyida pel Blau de Coomassie.

Tinció de nitrat de plata

La tinció de proteïnes amb nitrat de plata ofereix una major sensibilitat, podent detectar proteïnes en quantitats de fins a 1-2 ng, depenent del procediment utilitzat (Simpson 2003). Si bé hi ha alguns detalls del procés químic pel qual té lloc aquesta coloració que encara no han estat esclarits, en termes generals, es basa en la interacció de la plata catiònica amb determinats àtoms dels aminoàcids. La posterior reducció d'aquest complex (procés de velat), catalitzada pel formaldehid, dóna lloc a una coloració marró (Chevallet et al. 2006). D'entre els diversos protocols descrits a la literatura, en el marc d'aquesta tesi es va utilitzar el procediment adaptat a partir de (Sinha et al. 2001), compatible amb la posterior anàlisi per espectrometria de masses. La principal aportació d'aquest procediment pel que fa a la compatibilització amb l'anàlisi per espectrometria de masses, és l'absència de glutaraldehyd, que evita la formació d'enllaços creuats entre les proteïnes i l'acrilamida durant l'etapa de sensibilització.

Finalitzada l'electroforesi, el gel va ser incubat durant un mínim de 30 min i un màxim de 24 h en solució de fixació (40% metanol i 10% àcid acètic). La solució de fixació va ser retirada i es va dur a terme una nova incubació de 30 min en agitació amb solució de sensibilització (30% etanol, 6,8% acetat sòdic i 0,2% tiosulfat sòdic), seguida de 3 rentats de 5 min cadascun en aigua

ultrapura i una incubació de 20 min en solució de nitrat de plata al 0,25% (preparada al moment). Transcorregut el temps de tinció, la solució de nitrat de plata va ser descartada i el gel va ser breument rentat amb aigua ultrapura i incubat en solució de velat (0,25% carbonat sòdic i 0,04% de formaldehid, aquest afegit al darrer moment) i agitació. El gel va ser mantingut en aquesta solució fins a l'aparició de les bandes de proteïnes (2-5 min), moment en el qual la reacció de velat va ser aturada canviant la solució de velat per una solució d'EDTA al 1,5%.

Revelat per activitat carboxil esterasa

Per tal de visualitzar les proteïnes amb activitat esterasa, es va utilitzar com a substrat una mescla de dos acetats: l'acetat d' α -naftil i l'acetat de β -naftil. Els corresponents alcohols formats per la seva hidròlisi reaccionen amb una sal de diazoni (Fast Blue Reagent, Sigma), formant un precipitat de color marró o vermellós en la regió del gel on es troba l'enzim (Vogt & Riddiford 1981).

Metodològicament, el gel és incubat durant 15-30 min a 30-35 °C en una solució al 0,1% de Blue Brilliant Reagent (Sigma) en 100 mL de tampó Tris-HCl 20 mM (pH 7,3), a la qual se li addicionen 2 mL d'una solució extemporània del 2% d'acetat d' α -naftil i 2% d'acetat de β -naftil en acetona. Transcorregut aquest temps, el gel és rentat diverses vegades amb aigua desionitzada.

3.6.10. Cromatografia d'afinitat de proteïnes

La cromatografia utilitzada per a la purificació de proteïnes recombinants a partir d'un extracte proteic va ser la d'afinitat per metall. Aquesta cromatografia utilitza unes partícules d'agarosa funcionalitzades amb quatre grups acetat que, formant un enllaç de coordinació amb un àtom d'un metall divalent (en aquest cas, Ni^{2+}). Aquest complex format pels grups acetat i l'àtom de Ni^{2+} (anomenat Ni-NTA) té una elevada afinitat per l'imidazole, grup de la cadena lateral de l'aminoàcid His. Les proteïnes que tenen una seqüència de 6 His a un dels extrems de la cadena d'aminoàcids, seran retingudes per aquest complex. Finalment, la proteïna pot ser desplaçada del complex Ni-NTA mitjançant una concentració elevada d'imidazole.

Aproximadament 1 mL de resina Ni-NTA (Promega) va ser dipositada en una columna refrigerada i rentada amb 5 mL de tampó 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl i 5 mM imidazole, pH 7,9. L'extracte proteic filtrat amb un filtre de xeringa de 0,44 μm va ser carregat a la columna i eluït a un flux d'aproximadament 1 mL/min. Un cop eluït l'extracte proteic, la resina va ser rentada primer amb 7 mL del mateix tampó en que es trobava la mostra i després amb 10 mL de tampó de rentat (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl i 30 mM imidazole, pH 7,9). Finalment, les proteïnes retingudes van ser eluïdes i col·lectades amb 4 mL de tampó d'elució (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl i 300 mM Imidazole pH 7,9). Una mostra de cadascun dels rentats i eluïts va ser conservada per ser

analitzada per SDS-PAGE.

Purificació en condicions desnaturalitzants

Per a la cromatografia d'afinitat en condicions desnaturalitzants, el sediment insoluble provinent de la centrifugació del lisat va ser resuspès en el mateix tampó utilitzat per a la cromatografia, però en presència d'urea a una concentració de 6 M. La cromatografia es va completar pel procés habitual, però amb la presència d'urea 6 M a tots els tampons utilitzats. Finalment, la mostra va ser mesclada amb el tampó de càrrega de SDS-PAGE i incubada durant 30 min a temperatura ambient i en agitació.

3.6.11. Canvi de tampó

La purificació de proteïnes mitjançant una cromatografia d'afinitat per metall dóna lloc a una solució proteica que conté, entre d'altres sals, una concentració elevada d'imidazole. Tenint en compte que la proteïna obtinguda havia de ser posteriorment immobilitzada en un sistema Ni-NTA, va ser necessari un canvi del tampó en que es trobava disolta la proteïna. Aquest procés es va dur a terme mitjançant dos procediments diferents, en funció de les quantitats de proteïna obtingudes.

Diàlisi

El mètode de la diàlisi es va utilitzar per a volums d'elució superiors a 4 mL. La mostra de proteïna va ser introduïda a l'interior d'un sac de diàlisi Spectra/por (MWCO 6-8.000 i Ø 6,4 mm, Spectrumlabs) prèviament hidratat amb el tampó de diàlisi A (100 mM imidazole, 250 mM NaCl i 20 mM Tris-HCl, pH 7,3). El sac va ser degudament segellat i submergit en un 1 L de tampó de diàlisi A durant 50 min en agitació i a 4 °C. Transcorregut aquest temps, el sac de diàlisi va ser transferit a un nou vas de precipitats que contenia 1 L de tampó de diàlisi B (250 mM NaCl i 10 mM Tris-HCl 10 mM, pH 7,3), i va ser agitat a 4 °C durant aproximadament 16 h. Finalment la mostra va ser enretirada i es va afegir glicerol a una concentració final del 10%. La solució de proteïna va ser repartida en fraccions alíquotes i conservada a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

Filtració

Per a mostres inferiors a 4 mL es va optar per un procés de filtració per centrifugació, utilitzant les columnes Amicon Ultra (2 mL, 10K, Millipore), que retenen molècules amb un pes molecular superior a 10 kDa, però són permeables a molècules de pes inferior com l'imidazole. Per a dur a terme aquest tipus de filtració, aproximadament 1,8 mL de la mostra es van carregar en una columna, que es va centrifugar durant 30 min a 6.700 g i 4 °C. Als aproximadament 200 µL de

mostra que quedaven a l'interior de la columna s'hi van afegir 1,5 mL de tampó Tris-HCl 10 mM pH (7,3), i es va repetir el procés de centrifugació i addició de tampó. Després de la segona addició de tampó, la columna es va centrifugar durant 15 min en les mateixes condicions i la solució restant (aproximadament 500 µL) es va recollir en un nou tub. A la solució recollida s'hi va afegir glicerol a una concentració final del 10%, es va repartir en fraccions alíquotes, que van ser congelades a -80 °C i conservades a aquesta temperatura fins al moment de la seva utilització.

3.7. Assajos d'activitat enzimàtica

3.7.1. Metodologia general

Tant els productes com els substrats utilitzats en les reaccions enzimàtiques dutes a terme en aquest treball tenien una naturalesa hidròfoba. Així, tot i que les reaccions eren dutes a terme en medi aquós, en tots els casos es va considerar apropiat dur a terme la reacció en presència d'un cosolvent. D'altra banda, per tal d'analitzar i quantificar els productes obtinguts, aquests van ser extrets de la reacció mitjançant un dissolvent orgànic per al seu anàlisi per cromatografia de gasos (GC, de *Gas Chromatography*) o cromatografia de gasos acoplada a l'espectrometria de masses (GC-MS, de *GC-Mass spectrometry*). Donada aquesta necessitat d'utilitzar dissolvents orgànics, tant per a les reaccions, com per als posteriors tractaments, es van utilitzar vials de vidre.

Incubació i extracció

Les reaccions van ser incubades en un bany d'aigua de temperatura regulable i aturades en un bany de neu carbònica i metanol. Immediatament després de la descongelació, s'hi va afegir una solució del solvent orgànic que contenia una quantitat coneguda d'estàndard intern i la mescla va ser agitada enèrgicament. Per a la separació de les fases, l'emulsió es va centrifugar durant 10 min a 1.500 g i la fase aquosa va ser congelada amb CO₂, per tal de transvasar la fase orgànica a un nou vial, minimitzant el risc d'arrossegar aigua durant el transvasament.

Derivatització

En els assajos enzimàtics que donaven lloc a un alcohol com a producte de reacció, aquest va ser derivatitzat per tal de reduir la polaritat de la molècula i obtenir una millor resolució cromatogràfica. El procés de derivatització utilitzat consistia en la transferència d'un grup trimetilsilil (TMS) a l'hidroxil de l'alcohol, donant lloc a l'èter de TMS. Per a la derivatització, l'hexà de les fraccions orgàniques va ser evaporat sota una corrent de N₂ fins a un volum d'aproximadament 20 µL. Un mateix volum de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA, Merck) va ser afegit a les mostres i

aquestes van ser incubades a 70 °C durant 1 h. Transcorregut aquest temps, l'excés d'agent sililant va ser evaporat amb N₂ i a la solució restant (entre 5 i 10 µL) s'hi van afegir 15 µL d'heptà, procedint a l'anàlisi per GC o GC-MS.

Anàlisi quantitativa

La injecció en l'aparell de cromatografia de gasos es va dur a terme amb un robot automàtic, garantint així, l'homogeneïtat de les injeccions. Els valors de l'àrea sota la corba dels diferents productes i estàndards interns van ser interpolats amb les corresponents rectes de calibratge, i la quantitat de producte present a la mostra de partida va ser calculat segons la següent equació:

$$Q_{fp} \frac{Q_{ie}}{Q_{fe}} = Q_{ip} \quad , \text{ on } \mathbf{Q_{fp}}: \text{Quantitat de producte injectat al GC, } \mathbf{Q_{fe}}: \text{Quantitat d'estàndard intern}$$

injectat al GC (ambdós obtinguts per interpolació amb la recta de calibratge), **Q_{ip}**: Quantitat de producte present en finalitzar la reacció, **Q_{ie}**: Quantitat d'estàndard intern utilitzada en l'extracció.

Finalment, per al càlcul de les constants i paràmetres cinètics es va utilitzar un ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten. De forma complementària, es van calcular els mateixos paràmetres mitjançant un mètode de linealització de l'equació de Michaelis-Menten. Per aquest càlcul es va escollir entre els mètodes de linealització de Lineweaver-Burk i Hanes-Woolf, seleccionant aquell que mostrava un millor coeficient de correlació. Tant els ajustaments lineals com els no lineals es van dur a terme amb el programa GraphPad.

3.7.2. Condicions específiques per a cada reacció

Reductasa d'àcids grassos Slit-FAR1

Per tal d'estudiar l'activitat de l'enzim recombinant expressat en el llevat *S. cerevisiae* es van dur a terme dos tipus d'assajos. En primer lloc, es van realitzar assajos *in vivo*, afegint diferents àcids grassos al cultiu del llevat recombinant per a la reductasa SlitFAR. En segon lloc, es va obtenir un extracte proteic del llevat i se'n va estudiar l'activitat amb assajos *in vitro*.

Assajos *in vivo*

Per als assajos *in vivo* un cultiu que havia crescut durant 16 h en medi d'inducció (SG-U) va ser reinoculat en 2 mL de medi SG-U fresc que contenia 0,5 mM dels diferents àcids grassos i un 0,2% del tensioactiu Tergitol NP-40 (Sigma). El cultiu va ser incubat a 30°C i en agitació durant 22-24 h i finalitzat aquest temps va ser liofilitzat i els productes van ser extrets amb 1 mL d'hexà. Finalment, la fracció orgànica va ser derivatitzada i analitzada per GC-MS.

Assajos in vitro

Per a les reaccions in vitro, l'extracte proteic del llevat YPH501 amb el vector pESC-*SlitFAR* va ser incubat en presència de 2,5 mM del cofactor NADPH i diferents acil-CoAs a una concentració variable, depenent de l'assaig. El volum total de la reacció va ser de 400 μ L, que es van completar amb tampó Tris-HCl 10 mM (pH 7,3).

Per a l'obtenció dels productes formats, es van dur a terme dues extraccions consecutives amb 800 μ L d'una solució d'hexà que contenia 300 ng d'1-undecanol com a estàndard intern. Un cop reunides les dues fraccions orgàniques, les mostres van ser derivatitzades i analitzades. Les condicions de GC per a l'anàlisi d'aquests compostos van ser: 60 °C de temperatura inicial (mantenint-la durant 1 min), un increment de 10 °C/min fins a 120 °C, increment de 2 °C/min fins a 180 °C i finalment un increment de 10 °C/min fins a 280 °C, restant a aquesta temperatura durant 5 min.

En un assaig preliminar, 150 μ g d'extracte proteic van ser incubats durant 1 h en presència de 0,5 mM dels diferents acil-CoAs i un 2% de DMSO. Els assajos es van dur a terme en paral·lel amb l'extracte proteic d'un llevat transformat amb el mateix vector, però sense presència de la reductasa (YPH501 + pESC). Aquestes mostres van ser analitzades per GC-MS per tal de confirmar la presència dels productes en el test, així com la seva absència en el control. En les mateixes condicions es va dur a terme un assaig d'activitat comparatiu entre un extracte congelat i un extracte fresc per tal de garantir la conservació de l'activitat després del congelat.

Un cop confirmada l'activitat de l'enzim, les condicions de velocitat inicial de la reacció es van estudiar mitjançant la incubació a diferents temps, utilitzant 50 μ g d'extracte proteic, 125 μ M de (Z,E)-9,11-14:SCoA i un 2% de DMSO. Establertes les condicions de linealitat de la reacció, i comprovat que les diferències entre l'extracte congelat i el fresc no eren significatives, es van dur diferents reaccions a fi d'establir els paràmetres cinètics de l'enzim pels diferents acil-CoAs. Per a cadascun dels substrats, es va dur a terme un banc de reaccions de 6 o 7 concentracions diferents depenent del substrat, i en un rang d'1,25 μ M a 80 μ M, que van ser incubades durant 10 min a 30 °C en presència de 50 μ g d'extracte proteic i un 2% de DMSO. Per a cada concentració de cadascun dels substrats es van dur a terme tres assajos en paral·lel.

Alcohol acetil transferasa CmAAT1

Les reaccions es van dur a terme en un volum total de 500 μ L, utilitzant Tris-HCl 10 mM (pH 7,3) com a tampó i DMSO com a cosolvent. La concentració d'acetil-CoA va ser en tots els casos de 250 μ M i la d'enzim 10 ng/ μ L (0,17 μ M), mentre que la de l'alcohol va variar en funció de l'experiment. Un cop va ser confirmada per GC-MS l'habilitat de l'enzim per acetilar el (Z,E)-9,11-

14:OH, es van determinar les condicions de velocitat inicial de la reacció. Per a aquesta determinació, es van dur a terme assajos a 15, 30, 45, 60 i 120 min en presència de (Z,E)-9,11-14:OH a una concentració de 0,5 mM i un 4% de DMSO. En aquestes condicions i 15 min de temps d'incubació es va dur a terme una exploració de la concentració òptima de DMSO, realitzant assajos amb el 2, 4, 6 i 8% del cosolvent. Finalment, establertes les condicions de velocitat inicial i la concentració òptima de cosolvent, les constants cinètiques van ser calculades mitjançant reaccions amb (Z,E)-9,11-14:OH a 5, 10, 15, 30, 60 i 120 μ M.

Els productes de les reaccions van ser extrets amb 500 μ L d'hexà que contenien 150 ng d'acetat de dodecil com estàndard intern. Les fraccions orgàniques van ser concentrades i analitzades per GC en les següents condicions: 60 °C de temperatura inicial (mantenint-la durant 1 min), un increment de 10 °C/min fins a 150 °C, increment d'1 °C/min fins a 180 °C i finalment un increment de 10 °C/min fins a 250 °C, restant a aquesta temperatura durant 5 min.

Cera sintasa ATF

Les reaccions es van dur a terme en un volum total de 200 μ L, utilitzant Tris-HCl 10 mM (pH 7,3) com a tampó i DMSO com a cosolvent. La concentració d'acetil-CoA va ser en tots els casos de 300 μ M i la de l'enzim de 50 ng/ μ L (0,95 μ M), mentre que la de l'alcohol va variar en funció de l'experiment. En un primer assaig, 60 μ M de (Z,E)-9,11-14:OH van ser incubats amb la resta de components de la reacció a 35 °C durant 1 h.

Un cop confirmada la presència del producte de la reacció, (Z,E)-9,11-14:OAc, el curs de la mateixa es va estudiar realitzant incubacions entre 0 i 160 min amb 160 μ M de substrat. Així mateix, la influència de la concentració de DMSO a la solució va ser estudiada mitjançant reaccions amb 2, 4, 6 i 8% del cosolvent. Finalment, per tal d'establir les constants cinètiques es van dur a terme reaccions a les següents concentracions: 1,25 μ M, 2,5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M 320 μ M, 640 μ M i 1,28 mM. Totes les reaccions van ser extretes amb 400 μ L d'hexà que contenien 120 ng d'acetat de dodecil com estàndard intern. Les fraccions orgàniques van ser concentrades i analitzades per GC, amb les mateixes condicions de temperatura que les utilitzades per a l'anàlisi de les reaccions amb l'enzim CmAAT1.

Carboxil esterasa SICXE7

Les reaccions es van dur a terme en tampó Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) amb un volum total de 50 μ L (per als substrats (Z,E)-9,11-14:OAc i (Z,E)-9,12-14:OAc) o 200 μ L (per al substrat (Z)-3-6:OAc), que contenia 10 ng/ μ L (0,16 μ M) de proteïna recombinant, 4% d'etanol i el substrat a diferents concentracions. Per tal de descartar la hidròlisi espontània dels substrats, es va dur a terme un

assaig en les mateixes condicions, però sense la presència de l'enzim. Per als assajos comparatius amb extracte proteic provinent de les antenes, es van utilitzar les mateixes condicions, però substituint l'enzim recombinant per 4 µg d'extracte proteic d'antenes de mascle de *S. littoralis*.

Un cop confirmada (per GC-MS) la capacitat de l'enzim per hidrolitzar el (Z,E)-9,11-14:OAc a una concentració de 40 µM, a 28 °C i després d'1 h d'incubació, les condicions de velocitat inicial per a la reacció amb aquest substrat es van establir duent a terme reaccions a diferents temps, en un rang de 10 a 80 min. Finalment, per al càlcul de les constants cinètiques es van dur a terme reaccions amb incubacions de 5 min de durada, a 28 °C i amb les següents concentracions:

- Per al substrat (Z,E)-9,11-14:OAc: 5 µM, 20 µM, 60 µM, 180 µM, 540 µM, 1 mM i 1,5 mM.
- Per al substrat (Z,E)-9,12-14:OAc: 20 µM, 60 µM, 180 µM, 540 µM, 1 mM i 1,6 mM.
- Per al substrat (Z)-3-6:OAc: 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM i 20 mM.

Finalitzades les reaccions amb els substrats (Z,E)-9,11-14:OAc i (Z,E)-9,12-14:OAc, els productes van ser extrets amb 200 µL d'hexà que contenia 1-undecanol com a estàndard intern (75 ng per a les mostres 5 a 60 µM de substrat i 150 ng per a les mostres de 180 µM i superiors), derivatitzades i analitzades per GC. Al seu torn, les reaccions dutes a terme amb el substrat (Z)-3-6:OAc van ser extretes amb 400 µL d'una mescla 1:1 d'èter etílic amb hexà, que contenia 150 µg de 5-metil-1-hexanol com estàndard intern, concentrades i analitzades per GC. Les condicions cromatogràfiques per les reaccions dutes a terme amb els substrats (Z,E)-9,11-14:OAc i (Z,E)-9,12-14:OAc van ser: 80 °C inicials (mantinguts durant 1 min), increment de 2 °C/min fins a 180 °C i finalment increment de 10 °C/min fins a 280 °C; mentre que en les dutes a terme amb el substrat (Z)-3-6:OAc van ser: 50°C inicials (mantinguts durant 1 min), increment d'1°C/min fins a 65°C, seguit d'un increment de 5 °C/min fins a 80 °C i finalment 10 °C/min fins a 280 °C, mantenint aquesta temperatura durant 5 min.

Carboxil esterasa SICXE10

Les reaccions es van dur a terme en un volum total de 200 µL de tampó Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), que contenia 10 ng/µL (0,16 µM) de proteïna recombinant, 4% d'etanol i el substrat a diferents concentracions. Per tal de descartar la hidròlisi espontània dels substrats, es va dur a terme un assaig en idèntiques condicions, però sense la presència de l'enzim. Per als assajos comparatius duts a terme amb extracte proteic antenal, es van utilitzar les mateixes condicions descrites en l'apartat referent a l'esterasa SICXE7.

Un cop confirmada (per GC-MS) la capacitat de l'enzim per hidrolitzar el (Z)-3-6:OAc a una concentració de 70 μ M, a 28 °C i després d'1 h d'incubació, les condicions de velocitat inicial per a la reacció amb aquest substrat es van establir duent a terme reaccions a diferents temps, en un rang de 5 a 40 min. Finalment, per al càlcul de les constants cinètiques es van dur a terme diferents reaccions amb 5 min d'incubació i amb les següents concentracions de substrat: 1, 2, 5, 10 i 20 mM. Les reaccions van ser extretes amb 400 μ L d'una mescla 1:1 d'èter etílic amb hexà, que contenia 150 μ g de 5-metil-1-hexanol com estàndard intern, concentrades i analitzades per GC amb les mateixes condicions que les utilitzades per a l'anàlisi de les reaccions dutes a terme amb el (Z)-3-6:OAc i l'esterasa SICXE7.

IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'ENZIMS IMPLICATS EN LA BIOSÍNTESI FEROMONAL

4.1. La biosíntesi feromonal en lepidòpters

Degut a la naturalesa estructural dels compostos feromonals dels lepidòpters (cadena alifàtiques funcionalitzades), la biosíntesi feromonal està estretament lligada a la síntesi d'àcids grassos. Així, la major part de les espècies de lepidòpters comparteixen l'acetil Coenzim A (acetil-CoA) com a precursor comú en la biosíntesi de les seves feromones (Jurenka 2003). De la mateixa manera que en la síntesi d'àcids grassos, la biosíntesi feromonal s'inicia amb la carboxilació de l'acetil-CoA per formar malonil-CoA, seguit d'una elongació cíclica de la cadena d'àcid gras mitjançant el sistema enzimàtic àcid gras sintetasa, que donarà lloc a un acil-CoA amb una cadena saturada de 16 carbonis (palmitoil-CoA) o 18 carbonis (estearil-CoA). A partir d'aquest punt s'inicien les modificacions específiques per a la transformació d'aquests intermediaris en compostos pròpiament feromonals (Jurenka 2003). Els primers estudis duts a terme sobre la bioquímica de la biosíntesi feromonal suggerien que l'afinitat dels diferents precursors per aquests enzims definia les proporcions finals en la mescla feromonal (W.L. Roelofs and Jurenka 1996). Aquesta segona part del procés biosintètic, els enzims de la qual dependran de la composició feromonal de cada espècie, està regulada hormonalment mitjançant un neuropèptid anomenat PBAN (de l'anglès, *Pheromone biosynthesis activating neuropeptide*). La informació que hi ha sobre els mecanismes moleculars pels quals es produeix aquesta activació són encara incomplets. No obstant, s'ha pogut demostrar que el PBAN activa un receptor situat a la membrana de les cèl·lules de la glàndula feromonal i produeix una entrada del Ca^{2+} extracel·lular, que al seu torn provoca l'activació d'enzims relacionats amb el metabolisme dels àcids grassos, com lipases (Ohnishi et al. 2006), així com enzims clau en la producció de feromones, com ara reductases (Fabrías et al. 1994) i alcohol acetil transferases (Mas et al. 2000). Altres enzims implicats en les etapes més inicials de la biosíntesi feromonal, com les desaturases, en canvi, estarien excloses de l'activació per aquest neuropèptid (Arsequell et al. 1990).

Els estudis bioquímics realitzats sobre la dinàmica de la producció feromonal són escassos, però hi ha evidències de que els precursors feromonals són acumulats en gotes de lípids al citosol fins el moment de ser transformats en els productes finals i alliberats a l'ambient (Matsumoto et al. 2002). En un estudi dut a terme mitjançant RNAs d'interferència corresponents gens clau en la biosíntesi de la papallona de la seda *Bombyx mori*, s'ha pogut concloure que és l'acil-CoA intermediari (en aquest cas, (*E,Z*)-10,12-hexadecadienil-CoA) el que s'acumula en forma de triacil glicerols (TAG). L'activació del receptor del PBAN mobilitza el (*E,Z*)-10,12-hexadecadienil-CoA intermediari i el redueix per formar el (*E,Z*)-10,12-hexadecadienol (bombykol), producte final de la feromona de l'insecte (Ohnishi et al. 2006).

La figura 4.1.1 mostra un possible diagrama de la biosíntesi de feromones formades per una

cadena alifàtica insaturada i un grup funcional alcohol o acetat. Tot i que existeixen algunes excepcions a aquesta composició, la gran majoria de feromones de lepidòpters estat constituïdes per compostos d'aquest tipus. L'esquema està basat en els estudis realitzats per Ohnishi i col·laboradors sobre la biosíntesi del bombykol (Ohnishi et al. 2006). Cal apuntar que, donat que la feromona de *B. mori* no implica l'escurçament de la cadena, no hi ha dades experimentals que demostrin que aquesta etapa es produeixi en el punt indicat a la figura. No obstant, alguns estudis sobre la composició dels TAGs acumulats en forma de gotes lipídiques a les cèl·lules de la glàndula feromonal demostren que els precursors emmagatzemats en aquest punt ja han patit un escurçament de cadena (Matsumoto et al. 2002; Bjostad & Roelofs 1986).

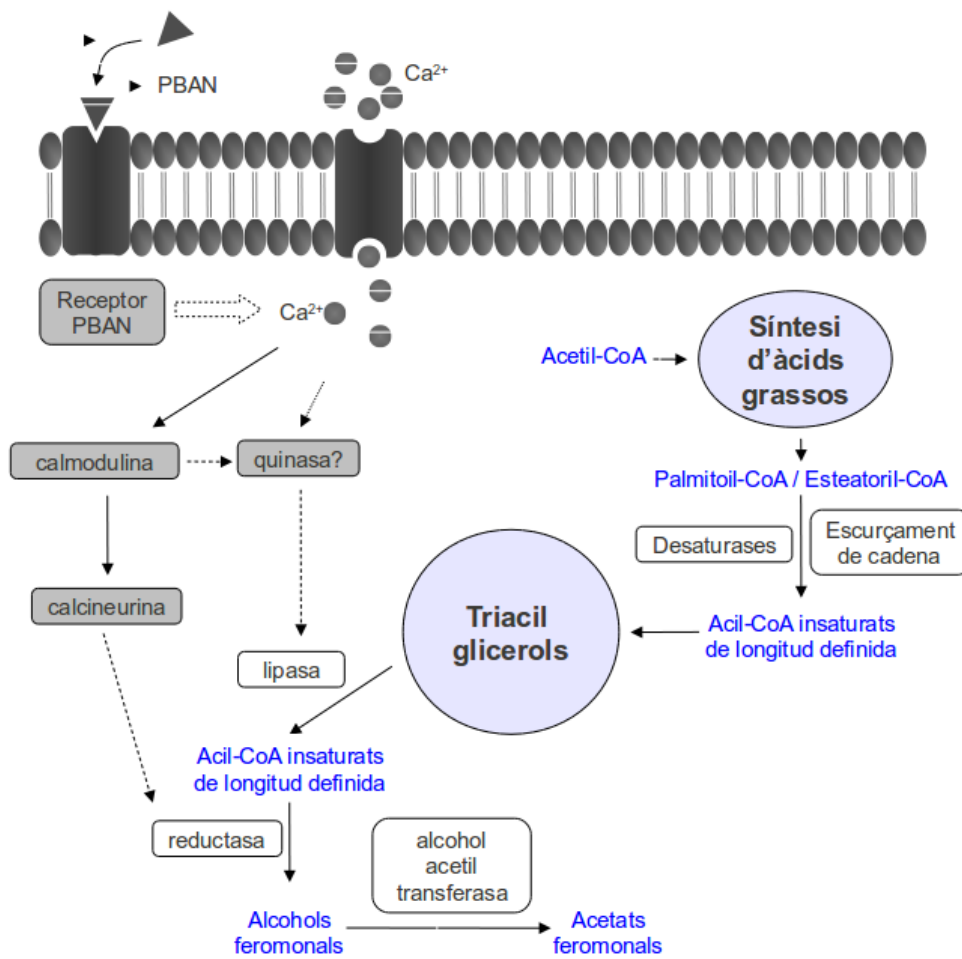


Figura 4.1.1 Possible esquema general de la biosíntesi feromonal, basat en Ohnishi et al. 2006.

4.1.1. Biosíntesi de la feromona de l'arna *S. littoralis*

Tal i com s'ha descrit en la introducció general, la feromona de la soca de *S. littoralis* utilitzada en aquest treball consisteix en una mescla de cinc acetats d'alcohols de 14 carbonis, amb diferents nombres, posicions i tipus d'insaturació. La ruta biosintètica d'aquest lepidòpter ha estat estudiada per diversos autors mitjançant l'aplicació tòpica a la glàndula feromonal d'intermediaris marcats amb radioisòtops, seguida de la extracció dels components de la glàndula amb un solvent orgànic (Muñoz et al. 2008). Malgrat no tots els enzims implicats en la ruta biosintètica proposada han estat identificats, aquesta tècnica ha permès aïllar els precursors de cadascun dels intermediaris biosintètics. D'acord amb aquests resultats, s'ha pogut establir que la biosíntesi de tots els components de la feromona de *S. littoralis* s'inicia amb el palmitoil-CoA. Aquest acil de 16 carbonis és desaturat i parcialment escurçat fins donar lloc als diferents intermediaris acil-CoA de 14 carbonis, amb la posició, tipus i nombre d'insaturacions definits. Finalment els acil-CoA insaturats són reduïts als corresponents alcohols i acetilats per tal de donar lloc als acetats que seran alliberats a l'ambient (figura 4.1.2).

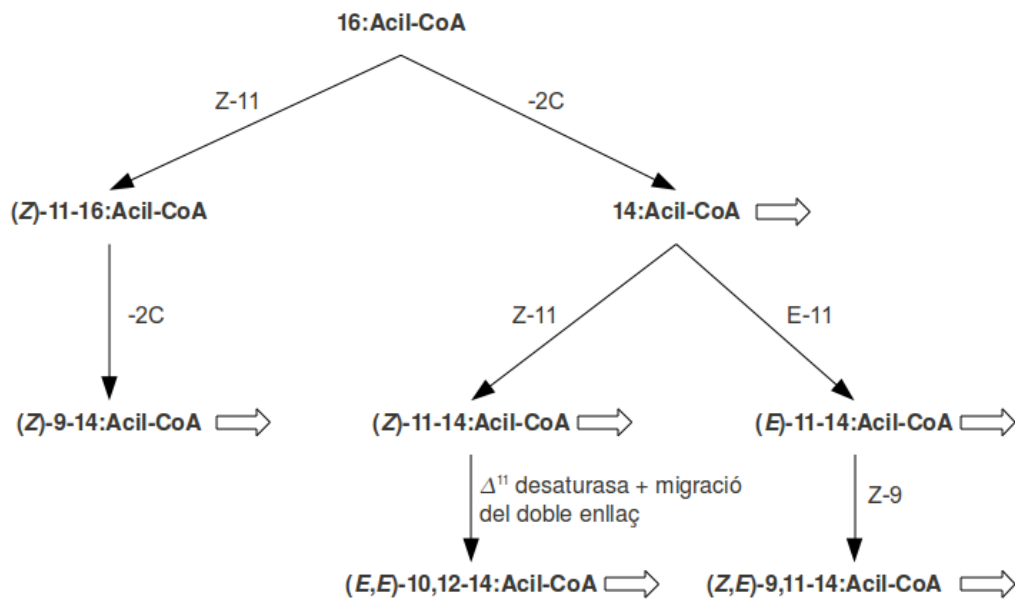


Figura 4.1.2. Ruta biosintètica de la feromona d'*S. littoralis* (Muñoz et al. 2008). Les fletxes buides indiquen dues etapes consecutives de reducció i acetilació, donant lloc als acetats que constituïran finalment la feromona.

4.1.2. Enzims implicats en la biosíntesi feromonal

Tal i com s'ha descrit a l'inici d'aquesta introducció, la primera part de la ruta biosintètica dels components feromonals és comuna amb el metabolisme d'àcids grassos. És a partir dels acils de cadena llarga (en el cas de *S. littoralis*, palmitoil-CoA), que tindran lloc les transformacions específiques necessàries per donar lloc a les molècules feromonals. Els enzims que participen en aquestes transformacions són diferents entre les espècies, doncs estan estretament lligats a la composició feromonal de cada lepidòpter. A nivell general, però, es poden classificar en tres grans grups: enzims d'escurçament de la cadena, desaturases i enzims de funcionalització de la cadena; aquests darrers, principals objecte d'estudi en aquesta tesi.

Enzims d'escurçament de cadena

Tot i que aquesta etapa no ha estat caracteritzada des d'un punt de vista enzimàtic en cap espècie, diversos estudis han posat de manifest la capacitat dels insectes per escurçar cadenes d'àcid gras fins a una longitud definida. Aquesta activitat ha estat atribuïda a una β -oxidació parcial identificada també en vertebrats i localitzada als peroxisomes (Hashimoto 1996). Els dos enzims implicats en aquest procés serien una acyl-CoA oxidasa i una 3-oxoacyl-CoA tiolasa. Un estudi realitzat en el lepidòpter *Trichoplusia ni* va demostrar una preferència de substrat en els enzims de la β -oxidació peroxisomal, que seria la responsable d'aturar el cicle de β -oxidació a un nombre determinat de carbonis (Jurenka et al. 1994). En el cas de *S.littoralis*, si bé la presència de β -oxidació ha estat corroborada bioquímicament mitjançant la utilització d'inhibidors d'acyl-CoA oxidases (Rosell et al. 1992), no existeix informació experimental pel que fa a l'especificitat d'aquests enzims. No obstant, donat que en la ruta biosintètica d'aquesta espècie únicament s'observa un escurçament de cadena en la transformació del 16:Acil-CoA en 14:Acil-CoA i del (Z)-11-16:Acil-CoA al (Z)-9-14:Acil-CoA, la β -oxidació peroxisomal en *S. littoralis* tindria una especificitat per substrats de 16 carbonis, però no de 14.

Desaturases

Si bé la desaturació dels intermediaris acil-CoA és l'etapa més complexa i amb més diversitat en la biosíntesi feromonal, també ha estat la més estudiada, tant des d'un punt de vista de la diversitat (identificant nombroses proteïnes responsables d'aquesta activitat), com del mecanisme (elucidant les diferents etapes de la reacció, així com la manera en que es produeix un isòmer o un altre). Els primers estudis duts a terme mitjançant l'aplicació tòpica d'intermediaris marcats sobre la glàndula d'*S. littoralis* demostraven que la ruta biosintètica de la seva feromona inclou 3 activitats desaturasa diferents en funció de la posició del doble enllaç (Martinez et al. 1990):

1. La desaturació en posició 11 del 16:Acil-CoA per produir (Z)-11-16:Acil-CoA i del 14:Acil-CoA per produir (E)-11- i (Z)-11-14:Acil-CoA.
2. La desaturació en posició 9 del (E)-11-14:Acil-CoA per produir (Z,E)-9,11-14:Acil-CoA.
3. La desaturació i reordenació del doble enllaç del (Z)-11-14:Acil-CoA per donar lloc a (E,E)-10,12-14:Acil-CoA.

Posteriorment, els treballs de biologia molecular duts a terme sobre l'insecte van revelar la presència de tan sols dues desaturases actives a la glàndula feromonal d'*S. littoralis*. Totes dues (anomenades posteriorment SlsZ9 i SlsZ/E11, respectivament) van ser expressades de forma recombinant en un llevat deficient en la desaturasa i elongasa pròpies (Rodríguez et al. 2004). Els resultats dels assajos d'activitat duts a terme amb la proteïna SlsZ9 recombinant van revelar que l'enzim produïa el (Z)-9-14:Àcid quan era incubat en presència de 14:Acid, però quan el medi de reacció contenia una mescla de 14:Acid i (E)-11-14:Acid, l'únic producte obtingut era el (Z,E)-9,11-14:Acid (Rodríguez et al. 2004). Aquests resultats explicarien el fet que, malgrat la presència d'una Z9 desaturasa a la glàndula feromonal, el compost (Z)-9-14:Acid no hagi estat mai detectat com a intermediari. Per la seva banda, els productes de reacció de SlsZ/E11 eren tant el (Z)-11-16:Acid, com el (E)-11-14:Acid i el (Z)-11-14:Acid, demostrant que el mateix enzim podia ser responsable de totes les insaturacions en la posició 11 del procés biosintètic. En estudis posteriors realitzats amb aquest mateix enzim, es va demostrar que la desaturasa SlsZ/E11 era també responsable de la formació del (E,E)-10,12-14:Acil-CoA a partir del (Z)-11-14:Acil-CoA, mitjançant una reacció d'insaturació acompanyada de migració i isomerització del doble enllaç (Serra et al. 2006).

Enzims de funcionalització del carbonil: Reductasa

En l'etapa de reducció, els diferents acil-CoAs són transformats als corresponents alcohols mitjançant l'oxidació del cofactor NADPH, en una reacció catalitzada per una reductasa d'àcids grassos (FAR, de *Fatty Acyl-CoA reductase*).

La reducció d'àcids grassos a alcohols està relativament estesa entre els éssers vius. Tant les plantes com els animals duen a terme aquesta transformació en una etapa prèvia a la síntesi de ceres (esters d'alcohols de cadena llarga i acils de cadena llarga) (Riendeau & Meighen 1985). Aquesta reacció, mecanísticament similar a la catalitzada per la HMG-CoA reductasa en la síntesi de colesterol, ha estat estudiada en diversos organismes mitjançant preparacions cel·lulars (Riendeau & Meighen 1985). Si bé els detalls sobre el mecanisme de la reacció són encara desconeguts, els estudis realitzats sobre extractes cel·lulars han pogut concloure que aquesta té lloc en una sola etapa, sense la formació intermèdia d'un aldehid. Així doncs, a diferència d'altres

sistemes metabòlics, que transformen els acil-CoAs en aldehids i posteriorment en alcohols per transferència de dos electrons a cada reacció, les FAR catalitzen la reacció en una sola etapa, la qual cosa implica la transferència dels quatre electrons necessaris per a la reducció per un sol enzim (Kolattukudy & Rogers 1986). Una altra diferència important amb les reductases formadores d'aldehids és la localització subcel·lular. Així, mentre que els enzims que redueixen l'acil-CoA a aldehyd es troben de forma soluble, les FAR s'han localitzat a la fracció microsomal, tant en els estudis realitzats en plantes, com en animals (Metz et al. 2000; Kolattukudy & Rogers 1986). Aquesta observació és consistent amb la naturalesa transmembrana de les prèviament descrites desaturases, que utilitzen el mateix tipus de substrats.

No obstant l'abundància relativa d'estudis bioquímics sobre aquests enzims, no va ser fins l'any 2000 que es va purificar i clonar la primera reductasa d'àcids grassos, en aquest cas, provinent de les llavors de la planta *Simmondsia chinensis*. Aquesta seqüència, juntament amb la de l'homòloga HMG-CoA reductasa va servir de referència l'any 2003 per a l'amplificació i el clonatge de la primera FAR implicada en la biosíntesi d'una feromona (Moto et al. 2003). Aquesta FAR, provinent de la glàndula feromonal de la papallona de la seda *B. mori*, va ser expressada en un sistema recombinant, mostrant la capacitat de catalitzar la formació de (*E,Z*)-10,12-hexadecadienol a partir del corresponent acil-CoA. En assajos realitzats amb diferents substrats, l'enzim mostrava una preferència pels acil-CoAs de 15 o 16 carbonis, essent poc actiu pels de 17 i 18, i del tot inactiu pels de 18 i 19 carbonis.

La hipòtesi segons la qual l'especificitat dels enzims biosintètics defineix la composició final de la mescla feromonal ha motivat l'estudi d'aquests enzims en altres espècies de lepidòpters. Posteriorment a la identificació de la FAR de l'arna *B. mori* (la mescla feromonal de la qual només conté un component susceptible de ser generat per l'acció de la FAR), diversos ortòlegs d'altres espècies de lepidòpters han estat identificats i caracteritzats bioquímicament en assajos d'activitat *in vivo*, expressant l'enzim recombinant en un sistema heteròleg. En les espècies estudiades fins al moment, l'especificitat dels enzims identificats ha resultat variable. Així, per exemple, mentre la FAR glandular de l'arna *Ostrinia nubilalis* mostrava una especificitat per l'isòmer *E* o *Z* de la feromona depenent de la raça de l'insecte (Lassance et al. 2010), la FAR de l'espècie *Yponomeuta evonimellus* tenia un perfil d'activitat força inespecífic pel que fa a la preferència de substrats (Liénard et al. 2010). No obstant, el nombre d'ortòlegs caracteritzats des d'un punt de vista bioquímic és encara molt baix per treure conclusions sobre la rellevança i la universalitat del paper de les FAR en la determinació de les proporcions de la mescla feromonal.

Enzims de funcionalització del carbonil: Acetil transferasa

La implicació d'una activitat acetil transferasa en la darrera etapa de la ruta biosintètica de

feromones de tipus acetat va ser demostrada per primera vegada per W. Roelofs en el barrinador europeu *Ostrinia nubilalis* (Jurenka & Roelofs 1989). Els estudis es van dur a terme mitjançant l'addició de l'intermediari feromonal marcat radioactivament a un extracte proteic de glàndules feromonals, i van posar de manifest que únicament els extractes proteics del teixit glandular (més concretament, de la fracció microsomal) catalitzaven la síntesi de la feromona a partir de l'alcohol precursor i l'acetil-CoA. D'altra banda, estudis cinètics on es comparava l'activitat en front de diferents precursors va demostrar una preferència de l'enzim per l'isòmer Z, majoritari en la mescla feromonal. No obstant el temps transcorregut des que va tenir lloc aquest primer descobriment, i malgrat l'evolució de les tècniques de biologia molecular, cap alcohol acetil transferasa (AAT) implicada en la biosíntesi feromonal ha estat aïllada o clonada fins al moment.

Tot i l'absència d'estudis sobre aquests enzims en lepidòpters, la funció de transferència d'un grup acetil a un alcohol (duta a terme per AATs) no és exclusiva de la biosíntesi feromonal i existeixen, per tant, nombrosos enzims que catalitzen aquesta reacció en un context diferent al de la producció de feromones. De tots ells, els més semblants pel que fa al tipus de substrat són les AATs responsables de la síntesi de compostos volàtils que formen part de diversos aromes naturals, molts d'ells constituïts també per molècules de tipus acetat (D'Auria et al. 2002; El-Sharkawy et al. 2005; Lilly et al. 2006). L'interès per l'estudi de les propietats organolèptiques dels productes naturals ha motivat la recerca dirigida a la identificació i caracterització d'aquests enzims en fruites, flors o en els llevats utilitzats per a la fermentació del raïm. En tots els casos, l'enzim transfereix el grup acetat des d'una molècula d'acetil-Coenzim A (acetil-CoA) a un alcohol, generalment primari, formant un enllaç ester que dona lloc a l'acetat del corresponent alcohol.

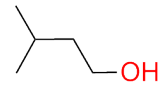
Si bé les AATs identificades fins al moment poden catalitzar l'acetilació de més d'un substrat, totes mostren una certa preferència per algun alcohol en particular. Així per exemple, algunes de les AAT identificades i caracteritzades en el meló mostren certa activitat en front un ampli ventall d'alcohols, però aquesta és majoritària per un d'ells en particular en cada enzim (El-Sharkawy et al. 2005). D'altra banda, en el llevat *S. cerevisiae* dues AATs diferents són les responsables de l'acetilació de l'etanol i la pregnenolona, respectivament, si bé totes dues mostren activitat per a formació de l'acetat d'isoamil (Mason & Dufour 2000).

Els criteris de classificació de les alcohol acetil transferases varien en funció del grau de coneixement que es té de cadascun dels diferents grups. Així, tot i que algunes AATs de planta accepten els mateixos substrats que les AATs de llevat (<http://www.brenda-enzymes.org>, EC:2.3.1.84), la base de dades InterPro les classifica a partir de la seva seqüència primària en dues famílies diferents: les de llevat, com acetil transferases pròpiament dites (IPR010828), i les de planta en un grup heterogeni anomenat genèricament transferases (IPR003480). A banda

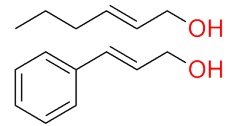
d'aquests dos grups amb activitat per a alcohols alifàtics i/o aromàtics, la base de dades InterPro identifica, al moment de l'elaboració d'aquest treball, unes altres 9 famílies amb activitat alcohol O-acetil transferasa. Aquestes inclouen enzims d'acetilació de proteïnes o polisacàrids, proteïnes d'unió a cofactors, enzims de detoxificació d'antibiòtics en procariotes i la família de les carnitin/colin acetil transferases, que inclou tant els enzims responsables de la síntesi i/o regeneració de l'acetilcolina en les neurones colinèrgiques, com de l'acetilació de la L-carnitina en l'homeòstasi dels grups acetil dins i fora del mitocondri.

De totes les 11 famílies, les anomenades transferases (IPR003480), les acetiltransferases (IPR010828), i les carnitin/colin acetiltransferases (IPR000542) es diferencien de la resta per utilitzar alcohols lliures (no formant part de cap macromolècula) i generalment alifàtics com a substrat (figura 4.1.3). No obstant això, aquesta proximitat en la reacció catalitzada no es tradueix en un elevat grau d'identitat entre les proteïnes. Així, per exemple, el percentatge d'identitat entre la colin acetil transferasa del mosquit *Culex quinquefasciatus* (número d'accés XP_001843149) i la carnitin acetil transferasa de la mateixa espècie (número d'accés XP_001869241) és només del 25%. Aquesta diferència és encara més acusada si es comparen dues proteïnes amb funcions catalítiques semblants, però pertanyents a dues famílies diferents, com ara les dues carnitin acetiltransferases del llevat *Saccharomyces cerevisiae* (números d'accés del GenBank CAA78399 i DAA07677 per les isoformes mitocondrial i citosòlica, respectivament) i les dues alcohol acetil transferases de la mateixa espècie (números d'accés del GenBank BAA05552 i DAA08272 per l'ATF1 i ATF2, respectivament), que tenen un percentatge d'identitat d'entre el 6 i el 8%. Així, llevat d'alguns elements conservats entre les proteïnes d'un mateix grup, l'únic motiu conservat universalment entre les acil transferases en general és l'hexapèptid HXXX(D/E)(G/A) (Brown et al. 1994), la histidina del qual està directament implicada en el mecanisme catalític de la reacció (McGarry & Brown 1997; Ramsay et al. 2001).

IPR010828
Acetil transferases
 (Enzims de llevat)



IPR003480
Transferases
 (Enzims de plantes)



IPR000542
Carnitin/colin acetil transferases
 (Enzims presents en nombroses espècies)

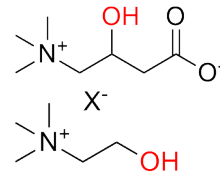


Figura 4.1.3. Exemples de substrats de tres famílies amb activitat alcohol O-acetil transferasa conegudes fins al moment. En vermell s'indica l'hidroxil que és acetilat.

Així doncs, malgrat la disponibilitat de la seqüència completa del genoma de *Drosophila melanogaster*, el mascle de la qual produeix una feromona d'agregació de tipus acetat (Bartelt et al. 1985), la carença de dominis o elements de seqüència conservats en aquest grup de proteïnes dificulta la identificació de possibles AAT implicades en la biosíntesi feromonal.

4.2. Resultats

4.2.1. Aïllament i caracterització de la reductasa d'àcids grassos de *S. littoralis*

Clonació del cDNA de Slit-FAR1

Metodologia: 3.2. i 3.3.2.

L'alineament de les cinc FARs amb activitat coneguda identificades fins al moment (figura 4.2.1) va posar de manifest la presència de com a mínim tres regions altament conservades, susceptibles de ser utilitzades com a motlle per al disseny d'oligonucleòtids degenerats que permetessin l'amplificació de proteïnes amb potencial activitat FAR. La primera d'elles, situada entre els residus 26 i 34 de la FAR de *B. mori* (BmorFAR) fou descartada per als propòsits de clonació, donat que havia estat proposada com a seqüència consens per al lloc d'unió dels co-factors NADH o NADPH, utilitzats per altres proteïnes cel·lulars. Les altres dues regions van ser utilitzades per al disseny dels oligonucleòtids degenerats FARfor (en sentit directe) i FARrev (en sentit revers), respectivament. La traducció teòrica del fragment obtingut de l'amplificació amb aquests dos oligonucleòtids va resultar en una seqüència parcial de 79 aminoàcids, sense la presència de cap codó d'aturada. La cerca per alineament local d'aquest fragment va mostrar una identitat d'un 51% amb el fragment situat entre els residus 215 a 293 de la seqüència d'aminoàcids de la BmorFAR. Finalment, la tècnica de PCR-RACE va permetre l'obtenció d'un cDNA complet de 1602 pb. La seqüència corresponent a la pauta oberta de lectura (ORF, de *open reading frame*) d'aquest fragment (verificada amb una polimerasa d'alta fidelitat), codificava per una seqüència de 454 aminoàcids, que va ser anomenada Slit-FAR1.

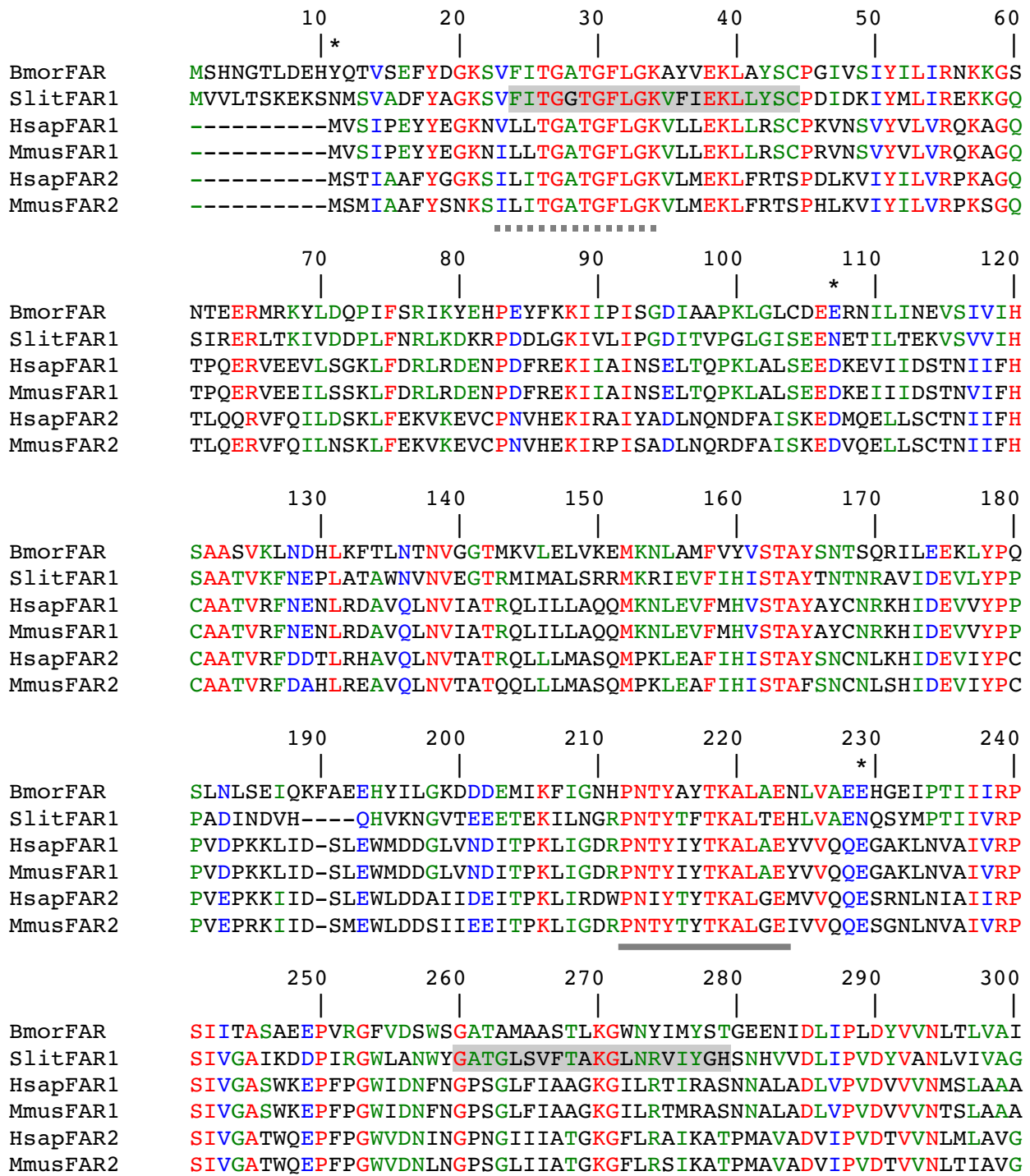
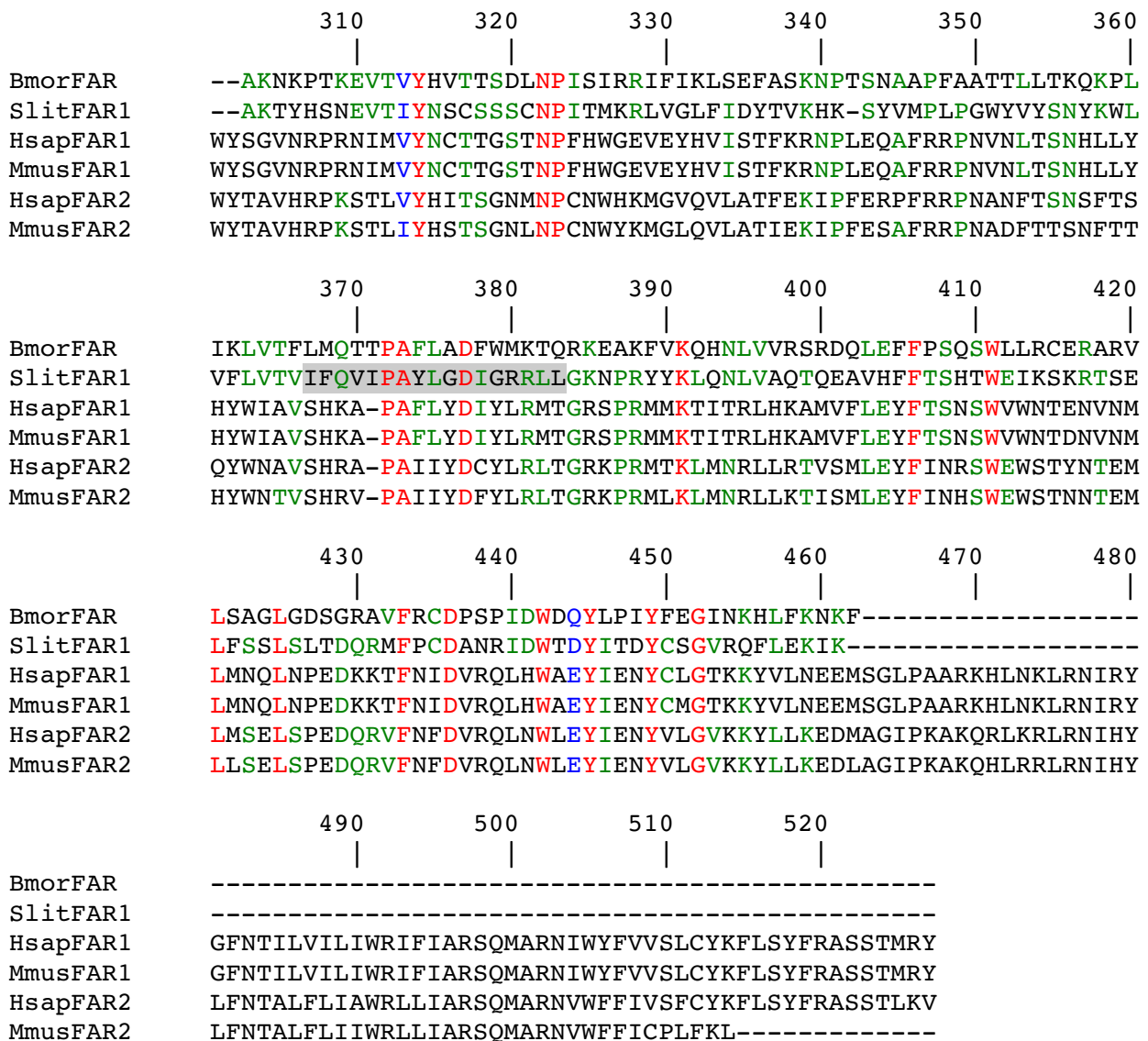


Figura 4.2.1. Alineament de la seqüència Slit-FAR1 amb les seqüències de FARs utilitzades per al disseny d'oligonucleòtids degenerats. Els números d'accés a la base de dades de proteïnes del GenBank són: *Bombyx mori* FAR (BAC79426), *Homo sapiens* FAR1 (NP_115604), *Homo sapiens* FAR2 (AAH22267), *Mus musculus* FAR1 (AAH07178), *Mus musculus* FAR2 (NP_848912). La seqüència consens proposada per a la interacció amb els cofactors està subratllada amb una línia discontinua, mentre que les dues regions seleccionades per al disseny d'oligonucleòtids degenerats estan subratllades amb línies contínues. (Continua a la pàgina següent).



Continuació **Figura 4.2.1**. Els asteriscs mostren les posicions de Slit-FAR1 potencialment glicosilables. Finalment, les regions predites com a possibles dominis transmembrana estan ombrejats en gris.

La seqüència SlitFAR1 tenia un pes molecular i punt isoelèctric calculats de 51,4 kDa i 8,9 respectivament i contenia, a més de les dues regions conservades utilitzades per al disseny dels oligonucleòtids degenerats, el motiu proposat per a la unió del cofactor NADPH. L'anàlisi bioinformàtica va posar de manifest la presència de tres punts potencialment glicosilables (assenyalats amb asteriscs a la seqüència), en cas de ser orientats a l'interior del reticle endoplasmàtic. Finalment, pel que fa a una possible topologia de tipus transmembrana, es van identificar fins a tres possibles regions transmembrana al llarg de la seqüència (ombrejats en gris a la la figura 4.2.1). No obstant, únicament el tercer (residus 360 a 376) va ser identificat pels tres

servidors utilitzats en la predicció, mentre que els altres dos únicament van ser identificats per un dels servidors. A més, el primer fragment transmembrana (residus 24 a 44) coincidia amb el lloc predit per a la unió del cofactor NADPH, molt probablement situat fora de la membrana.

Caracterització del transcrit Slit-FAR1

Anàlisi filogenètica

Metodologia: 3.2.1.

La seqüència d'aminoàcids deduïda del cDNA identificat es va comparar amb altres reductases d'àcids grassos identificades en lepidòpters. Per a l'anàlisi es va utilitzar una selecció de seqüències descrita prèviament per Löfstedt i col·laboradors (Liénard et al. 2010), basada en cerques BLASTP i TBLASTN sobre la base de dades GenBank, així com diverses llibreries de cDNA. A aquesta selecció s'hi van afegir, a més de Slit-FAR1, 3 seqüències del lepidòpter *Heliothis virescens*, identificades recentment en un banc de cDNA de la glàndula de l'insecte (Vogel et al. 2010). Tal i com mostra la figura 4.2.2, la seqüència Slit-FAR1 és agrupada en el sí d'un conjunt de reductases (indicat a la figura amb branques de color vermell), la majoria de les quals han estat identificades específicament a la glàndula feromonal de diferents lepidòpters. De totes elles, la seqüència més propera a Slit-FAR1 va ser la FAR d'*Heliothis virescens* (número d'accés ACX53790), identificada en un banc de cDNA glandular d'aquesta arna, i que té una identitat de seqüència del 72 % amb la Slit-FAR1.

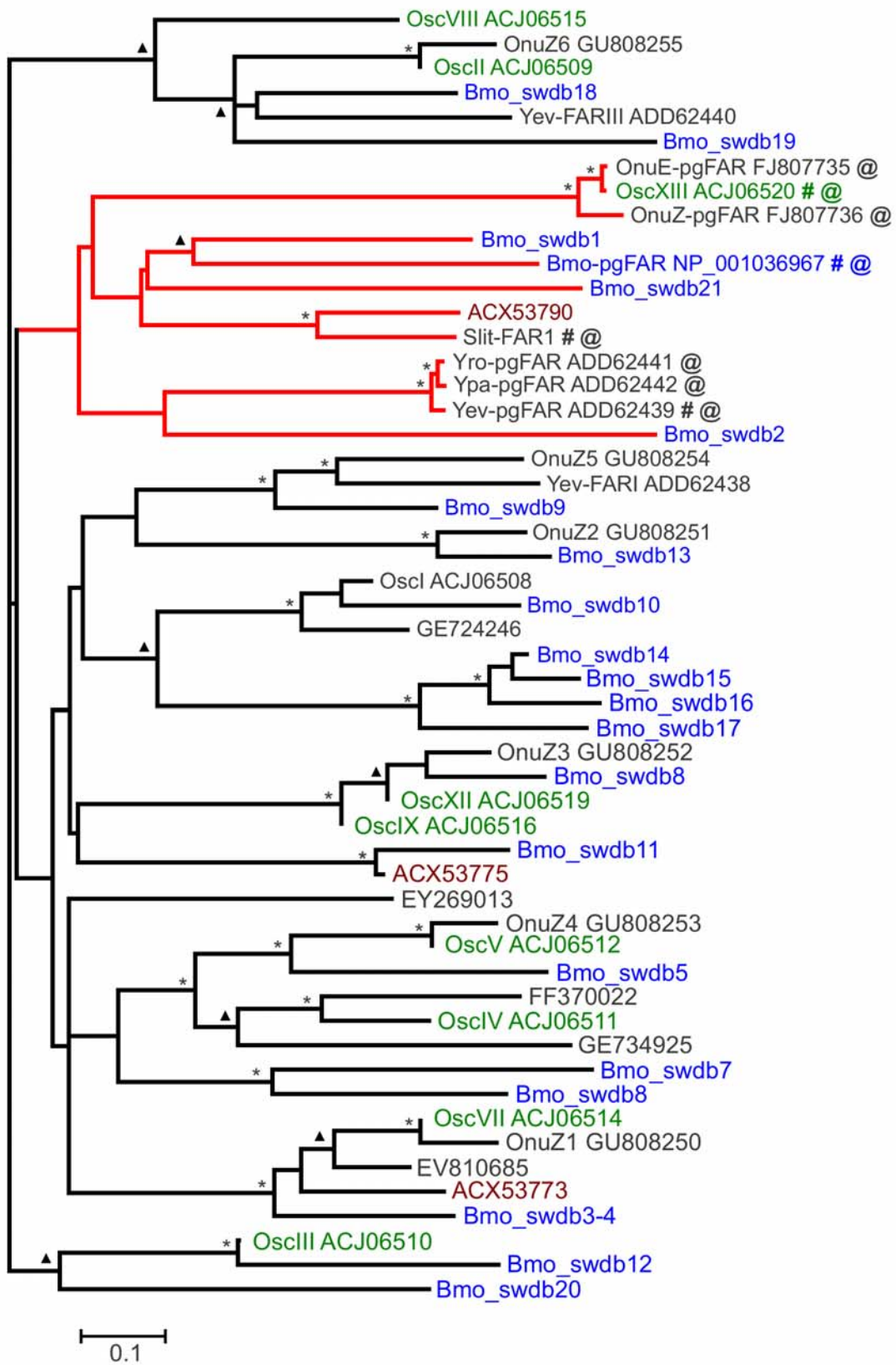


Figura 4.2.2. Anàlisi filogenètica de les reductases de lepidòpter. (Continua a la pàgina següent)

Estudi d'especificitat tissular

Metodologia 3.4.2.

D'altra banda, a fi d'avaluar l'especificitat del transcrit de Slit-FAR1, es va estudiar la presència d'aquest en diferents teixits de l'insecte. Addicionalment als teixits de la femella, s'hi va incloure l'abdomen sencer del mascle. El resultat va mostrar una presència del transcrit únicament a la glàndula feromonal (figura 4.2.3).

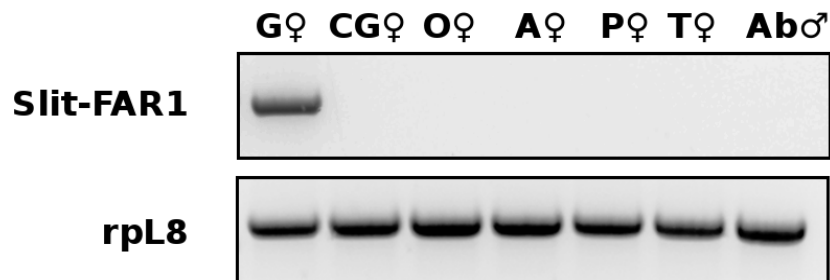


Figura 4.2.3. Presència del transcrit de Slit-FAR1 en diferents teixits de l'insecte *S. littoralis*. **G**: glàndula feromonal, **CG**: cos gras, **O**: ovaris, **A**: ales, **P**: potes, **T**: tòrax, **Ab**: abdomen. La proteïna ribosomal rpL8 va ser utilitzada com a control dels nivells d'expressió.

4.2.2. Expressió recombinant de Slit-FAR1

Metodologia: 3.5.2 i 3.6.3

El DNA Slit-FAR1 va ser clonat en el vector pESC-URA (figura 3.6 de material i mètodes) entre les dianes de restricció BamHI i HindIII, presents en el lloc de clonatge múltiple MCS2. El plàsmid resultant, anomenat pESC-SlitFAR1, va ser seqüenciat en la regió d'inserció per tal de verificar-ne la seva integritat.

Un cop el vector va ser transformat amb èxit en el llevat competent de la soca YPH501, l'expressió de la proteïna i purificació de l'extracte total va donar com a resultat l'obtenció d'aproximadament 18 mg de proteïna soluble total per cada 100 mL de cultiu, a una concentració mitjana de 2,5 mg/mL.

Continuació de la **figura 4.2.2**. Les seqüències en blau corresponen a *B. mori*, en verd a *Ostrinia scapularis* i en marró a *Heliothis virescens*. El símbol # indica que ha estat demostrada la presència específica del transcrit a la glàndula feromonal, mentre que el símbol @ indica que ha estat demostrada la capacitat de l'enzim per produir alcohols feromonals a partir dels corresponents precursors. L'asterisc i el triangle mostren valors de bootstrap de 90-100% i 80-89%, respectivament.

4.2.3. Activitat de la proteïna Slit-FAR1 recombinant

Metodologia: 3.7.

Assajos *in vivo*

En un primer intent per verificar l'activitat de l'enzim recombinant, el llevat recombinant per a la reductasa Slit-FAR1 va ser incubat en presència dels següents àcids grassos: l'àcid (Z,E)-9,11-tetradecadienoic, l'àcid (Z)-9-tetradecenoic, l'àcid (E)-11-tetradecenoic, l'àcid (Z)-11-tetradecenoic i l'àcid tetradecanoic, que van ser afegits al medi a una concentració final de 0,5 mM. Després de 24 i 48 h de creixement en condicions d'inducció i en presència dels diferents àcids grassos, cap dels corresponents alcohols va ser detectat en l'extracció amb hexà dels productes presents en el medi d'incubació.

Assajos *in vitro*

Posteriorment a aquest assaig les cèl·lules del llevat van ser trencades i l'extracte proteic soluble va ser utilitzat per a dur a terme un assaig d'activitat *in vitro*, utilitzant els derivats acyl-CoA dels àcids grassos com a substrat i el NADPH com a cofactor. En un primer estadi de l'estudi, i per tal de detectar la possible activitat, es va dur a terme l'assaig únicament amb el (Z,E)-9,11-14:SCoA (com a àcid gras diinsaturat), el (Z)-9-14:SCoA (com a àcid gras mono-insaturat) i el 14:SCoA (com a àcid gras saturat). L'assaig es va dur a terme en paral·lel amb un extracte proteic del llevat recombinant YPH501 + pESC-SlitFAR1 i l'extracte proteic d'un llevat transformat amb el vector nu com a control (YPH501 + pESC).

Els cromatogrames de la fracció orgànica de l'extracció dels productes van mostrar la presència de l'alcohol corresponent a cadascun dels assajos (figura 4.2.5, filera superior). En canvi, cap traça d'aquests alcohols va ser detectada en els experiments control (figura 4.2.5, filera inferior).

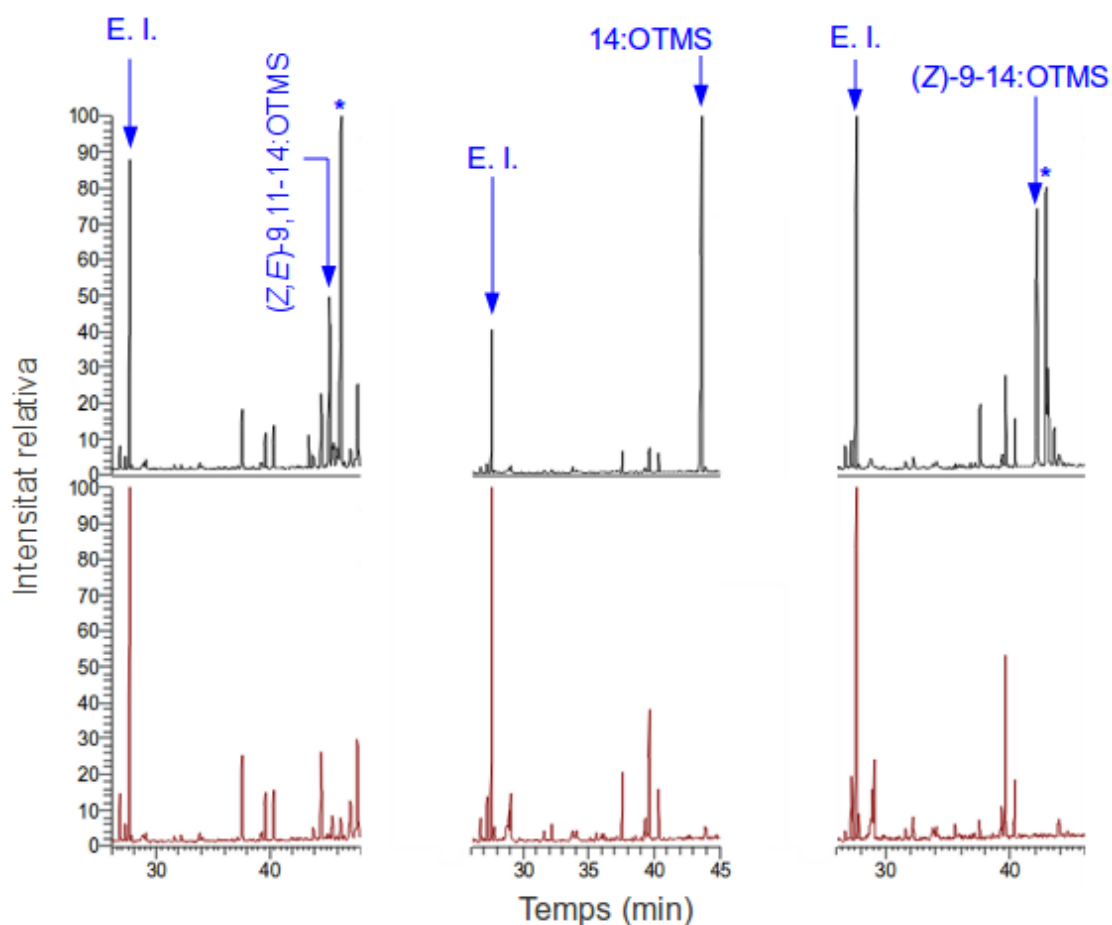


Figura 4.2.5. Cromatogrames dels assajos d'activitat *in vitro* duts a terme utilitzant diferents derivats acil-CoA com a substrat: (Z,E)-9,11-14:SCoA, (Z)-9-14:SCoA i 14:SCoA. Els cromatogrames de la filera superior corresponen als assajos d'activitat duts a terme amb l'extracte proteic del llevat recombinant per Slit-FAR1, mentre que els de la filera inferior (en vermell) corresponen als assajos duts a terme amb el llevat control. Per a cada cromatograma es mostra el pic corresponent al derivat trimetilsilil (TMS) de l'alcohol format en la reacció. Els asteriscs indiquen pics corresponents als isòmers del producte. Les sigles E.I. indiquen el pic corresponent a l'estàndard intern.

D'altra banda, mentre que el derivat TMS de l'alcohol 14:OH va ser detectat en un sol pic del cromatograma, l'espectre de masses dels corresponents derivats TMS dels alcohols (Z)-9-14:OH i (Z,E)-9,11-14:OH van ser detectats en més d'un pic. L'anàlisi per GC-MS en les mateixes condicions d'una mescla sintètica dels quatre isòmers de l'alcohol (Z,E)-9,11-14:OH i els dos isòmers de l'alcohol (Z)-9-14:OH va donar lloc a quatre i dos pics, respectivament, coincidents amb els obtinguts en els corresponents assajos d'activitat.

Un cop confirmada l'activitat de l'enzim recombinant, es van estudiar i optimitzar les condicions de reacció. En primer lloc, es van explorar diferents concentracions del cosolvent utilitzat (DMSO), mostrant-se una activitat major quan aquest es trobava a una concentració del 2% (figura 4.2.6 A).

Així mateix, per tal de poder dur a terme les futures reaccions amb un mateix extracte congelat, es va comprovar que l'enzim era encara actiu després del procés de congelació. L'assaig no va mostrar diferències significatives entre el producte obtingut mitjançant l'extracte fresc i el congelat ($21,1 \pm 1,7$ i $20,4 \pm 1,5$ μM de producte obtingut, respectivament) (figura 4.2.6 B). Aquest mateix extracte va ser utilitzat per a totes les reaccions dutes a terme amb posterioritat.

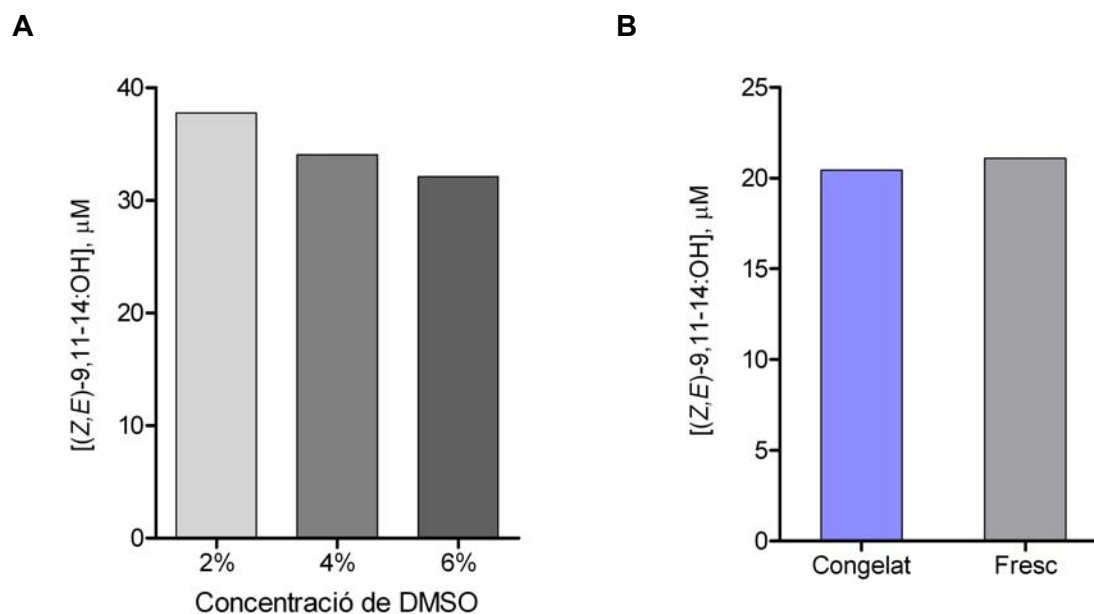


Figura 4.2.6. Optimització de la concentració de DMSO (A) i verificació de la conservació de l'activitat després del congelat (B).

Finalment, es van determinar les condicions en que la reacció enzimàtica avançava a una velocitat propera a la velocitat inicial. Amb aquesta finalitat, un mateix extracte proteic es va utilitzar per a dur a terme assajos d'activitat amb el (Z,E)-9,11-14:SCoA com a substrat i a diferents temps d'incubació (figura 4.2.7).

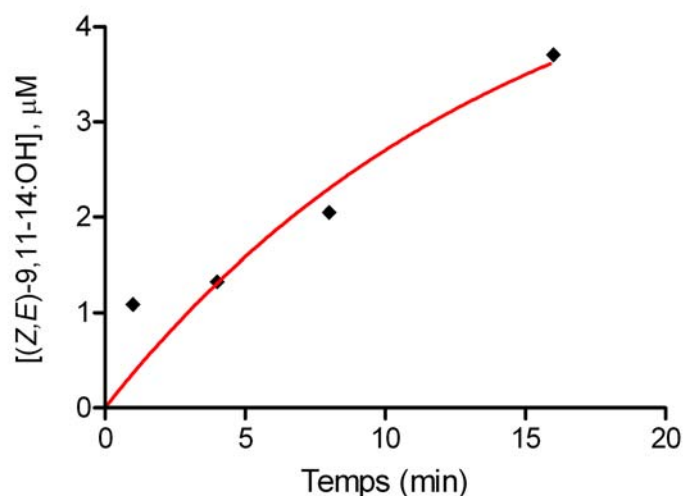


Figura 4.2.7. Activitat de la SlitFAR recombinant per a (Z,E)-9,11-14:SCoA aturant la reacció a diferents temps d'incubació.

El resultat va mostrar que la reacció enzimàtica progressava de forma propera a la linealitat com a mínim fins als 16 min en les condicions de concentració de proteïna utilitzades. A partir d'aquest resultat, el temps seleccionat per a les futures incubacions va ser de 10 min.

Per al càlcul dels paràmetres cinètics es van dur a terme reaccions en un rang de concentracions de substrat d'entre 1,25 μM i 80 μM. Tal i com mostra la figura 4.2.8, si bé l'enzim mostrava un perfil de tipus Michaelis-Menten per a tots els substrats, en tots els casos es va observar una reducció de la velocitat aparent de la reacció a les concentracions més elevades.

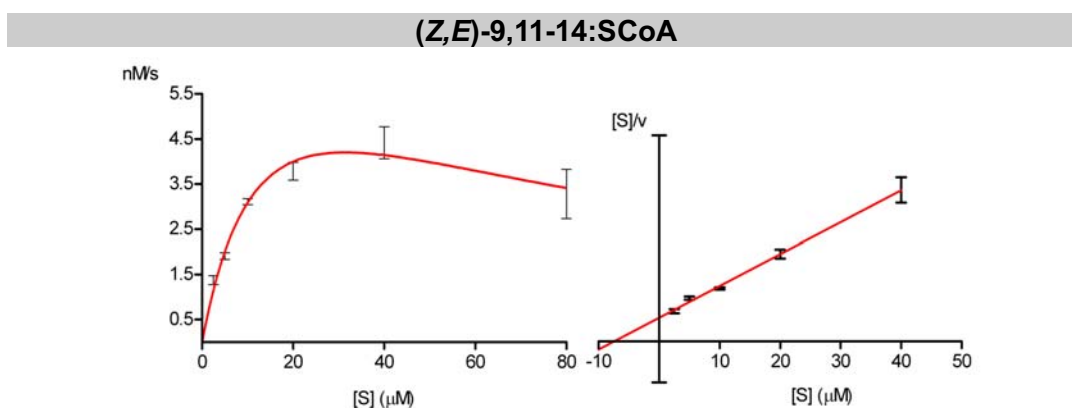
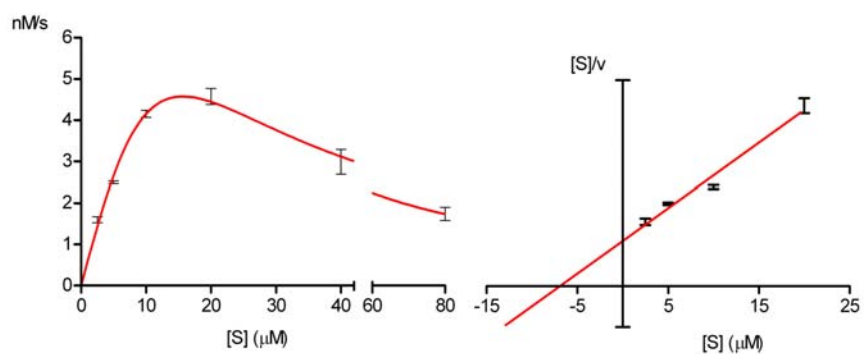
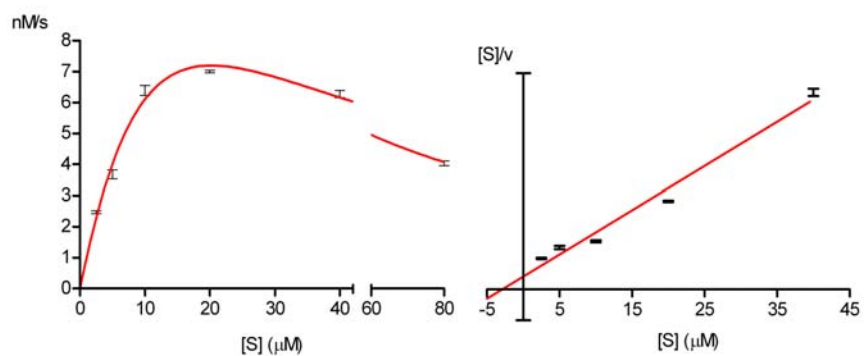


Figura 4.2.8. Corbes de Michaelis-Menten (esquerra) i linealitzacions de Hanes-Woolf (dreta) de la Slit-FAR1 per a cadascun dels diferents precursors feromonal estudiats.

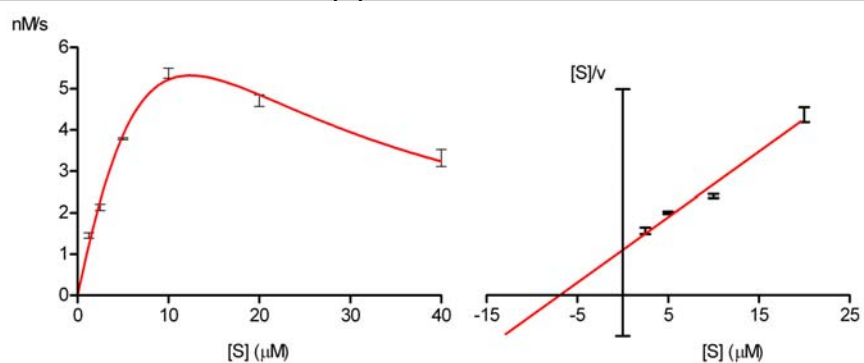
(Z)-9-14:SCoA



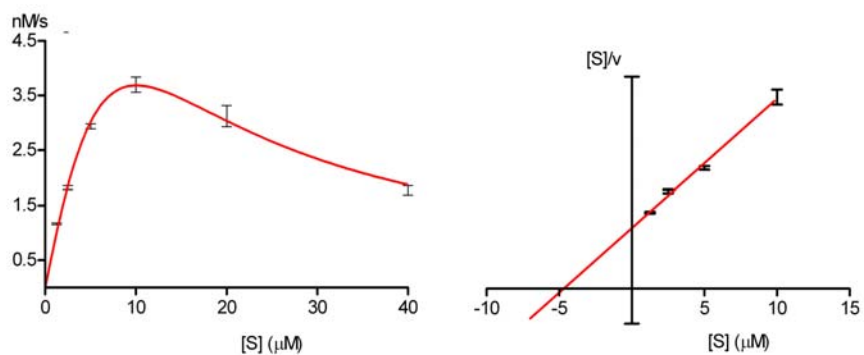
(Z)-11-14:SCoA



(E)-11-14:SCoA



14:SCoA



Continuació de la **figura 4.2.8**.

A partir d'aquestes dades, els paràmetres cinètics aparents K_m^{ap} i V_{max}^{ap} van ser calculats, tant pel mètode d'ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten, com pel mètode de linealització de Hanes-Woolf. La taula 4.2.1 mostra els diferents valors obtinguts, així com el rang de concentracions utilitzades en el càlcul d'aquests paràmetres:

Taula 4.2.1. Valors dels paràmetres cinètics de l'enzim Slit-FAR1 per als diferents substrats estudiats.

	Ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten		Linealització de Hanes-Wolff		Rang de concentracions utilitzat per al càlcul (μM)
	K_m^{ap} (μM)	V_{max}^{ap} (nM/s)	K_m^{ap} (μM)	V_{max}^{ap} (nM/s)	
(Z,E)-9,11-14:SCoA	7,7	5,2	7,5	5,1	2,5 a 40
(Z)-9-14:SCoA	7,0	6,4	7,0	6,3	2,5 a 20
(Z)-11-14:SCoA	4,4	7,8	2,9	7,0	2,5 a 40
(E)-11-14:SCoA	3,7	6,2	3,0	5,7	1,25 a 20
14:SCoA	2,5	4,0	4,7	5,5	1,25 a 10

Finalment, a partir dels valors de K_m^{ap} i V_{max}^{ap} , es van calcular les eficiències catalítiques de l'enzim per a cadascun dels precursors feromonals. Donat que l'enzim no havia estat purificat i que, per tant, no resultava possible obtenir els valors de K_{cat} , l'eficiència catalítica es va calcular segons el quocient V_{max}^{ap}/K_m^{ap} , i considerant les dades obtingudes en el càlcul segons la linealització de Hanes-Wolff (taula 4.2.2).

Taula 4.2.2. Eficiències catalítiques de l'enzim per a cadascun dels precursors feromonals.

Precursor	Eficiència catalítica (s^{-1})
(Z,E)-9,11-14:SCoA	$6,8 \times 10^{-4}$
(Z)-9-14:SCoA	$9,0 \times 10^{-4}$
(Z)-11-14:SCoA	$24,1 \times 10^{-4}$
(E)-11-14:SCoA	$19,0 \times 10^{-4}$
14:SCoA	$11,7 \times 10^{-4}$

4.2.4. Ttemptativa de clonatge de l'alcohol acetil transferasa de *S. littoralis*

Metodologia general: 3.2. i 3.3.2.

Tal i com s'exposa a la introducció, l'absència de seqüències de referència per al disseny d'oligonucleòtids degenerats va motivar la utilització de seqüències d'altres enzims que catalitzessin la transferència d'un grup acetil a un alcohol. En una primera anàlisi es van comparar diverses seqüències d'AATs de planta amb 4 seqüències de la família carnitin/colin acetil transferasa (dues carnitin acetil transferases i dues colin acetil transferases) identificades en el mosquit *Aedes aegypti* i en la mosca *Drosophila melanogaster* en el moment de la realització del present treball. Tal i com es mostra a la figura 4.2.9, el grau d'identitat entre les seqüències de planta i les d'insecte va resultar ser baix, no identificant-se tampoc cap motiu conservat entre elles. D'altra banda, els dos ortòlegs carnitin acetil transferases d'insectes van mostrar un 20 % d'identitat, mentre que el de les colin acetil transferases va ser del 65 %.

Pwas AAT	Pwas AAT							
Thio AAT	32%	Thio AAT						
Saut AAT	32%	33%	Saut AAT					
Spas AAT	10%	7%	8%	Spas AAT				
Rhyb AAT	8%	6%	7%	6%	Rhyb AAT			
Cmel AAT	6%	7%	6%	9%	15%	Cmel AAT		
Aaeg ChAT	5%	5%	4%	6%	4%	5%	Aaeg ChAT	
Dmel ChAT	5%	4%	3%	5%	4%	4%	66%	Dmel ChAT
Aaeg CAT	5%	4%	5%	5%	5%	5%	23%	23%
Dmel CAT	5%	3%	3%	5%	4%	4%	19%	21%
							20%	Aaeg CAT

Figura 4.2.9. Matriu d'identitats de les AAT de plantes i carnitin/colin acetil transferases (CAT per carnitin acetil transferases i ChAT per colin acetil transferases. Ombrejat en verd s'indiquen els percentatges d'identitat entre les AAT de planta i les carnitin/colin acetil transferases d'insecte.

D'acord amb aquestes resultats, es va optar per utilitzar les quatre seqüències d'insecte com a referència per al disseny d'oligonucleòtids degenerats amb els quals amplificar una seqüència d'AAT de la glàndula de *S. littoralis*.

Si bé l'alineament va posar de manifest la presència de diverses posicions conservades, únicament el motiu NRWFDK contenia més de tres residus altament conservats (figura 4.2.10). Aquest únic motiu visiblement conservat també es va observar en l'alineament de carnitin/colin acetil transferases de mamífer. D'altra banda, les quatre seqüències contenien la seqüència consens EHXXX(D/E)(G/A) de les carnitin/colin acetil transferases d'insecte, present també en el centre actiu dels enzims amb activitat aciltransferasa.

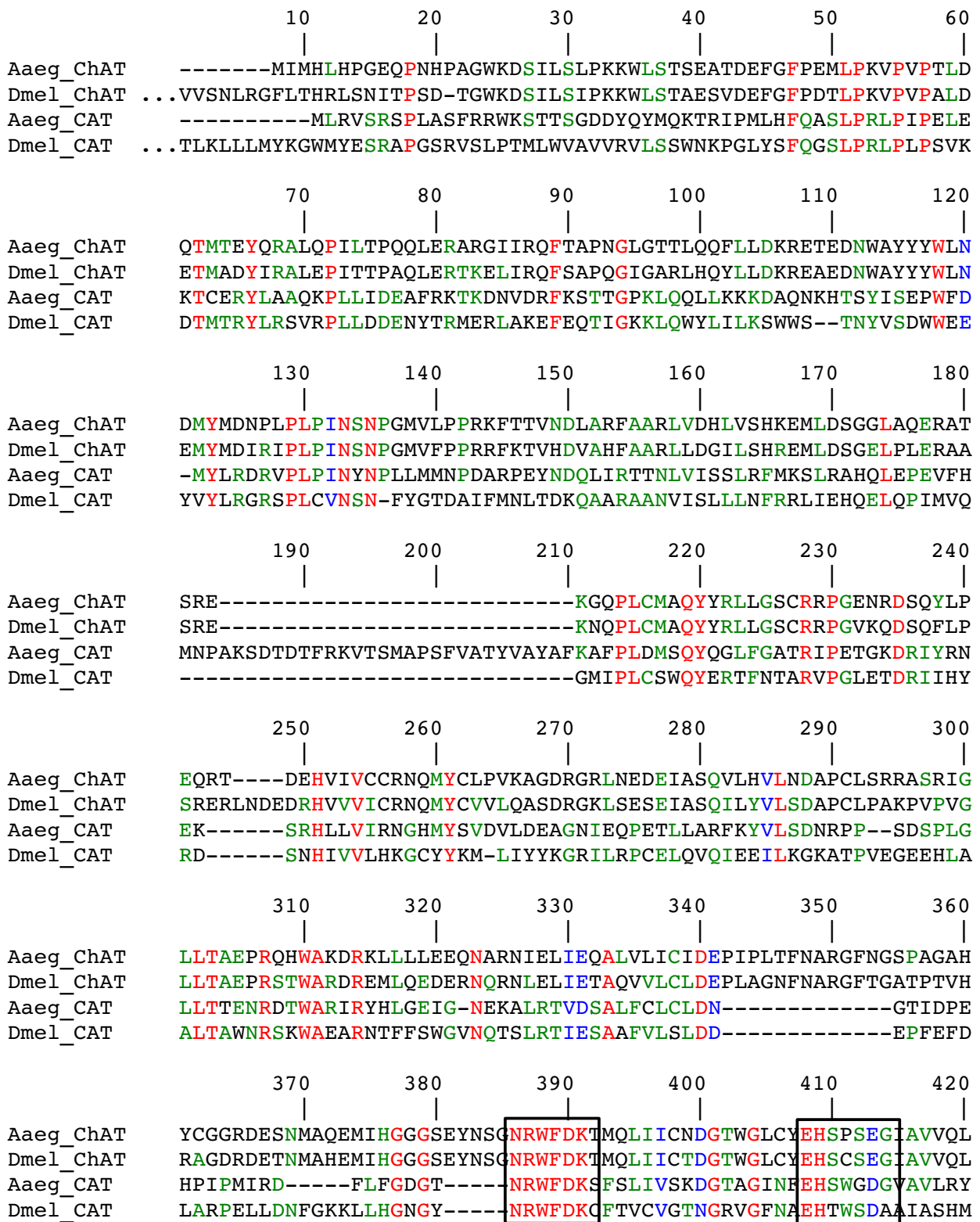
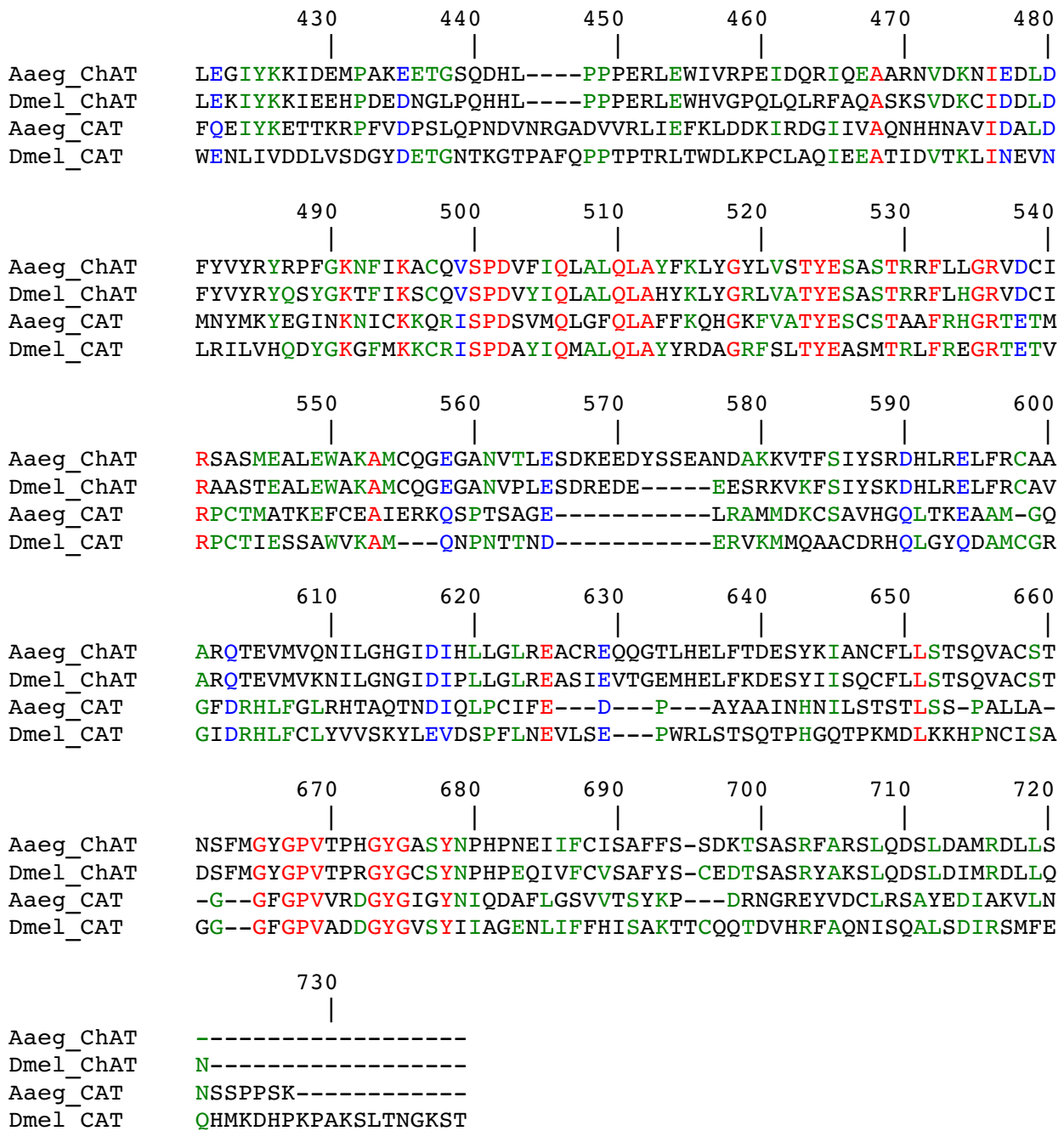


Figura 4.2.10. Alineament de proteïnes d'insecte amb activitat acetil transferasa. **Aaeg_ChAT** i **Aaeg_CAT**: colin acetil transferasa i carnitin acetil transferasa d'*Aedes aegypti*, respectivament. (Continua a la pàgina següent)



Continuació **Figura 4.2.10. Dmel_ChAT i Dmel_CAT**: colin acetil transferasa i carnitin acetil transferasa de *Drosophila melanogaster*, respectivament. Per a l'alineament, els primers 38 residus de la seqüència Dmel_ChAT i 121 residus de Dmel_CAT han estat eliminats, ja que no es va trobar cap coincidència significativa. Els requadres mostren la regió conservada NRWFDK i el pèptid consens EHXXX(D/E) (G/A).

Malgrat la divergència de seqüències observada per a aquesta seqüència consens, l'alineament de nucleòtids corresponents a aquests 7 residus en cadascuna de les seqüències va posar de manifest la presència d'alguns nucleòtids conservats (figura 4.2.11), que van ser utilitzats per al

disseny dels oligonucleòtids degenerats.

Ch_AAeg	NRWFDK	Ch_AAeg	EHSPSEG
Ch_DMel	NRWFDK	Ch_DMel	EHSCSEG
Cn_AAeg	NRWFDK	Cn_AAeg	EHSWGDG
Cn_DMel	NRWFDK	Cn_DMel	EHTWSDA
	*****		**
Cn_DMel	AACCGCTGGTTTGACAAG	ChDMel	GAGCACTCCTGTTCCGAAGGC
Cn_AAeg	AACCGTTGGTTCGACAAA	Cn_DMel	GAACACACCTGGTCCGACGCT
Ch_AAeg	AATCGCTGGTTTGACAAA	Ch_AAeg	GAGCATTCCCCTCTGAAGGA
Ch_DMel	AATCGCTGGTTTGACAAA	Cn_AAeg	GAGCACTCCTGGGGAGATGGA
	** ** ***** *****		** ** ** ** *

Oligonucleòtid AATUp

AA[CT]CG[CT]TGGTT[CT]GACAA

Oligonucleòtid AATDo

GA[AG]CA[CT]TCC[CT][GC][I]TCCGA[ACT]G

Figura 4.2.11. A dalt, seqüències d'aminoàcids (i la seva correspondència en nucleòtids) seleccionades per al disseny d'oligonucleòtids degenerats i a baix, seqüència dels oligonucleòtids degenerats. Els asteriscs indiquen les posicions en que els nucleòtids o aminoàcids estan totalment conservats.

Dues amplificacions per PCR consecutives amb l'oligonucleòtid AATUp (primer en combinació amb el 3'Outer i posteriorment amb el 3'Inner) van donar lloc a un fragment de DNA de 699 pb. Dos dels clons obtinguts a partir d'aquest DNA van ser analitzats mitjançant una cerca BLAST, mostrant una identitat pel gen d'una proteïna d'unió a nucleòtids (*Histidine triad nucleotide-binding protein 1*) i pel d'una gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa, respectivament. Alternativament, l'amplificació utilitzant AATDo i 3'Outer (Ambion) va donar com a resultat un fragment de DNA de 687 pb, que va ser aïllat i clonat. L'anàlisi (anàloga a l'anterior) de tres dels clons obtinguts va mostrar novament i en tots tres casos una identitat pel gen d'una proteïna d'unió a nucleòtids (*Histidine triad nucleotide-binding protein 2*), no relacionada amb l'activitat acetil transferasa.

4.2.5. Expressió recombinant i d'ortòlegs amb activitat acetil transferasa

Degut a les dificultats trobades en l'intent de clonatge d'una alcohol acetil transferasa feromonal de *S. littoralis*, es va optar per la utilització d'un enzim ortòleg com a alternativa per a la catàlisi de la reacció de transferència d'un grup acetil a un alcohol. Després de dur a terme un estudi bibliogràfic sobre les AAT estudiades fins al moment, se'n van seleccionar tres que havien estat expressades amb èxit en un sistema recombinant: l'acetil transferasa de poma (MpAAT1), expressada en *E. coli* (Souleyre et al. 2005); l'acetil transferasa de meló (CmAAT1), expressada en *S. cerevisiae* (Yahyaoui et al. 2002); i una cera sintasa d'*Acinetobacter sp.* (anomenada pels

autors del treball ATF, de *acyl transferase*), expressada en *E. coli* (Uthoff et al. 2005). D'aquestes tres, únicament les dues darreres van ser expressades i assajades amb el precursor de la feromona de *S. littoralis*.

Expressió i purificació de l'alcohol acetil transferasa CmAAT1 en *S. cerevisiae*

Metodologia general: 3.5.2. i 3.6.3.

En un primer assaig es van utilitzar les condicions d'expressió descrites pel grup que havia identificat la proteïna (El-Sharkawy et al. 2005), canviant el sistema d'extracció de boles descrit en aquest treball pel disruptor cel·lular. En els primers assajos, es va utilitzar el temps d'incubació en condicions d'inducció descrit pels autors (que era fins assolir una DO_{600} de 4 segons la publicació, o 48 h d'incubació, segons comunicació personal), obtenint-se entre 4 i 7 mg de proteïna total per 100 mL de cultiu, una quantitat inferior a l'esperada. Paral·lelament, una visualització al microscopi del lisat obtingut va revelar un baix percentatge de trencament cel·lular en aquestes condicions. Després de diversos assajos d'optimització es va observar que amb el dispositiu utilitzat al nostre laboratori la lisi era òptima quan tenia lloc durant la fase exponencial del creixement del llevat. Un cop establert el perfil de creixement del llevat en les condicions utilitzades en el nostre laboratori (figura 4.2.12), es va decidir aturar la incubació del cultiu a valors de DO_{600} que no superessin l'1,5. En aquestes condicions, el rendiment obtingut en extreure la proteïna del cultiu del llevat va ser d'aproximadament 13 mg de proteïna total per 100 mL de cultiu. Després de la cromatografia d'afinitat per metall, la quantitat de proteïna pura obtinguda va ser de 10 μ g per 100 mL de cultiu.

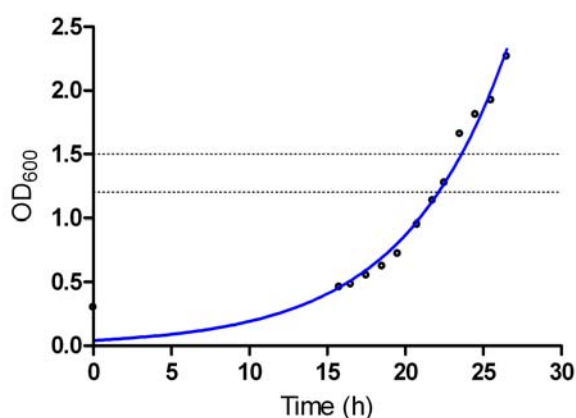


Figura 4.2.12. Perfil de creixement del llevat *S. cerevisiae* (soca INVSc1) transformat amb el plàsmid pYES-CmAAT1 i en presència de medi SG-U.

L'electroforesi (SDS-PAGE) de la proteïna purificada per cromatografia d'afinitat (figura 4.2.13) per metall va mostrar una banda majoritària d'un pes molecular mesurat de 43 kDa, proper, però no coincident amb el pes molecular deduït a partir de la seqüència d'aminoàcids (57,6 kDa,

considerant l'epítip V5 i la seqüència de 6 His introduïdes pel vector pYES). A part de la banda majoritària, es va observar una segona banda d'un pes molecular de 34 kDa. Un gel dut a terme amb les mateixes condicions va ser tenyit amb nitrat de plata, no apareixent altres bandes addicionals. Paral·lelament, el sediment insoluble obtingut després de la lisi va ser purificat en condicions desnaturalitzants (figura 4.2.12, carril A).

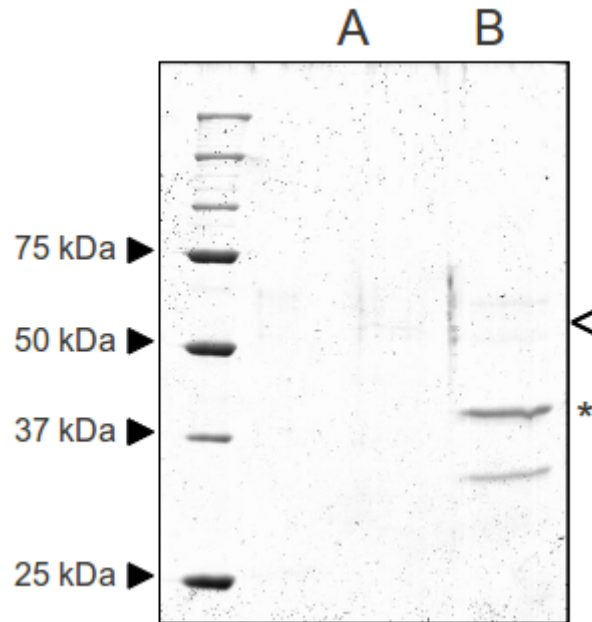


Figura 4.2.13. SDS-PAGE tenyit amb Blau de Coomassie de la proteïna CmAAT1 purificada. **A:** 50 μ L del producte de purificació de la fracció insoluble. **B:** 0,4 μ g de la proteïna CmAAT1 purificada a partir de la fracció soluble. El triangle buit indica el pes molecular esperat per a la proteïna recombinant, mentre que l'asterisc mostra la banda majoritària observada.

Expressió i purificació de la cera sintasa ATF en *E. coli*

Metodologia: 3.5.2. i 3.6.2.

L'expressió i purificació de la cera sintasa d'*Acinetobacter sp.* ATF, formalment anomenada *wax ester synthase/acyl coenzyme A (acyl-CoA):diacylglycerol acyltransferase (WS/DGAT)*, va ser expressada i purificada seguint el procediment descrit pels seus autors (Uthoff et al. 2005), afegint una etapa d'eliminació (o reducció de la concentració) d'imidazole al finalitzar la cromatografia d'afinitat per metall. El rendiment del procés va ser de 410 μ g de proteïna pura per 100 mL de cultiu.

L'electroforesi per SDS-PAGE del procés d'expressió i purificació (figura 4.2.14) va mostrar una banda de sobreexpressió d'aproximadament 50 kDa, proper al pes molecular teòric de la proteïna

(52,6 kDa, inclosa la cua d'His inserida pels autors per tal de facilitar-ne la purificació).

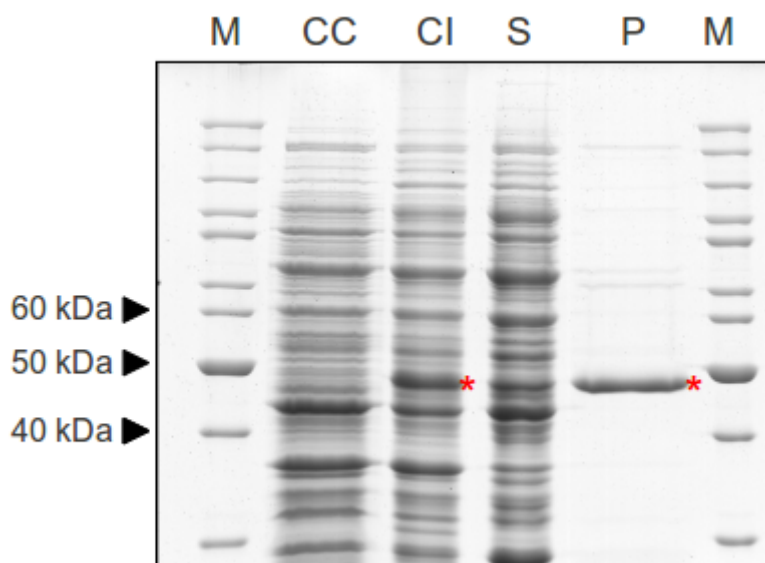


Figura 4.2.14. SDS-PAGE de les diferents etapes d'expressió i purificació de la proteïna ATF. **M:** marcador de pesos moleculars, **CC:** cultiu control (no induït), **CI:** cultiu induït, **S:** fracció soluble del cultiu induït, **P:** fracció pura. Els asteriscs vermells indiquen la proteïna sobreexpressada.

4.2.6. Assajos d'activitat amb alcohol acetil transferases

Metodologia: 3.7.

Les dues proteïnes recombinants expressades i purificades van ser utilitzades en assajos d'activitat per a la formació del component feromonal majoritari de *S. littoralis* el (Z,E)-9,11-14:OAc a partir del seu corresponent alcohol i l'acetil-CoA.

Assajos amb l'alcohol acetil transferasa CmAAT1

Un cop confirmada l'activitat de l'enzim obtingut pel (Z)-3-hexenol, un dels seus substrats naturals (Yahyaoui et al. 2002), l'enzim va ser assajat amb el precursor feromonal (Z,E)-9,11-14:OH a les concentracions de 0,5 i 1 mM. L'anàlisi per GC-MS de l'extracció amb un dissolvent orgànic dels productes d'aquesta reacció va posar de manifest la presència del compost (Z,E)-9,11-14:OAc, que va coincidir en temps de retenció i espectre de masses amb un estàndard sintètic de referència.

Un cop confirmada la capacitat de l'enzim per utilitzar aquest substrat, el progrés de la reacció es

va estudiar utilitzant temps d'incubació creixents. Tal i com es mostra a la figura 4.2.15, la reacció assolí un perfil pla (en que la formació de producte respecte al temps és propera a zero) a partir d'aproximadament 80 min. D'acord amb aquests resultats, els posteriors assajos es van dur a terme amb un temps d'incubació de 15 min.

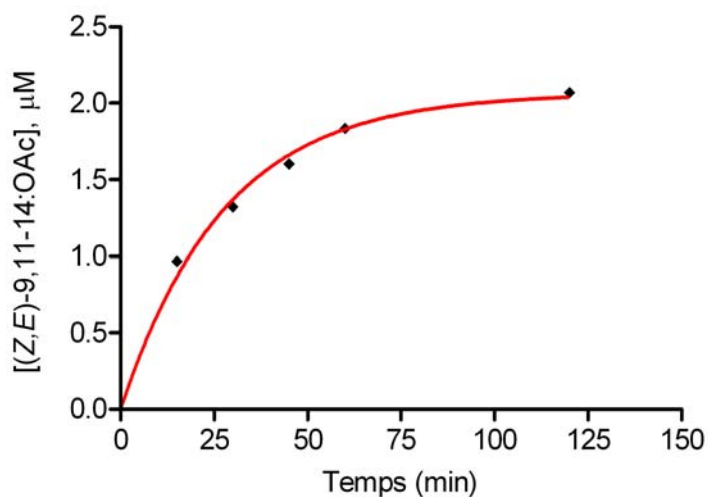


Figura 4.2.15. Corba de progrés de la reacció de formació del (Z,E)-9,11-14:OAc per l'enzim CmAAT1.

Posteriorment es va explorar la utilització de diferents concentracions de DMSO, a fi d'establir la concentració òptima d'aquest cosolvent per a la reacció. Els assajos es van dur a terme en presència d'un 2, 4, 6 i 8% de DMSO, en les mateixes condicions descrites anteriorment. L'anàlisi i quantificació dels productes obtinguts, va mostrar com la reacció duta a terme amb un 4% de DMSO va assolir una concentració de producte més elevada que les demés (figura 4.2.16).

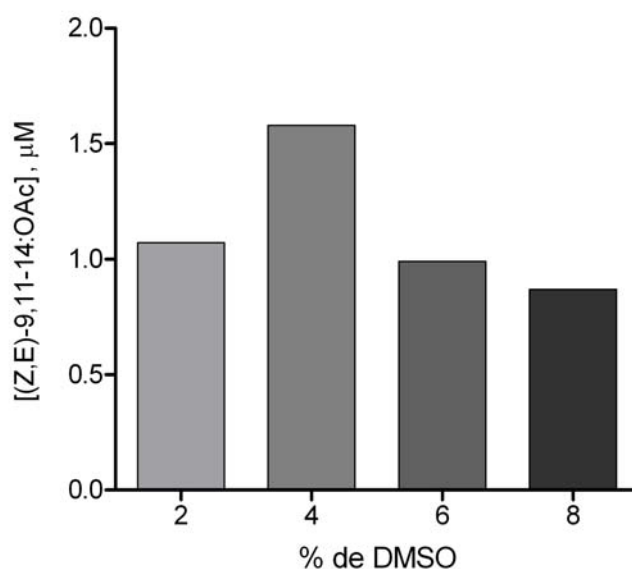


Figura 4.2.16. Activitat de l'enzim CmAAT1 en presència de diferents concentracions de DMSO.

Finalment, es van dur a terme un banc de reaccions a diferents concentracions de substrat, amb la finalitat d'obtenir les constants cinètiques K_m i V_{max} de l'enzim per al substrat (Z,E)-9,11-14:OH. L'assaig es va dur a terme amb les mateixes condicions anteriorment descrites, utilitzant un rang de concentracions de 5 a 250 μM . La representació gràfica de les velocitats obtingudes en funció de les diferents concentracions de substrat utilitzades va mostrar un perfil de tipus Michaelis-Menten (figura 4.2.17).

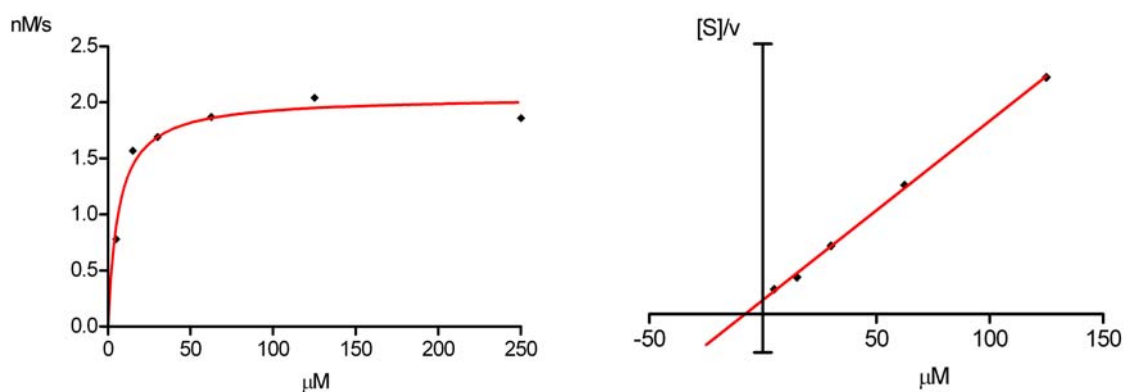


Figura 4.2.17. Corba de Michaelis-Menten (esquerra) i linealització de Hanes-Wolff (dreta) per a l'enzim CmAAT1 amb el substrat (Z,E)-9,11-14:OH a concentració constant d'acetil-CoA.

Les constants cinètiques aparents van ser calculades tant per ajustament no lineal a la corba de Michaelis-Menten, com mitjançant la linealització de Hanes-Woolf, utilitzant únicament els valors per a concentracions igual o inferiors a 125 μM . La taula 4.2.3. mostra els paràmetres cinètics obtinguts amb aquests dos mètodes de càlcul.

Taula 4.2.3. Valors de les constants cinètiques de l'enzim CmAAT1 amb el substrat (Z,E)-9,11-14:OH

Mètode de càlcul utilitzat	Constants cinètiques		
	K_m^{ap} (μM)	$V_{\text{max}}^{\text{ap}}$ (nM/s)	$K_{\text{cat}}^{\text{ap}}$ (s^{-1})
Ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten	7,4	2,1	$1,2 \times 10^{-2}$
Linealització de Hanes-Woolf	7,8	2,2	$1,3 \times 10^{-2}$

Assajos amb la cera sintasa ATF

Metodologia: 3.7.1. i 3.7.2.

La capacitat de l'enzim per formar el (Z,E)-9,11-14:OAc a partir del corresponent alcohol i l'acetil-CoA va ser verificada analitzant els productes obtinguts per GC-MS. El cromatograma va posar de manifest la presència d'un compost amb igual temps de retenció i espectre de masses que el corresponent estàndard sintètic (Z,E)-9,11-14:OAc.

Per a l'estudi de l'evolució de la reacció, es van dur a terme incubacions a diferents temps, obtenint-se una progressió en la concentració del producte aparegut (figura 4.2.18). D'acord amb aquests resultats, el temps d'incubació utilitzat per tal que les condicions de reacció fossin properes a les de velocitat inicial va ser de 25 min.

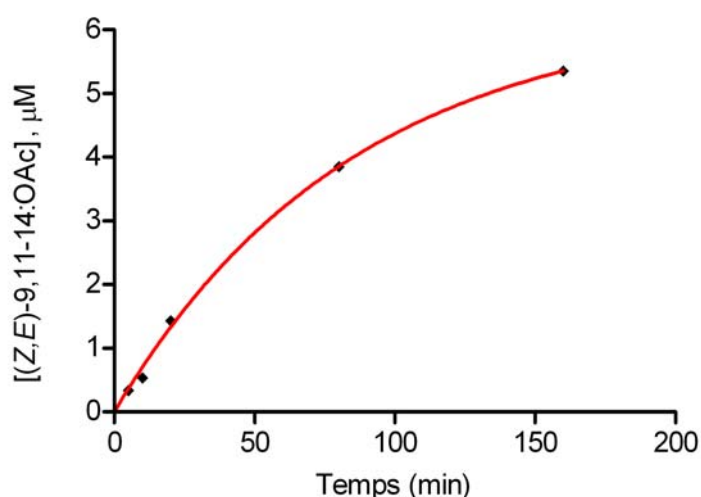


Figura 4.2.18. Evolució de la reacció a diferents temps d'incubació.

Per tal d'elucidar les constants cinètiques de la reacció es van dur a terme incubacions de l'enzim en presència de concentracions de substrat variables, en un rang d'entre 1,25 μM i 1,3 mM. La representació gràfica de les velocitats obtingudes per a cada concentració de substrat va mostrar una corba de tipus Michaelis-Menten (figura 4.2.19).

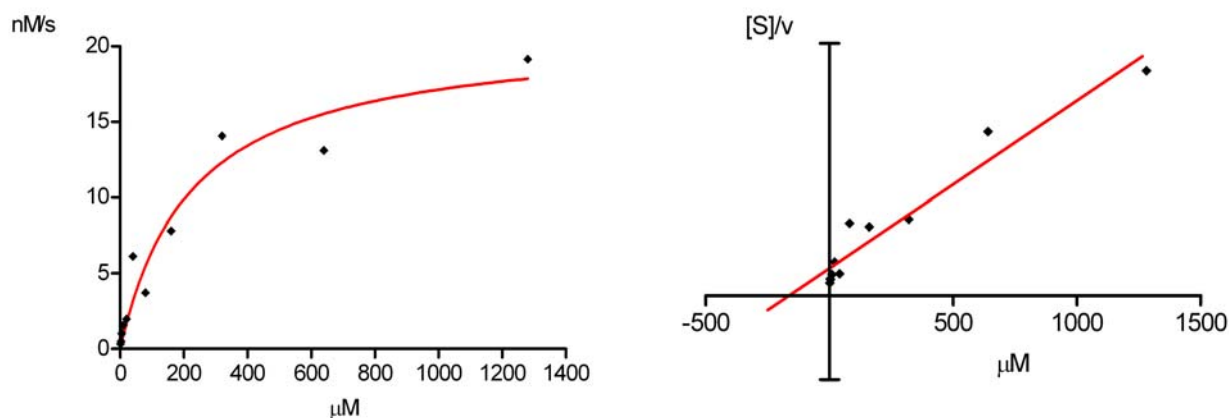


Figura 4.2.19. Corba de Michaelis-Menten (esquerra) i linealització de Hanes-Woolf (dreta) per a l'enzim ATF amb el substrat (Z,E)-9,11-14:OH, a concentració d'acetil-CoA constant.

El càlcul dels paràmetres cinètics aparents es va dur a terme tant mitjançant un ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten, com per la linealització de Hanes-Woolf. La taula 4.2.4 mostra un resum dels valors obtinguts en funció del mètode de càlcul utilitzat.

Taula 4.2.4. Valors dels paràmetres cinètics de l'enzim ATF amb el substrat (Z,E)-9,11-14:OH.

Mètode de càlcul utilitzat	Constants cinètiques		
	K_m^{ap} (μM)	V_{max}^{ap} (nM/s)	K_{cat}^{ap} (s^{-1})
Ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten	225	21	$2,2 \times 10^{-2}$
Linealització de Hanes-Woolf	163	20	$2,1 \times 10^{-2}$

4.3. Discussió

4.3.1. Aïllament i caracterització del cDNA de la reductasa d'àcids grassos de *S. littoralis*

Aïllament del cDNA de Slit-FAR1

Les reductases d'àcids grassos (FARs) identificades fins al moment en lepidòpters i verificades funcionalment presenten un grau d'identitat de la seqüència primària variable, que oscil·la entre el 99% (de OscXIII de *O. scapularis* vs. OnuZpgFAR de *O. nubilalis*) i el 21% (BmorpgFAR de *B. mori* vs. YevFARIII de *Y. evonimelus*). No obstant, en el moment de la identificació de la proteïna Slit-FAR1, la única FAR d'insecte identificada era la BmorFAR del lepidòpter *B. mori*, que va ser alineada amb reductases de mamífer per tal d'identificar regions de la seqüència altament conservades a la família de les FARs. L'alineament va posar de manifest la presència de tres d'aquestes regions, que van permetre aïllar satisfactòriament el cDNA de la primera FAR identificada en l'arna *S. littoralis*. En treballs realitzats posteriorment en els lepidòpters *Ostrinia scapularis* i *Heliothis virescens*, en que s'ha optat per una estratègia de llibreria de cDNA, s'ha posat de manifest la presència de més d'una reductasa a la glàndula del lepidòpter (Antony et al. 2009; Vogel et al. 2010). Tot i que en l'anàlisi transcriptòmica de la glàndula de *H. virescens* no apareix informació sobre la distribució tissular del transcrit, en el cas de *O. scapularis* es va observar que només una d'aquestes isoformes era específica del teixit glandular. En el cas de *S. littoralis*, si bé tots els clons analitzats (provinents d'una amplificació amb oligonucleòtids degenerats) van donar com a resultat la mateixa seqüència, no es pot descartar la presència d'altres FAR a la glàndula de l'insecte. La utilització d'una estratègia basada en l'amplificació mitjançant oligonucleòtids degenerats restringeix els resultats únicament a aquelles seqüències que contenen la regió a la qual s'hibrida l'oligonucleòtid, obviant altres seqüències que podrien estar relacionades amb la família de les FARs.

El nombre de seqüències de FAR identificades fins al moment és encara baix. A més, degut la manca d'informació estructural, no s'han assenyalat encara dominis o residus clau per a l'activitat (a excepció de la zona d'interacció amb el cofactor NAD(P)H). No obstant, la seqüència obtinguda va mostrar les característiques observades en l'ortòleg BmorpgFAR, com ara la presència de les regions conservades esmentades anteriorment, o una longitud de seqüència de 454 residus (propera als 466 residus de l'homòloga BmorFAR).

Pel que fa a les altres característiques de la seqüència, cal tenir en compte la limitació que suposa el fet que la localització subcel·lular de les FARs no hagi estat definida encara amb claredat.

Existeixen evidències experimentals que indiquen que aquestes proteïnes es trobarien a la fracció microsomal (Metz et al. 2000; Kolattukudy & Rogers 1986). Aquesta localització seria coherent amb la d'altres enzims que utilitzen els mateixos substrats que les FARs (acil-CoAs de cadena llarga), com ara les desaturases, que han estat associades a la membrana del reticle endoplasmàtic, i de les quals es disposa d'abundant informació estructural sobre el plegament i els dominis transmembrana (Buist 2004). No obstant, la predicció de dominis transmembrana mitjançant eines bioinformàtiques no dona lloc a resultats concloents pel que fa a aquest tipus de topologia. Tot i tractar-se d'algoritmes àmpliament utilitzats i citats a la literatura, els propis servidors adverteixen de la prudència amb que cal tractar els resultats obtinguts. En el cas de la seqüència Slit-FAR1, els tres servidors utilitzats van coincidir en la predicció d'una regió transmembrana, que estaria situada entre els residus 360 i 376 aproximadament. Pel que fa als altres dos segments (residus 24 a 44 i 256 a 275), el més feble o poc probable seria el primer, que a més d'haver estat identificat en un sol dels servidors, coincideix amb la regió proposada per a la unió del cofactor NADPH (probablement situada fora de la membrana). Aquesta manca de certesa sobre la localització subcel·lular de la proteïna no afecta únicament les prediccions estructurals, sinó també a les modificacions postraduccionals, que depenen en gran mesura d'aquesta localització. Així, per exemple, els possibles punts de glicosilació predits són condició necessària, però no suficient per tal que es produeixi aquesta modificació postraduccionals, que únicament té lloc a l'interior del reticle endoplasmàtic (Berg et al. 2002).

Caracterització

Si bé existeix encara poca informació sobre la major part de les seqüències presumiblement codificants per FARs identificades fins al moment, l'anàlisi filogenètica d'aquestes mostra un grup format majoritàriament per seqüències identificades específicament a la glàndula feromonal de lepidòpters. Per contra, altres seqüències identificades en aquest teixit, però que han resultat tenir un patró d'expressió heterogeni o ubic, apareixen localitzades en altres grups. És el cas, per exemple, de l'arna *Ostrinia scapularis*, per a la qual s'han identificat un total de 13 reductases a la glàndula feromonal, de les quals només una (aquella que s'expressa únicament a la glàndula) està present en aquest grup filogenètic (Antony et al. 2009). La localització de la seqüència Slit-FAR1 en aquest grup filogenètic és, doncs, coherent amb aquesta especificitat de teixit, que va ser confirmada mitjançant un experiment d'RT-PCR a partir de diferents teixits de l'insecte. Per a aquest estudi d'especificitat tissular es van seleccionar diferents teixits potencialment involucrats en la reducció d'àcids grassos a alcohols. Si bé aquesta activitat resulta d'una importància cabdal en la biosíntesi de nombrosos components feromonals dels lepidòpters, també ha estat associada a altres processos, com ara la formació de ceres per a la impermeabilització de les cutícules

(Locke 1965). D'altra banda, la naturalesa de les molècules utilitzades com a substrat (àcids grassos activats en forma d'acil-CoA), podria fer pensar en la presència d'aquests enzims en teixits amb un elevat metabolisme lipídic. D'acord amb aquestes dues potencials activitats, els teixits seleccionats per a l'anàlisi van ser el tòrax, les potes, el cos gras, els ovaris i la glàndula feromonal, detectant-se únicament la presència de Slit-FAR1 en aquest darrer teixit. Finalment, l'especificitat de sexe va ser també verificada amb l'absència de productes d'amplificació en l'abdomen del mascle.

4.3.2. Expressió recombinant i activitat de la reductasa Slit-FAR1

El sistema d'expressió seleccionat per a obtenir la proteïna Slit-FAR1 recombinant va ser el llevat *S. cerevisiae* i el vector pESC (concretament pESC-URA), utilitzats amb èxit per a l'expressió de la proteïna BmorFAR (Moto et al. 2003), amb el DNA d'aquesta sota el control del promotor GAL1. Donada l'absència de dades estructurals sobre aquestes proteïnes, així com l'existència d'algunes dades que suggereixen una localització d'aquestes proteïnes a la fracció microsomal (Metz et al. 2000; Kolattukudy & Rogers 1986), es va optar per no afegir cap seqüència de marcatge (tipus epítot o cua d'His) als seus extrems.

En un primer estadi de l'estudi es va plantejar la detecció d'activitat reductasa per addició dels corresponents àcids grassos als cultius del llevat recombinant i control, tal i com ha estat descrit per a la reductasa de *B. mori* (Moto et al. 2003). No obstant, transcorregudes 24 h o 48 h de creixement en presència dels diferents precursors, cap dels alcohols era detectat en l'extracte orgànic del liofilitzat del cultiu. Tot i les sospites inicials de que l'enzim no era correctament expressat, els assajos posteriors van demostrar la capacitat d'aquest per a produir alcohols a partir dels corresponents acil-CoAs. D'altra banda, els experiments *in vivo* no només no van mostrar activitat, sinó que es va observar una reducció notable en el ritme de creixement del llevat en afegir el precursor diinsaturat (Z,E)-9,11-14:Acid al medi de cultiu. Així doncs, aquesta absència d'activitat podria ser deguda al propi disseny experimental, que depèn de la implicació de diversos processos metabòlics del propi llevat, com ara la incorporació dels àcids grassos afegits al medi al o la transferència del coenzim A als mateixos. El llevat *S. cerevisiae*, de la mateixa manera que altres eucariotes, manté un balanç d'àcids grassos saturats i insaturats a les seves membranes en un ampli rang de condicions fisiològiques i de nutrients (Choi et al. 1996). De la mateixa manera, les diferents longituds dels àcids grassos presents a la membrana del llevat també poden alterar-ne certes propietats, com ara l'activitat de les proteïnes de membrana (Lee 2004). Tant és així que s'ha observat una disminució (dosi depenent) del creixement del llevat en ser incubat en presència d'àcids grassos inferiors a 16 carbonis (Serra 2006). Òbviament, l'escassetat d'informació sobre els aspectes mecanístics d'aquests assajos d'activitat *in vivo* únicament permet especular sobre

els resultats obtinguts. No obstant, tenint en compte aquestes dades sobre el metabolisme d'àcids grassos del llevat, el fet que els substrats utilitzats fossin àcids grassos de 14 carbonis (en contraposició als emprats per Moto i col·laboradors, que eren de 16 carbonis) podria explicar el fet de no haver detectat activitat en els experiments *in vivo* duts a terme amb Slit-FAR1.

Davant la incapacitat de detectar activitat reductasa mitjançant assajos *in vivo*, es va optar per dur a terme una extracció de la proteïna per tal de realitzar assajos *in vitro* amb l'extracte proteic. Per a l'obtenció d'aquest extracte es van utilitzar forces de centrifugació de l'ordre de 18.000 g, inferiors a les necessàries per tal de sedimentar els microsomes formats durant el trencament de les membranes (100.000 g o superiors (Schneider & Hogeboom 1950)). Per tant, tot i tractar-se d'un extracte soluble i sense partícules en suspensió apreciables a simple vista, era d'esperar que contingués tant la fracció citosòlica com la microsomal.

En un assaig preliminar, dut a terme amb tres dels cinc substrats assajats finalment, es va utilitzar un extracte produït en les mateixes condicions, però a partir d'un llevat transformat amb el vector nu (sense el DNA codificant per Slit-FAR1) com a control negatiu. L'absència d'alcohols provinents de la reducció dels acil-CoAs en les mostres control descartava que la reducció observada hagués estat catalitzada per enzims del propi llevat presents a l'extracte proteic. Els assajos duts a terme en presència de l'enzim van posar de manifest la presència d'isòmers dels alcohols esperats. Tot i que no es va poder determinar de forma estricta la configuració del doble enllaç d'aquests isòmers, tant els espectres de masses com els temps de retenció cromatografia de gasos coincidien amb els observats en analitzar una mescla de compostos obtinguda per isomerització química dels alcohols esperats. Gràcies a que les fraccions orgàniques de les extraccions dels productes de reacció contenien també una part del substrat sense reaccionar (en forma de derivat trimetilsilil del corresponent àcid gras), es va poder posar de manifest que aquesta isomerització ja tenia lloc en l'acil-CoA. D'altra banda, les anàlisis per GC-MS dels productes de reacció dels cinc substrats va revelar que aquesta isomerització únicament es produïa en aquells substrats amb un doble enllaç de tipus *cis* i posició 9 (el (*Z,E*)-9,11-14:SCoA i el (*Z*)-9-14:SCoA), especificitat que suggereix la participació d'algun enzim en aquesta transformació. Tot i que no es va trobar cap enzim amb aquesta activitat a la literatura, aquest tipus de transformació no és del tot estranya a la natura. Per una banda, s'han descrit isomerases amb capacitat de desplaçar dobles enllaços en acil-CoAs insaturats (Gurvitz et al. 1998), i per l'altra s'ha observat com algunes desaturases tenen la capacitat de migrar i isomeritzar dobles enllaços en el mateix tipus de substrats (Serra et al. 2006).

Les corbes obtingudes en representar la velocitat en front les diferents concentracions de substrat tenien un perfil proper al de l'equació de Michaelis-Menten, si bé mostraven una curvatura

(descens de la velocitat) a concentracions de substrat elevades (superiors al doble de la K_m). Tot i que en el present treball no s'han dut a terme els estudis necessaris per tal de caracteritzar aquesta desviació en el comportament "michaelià" de l'enzim, el perfil observat és generalment atribuïble a una inhibició per excés de substrat (Copeland 2000). Segons aquesta teoria, a concentracions elevades una segona molècula de substrat interaccionaria amb l'enzim, donant lloc a un complex substrat-enzim-substrat que no evolucionaria i que, per tant, es traduiria experimentalment en una reducció de la velocitat de reacció observada. Donada aquesta limitació, per al càlcul dels paràmetres cinètics es van obviar els valors de les concentracions més altes. No obstant això, el fet que tots els substrats mostressin (en major o menor grau) aquest fenomen, permetia comparar els paràmetres cinètics de l'enzim per a cadascun dels substrats. Tant les afinitats (K_m^{ap}) com les eficiències catalítiques (en aquest cas definides pels quocients V_{max}^{ap}/K_m^{ap} , ja que no resultava possible calcular la K_{cat}) no van resultar tenir diferències importants entre els substrats assajats, que van mostrar una eficiència catalítica en el rang de $6,8 \times 10^{-4}$ a $24,1 \times 10^{-4} s^{-1}$. En qualsevol cas, aquestes diferències observades en les eficiències catalítiques no es corresponien, com havia estat plantejat inicialment, amb les abundàncies relatives dels diferents compostos en la mescla feromonal de *S. littoralis* (taula 1.1 de la introducció general).

La hipòtesi segons la qual l'eficiència catalítica dels enzims biosintètics per als diferents precursors feromonal defineix la proporció dels compostos en la mescla final va ser suggerida ja en els primers estudis bioquímics duts a terme sobre la biosíntesi feromonal en lepidòpters (Roelofs & Jurenka 1996). Malgrat l'absència d'informació sobre les alcohol acetil transferases (etapa posterior a la FAR) i les poques dades cinètiques sobre l'activitat de les desaturases (etapa immediatament anterior a la FAR) sobre diferents precursors feromonal, en els darrers anys han estat publicats diversos treballs duts a terme amb FARs recombinants. En tots els casos, les dades publicades corresponen a assajos d'activitat *in vivo*, duts a terme addicionant diferents àcids grassos a un cultiu de llevat recombinant, donant lloc a una activitat observada que correspon, en realitat, a la suma de diversos processos biològics. Malgrat aquestes limitacions, algun dels treballs publicats mostra una gran diferència entre l'activitat de la FAR sobre el precursor majoritari respecte del minoritari (Lassance et al. 2010), evidenciant una participació de la FAR en la proporció final dels diferents compostos de la mescla feromonal. Els assajos d'activitat duts a terme en el marc d'aquesta tesi presenten l'avantatge d'haver estat realitzats *in vitro* i no veure's, per tant, influenciats per altres processos metabòlics del llevat. No obstant, tot i que la única activitat reductasa observada és atribuïble a l'enzim recombinant, el fet que l'enzim no estigui purificat pot donar lloc a interaccions, tant dels substrats com dels productes formats, amb altres proteïnes presents a l'extracte, alterant també els valors d'activitat observats.

Independentment de la correspondència més o menys gran entre l'activitat real i la observada en els assajos *in vitro*, cal tenir en compte que la FAR no és l'únic enzim que participaria en aquesta proporció, sinó que seria la resultant de les activitats dessaturasa, FAR i alcohol acetil transferasa la que acabaria per definir les proporcions de cada compost a la mescla feromonal. A més, cal tenir present que la feromona de l'insecte utilitzat per Lassance i col·laboradors té diferències molt grans entre les proporcions dels seus dos components (97-98% de component majoritari i 3-2% del minoritari). Aquestes diferències, més acusades que en el cas de *S. littoralis*, es poden traduir també en eficiències catalítiques més marcades, susceptibles de ser evidenciades en un assaig d'activitat.

4.3.3. Temptativa d'identificació d'una alcohol acetil transferasa de *S. littoralis*

La presència d'activitat alcohol acetil transferasa (AAT) a les glàndules d'un lepidòpter amb acetats a la seva feromona va ser documentada per primera vegada fa més de vint anys (Jurenka & Roelofs 1989). No obstant, la informació recollida des d'aleshores sobre la participació d'aquests enzims en la biosíntesi feromonal ha estat pràcticament nul·la. A aquesta manca d'informació específica sobre les AATs de lepidòpter, cal afegir-hi l'heterogeneïtat que s'observa entre els diferents grups d'enzims que catalitzen la transferència d'un grup acetil a un alcohol. Tal i com es descriu a la introducció, des d'un punt de vista catalític els enzims que utilitzen un tipus de substrat més proper als alcohols feromonals són les AATs responsables de la síntesi de compostos volàtils en plantes. D'altra banda, tant les carnitin acetil transferases com les colin acetil transferases, identificades en diverses espècies d'insecte, catalitzen també la transferència d'un grup acetil a un alcohol. No obstant aquesta similitud en la funció bioquímica dels tres grups d'enzims, el grau d'identitat entre les seqüències és baix, fet que es tradueix en una absència de motius conservats comuns entre els tres grups d'enzims.

Malgrat l'escassetat de seqüències de referència, es va plantejar l'amplificació del cDNA d'una AAT de la glàndula de *S. littoralis* mitjançant oligonucleòtids degenerats. La hipòtesi de partida era que per proximitat taxonòmica (i tenint en compte que la reacció catalitzada és la mateixa) les AATs feromonals compartissin motius de seqüència amb les carnitin acetil transferases i les colin acetil transferases d'insecte. No obstant, l'amplificació de cDNA total de glàndula feromonal amb els oligonucleòtids dissenyats a partir de les dues regions conservades identificades en l'alineament, no va permetre obtenir cap seqüència susceptible de codificar per una AAT. D'altra banda, més enllà de la manca d'evidències de que les regions seleccionades formessin part també d'una AAT glandular, l'escassetat d'informació sobre les característiques comunes de la seqüència primària d'aquestes proteïnes dificultaria enormement la interpretació dels resultats

obtinguts. Així, a diferència d'altres famílies de proteïnes, en que la pròpia seqüència primària proporciona una informació orientativa sobre la identitat de la proteïna, en el cas d'una AAT feromonal resultaria imprescindible una verificació funcional de la seqüència obtinguda per tal d'atribuir-li una identitat. Per aquest motiu, i donat que per a l'assoliment dels objectius del projecte iCHEM era necessària la obtenció d'un enzim capaç de catalitzar la reacció d'acetilació dels alcohols feromonals, es va optar per la cerca d'un enzim ortòleg que pogués acceptar aquests alcohols com a substrat.

4.3.4. Expressió recombinant i activitat d'alcohol acetil transferases

Amb el propòsit de trobar una alcohol acetil transferasa que pogués catalitzar l'acetilació dels alcohols feromonals de *S. littoralis* es van cercar a la literatura enzims que haguessin estat expressats amb èxit en un sistema recombinant i que fossin susceptibles d'acceptar alcohols de 14 carbonis de longitud com a substrats. En el moment de la realització d'aquesta cerca bibliogràfica, un mínim de cinc enzims amb activitat alcohol acetil transferasa havien estat clonats i expressats en un sistema recombinant:

- L'alcohol acetil transferasa de la poma MpAAT1 (Souleyre et al. 2005)
- Les alcohol acetil transferases del meló CmAAT1, CmAAT2, CmAAT3 i CmAAT4 (El-Sharkawy et al. 2005)
- L'enzim bifuncional cera sintasa/diacilglicerol acil transferasa d'*Acinetobacter* sp. (anomenat ATF pels autors) (Uthoff et al. 2005).

L'enzim MpAAT1 és el responsable de la biosíntesi de diversos compostos volàtils presents a la poma i ha demostrat poder acceptar, entre d'altres, un alcohol de 10 carbonis com a substrat. Va ser expressat amb èxit en *E. coli* mitjançant el vector pET23Xa/LIC i purificat mitjançant una seqüència d'His. No obstant, la seva utilització va ser descartada per les dificultats i el baix rendiment que presentava la seva expressió recombinant (comunicació directa dels propis autors).

Per la seva banda, les alcohol acetil transferases del meló havien estat expressades amb èxit en el llevat *S. cerevisiae* (soca INVSc1) mitjançant el vector pYES i havien mostrat activitat per un espectre de substrats relativament gran. De totes elles, CmAAT1 era la que semblava acceptar un ventall de substrats més ampli; CmAAT3 mostrava una preferència per als alcohols aromàtics (com l'alcohol benzílic), amb una activitat reduïda per als alcohols alifàtics; CmAAT4 resultava força específica per a l'alcohol cinàmic, no presentant pràcticament activitat pels altres alcohols; CmAAT2, finalment, no era capaç de produir acetats a partir de cap dels alcohols estudiats. Així doncs, la isoforma més prometedora per als propòsits del present treball era CmAAT1, que si bé

havia estat descrita ser poc activa per a alcohols superiors a 7 carbonis, la presència d'algun cosolvent (no utilitzat en els treballs de El-Sharkawy i col·laboradors) podia afavorir l'activitat fins i tot per a alcohols de cadena més llarga.

En els primers intents d'expressió de la proteïna recombinant es va seguir el procediment utilitzat per El-Sharkawy i col·laboradors. Tal i com havien descrit els autors en altres treballs (Yahyaoui et al. 2002), els cultius que sobreexpressaven l'AAT recombinant desprenien una forta olor a plàtan, deguda a l'acetilació de l'alcohol isoamílic produït pel llevat. No obstant, la lisi del sediment cel·lular del cultiu (obtinguda amb un dispositiu diferent al utilitzat per El-Sharkawy i col·laboradors) va rendir una baixa quantitat de proteïna total. Després de diversos assajos d'optimització es va observar que els màxims rendiments de recuperació de la proteïna tenien lloc quan la lisi del llevat es produïa durant la fase exponencial del creixement del microorganisme. A diferència d'altres microorganismes, com *E. coli*, la paret cel·lular del llevat *S. cerevisiae* li confereix una gran resistència al trencament. El fet que la lisi sigui més eficient durant la fase exponencial del creixement podria ser atribuïble a un afebliment de la paret cel·lular durant el procés de divisió, que té lloc majoritàriament en aquesta fase del creixement del cultiu.

Tal i com s'havia predit, l'enzim va demostrar acetilar satisfactòriament el precursor feromonal (Z,E)-9,11-14:OH en presència de DMSO, la concentració òptima del qual es va establir en el 4%. A més, la corba formada per les velocitats de reacció a diferents concentracions de substrat mostrava un perfil de tipus Michaelis-Menten, amb una K_m^{ap} de 7,8 μM i una K_{cat}^{ap} d' $1,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Si bé els resultats d'activitat obtinguts amb l'enzim CmAAT1 van ser satisfactoris pel que fa als propòsits del projecte, es va estudiar també la possibilitat d'utilitzar l'enzim ATF, d'*Acinetobacter sp.*, que havia estat expressat en *E. coli*. Aquest sistema d'expressió recombinant sol oferir uns rendiments superiors als de *S. cerevisiae*, fet que podia resultar avantatjós, ja que la proteïna hauria de ser periòdicament expressada, purificada i transmesa a un segon membre del projecte per tal d'immobilitzar-la en un microreactor.

L'expressió duta a terme pel grup del Dr. Stainbüchel i col·laboradors (Uthoff et al. 2005) va ser reproduïda amb èxit, obtenint-se 34 μg de proteïna pura per 100 mL de cultiu d'*E. coli*. Pel que fa als assajos d'activitat, en els experiments duts a terme per Uthoff i col·laboradors sobre la síntesi de ceres amb ATF s'emprava una solució concentrada d'albumina sèrica bovina (BSA) per tal de solubilitzar els substrats (que eren alcohols i acil-CoAs de 16 carbonis de longitud). En el projecte iCHEM, però, l'enzim havia de ser immobilitzat en microreactors, i la solució que contenia tots els components provinents de la reacció havia de ser evaporada a través d'una membrana porosa. En aquest escenari es va considerar més apropiat substituir la BSA per algun cosolvent evaporable que no bloquegés el sistema. A més, era d'esperar que la solubilitat en aigua dels substrats

utilitzats en aquest treball (alcohols de 14 carbonis i acetil-CoA) fos major que la dels substrats naturals de l'enzim. Per tots aquests motius, es va optar pel DMSO com a cosolvent, que es va afegir al medi de reacció a una concentració final del 4%.

De la mateixa manera que en el cas de CmAAT1, la representació de les velocitats de reacció obtingudes amb l'enzim atf en relació a les diferents concentracions de substrat va donar lloc a una corba de tipus Michaelis-Menten. En aquest cas, però, l'afinitat del precursor feromonal majoritari (*Z,E*)-9,11-14:OH per l'enzim va resultar ser força menor (K_m^{ap} de 163 μ M). Així i tot, i malgrat l'eficiència catalítica fos també menor que en el cas de la CmAAT1, la constant catalítica K_{cat}^{ap} va resultar major ($2,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), permetent-se assolir velocitats màximes de reacció superiors. Degut a aquesta característica (considerada avantatjosa per als propòsits del projecte), juntament amb els majors rendiments en l'expressió, l'enzim ATF va ser el seleccionat per als assajos d'immobilització en el microreactor.

En general, els assajos d'activitat duts a terme amb els dos enzims recombinants confirmen l'elevada flexibilitat de les AAT a l'hora d'acceptar diferents tipus de substrats. D'altra banda, en el cas particular del tipus de substrat emprat en aquest treball, els resultats obtinguts suggereixen (juntament amb les dades publicades a la literatura) que la solubilitat tant del substrat com del producte format poden tenir una influència important en l'accés del substrat a l'enzim (afectant l'afinitat) i en el desplaçament de la reacció (modificant-ne la constant catalítica). Resulta difícil (i tampoc era el propòsit d'aquest treball) reproduir l'entorn químic en que es troben les feromones i els seus precursors en el moment d'interaccionar amb els corresponents enzims. En qualsevol cas, però, la baixa solubilitat d'aquests compostos en medi aquós és un factor rellevant que cal tenir present a l'hora d'interpretar els resultats d'assajos *in vitro* duts a terme amb enzims que participen en el metabolisme feromonal en general.

**IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'ENZIMS
IMPLICATS EN LA DEGRADACIÓ FEROMONAL**

5.1. Percepció feromonal en lepidòpters

Els semioquímics que constitueixen les mescleres feromonals es produeixen en ínfimes quantitats, que es dilueixen en ser alliberats a l'ambient. És per això que les antenes dels insectes en general, i dels lepidòpters en particular, han evolucionat tant molecularment, com anatòmicament, per tal d'assolir una gran eficiència en la detecció feromonal. En un estudi realitzat amb la papallona de la seda *B. mori*, es va observar que la sensibilitat olfactiva d'aquest insecte era del mateix ordre que la d'un gos, tot i comptar amb uns 10.000 receptors menys que els canins (Kaissling 2009b). Si bé aquesta sensibilitat està influenciada i modulada per factors intrínsecs (com ara l'espècie o l'estat fisiològic de l'individu) i ambientals (com la humitat o la temperatura) (Kaissling & Priesner 1970), una de les característiques que més hi contribueix és l'estructura anatòmica de l'antena, òrgan olfatiu dels insectes. Tal i com es mostra a la figura 5.1.1, l'antena dels lepidòpters està anatòmicament dissenyada per tal de filtrar una gran quantitat d'aire durant el vol de l'insecte.

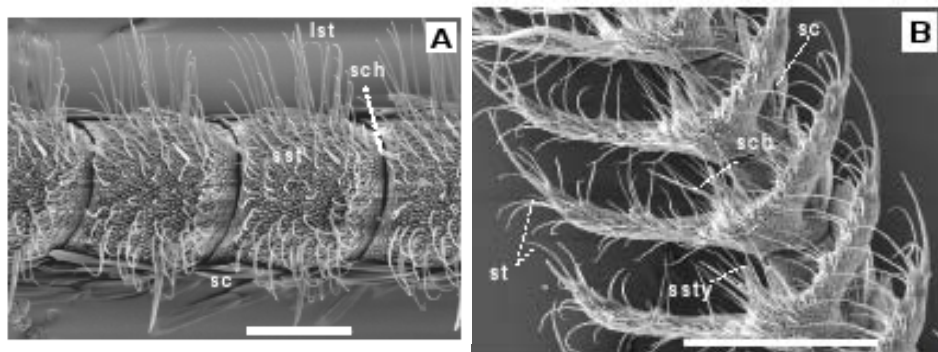


Figura 5.1.1. Fotografia de microscòpia electrònica de rastreig de l'antena de mascle de *S. littoralis* (A) i *S. nonagrioides* (B) (Merlin et al. 2007)

Les estructures filamentoses (anomenades sensiles) mostrades a les imatges de la figura 5.1.1 són les unitats anatòmiques responsables de la detecció feromonal. Les molècules presents a l'ambient accedeixen a l'interior d'aquestes sensiles a través d'uns porus (porus cuticulars) que comuniquen el medi exterior amb el medi interior, anomenat limfa sensilar (figura 5.1.2). Situada a l'interior de la sensila i envoltada per limfa sensilar, es troben les dendrites de les neurones olfatives, a la superfície de les quals estan situats els receptors de membrana encarregats de detectar les molècules feromonals. Finalment, les cèl·lules accessòries, que envolten les neurones tancant la cavitat sensilar, són responsables de la secreció de nombrosos constituents de la limfa sensilar (Kaissling 2004).

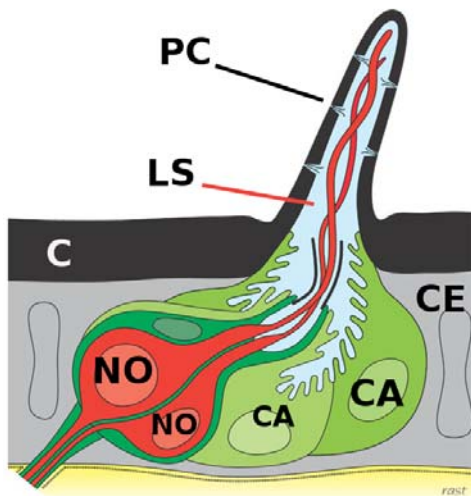


Figura 5.1.2. Esquema de la composició d'una sensila olfactiva. **C:** Cutícula, **CA:** Cèl·lula accessòria, **CE:** Cèl·lula epidèrmica, **LS:** Limfa sensorial, **NO:** Neurona olfactiva, **PC:** Porus cuticular. (Kaisling 2004)

En el cas de les neurones olfactives responsables de la detecció feromonal, cada cèl·lula allotja el receptor corresponent a una determinada molècula feromonal. No obstant, una mateixa sensila pot contenir dendrites de dues neurones olfactives diferents, donant lloc a sensiles amb capacitat per a detectar dos compostos feromonals diferents (Steinbrecht 1987).

Els estudis d'electrofisiologia duts a terme en les espècies objecte d'estudi en aquesta tesi han permès assignar alguns components feromonals a les seves corresponents sensiles. En el cas de l'espècie *S. littoralis*, han estat descrits dos tipus de sensiles: curtes, amb sensibilitat per a volàtils de planta, i llargues, amb sensibilitat per a compostos feromonals. La gran majoria de les sensiles de tipus llarg contenen una neurona que respon al component feromonal majoritari ((*Z,E*)-9,11-14:OAc) i una segona neurona el lligand de la qual no ha estat encara identificat. A part d'aquesta, la única sensila que ha pogut ser caracteritzada fins al moment conté una neurona sensible al component minoritari (*Z,E*)-9,12-14:OAc i al (*Z*)-9-14:OH (Quero et al. 1996), un compost no emès per la femella d'aquesta espècie, sinó per la de l'espècie *Spodoptera exigua*. Aquest compost, amb efectes repel·lents sobre el mascle de *S. littoralis* tindria com a funció permetre la coexistència d'ambdues espècies en un mateix territori. En el cas de l'arna *Sesamia nonagrioides*, tots els components feromonals (a excepció feta del minoritari 12:OAc) han estat relacionats amb neurones olfactives concretes. Dels dos tipus funcionals de sensiles identificades, una respon al (*Z*)-11-16:OAc i al (*Z*)-11-16:OH, mentre que la segona ho fa al (*Z*)-11-16:OAc i al (*Z*)-11-16:Ald (Quero et al. 2004).

Un cop la molècula feromonal ha generat una resposta elèctrica en la corresponent neurona olfactiva, la senyal és transferida als lòbuls antenals, on serà parcialment processada, i finalment dirigida a les regions centrals del cervell de l'insecte per tal de provocar els canvis en el

comportament associats a la senyal feromonal (Hansson & Anton 2000).

5.1.1. Aspectes moleculars de la percepció feromonal

La molècula feromonal accedeix a la limfa sensorial a través dels porus cuticulars (figura 5.1.3). Donada la naturalesa hidrofòbica dels compostos olfactivs, les molècules necessiten d'unes proteïnes transportadores (PBPs, de *pheromone binding protein*) per tal de desplaçar-se a través de la limfa sensorial, fins assolir la superfície neuronal, on es troben situats els receptors olfactivs (ORs, de *olfactory receptors*). Finalment, la molècula feromonal és metabolitzada gràcies a l'acció dels enzims degradadors d'odorants (ODEs, de *odorant degrading enzyme*) presents a la limfa sensorial.

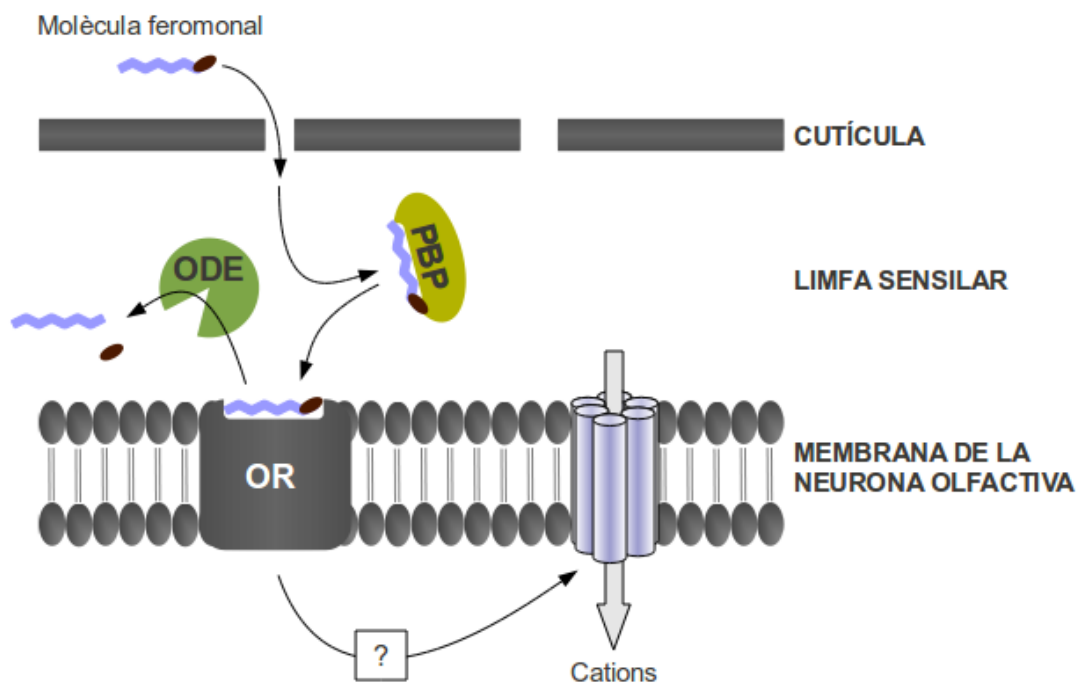


Figura 5.1.3. Model proposat per als mecanismes moleculars implicats en la percepció feromonal. **PBP**: proteïna d'unió a feromones, **OR**: receptor olfactiu, **ODE**: enzim de degradació d'odorants.

Tot i el progressos assolits en l'estudi de l'engranatge bioquímic que fa possible la detecció feromonal, alguns aspectes del mecanisme precís, així com del grau de participació de cadascun dels elements proteics, estan encara pendents d'esclariment. D'altra banda, no es descarta la participació directa d'altres grups de proteïnes, com ara les anomenades proteïnes sensorials de la membrana neuronal (SNMP, de *sensory neurone membrane protein*), que si bé resulten importants per a la detecció de la senyal, encara no se'ls ha atribuït una funció concreta (Rogers et al. 1997).

Proteïnes de transport d'odorants

Les proteïnes responsables del transport de la molècula d'odorant a través de la limfa sensilar, anomenades genèricament *odorant-binding proteins* (OBPs) es poden dividir en dos grups altament conservats: Les proteïnes d'unió a feromones (PBPs) i les proteïnes d'unió a odorants en general (GOBPs, de *general odorant-binding proteins*), responsables del transport d'altres molècules volàtils, com per exemple les kairomones produïdes per les plantes.

Ambdós grups de proteïnes són secretades per les cèl·lules accessòries i es troben habitualment a una elevada concentració a la limfa sensilar (de l'ordre de 10 mM, en l'arna *Antheraea polyphemus*, (Klein 1987)). Degut a l'abundància de les OBPs a la limfa sensilar, aquestes proteïnes van ser les primeres en ser identificades i caracteritzades en l'antena dels lepidòpters. No obstant, després de més de dues dècades d'estudi, alguns aspectes clau del seu mecanisme són encara motiu de controvèrsia.

En els primers estadis de l'estudi de les PBPs, es va observar la coexistència de dos estats d'oxidació d'aquestes proteïnes, imbuït a la conclusió de que el mecanisme responsable de la captura i alliberament de la molècula feromonal es basava en l'oxidació o reducció d'un pont disulfur entre dues cisteïnes altament conservades de la molècula. No obstant, diversos estudis per ressonància magnètica nuclear (RMN) duts a terme recentment han posat de manifest la formació i desaparició d'una hèlix alfa en l'extrem C-terminal de la cadena, provocades per un canvi en el pH (Leal et al. 2005). Segons aquesta teoria, el descens del pH a les regions properes a la membrana cel·lular (produït per l'acumulació de protons a les proximitats dels fosfolípids de membrana), afavoriria la formació d'una hèlix alfa, emplaçada al mateix lloc de la proteïna on hi resideix la molècula feromonal, que seria desplaçada cap al medi.

El segon aspecte que ha estat objecte de controvèrsia és l'especificitat de les PBPs i, per tant, la seva possible participació en la selectivitat de la percepció feromonal. Alguns estudis *in vitro* duts a terme amb proteïna recombinant mostren una capacitat de les PBPs per unir diverses molècules d'una mateixa mescla feromonal (Leal et al. 2009). No obstant, estudis més acurats duts a terme recentment posen de manifest com aquesta aparent inespecificitat desapareix quan la concentració de la molècula feromonal és propera al rang de concentracions natural de la feromona a la limfa sensilar (Forstner et al. 2009).

Receptors

L'estudi dels receptors implicats en la detecció feromonal (i d'odorants en general) és notòriament més recent que la de la resta de grups de proteïnes implicades de forma activa en aquest procés. La identificació del primer receptor olfactiu en mamífers (Buck & Axel 1991) va ser mereixedor del

premi Nobel de Medicina l'any 2004. Aquest descobriment, juntament amb la seqüenciació del genoma de *Drosophila melanogaster* i *B. mori* va obrir la porta a la identificació i posterior caracterització de nombrosos potencials receptors olfactivus en els insectes. No obstant, l'homologia entre els receptors d'odorants de mamífers i els corresponents ortòlegs en lepidòpters ha resultat ser més baixa de l'esperada, i fins i tot s'han identificat diferències notables en la seva estructura i funció.

La primera gran diferència observada entre els receptors olfactivus de mamífer i d'insecte va ser que, malgrat tenir certa proximitat de seqüència amb els receptors acoblats a proteïna G (GPCR, de *G protein coupled receptors*) presents en els mamífers, els receptors d'odorants d'insectes tenien una orientació invertida en la membrana, amb l'extrem C-terminal situat a l'espai extracel·lular (oposada a la dels GPCR), impossibilitant-ne la interacció amb una proteïna G (Jordan et al. 2009). Aquesta activitat independent de proteïna G va ser també confirmada en experiments en cèl·lules en cultiu, en que la cèl·lula produïa una resposta quan el receptor era estimulat en presència d'inhibidors de la via de transducció de senyal de la proteïna G (Smart et al. 2008). No obstant, experiments *in vivo* duts a terme amb individus de *D. melanogaster* en que una lipasa de diacilglicerols (necessària per a l'acció de la proteïna Gq) ha estat mutada, mostren una relació de dependència entre la resposta olfactiva i aquesta via de transducció de la senyal (Kain et al. 2009).

Una altra diferència important dels receptors d'insectes respecte dels receptors olfactivus de mamífers és la coexpressió, en totes les espècies estudiades fins al moment, d'un segon receptor present en totes les neurones olfactives de l'antena. Aquest segon receptor (anomenat OR83b en *D. melanogaster* i OR2 en les altres espècies d'insectes), forma un heterodímer amb el receptor específic, i resulta imprescindible per a l'activació i funcionament d'aquest (Nakagawa et al. 2005; Wicher et al. 2008).

A l'espera de més dades experimentals que aportin una informació detallada sobre el funcionament dels receptors olfactivus en els insectes, el model més plausible proposat fins al moment, i compatible amb les evidències experimentals, és el d'un mecanisme dual, que podria funcionar o bé com a receptor metabotròpic o bé com a receptor ionotròpic (figura 5.1.4). Segons aquest model (Ha & Smith 2008), l'estimulació per una elevada dosi de molècules d'odorant, permetria l'obertura d'un canal iònic entre els dos membres de l'heterodímer. En contraposició a aquest escenari, l'estimulació per una baixa dosi de molècules d'odorant, n'activaria només el receptor específic que, a través d'alguna via dependent de proteïna G, acabaria activant el receptor auxiliar, fent-lo actuar de canal iònic. Òbviament, aquesta hipòtesi és encara excessivament especulativa, i cal una major informació molecular del procés per tal de poder dibuixar un

esquema clar que expliqui el funcionament de la detecció d'odorants en les neurones olfatives.

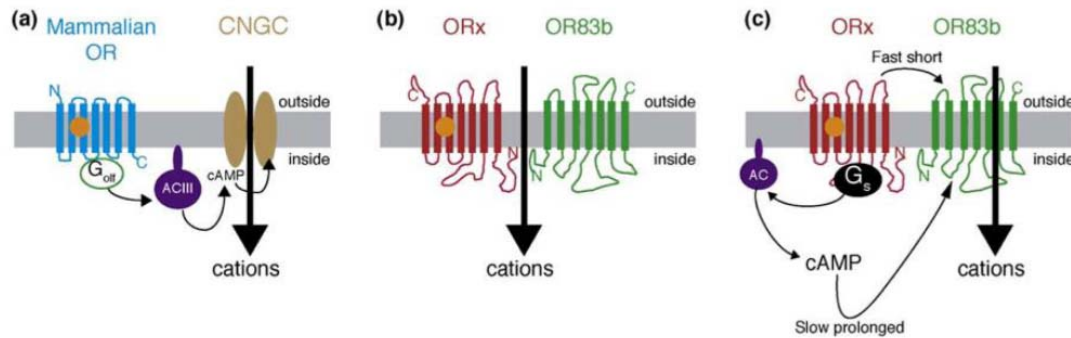


Figura 5.1.4. Models de funcionament dels receptors olfactivs. **(a)**: Transducció de la senyal olfactiva en mamífers. **(b)** i **(c)**: Possibles models proposats per a la transducció de la senyal olfactiva en insectes. **OR**: receptor olfatiu, **CNGC**: canal iònic dependent de nucleòtids cíclics (de l'anglès, *cyclic nucleotide-gated chanel*), **AC**: adenilat ciclasa. Extret de (Nakagawa & Vosshall 2009)

Proteïnes sensorials de la membrana neuronal (SNMP)

Les SNMPs són proteïnes de baix pes molecular amb dos únics segments transmembrana i homòlogues a una família de proteïnes anomenades en els vertebrats CD36 (Rogers et al. 2001). Aquesta família de proteïnes conté receptors i transportadors amb una elevada capacitat d'unió de molècules de tipus lipídic. Si bé en els vertebrats s'ha pogut establir una clara funció per a les proteïnes CD36, relacionades amb la incorporació de molècules lipídiques a la cèl·lula, la funció de les seves homòlogues en insectes (SNMPs) és encara desconeguda. Ha estat proposat que les SNMPs podrien jugar un paper clau en la transferència de la feromona des de la proteïna transportadora fins al receptor (Benton et al. 2007). No obstant, altres estudis els hi han atribuït una funció de finalització de la senyal per mitjà de la inhibició del complex lligand-receptor (Jin et al. 2008).

Enzims de degradació feromonal

Tal i com s'ha descrit anteriorment, les antenes dels insectes estan dissenyades per a filtrar grans quantitats d'aire i incorporar les molècules volàtils presents a l'ambient. Més enllà d'aportar informació rellevant sobre l'entorn, molts d'aquests volàtils són simplement xenobiòtics ambientals que han de ser inactivats i/o eliminats de la limfa sensilar per tal que no puguin danyar les neurones olfatives. Aquest metabolisme de volàtils, però, no té únicament una funció protectora, sinó que constitueix una peça clau en la dinàmica de percepció de semioquímics. Durant l'aproximació del mascle a través de la ploma feromonal generada per la femella, es produeix un vol en zig-zag que permet a aquest escanejar l'ambient per tal de detectar la presència o absència

de feromona. Perquè aquesta discriminació es produeixi, la senyal generada per la feromona que interacciona amb el receptor ha de ser eliminada ràpidament. En experiments d'electrofisiologia s'ha pogut observar que la despolarització provocada per l'estimulació d'una sensilla mitjançant una baixa quantitat de feromona es recupera en aproximadament 50 ms (Kaissling 1998). Tenint en compte la resta de processos que han de tenir lloc per tal que l'alliberació del receptor sigui traduïda en una repolarització, la molècula feromonal ha de ser eliminada del centre actiu en un període de temps de l'ordre de pocs milisegons.

Encara avui dia existeix certa controvèrsia sobre quin és l'element responsable directe d'aquesta ràpida finalització de la senyal. Ha estat proposat que sigui el propi receptor el responsable de la finalització de la senyal (Kaissling 1998), o que es produeixi un segrest de la molècula feromonal, ja sigui per part dels SNMPs (Jin et al. 2008) o de les PBPs (Kaissling 2009a). Però la hipòtesi per a la qual existeixien més evidències experimentals és la que en responsabilitza els enzims de degradació d'odorant (ODEs), més concretament els enzims de degradació de feromones (PDE, de l'anglès *Pheromone degrading enzymes*). En una primera aproximació, duta a terme amb un enzim parcialment purificat, es va concloure que el temps de vida mitja de la feromona a la limfa sensilar seria de 15 ms en cas que es tingués en consideració únicament l'acció de la PDE (Vogt et al. 1985). Posteriorment, assajos d'activitat realitzats amb aquesta mateixa proteïna expressada de forma recombinant, van atribuir a l'enzim una K_{cat} de 127 s^{-1} , reafirmant la capacitat de l'enzim per degradar ràpidament la feromona (Ishida & Leal 2005).

La naturalesa química dels volàtils a que estan exposats els insectes és molt àmplia, donant lloc també a una gran diversitat dels enzims que formen part de la maquinària catabòlica present a les antenes. Fins al present han estat identificats enzims pertanyents a les famílies de la glutatió S-transferasa (GST) i citocrom P450 (CYP450) (Claudianos et al. 2006), UDP glucuronosil transferasa (UGT) (Lazard et al. 1991), epòxid hidrolasa (EH) (Prestwich et al. 1989), carboxil/colin esterasa (CCE) (Oakeshott et al. 1999), alcohol deshidrogenasa (ADH) (Kasang et al. 1989) i aldehyd oxidasa (AOX) (Rybczynski et al. 1990). No obstant, la diversitat estructural dels volàtils en general no es correspon a la de les feromones, reduint també el ventall d'enzims potencialment responsables de la degradació feromonal. Tal i com s'ha dit anteriorment, les feromones de la major part dels lepidòpters estudiats fins al moment estan formades per mescles d'acetats, amb la presència d'alguns alcohols i aldehids (<http://www.pherobase.com>). En el cas de les espècies utilitzades en aquesta tesi, els compostos que constitueixen les mescles feromonals són de tipus acetat, a excepció feta d'un alcohol i un aldehyd, presents ambdós de forma molt minoritària a la feromona de l'espècie *S. nonagrioides*. Així doncs, les proteïnes susceptibles de ser PDEs en les dues espècies objecte d'estudi pertanyen a la família de les CCE.

Carboxil/colin esterases

Les carboxil/colin esterases (EC: 3.1.1.1) catalitzen la hidròlisi d'èsters alifàtics i aromàtics, amides i tioèsters mitjançant l'addició d'una molècula d'aigua. Estructuralment pertanyen a la superfamília d'hidrolases amb plegament tipus α/β (α/β -hidrolases), una superfamília d'evolució divergent, caracteritzada estructuralment per la presència de vuit làmines β quasi paral·leles i alternades per hèlix α (figura 5.1.5) (Holmqvist 2000).

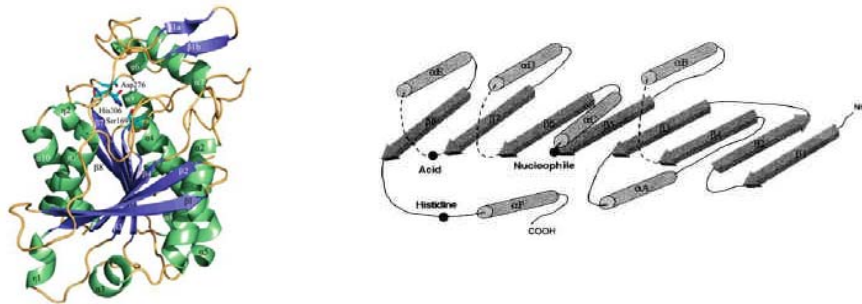


Figura 5.1.5. Estructura (esquerra) i esquema de l'estructura secundària (dreta) de les α/β -hidrolases.

El mecanisme d'acció d'aquesta família d'enzims transcorre per mitjà de la intervenció de tres residus (anomenats la tríada catalítica), altament conservats en la seqüència primària. Una serina, situada sempre en el centre del pentapeptid GXSXG, és la responsable de l'atac nucleòfil al carbonil de l'èster (figura 5.1.6). Els altres dos residus de la tríada catalítica (His i Asp, en el cas de les acetilcolinesterases; i His i Glu en el cas de la resta de carboxilesterases) tenen com a funció augmentar el caràcter nucleofílic de l'hidroxil de la Ser catalítica (Redinbo & Potter 2005).

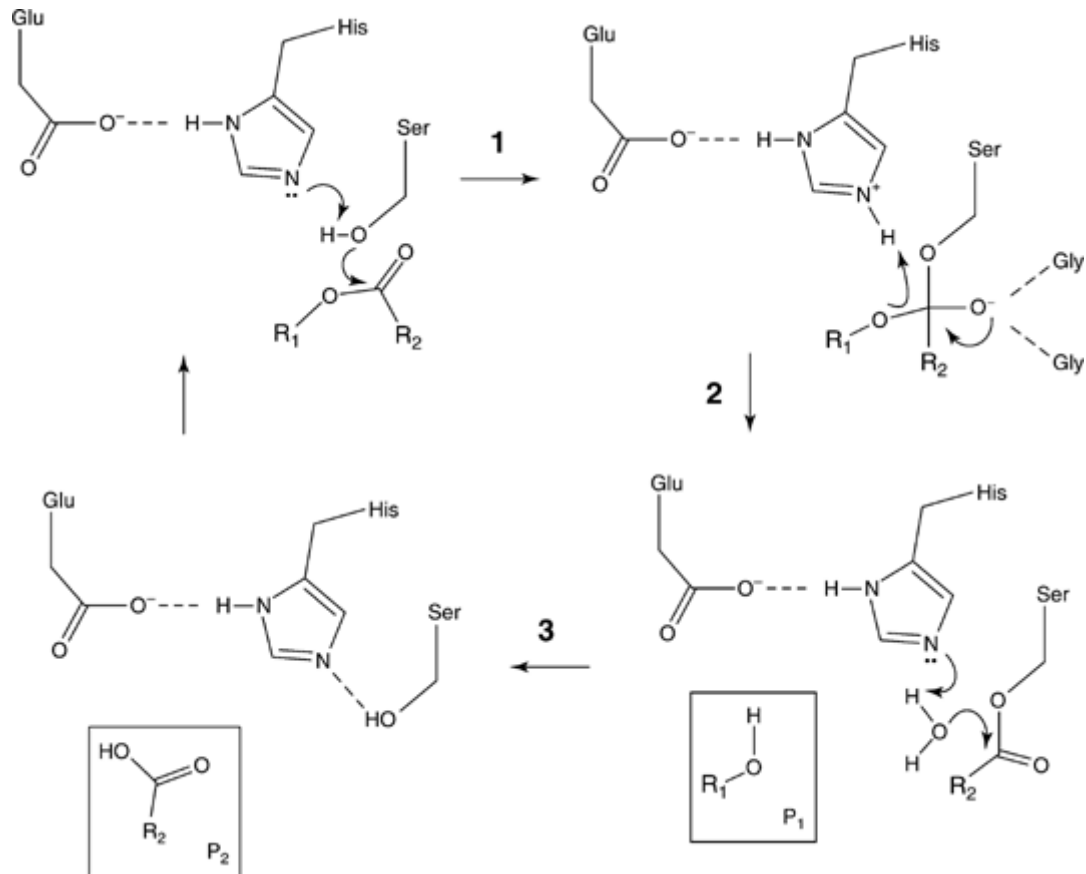


Figura 5.1.6. Esquema del mecanisme catalític de les carboxilesterases (CEs). Les posicions dels residus Ser, His i Glu implicats es troben altament conservades en les seqüències d'aminoàcids.

La família de les CEs està àmpliament estesa per entre els éssers vius, essent la seva funció principal la detoxificació de xenobiòtics ambientals i alimentaris. Si bé la flexibilitat de la seva estructura acostuma a donar una àmplia capacitat a la major part de les CEs per a acceptar diferents substrats (Wadkins et al. 2001; Hosokawa 2008), recentment han estat caracteritzats enzims amb una clara preferència per cadenes de diferent tamany (Durand et al. 2010), i fins i tot amb selectivitat per a una determinada configuració d'un centre estereogènic (Ishida & Leal 2008).

Les primeres evidències sobre el paper que podien tenir les CCEs en la finalització de la senyal feromonal en aquells insectes que tenien acetats en la seva feromona es van observar en el lepidòpter *Antheraea polyphemus*. Després que una electroforesi nativa posés de manifest la presència d'una CE expressada únicament a les antenes de l'insecte, l'enzim va ser parcialment purificat, demostrant-se la seva capacitat per hidrolitzar la feromona de l'insecte, amb una Km de 2,23 μM (Vogt & Riddiford 1981). Els treballs de biologia molecular sobre les CEs amb una funció degradadora de feromones es van iniciar novament amb el lepidòpter *A. polyphemus*. L'esterasa identificada inicialment per Vogt i col·laboradors va resultar ser una mescla de dues isoformes

(Ishida & Leal 2005; Ishida & Leal 2002), una de les quals fou la primera CE antenal d'un insecte en ser expressada en un sistema recombinant i purificada (Ishida & Leal 2005). Els assajos d'activitat duts a terme amb l'enzim recombinant van confirmar l'elevada afinitat i capacitat de degradació de la molècula feromonal ($K_m = 1,2 \mu\text{M}$ i V_{max} de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Si bé aquesta elevada afinitat de l'enzim pel compost feromonal és coherent amb la baixa concentració en que aquestes molècules són alliberades a l'ambient, la segona PDE caracteritzada cinèticament va resultar tenir una K_m de $700 \mu\text{M}$ (Ishida & Leal 2008). No obstant, donat que el nombre d'enzims estudiats des d'un punt de vista de l'activitat és encara baix, resulta prematur treure conclusions sobre el grau de conservació de les seves propietats cinètiques.

Més enllà de les CEs caracteritzades des d'un punt de vista cinètic, els projectes de seqüenciació de genomes i de bancs de marcadors de seqüència expressada (EST, de l'anglès *expression sequence tag*), així com els avenços en biologia molecular en general, han permès la identificació de nombroses seqüències codificants per esterases d'insecte. Malgrat l'absència de dades d'activitat, la predicció bioinformàtica de pèptids senyal i/o l'absència d'aminoàcids essencials per a l'activitat va permetre l'any 2005 elaborar una primera classificació filogenètica de les CCEs. Tot i que algunes de les relacions filogenètiques són febles degut a la baixa identitat que hi ha entre les seqüències, que pot ser menor al 20% en esterases d'una mateixa espècie (Claudianos et al. 2006), aquesta classificació constitueix encara una referència per a noves CCEs identificades (Oakeshott et al. 2005) (figura 5.1.7).

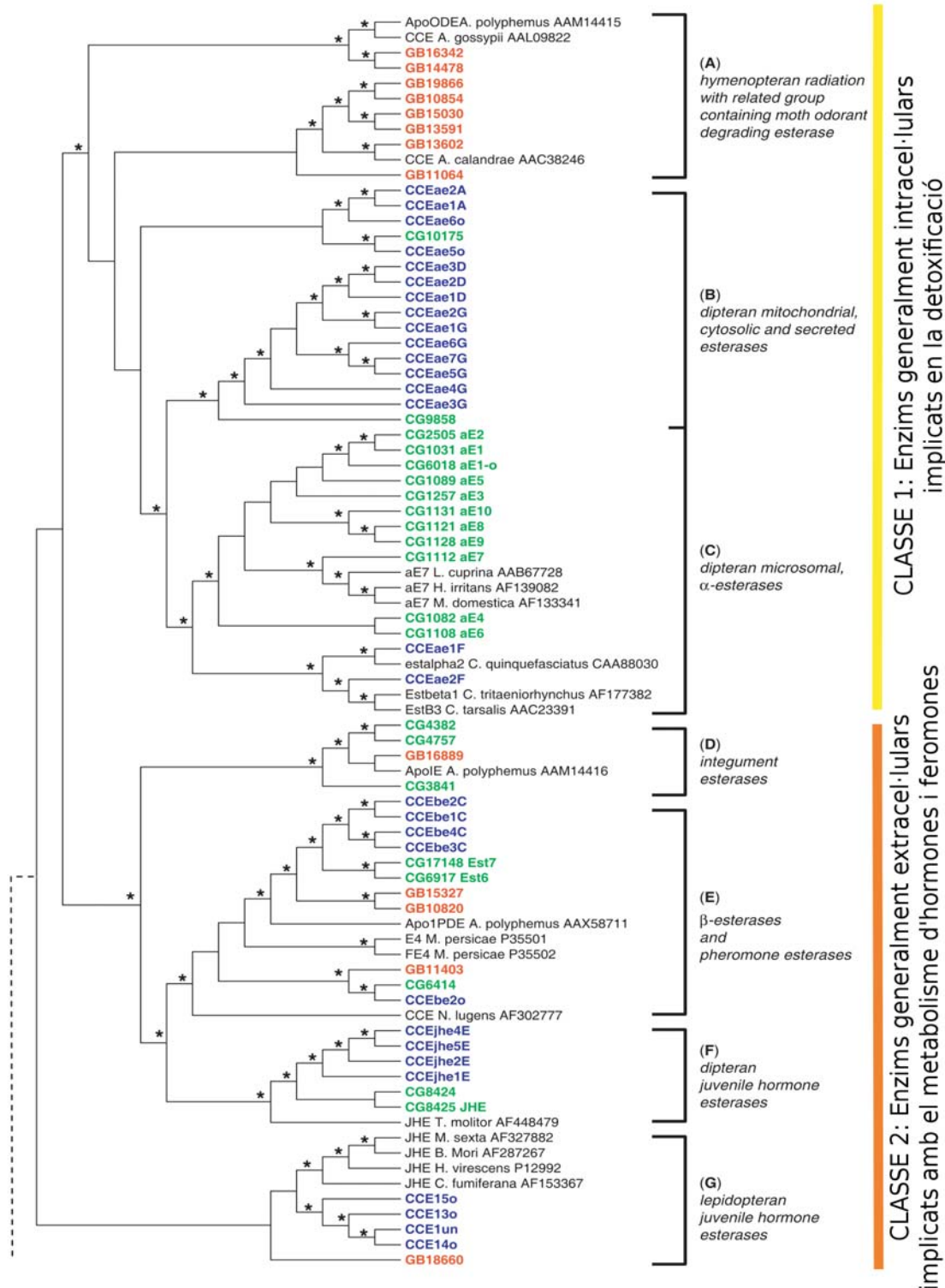
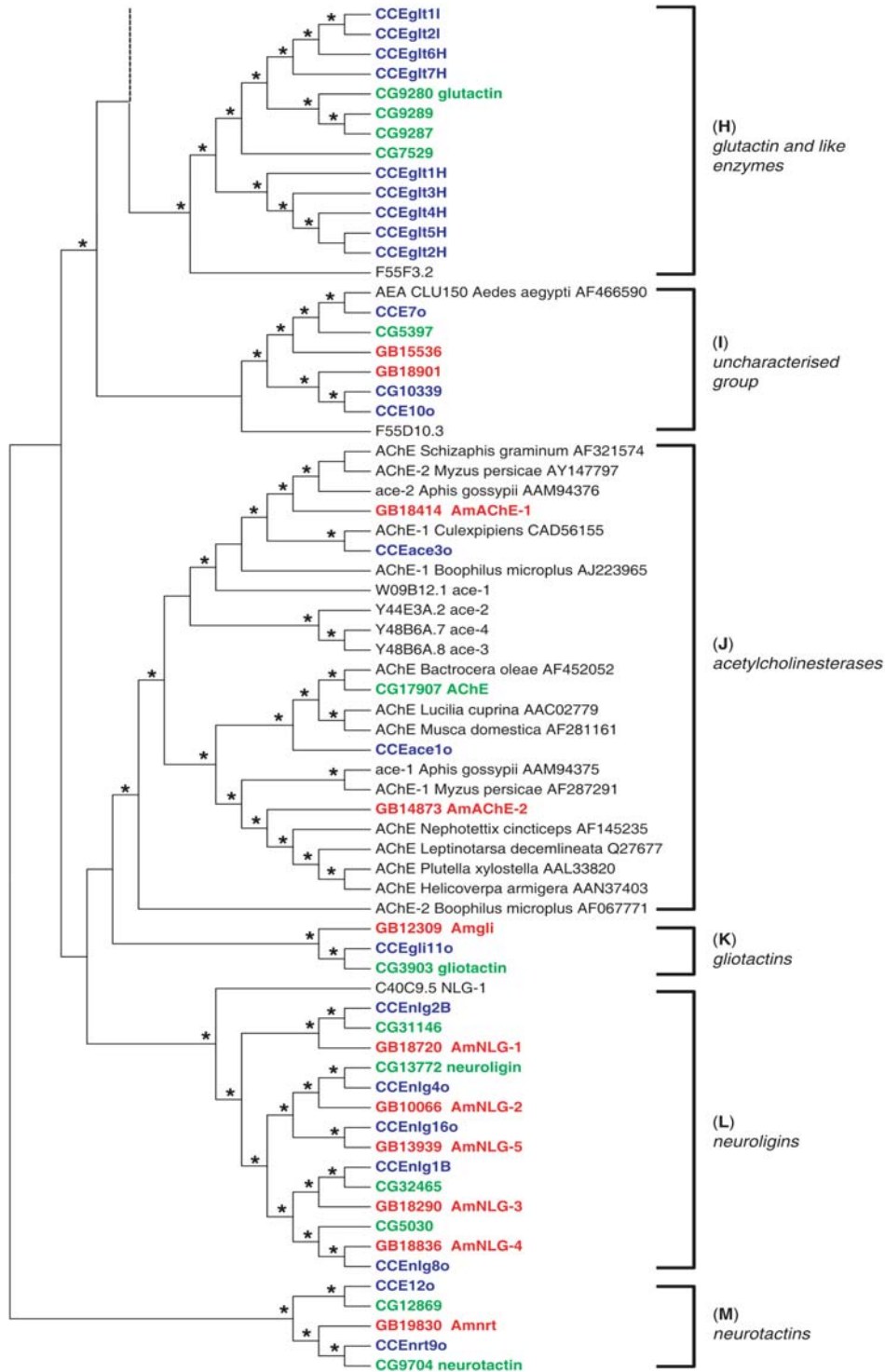


Figura 5.1.7. Arbre filogenètic de les carboxil/colinesterases d'insecte. En vermell, les seqüències de *Apis mellifera*, en verd les de *Drosophila melanogaster* i en blau les d'*Anopheles gambiae*. La resta de seqüències incloses en l'anàlisi contenen els números d'accés de GenBank. L'asterisc indica un valor de *bootstrap* igual o superior al 50% (Claudianos et al. 2006). (Continua a la pàgina següent)



Funcions neurològiques i de desenvolupament (inclou proteïnes no catalítiques)

Continuació figura 5.1.7

Segons aquesta classificació, les CCEs són dividides en tres grans classes (assignades segons la funció predita) que, al seu torn, es subdivideixen donant lloc a un total de 13 grups.

La CLASSE 1 (anomenada de dieta i detoxificació) inclou enzims generalment intracel·lulars, potencialment implicats en el metabolisme o la detoxificació de compostos d'origen alimentari. Dels tres grups que conté, el primer en ser identificat va ser el **C**, inicialment anomenat α -esterases per la preferència d'aquests enzims per hidrolitzar l'acetat d' α -naftil en comparació amb el de β -naftil (Oakeshott et al. 2005). El grup **C** inclou enzims de *D. melanogaster* presumiblement relacionats amb el metabolisme de xenobiòtics alimentaris, i enzims de mosquits relacionats amb la detoxificació d'insecticides. El grup **A** ha estat també relacionat amb la detoxificació d'insecticides. Representat sobretot per enzims d'himenòpters (abelles en particular), en els enzims del grup **A** s'han identificat casos de resistència a pesticides, ja sigui per un augment dels nivells de transcrit, o bé per mutacions que augmenten l'eficàcia de degradació de pesticides (Cao et al. 2008; Pan et al. 2009). Finalment, la CLASSE 1 conté un darrer grup (anomenat **B**), que inclou seqüències de dípters pertanyents inicialment al grup **C**, però que van ser agrupades per les anàlisis filogenètiques en un grup independent (Oakeshott et al. 2010).

La CLASSE 2 (anomenada hormonal i semioquímica) conté enzims extracel·lulars involucrats, entre d'altres, en la degradació hormonal o feromonal, i està dividida en quatre grups (**D** a **G**). El **D** és un grup reduït que inclou esterases presumiblement relacionades amb la degradació de compostos hidrofòbics adsorbits a les cutícules de l'insecte. Un dels casos més destacables en el context del catabolisme feromonal és el de l'esterasa integumental d'*Antheraea polyphemus* (Apol-IE) que, tot i no existir-ne una verificació funcional, estaria involucrada en la degradació de la feromona dipositada a la cutícula de l'animal (Ishida & Leal 2002). El grup **E** inclou les primeres esterases identificades com ODEs. Els dos casos més representatius són l'esterasa sensilar d'*A. polyphemus* (Apol-PDE) (Ishida & Leal 2005) i l'esterasa *est6* de *D. melanogaster*, activa en la degradació de l'acetat de *cis*-vaccenil, una feromona d'agregació de la mosca del vinagre (Mane et al. 1983). Finalment, els grups **F** i **G** contenen esterases de degradació de l'hormona juvenil en dípters i lepidòpters, respectivament. Aquesta hormona juga un paper molt important en el control del cicle biològic de l'insecte, com ara el desenvolupament postembrionari, la metamorfosi o la maduració del sistema reproductiu (Gilbert et al. 2000). L'hormona juvenil (JH, de *Juvenil Hormone*) és alliberada a l'hemolimfa en grans quantitats, per la qual cosa necessita ser eliminada ràpidament un cop exercida la funció corresponent. Per la seva estructura sesquiterpènica, la JH únicament és degradada eficaçment per aquest grup d'esterases, que tenen un grau de conservació particularment elevat dins la família (Kamita et al. 2003).

Finalment, la tercera classe (neuro/desenvolupament) està formada per sis grups (**H** a **M**), dels

quals el **J** correspon a les acetilcolinesterases (AChE), mentre que els cinc restants corresponen a proteïnes no catalítiques de tipus esterasa (CLAMS, de *choline-esterase like adhesion molecules*). Les AChE, àmpliament estudiades tant en vertebrats com en insectes, participen del metabolisme del neurotransmissor acetilcolina. La seva rellevància en els insectes es deu a que les AChE són la diana de nombrosos pesticides clàssics de tipus organofosforat (Sturm et al. 2000). Les CLAMS inclouen proteïnes com les glutactines, les gliotactines, les neuroligines i les neurotactines. Han estat molt estudiades en vertebrats i recentment se n'han trobat representants en els insectes. En general, es tracta de proteïnes transmembrana amb un domini extracel·lular de tipus carboxil/colinesterasa que, en la major part dels casos, no contenen el residu de Ser necessari per a l'activitat. Es troben expressades de forma ubiqua en una gran varietat de teixits, i sembla que podrien jugar un paper important en l'adhesió cel·lular per a la formació d'unions sinàptiques (Gilbert & Auld 2005).

5.2. Resultats

5.2.1. Identificació de proteïnes amb activitat esterasa en *S. littoralis* i *S. nonagrioides*

En un estadi preliminar de la identificació de potencials enzims de degradació feromonal, es va estudiar la presència de proteïnes amb activitat esterasa en diferents teixits de l'insecte, per tal de detectar la presència d'isoformes que fossin expressades específicament o majoritària en l'òrgan olfatiu. Els diferents teixits seleccionats van ser homogeneïtzats i les proteïnes extretes van ser separades mitjançant una electroforesi o un isoelectroenfoc, ambdós en condicions no desnaturitzants. Finalment, les proteïnes amb activitat esterasa es van detectar amb la tinció d'acetats de naftil.

Electroforesi no desnaturitzant

Metodologia: 3.6.6. i 3.6.9.

La separació mitjançant una electroforesi en condicions no desnaturitzants de les proteïnes de l'extracte antenal va revelar la presència d'un mínim de 7 enzims amb activitat esterasa tant en *S. nonagrioides* com en *S. littoralis*, no apreciand-se diferències entre els patrons de mobilitat electroforètica dels extractes d'antena de mascles i de femelles en cap dels dos casos (figura 5.2.1).

En una primera electroforesi, duta a terme amb quantitats arbitràries de cada teixit (figura 5.2.1), una de les bandes apareixia específica de les antenes en l'arna *S. nonagrioides*, mentre que en *S. littoralis* cap de les bandes mostrava una especificitat d'expressió en les antenes.

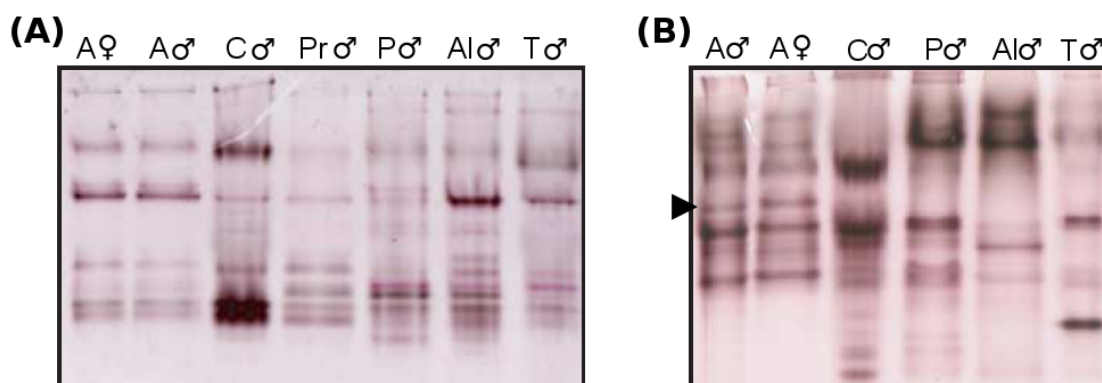


Figura 5.2.1. Electroforesi no desnaturitzant dels extractes proteics (no quantificats) de diferents teixits de *S. littoralis* (A) i *S. nonagrioides* (B) tenyits amb un revelat específic d'activitat. **A:** antenes, **C:** cervell, **Pro:** probòscide, **P:** potes, **T:** tòrax i **Al:** ales. El triangle indica la banda

observada únicament a l'antena.

Una segona electroforesi (figura 5.2.2), aquest cop utilitzant la mateixa quantitat de proteïna total (15 µg de cadascun dels teixits per *S. littoralis* i 50 µg per *S. nonagrioides*), va permetre mostrar com també en el cas de l'espècie *S. littoralis* una de les bandes apareixia només en el teixit olfactiv de l'insecte.

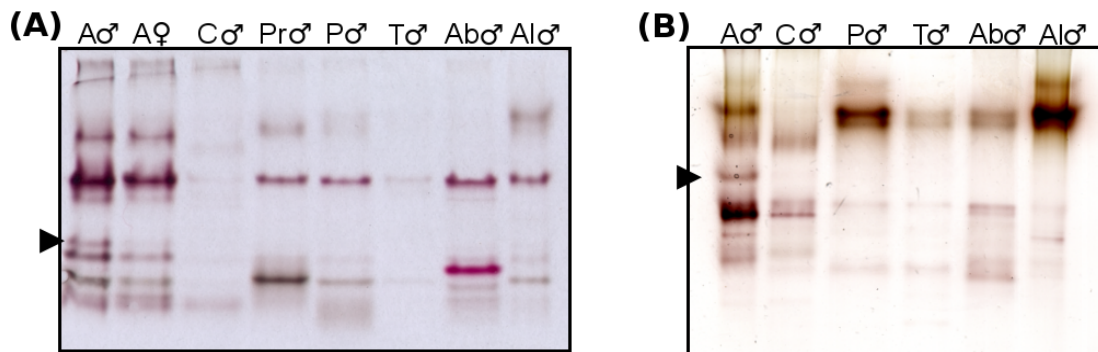


Figura 5.2.2. Electroforesi no desnaturalitzant dels extractes proteics (amb la mateixa quantitat de proteïna total en cada teixit) dels diferents teixits de *S. littoralis* (A) i *S. nonagrioides* (B) tenyits amb un revelat específic d'activitat. **A:** antenes, **C:** cervell, **Pro:** probòscide, **P:** potes, **T:** tòrax, **Ab:** abdomen i **Al:** ales. El triangle indica les bandes observades únicament a l'antena.

Isoelectroenfoc no desnaturalitzant

Metodologia: 3.6.7.

De forma anàloga a l'exploració duta a terme mitjançant una electroforesi nativa, els extractes proteics corresponents a diferents teixits de l'insecte van ser separats en funció del seu punt isoelèctric en condicions no desnaturalitzants.

Els resultats van mostrar novament la presència de diverses proteïnes amb activitat esterasa a les antenes, la major part de les quals tenien un patró d'expressió no específic pel teixit olfactiv (figura 5.2.3). En el teixit antenal, a excepció feta d'una esterasa, totes les bandes van aparèixer concentrades en una regió de punt isoelèctric natiu d'entre 4 i 6. No obstant, l'IEF mostrava la presència d'una esterasa específica de les antenes en tots dos insectes. La interpolació en la recta de calibratge dels marcadors de punt isoelèctric ($r^2=0,98$ en tots dos casos) va permetre estimar el punt isoelèctric no desnaturalitzant d'aquestes dues esterases específiques de l'antena en 6,2 i 7,7 en *S. littoralis* i *S. nonagrioides*, respectivament.

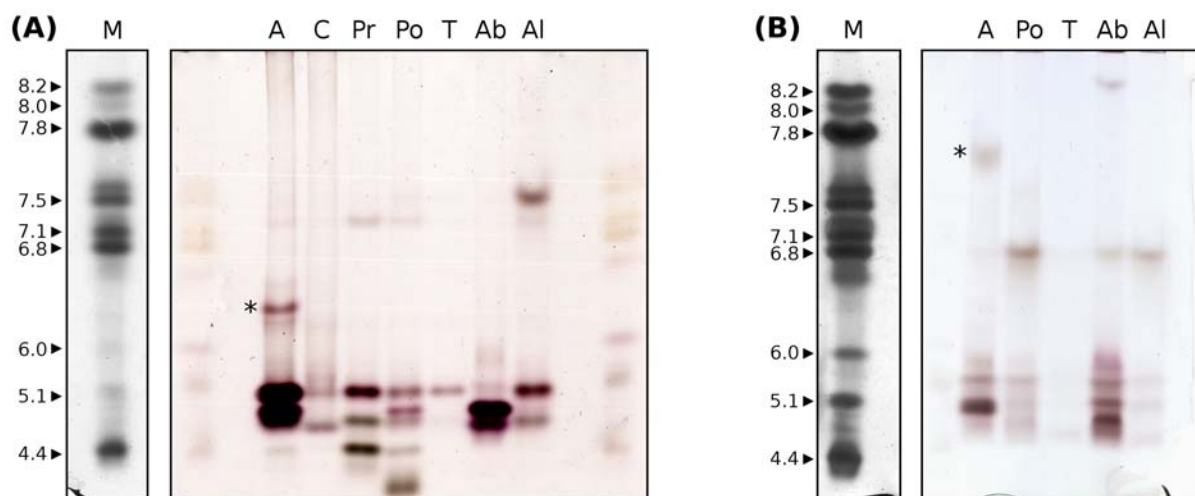


Figura 5.2.3. Isoelectroenfoc dels extractes proteics de *S. littoralis* (A) i *S. nonagrioides* (B), revelats amb la tinció d'acetats de naftil. **M:** marcadors de punt isoelèctric, **A:** antenes, **C:** cervell, **Pr:** probòscide, **Po:** potes, **T:** tòrax, **Ab:** abdomen, **Al:** ales. Els asteriscs mostren les bandes específiques de l'antena.

5.2.2. Aïllament i caracterització d'esterases de *S. nonagrioides*

Clonació del cDNA d'Snon-EST1

Metodologia: 3.2. i 3.3.2.

Paral·lelament a la identificació de proteïnes als teixits de l'insecte, en el cas de l'arna *S. nonagrioides* es va dur a terme un intent d'identificar una seqüència de cDNA codificant per una CE a les antenes de l'insecte. Amb aquesta finalitat, es va plantejar una estratègia basada en la PCR amb oligonucleòtids degenerats, que van ser dissenyats a partir d'un alineament d'altres esterases de lepidòpter identificades fins al moment. Aquest treball va ser dut a terme en col·laboració amb la unitat *Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication* (UPMC-INRA, France).

L'amplificació per 3'RACE-PCR amb l'oligonucleòtid degenerat 3'ESTSnUp i l'oligonucleòtid UPM (Clontech) va donar com a resultat un fragment de DNA de 1340 pb. Després d'extendre la seqüència obtinguda en 5' i amplificar la totalitat del cDNA mitjançant oligonucleòtids específics, es va obtenir una seqüència de DNA de 1854 pb, que va ser anomenada Snon-EST (renombrada com Snon-EST1 en el present treball) i introduïda a la base de dades de GenBank amb el número d'accés DQ680829. La traducció teòrica del cDNA Snon-EST1 donava lloc a un ORF de 530 aminoàcids (figura 5.2.4), amb un pes molecular i un punt isoelèctric (calculats a partir de la seqüència primària d'aminoàcids) de 60 kDa i 7,0, respectivament. La cerca mitjançant l'eina

d'aliniament BLAST mostrava una similitud amb les altres seqüències d'esterases d'insecte. D'altra banda, l'alineament amb aquestes mateixes seqüències mostrava la presència en una posició altament conservada de la Ser del centre actiu de l'enzim (inclosa en el sí d'un pentapèptid característic d'aquesta família: Gly-X-Ser-X-Gly), així com la presència en una posició també conservada del Glu i la His que participen del centre actiu de l'enzim. L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids mitjançant el programa SignalP 3.0 va predir la presència d'un probable punt de clivatge entre l'Ala-19 i la Val-20, suggerint una secreció a l'espai extracel·lular d'aquesta proteïna. Finalment, una anàlisi amb el programa NetNGlyc va posar de manifest la presència de 4 residus susceptibles de ser N-glicosilats.

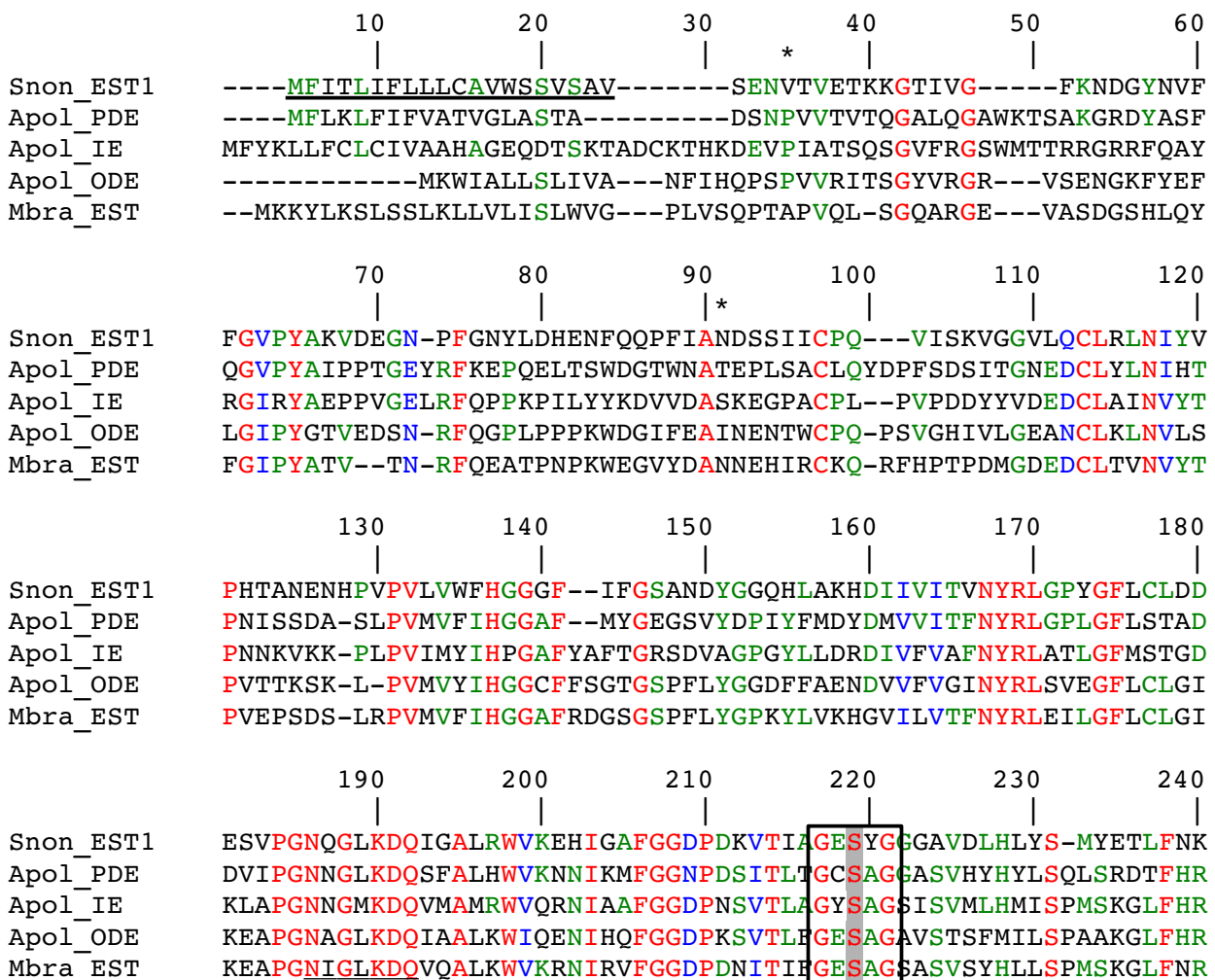


Figura 5.2.4. Alineament de l'esterasa Snon-EST1 (ABH01082) amb Apol-PDE (AAX58711), Apol-ODE (AAM14415), Apol-IE (AAM14416) i Mbra-EST (AAR26516). El pèptid senyal d'excreció extracel·lular està subratllat amb una línia simple, mentre que els asteriscs indiquen els residus potencialment glicosilables. Els residus de la tríada catalítica estan ombrejats, i el pentapèptid característic de les CEs enmarcat. (Continua a la pàgina següent).

	250	260	270	280	290	300
Snon_EST1	AIIESGSI	FTPGFYRHGDDKAA	AVTLAKHMGHRV	TRTKALEALAKED	PIDVMTAARNL	TM
Apol_PDE	GIAFSGS	AFDPWAFVAVKPVQ	NANTLASIVGCS	SDTSTEILNCL	MDASAEDIVNA	QNEFMFD
Apol_IE	GISM	SASPINKEPLPNN	FQSLAVKQAQI	VNCSTASNQAI	VDC	LKTISWKVLGDSL
Apol_ODE	AILQSG	SSLAPWGLQHP	IRRASALVKKF	GYDTPREIYSI	IISNRTINEL	INA-LKYED
Mbra_EST	AILQSG	SALSFWALQFEPL	KIASLHAQQMG	YTTTDPKEI	YNLFNNTADE	LLSYVPRKE
	310	320	330	340	350	360
Snon_EST1	R-----	LTPCRE	TRFRRSQH	FVTKCINHLN	NTDR	IKKIPIMIGYNSK
Apol_PDE	WK-VK	LFSHFTPTIE	AA-EVEDA	FLNKYPYQAA	VDGMDLNV	PLITAMNAQ
Apol_IE	GG-DPI	-GLWGPVV	END-FGQER	FLDIQPLDA	IRQGRFHS	VPHIISQTKY
Apol_ODE	KYCVADEN	IFVPCVEN	KIDGVEAV	VTDYPSNVI	KSGNYTK	VPMIIGYTDN
Mbra_EST	GDIVESDI	IFVPCVE	KKIRRVTP	FLPDS	PYNLITQ	GKYNKVP
	370	380	390	400	410	420
Snon_EST1	NKQQDFY	DNLQDIFSK	LQNNF	DVTKSELE	KLSDIVRT	FYLGSKKIG
Apol_PDE	IYLDEIE	SQWSVVAR	DLFKYND	TLSSTLW	SDVAAKI	KEEYFGDET
Apol_IE	FKN	DTLITRM	NDDWETA	ARVSP	LLPEKN	IRAAANKL
Apol_ODE	GLSIK	NNTELN	IMRNLQ	TDLF	PNEWEK	NC-TELNI
Mbra_EST	DTTL---	SKIDFY	KAMPRDL	TFFP	DEEKVK-	TANRLNEL
	430	440	450	460	470	480
Snon_EST1	SDFKLN	FAVEKSV	ARYMEQ	GGN-VY	KYMF	SYIGGSEY
Apol_PDE	TDRLF	IMDIGRL	AEIHAL	KSGQAT	VYKY	SYRATT
Apol_IE	RDSIT	SLGVHR	MANLM	CRHSK	HPVY	YEF
Apol_ODE	SDLHF	KFP	IIL	ESRMY	AETT	NQPI
Mbra_EST	GDADI	IYPV	LATID	LFLQ	TTRK	PVYAY
	490	500	510	520	530	540
Snon_EST1	EMTFEL	KSD	E-----	QRMIR	DKMT	TMWAN
Apol_PDE	NYPYID	ARTD	TDLQMI	YNLC	EMI---	YTYAST
Apol_IE	TMSYR	FPVIE	TTS	PHSY	VIDE	MALWY
Apol_ODE	K-PR	SFPL	PQRW	LESEM-	IKRM	VTLW
Mbra_EST	S-TL	TL	PALS---	EVSF-	IDK	FTLW
	550	560	570	580		
Snon_EST1	NIDVT	MSMED	HA-Y	RERMA	FWD	LFTQ
Apol_PDE	S-PN	STEM	KSSS-	DFGR	RS	FWD
Apol_IE	RIGN	KLTV	HKNM-	FEDR	YK	WDE
Apol_ODE	VIDS	RIT	TAP	MW-E	HAS	VAL
Mbra_EST	LIDR	ECS	MEP	VWGD	NEA	WR

Continuació **Figura 5.2.4**. Finalment, la seqüència utilitzada per al disseny de l'oligonucleòtid degenerat està subratllada amb una línia doble.

Caracterització del transcrit Snon-EST1

Metodologia: 3.4.1.

L'estudi de la distribució tissular del transcrit Snon-EST1 es va dur a terme mitjançant la tècnica de *Northern blot*. L'RNA extret de les antenes de l'insecte es va comparar amb l'RNA extret d'altres teixits no implicats en el procés olfatiu, com les potes, les ales, el tòrax, l'abdomen i el cervell. La incubació amb una sonda específica de 540 pb i el posterior revelat amb el substrat CSPD va posar de manifest la presència del transcrit en tots els teixits estudiats de l'insecte. A partir del càlcul de les intensitats de senyal i la ponderació amb els nivells d'expressió del gen control rpL8, es va poder concloure que el teixit que presentava una major quantitat d'mRNA d'Snon-EST1 era les ales, seguit de les potes i la resta de teixits (figura 5.2.5).

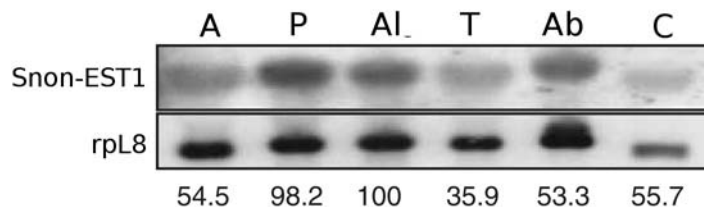


Figura 5.2.5. Anàlisi per *Northern blot* de la presència del transcrit de Snon-EST1 en diferents teixits de l'insecte. **A:** antenes, **P:** potes, **Al:** ales, **T:** tòrax, **Ab:** abdomen, **C:** cervell. Les xifres que apareixen a la part inferior corresponen al nivell de transcrit relatiu a la proteïna ribosomal Snon-L8.

Aïllament d'esterases específiques de les antenes de *S. nonagrioides*

Metodologia: 3.6.8.

Tot i el resultat satisfactori en la identificació d'un cDNA de CE a les antenes de l'insecte *S. nonagrioides*, el fet que tant l'electroforesi com l'isoelectroenfoc mostressin una banda específica de les antenes, va motivar l'intent d'aïllar el cDNA d'una CE amb especificitat antenal. L'estratègia plantejada va ser separar les proteïnes antenals mitjançant una electroforesi bidimensional, obtenir una seqüència de la proteïna d'interès mitjançant espectrometria de masses i finalment utilitzar la seqüència obtinguda per al disseny d'oligonucleòtids que permetessin amplificar el cDNA de la proteïna aïllada.

L'electroforesi bidimensional per a l'aïllament de la proteïna es va dur a terme mitjançant dues estratègies alternatives. En tots dos casos la segona dimensió va consistir en una electroforesi en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). Per a la primera dimensió, en canvi, es va utilitzar o bé

una electroforesi no desnaturant (PAGE) o bé un isoelectroenfoc.

Electroforesi bidimensional a partir d'una electroforesi no desnaturant

Donat que no es van trobar referències bibliogràfiques d'aquesta tècnica en particular, el procés va ser posat a punt i validat amb l'acetilcolin esterasa d'anguila elèctrica comercial (Sigma), establint-se finalment el procediment descrit a l'apartat 3.6.8 de material i mètodes. Un cop validat el procés amb l'esterasa comercial, es van dur a terme tres electroforesis bidimensionals a partir de 76, 120 i 122 equivalents d'antena (corresponents aproximadament a 230, 365 i 366 µg de proteïna, respectivament), obtenint-se en els tres casos 4 bandes clarament visibles en el revelat amb nitrat de plata de la segona electroforesi (figura 5.2.6). Els pesos moleculars aparents van ser calculats per interpolació en una recta de calibratge, construïda a partir dels logaritmes dels pesos moleculars dels marcadors ($r^2=0,98$), donant com a resultat els següents valors: 42 kDa, 52 kDa, 65 kDa i 75 kDa.

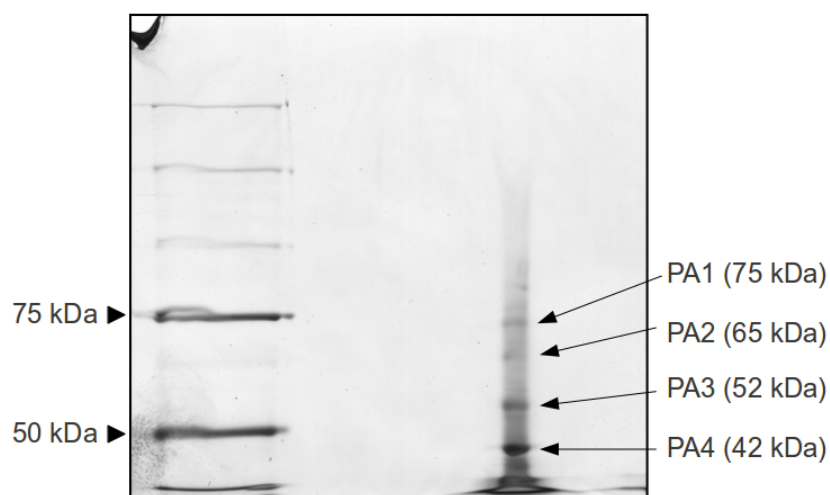


Figura 5.2.6. Tinció amb nitrat de plata de l'SDS-PAGE obtingut en la segona dimensió de la separació de proteïnes antenals.

Les quatre bandes (nombrades com PA 1-4) van ser retallades, digerides amb tripsina i seqüenciades per espectrometria de masses en tàndem. La primera anàlisi dels espectres de masses (realitzada amb el programa Mascot) va permetre establir similituds entre les proteïnes seqüenciades i d'altres proteïnes ja identificades i descrites a la literatura. La taula 5.2.1 mostra les similituds més rellevants.

Taula 5.2.1. Seqüències homòlogues als pèptids identificats per espectrometria de masses. La banda PA2 no va mostrar homologia per cap seqüència publicada en les bases de dades de proteïnes.

Mostra	Proteïnes coincidents	Espècie	Pes molecular
PA1	Dipeptidil peptidasa III	<i>Rattus norvegicus</i>	83,4 kDa
	Proteïna hipotètica H16_B242	<i>Ralstonia entropha</i>	11,7 kDa
PA2	-	-	-
PA3	Glucosa-6-fosfatasa	<i>Bombyx mori</i>	62,1 kDa
	Fosfoglucosa isomerasa	<i>Colias eurytheme</i>	62,0 kDa
	Esterasa	<i>Chilo suppressalis</i>	56,9 kDa
PA4	Enolasa	<i>Bombyx mori</i>	47,2 kDa
		<i>Monodelphis domestica</i>	47,6 kDa
		<i>Aedes aegypti</i>	46,9 kDa
		<i>Aphauarthrum glabrum</i>	39,4 kDa

De les quatre mostres analitzades, únicament l'anomenada PA3 contenia pèptids (concretament 2) amb homologia per una esterasa. Les seqüències assignades a aquests dos pèptids (obtingudes per identitat amb l'esterasa de *C. suppressalis*) van ser YPELLVPR i GIPYAKPPVGK. Aquest darrer pèptid, però, va resultar ser GIPYAQPPVGK en ser analitzat més acuradament amb el programa Peaks, que permet dur a terme seqüenciacions *de novo* a partir dels espectres de masses obtinguts. Pel que fa a l'altre pèptid, la seva seqüència no va poder ser confirmada amb claredat, ja que els aminoàcids Leu i Ile són isòmers i donen lloc al mateix espectre de masses. D'altra banda, la seqüenciació *de novo* dels altres espectres de masses obtinguts a partir de la mostra PA3 no va donar lloc a cap altre pèptid amb una clara identitat per proteïnes de la família de les CEs.

Electroforesi bidimensional a partir d'un isoelectroenfoc

En la segona estratègia plantejada per a la separació de proteïnes antenals de *S. nonagrioides*, l'electroforesi no desnaturant de la primera dimensió va ser substituïda per un isoelectroenfoc en condicions no desnaturants.

El procés es va dur a terme per duplicat i, en aquest cas, la tinció de plata de l'electroforesi va mostrar la presència de cinc bandes (la banda anomenada iPA3 estava formada per dues bandes sobreposades, figura 5.2.7), amb els pesos moleculars i punts isoelèctrics aproximats que es mostren a la figura 5.2.7.

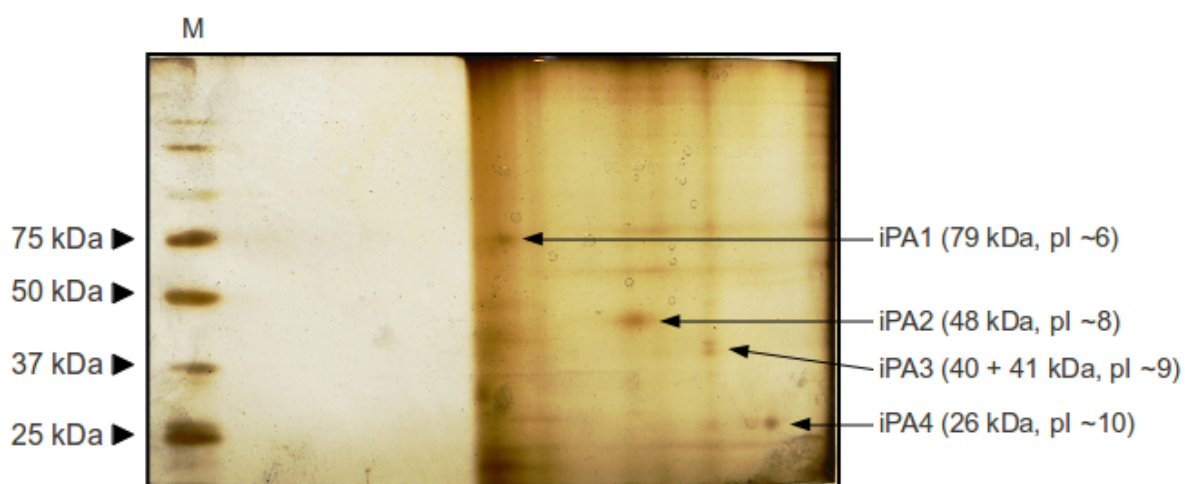


Figura 5.2.7. Gel de l' SDS-PAGE (segona dimensió) de la separació de proteïnes antenals, tenyit amb nitrat de plata. Al costat del nom de cada banda identificada es mostren el pes molecular calculat i el punt isoelèctric aproximat.

Les bandes iPA1, iPA2 i iPA3 es van seqüenciar per espectrometria de masses en tàndem. La taula 5.2.2. mostra les coincidències més rellevants entre les proteïnes analitzades i les descrites a la literatura.

Taula 5.2.2. Seqüències homòlogues als pèptids identificats per espectrometria de masses.

Mostra	Proteïnes coincidents	Espècie	Pes molecular
iPA1	Transferrina	<i>Spodoptera litura</i>	83,4 kDa
	Proteïna GD23860	<i>Drosophila melanogaster</i>	11,7 kDa
iPA2	Ferritina	<i>Galleria mellonella</i>	32 kDa
		<i>Calpodes ethilus</i>	26 kDa
		<i>Apriona germani</i>	24 kDa
		<i>Trichoplusia ni</i>	15 kDa
		<i>Bombyx mori</i>	23 kDa
iPA3	Glutatió S-transferasa	<i>Galleria mellonella</i>	24 kDa
iPA4	Factor de creixement del disc imaginal	<i>Mamestra brassicae</i>	48 kDa
		<i>Pieris rapae</i>	48 kDa
	Proteïna de la família glicosil hidrolasa	<i>Bombyx mori</i>	48 kDa

Tal i com es pot observar a la taula, cap dels pèptids trítptics identificats per espectrometria de masses mostrava homologia per una proteïna de la família de les CEs. Per aquest motiu, les seqüències seleccionades per al disseny d'oligonucleòtids que permetessin amplificar el cDNA d'una CE específica de les antenes van ser les obtingudes mitjançant la primera tècnica de separació de proteïnes.

Amplificació del cDNA

Metodologia: 3.2. i 3.3.2.

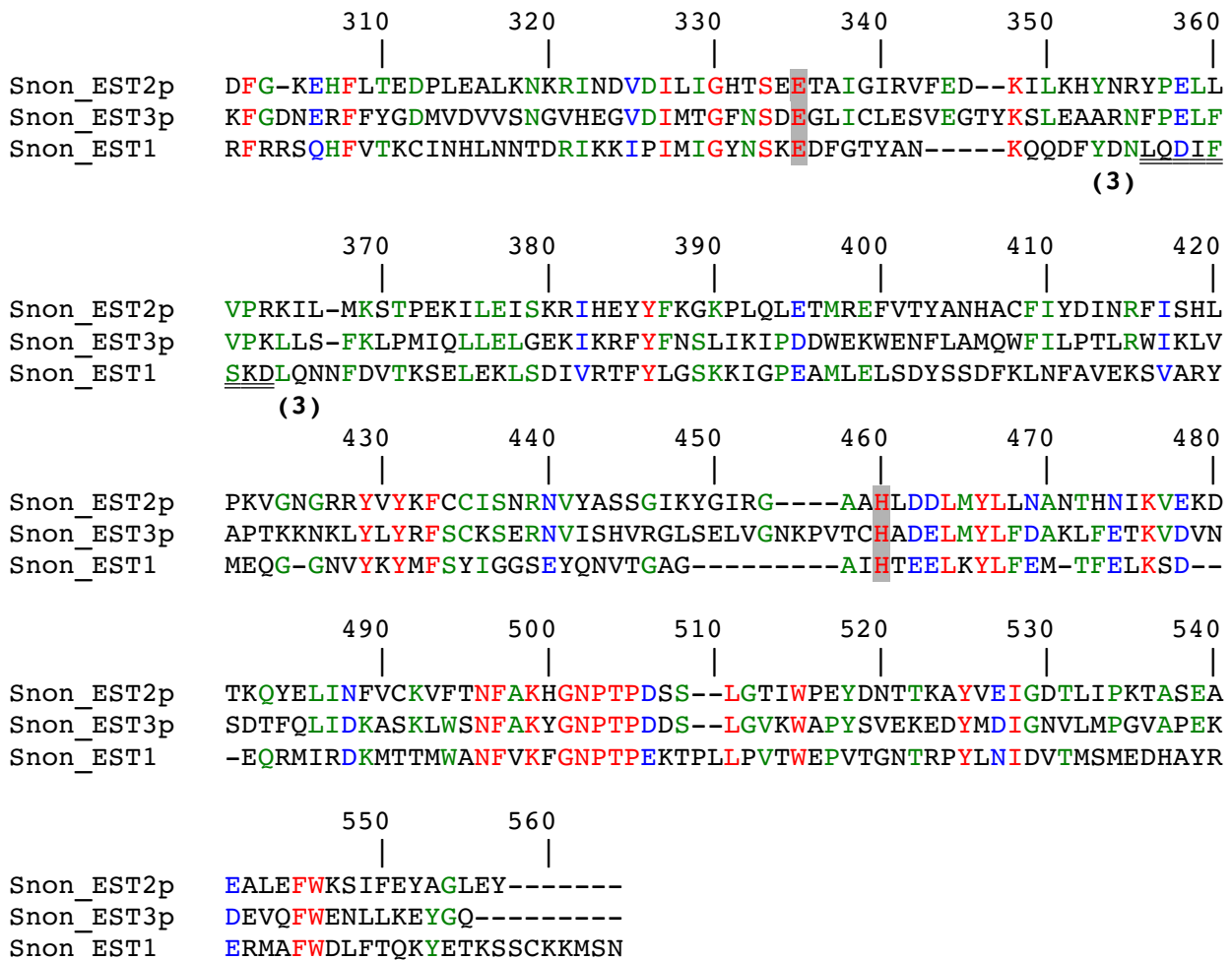
Procedint amb l'objectiu plantejat d'aïllar el cDNA d'una CE específica de les antenes, els pèptids obtinguts en la primera separació bidimensional de proteïnes van ser utilitzats de referència per a l'obtenció de dos oligonucleòtids degenerats (taula 5.2.3). Addicionalment, un tercer oligonucleòtid degenerat va ser dissenyat a partir d'una regió conservada en la família de les CEs.

Taula 5.2.3. Oligonucleòtids degenerats dissenyats per a l'amplificació d'esterases antenals de *S. nonagrioides*. A la columna de l'esquerra es mostren els pèptids corresponents a les seqüències.

Seqüències d'aminoàcids	Oligonucleòtids dissenyats.		
	Nom	Seqüència	Sentit
<i>SEQÜÈNCIES IDENTIFICADES PER ESPECTROMETRIA DE MASSES</i>			
GIPYAQPPVGK	Pep1_3RACE	TA[CT]GC[I]CA[AG]CC[I]CC[AT]GT[CT]GG[I]AA	5' > 3'
YPELLVPR	Pep2	C[GT][I]GG[ACGT]AC[I]AA[AGT]ATTTC	3' > 5'
<i>SEQÜÈNCIA CONSERVADA EN LES PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA CCE</i>			
GNAGLKD	EstRev	TC[CT]TT[CT]AG[GT]CC[AT]GC[AG]TT[GT]CC	3' > 5'

Els assajos de PCR utilitzant la combinació de Pep1_3RACE i Pep2 no va donar cap producte d'amplificació. En una estratègia paral·lela es va dur a terme l'amplificació de DNA per 3'RACE-PCR amb una combinació de l'oligonucleòtid Pep1_3RACE i UPM (Clontech). Aquesta amplificació va donar com a resultat una seqüència parcial d'aproximadament 1600 pb, que mostrava una identitat significativa per CCEs (segons una cerca BLAST) i que va ser anomenada Snon-EST2p (figura 5.2.8).

Alternativament, es va assajar la reamplificació d'aquest producte de PCR amb una combinació dels oligonucleòtids Pep1_3RACE i EstRev, conduint a l'obtenció d'una nova seqüència de 400 pb amb identitat per CCEs. Aquesta seqüència va ser allargada en sentit 3' mitjançant una 3'RACE-



Continuació **Figura 5.2.8.**

Si bé les seqüències d'aminoàcids deduïdes de Snon-EST2p i Snon-EST3p no contenen la metionina inicial, l'alineament amb la homòloga Snon-EST1 va mostrar que ambdues tenien una part molt majoritària dels residus esperats per a una proteïna d'aquesta família. Considerant la seqüència de l'esterasa Snon-EST1 únicament a partir del residu número 44, es van calcular els percentatges d'identitat entre aquesta seqüència i les obtingudes Snon-EST2p i Snon-EST3p, que va ser de 25 i 22 %, respectivament. Per la seva banda, Snon-EST2p i Snon-EST3p presentaven entre elles una identitat en aminoàcids del 37 %. Pel que fa als residus característics de la família CCE, la seqüència Snon-EST3p mostrava el pentapèptid GX SXG (amb la serina catalítica al centre del motiu), així com els altres dos residus de la tríada catalítica (Glu i His, ressaltats en gris a l'alineament de la figura 5.2.8), situats en una posició conservada en l'alineament amb Snon-EST1. En el cas de la seqüència Snon-EST2p, si bé els residus Glu i His es trobaven també en una posició conservada, no succeïa així amb el pentapèptid i la serina catalítica, absent en tota la regió central de la seqüència.

Caracterització dels transcrits Snon-EST2p i Snon-EST3p

Metodologia: 3.4.2.

Per tal d'estudiar la distribució tissular de les dues proteïnes obtingudes, es van dissenyar dos parells d'oligonucleòtids que amplificaven regions de 87 i 600 pb per Snon-EST2p i Snon-EST3p, respectivament. La utilització d'aquests oligonucleòtids en PCRs sobre els cDNA total de diferents teixits de l'insecte va posar de manifest la presència d'ambdós transcrits en tots els teixits estudiats (figura 5.2.9).

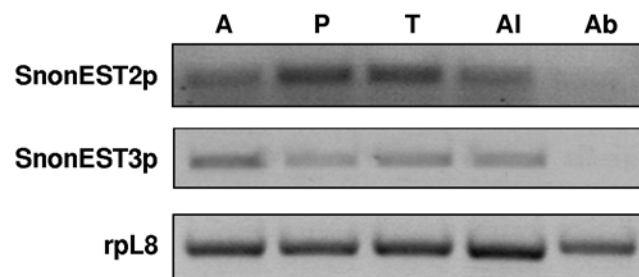


Figura 5.2.9. Estudi de la presència dels transcrits Snon-EST2p i Snon-EST3p als diferents teixits del mascle de l'insecte. La proteïna ribosomal L8 (rpL8) es va utilitzar com a control. **A:** antenes, **P:** potes, **T:** tòrax, **AI:** ales, **Ab:** abdomen.

5.2.3. Aïllament i caracterització d'esterases de l'espècie *S. littoralis*

Identificació d'esterases de *S. littoralis*

Metodologia: 3.3.2.

De la mateixa manera que en *S. nonagrioides*, es va plantejar l'obtenció de cDNAs codificants per CEs antenals en el lepidòpter *S. littoralis*. En aquest cas, però, l'estratègia utilitzada va ser la construcció d'una llibreria de cDNA, elaborada per les doctores Emmanuelle Jacquin-Joly i Martine Maïbèche-Coisne (*Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication*, UPMC-INRA, France) en el marc del consorci Genoscope. L'anàlisi bioinformàtica de la llibreria va donar com a resultat 95 seqüències homòlogues a Slit-EST, identificada prèviament a partir d'una estratègia d'oligonucleòtids degenerats (Merlin et al. 2007) i renombrada com SICXE1 en aquest treball. Un cop units els diferents fragments, aquestes 95 seqüències es van traduir en 19 proteïnes addicionals a SICXE1. Cinc d'aquestes seqüències van haver de ser completades en els seus extrems 5' i/o 3' mitjançant una amplificació per RACE-PCR. En tots els casos, la seqüència obtinguda a partir del DNA purificat de les PCRs contenia una regió coincident amb la seqüència parcial identificada a la llibreria de cDNA. Les seqüències finalment obtingudes van ser introduïdes

al GenBank amb els números d'accés FJ652445 a FJ652463 (per SICXE2 a SICXE20, respectivament).

La taula 5.2.4 mostra un resum de les principals característiques de les seqüències aïllades, incloent-hi la prèviament identificada SICXE1.

Taula 5.2.4. Característiques de les seqüències de presumibles esterases identificades en *S. littoralis*. A banda de la presència dels residus característics de la família CCEs, es mostren les propietats calculades a partir de la seqüència d'aminoàcids (**PM**: pes molecular, **PI**: punt isoelèctric), així com la presència o absència del pèptid senyal d'excreció extracel·lular (**PS**).

	Residus característics			Propietats calculades		PS
	Pentapèptid	Glu	His	PM (kDa)	PI	
SICXE1	GESAG	+	+	63,0	8,4	+
SICXE2	GQSAG	+	+	60,6	5,4	+
SICXE3	GESAG	+	+	60,7	5,9	-
SICXE4	GYSAG	+	-	60,3	5,2	+
SICXE5	GCSAG	+	+	61,1	7,7	+
SICXE6	GESYG	+	+	57,7	6,8	+
SICXE7	GFSAG	+	+	61,6	5,9	+
SICXE8	GTSAG	+	+	58,6	6,2	+
SICXE9	GSSSG	+	+	62,5	5,3	-
SICXE10	GESAG	+	+	61,0	6,4	-
SICXE11	GISAG	+	+	60,1	5,5	-
SICXE12	GQSYG	+	+	56,5	9,0	-
SICXE13	GCSAG	+	+	60,1	5,8	+
SICXE14	GYSAG	+	+	61,4	5,5	+
SICXE15	GQSAG	+	+	63,4	5,1	+
SICXE16	GYSAG	+	+	62,4	6,9	+
SICXE17	GESAG	+	+	60,0	5,8	+
SICXE18	GQSAG	+	+	58,6	5,6	+
SICXE19	GHDAG	+	+	68,2	5,3	+
SICXE20	GESAG	+	+	58,4	6,4	+

Especificitat tissular dels transcrits

Metodologia: 3.4.2.

Per tal d'estudiar la distribució de cada transcrit entre les diferents parts de l'insecte, es van dur a terme amplificacions a partir del cDNA de diversos teixits. Els teixits seleccionats per a aquest estudi van ser les antenes de mascle i femella, i el probòscide, cervell, potes, tòrax, abdomen i

ales de mascle.

Com a control, es va dur a terme l'amplificació del cDNA de la proteïna ribosomal rpL8, que s'expressa de forma constitutiva. Pel que fa a les 20 CE estudiades, es va posar de manifest que si bé la majoria dels transcrits tenien una distribució tissular heterogènia (o fins i tot ubiqua), tres esterases (SICX7, SICX8 i SICX14) es trobaven preferentment o exclusiva en teixits relacionats amb la comunicació química, essencialment antenes i probòscide (figura 5.2.10).

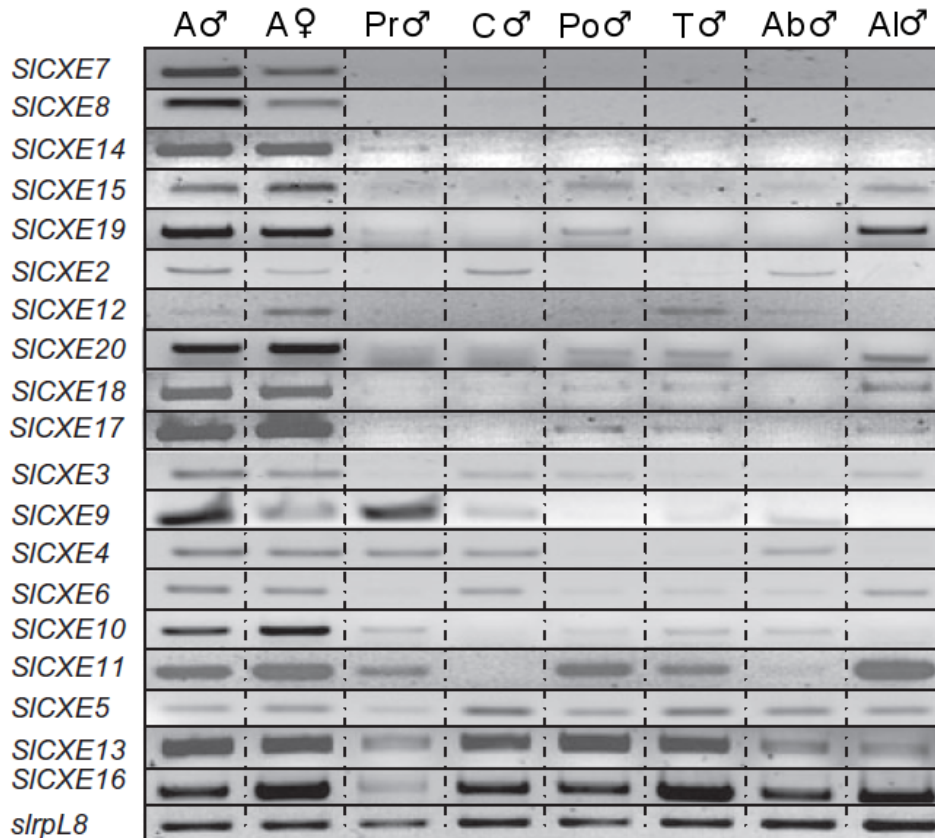


Figura 5.2.10. Distribució dels transcrits de les esterases identificades en *S. littoralis* a través dels diferents teixits de l'insecte. **A:** antenes, **Pr:** probòscide, **C:** cervell, **Po:** potes, **T:** tòrax, **Ab:** abdomen i **Al:** ales.

Nivells del transcrit al llarg del desenvolupament

Metodologia: 3.4.2.

De forma anàloga a l'estudi de la distribució tissular del transcrit, aquells que mostraven una presència majoritària als teixits olfactivs i gustatius (SICX7, SICX8 i SICX14) van ser seleccionats per tal d'estudiar els nivells del transcrit en diferents etapes del desenvolupament (figura 5.2.11). El cDNA total de les antenes en diferents estadis del desenvolupament (un per la larva, tres per a

l'estadi de pupa i dos per a l'estadi d'adult) van ser utilitzats com a motlle per a l'amplificació dels diferents transcrits.

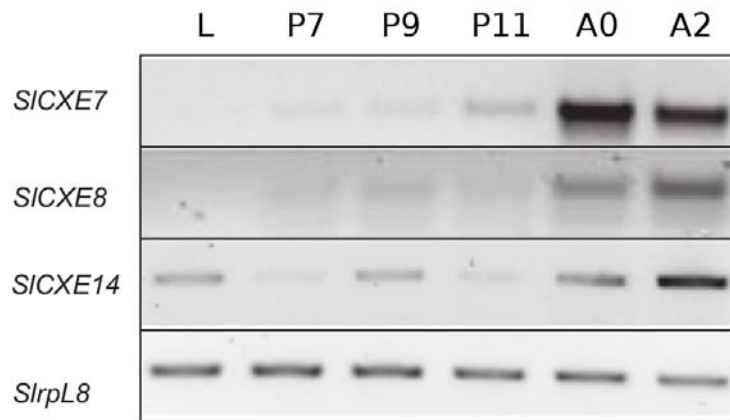


Figura 5.2.11. Evolució dels nivells de transcrit al llarg del desenvolupament de l'insecte. **L:** estadi de larva. **P:** estadi de pupa (de 7, 9 i 11 dies d'edat) i **A:** estadi adult el mateix dia de l'emergència (**0**) i als 2 dies (**2**).

Novament, la proteïna ribosomal rpl8 es va utilitzar com a control dels nivells de transcrit. Pel que fa a les 3 CEs seleccionades, SICX14 va mostrar un patró de transcripció oscil·lant, sent no obstant clarament més elevat en l'adult de dos dies de vida. Les altres dues CEs estudiades van mostrar uns nivells de transcripció creixent, sent el transcrit pràcticament indetectable (en les condicions utilitzades per a l'estudi) en l'estadi de larva, i augmentant progressivament fins arribar a un màxim en l'estadi d'adult (figura 5.2.11).

5.2.4. Caracterització filogenètica d'esterases antenals

Metodologia: 3.2.1.

Adicionalment a les característiques de la seqüència d'aminoàcids i a l'anàlisi dels nivells del transcrit de cadascuna de les CEs identificades, es va dur a terme una anàlisi filogenètica d'aquestes a fi d'identificar possibles similituds amb altres CEs descrites a la literatura. Per a l'estudi es van recopilar un total de 48 seqüències del GenBank, representatives dels 13 grups de CEs descrits a la literatura (Oakeshott et al. 2005), i s'hi van afegir les 22 noves seqüències identificades, és a dir, 19 seqüències de *S. littoralis*, i les seqüències Snon-EST1, Snon-EST2p i Snon-EST3p de *S. nonagrioides*. L'anàlisi va mostrar una distribució de les CEs identificades per pràcticament tots els grups filogenètics a excepció dels grups de les Gliolactines, Neuroglines i un tercer grup format per esterases de l'hormona juvenil de coleòpters i dípters (figura 5.2.12). D'altra banda, el grup de les esterases de l'hormona juvenil de lepidòpters (que inclou també esterases

antenals de lepidòpter) va ser el que contenia més representants de les CCEs identificades en *S. littoralis*, així com l'esterasa Snon-EST1 de *S. nonagrioides*. Finalment, cal destacar que únicament l'esterasa SICXE13 formava part del grup de les β -esterases, on s'hi troben les esterases degradadores de feromona Apol-PDE (Ishida & Leal 2005) i Pjap-PDE (Ishida & Leal 2008), del lepidòpter *Antheraea polyphemus* i el coleòpter *Popillia japonica*, respectivament.

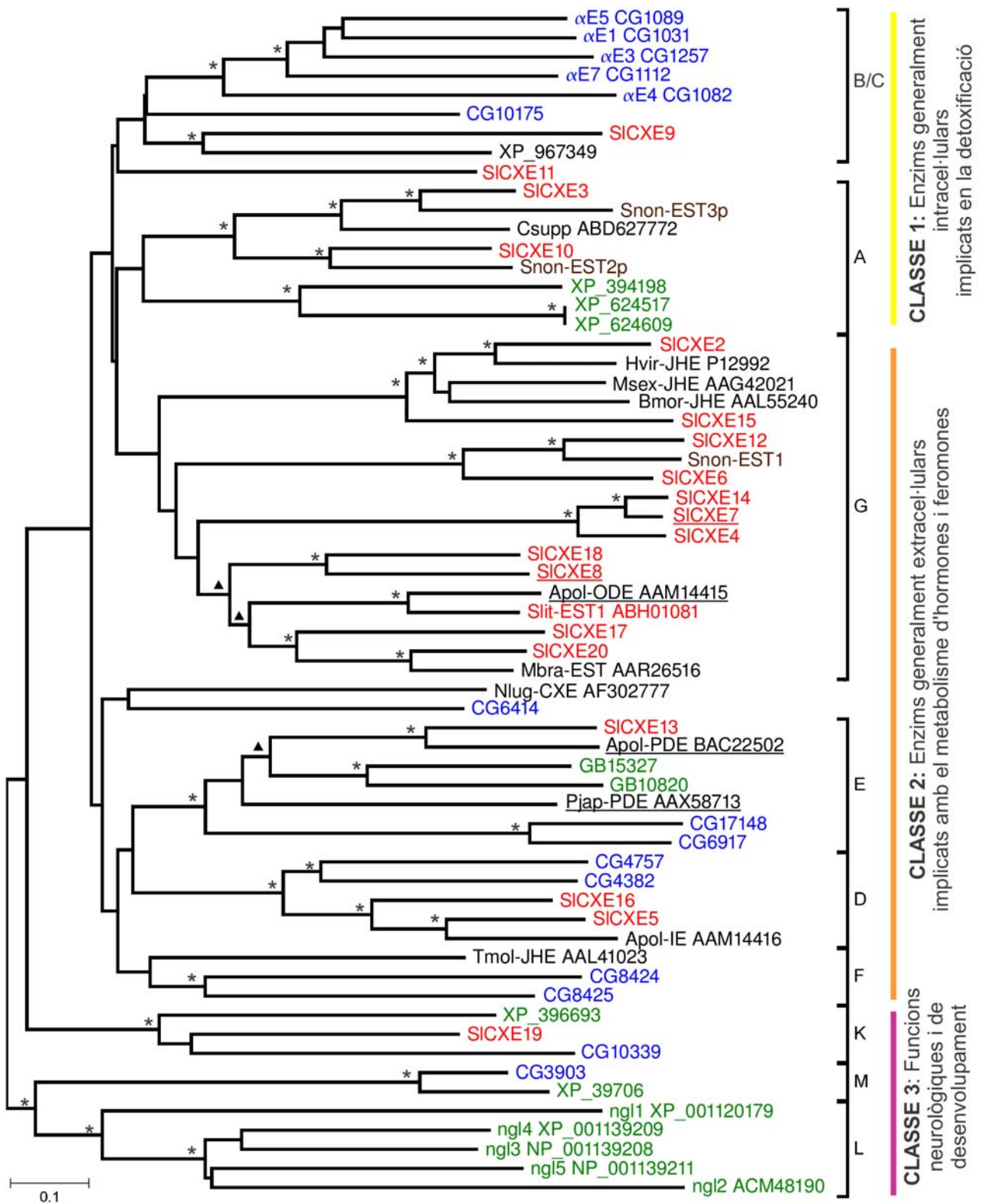


Figura 5.2.12. Anàlisi filogenètica de les CE identificades. Les esterases de l'espècie *S. littoralis* estan en vermell, les de *S. nonagrioides* en marró, les de *D. melanogaster* en blau i les d'*A. mellifera* en verd. Els asteriscs indiquen valors de *bootstrap* de 90-100% i els triangles de 80-89%. (Continua al peu de la pàgina següent).

5.2.5. Expressió recombinant de carboxil esterases antenals

Per a l'expressió recombinant de CEs antenals es van utilitzar dos sistemes d'expressió diferents: l'expressió mitjançant el bacteri *E. coli* (únicament per a l'esterasa Snon-EST1) i l'expressió mitjançant les cèl·lules d'insecte en cultiu infectades amb baculovirus, que es va dur a terme amb les esterases SICXE7 i SICXE10.

Donat que les primeres 57 bases de la seqüència de nucleòtids de l'esterasa Snon-EST1 codificaven per una seqüència d'aminoàcids que havia estat identificada com a pèptid senyal d'excreció extracel·lular, per als assajos d'expressió en *E. coli*, únicament es va utilitzar la seqüència de Snon-EST1 compresa entre les bases 58 i 1593.

Expressió en el bacteri *E. coli*

Metodologia: 3.5.1.

Assajos utilitzant el vector pGEX

El fragment de la seqüència Snon-EST1 escollit per a l'expressió va ser clonat satisfactòriament entre les dianes de restricció EcoRI i XhoI del vector pGEX. L'anàlisi de la seqüència inserida no va mostrar cap mutació ni error d'inserció, codificant per una proteïna de 84 kDa formada per la GST i Snon-EST1.

L'electroforesi dels primers assajos d'expressió, realitzats amb 4 i 6 h d'inducció a 37 °C, van mostrar una banda de sobreexpressió en la fracció insoluble, absent tant al cultiu control com a la fracció soluble del cultiu induït (figura 5.2.13). D'altra banda, la banda de sobreexpressió tenia un pes molecular aparent de 71 kDa, 13 unitats menys que el pes molecular esperat (84 kDa).

Continua de la **figura 5.2.12**. Finalment, les CEs expressades de forma selectiva a les antenes es mostren subratllades. Per a l'agrupament de seqüències es va respectar el criteri descrit per Oakeshott i col·laboradors (Oakeshott et al. 2005). Els grups filogenètics són **A**: CEs mitocondrials i citosòliques, **B/C**: CEs de dípters i α -esterases, **D**: CEs integumentals i antenals, **E**: β -esterases, **F**: CEs de l'hormona juvenil de coleòpters, **G**: CEs de l'hormona juvenil de lepidòpter i CEs antenals de lepidòpters, **K**: possibles neuroreceptors, **L**: neuroglines, **M**: gliotactines.

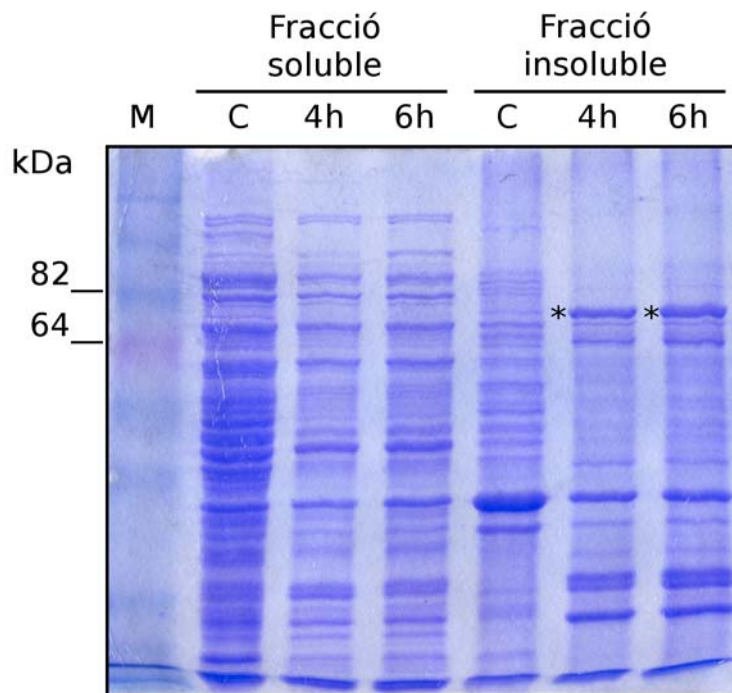


Figura 5.2.13. SDS-PAGE al 10% de l'expressió de Snon-EST1 amb pGEX. **M:** macador de pesos moleculars, **C:** control negatiu (no induït), **4 h** i **6 h:** cultiu induït durant 4 i 6 h, respectivament. Els asteriscs mostren la proteïna sobreexpressada.

Els assajos duts a terme a temperatures d'inducció inferiors (20 °C) i temps d'inducció superiors (16 h) van donar com a resultat un augment en la quantitat de proteïna sobreexpressada a la fracció soluble. Aquest augment en el rendiment de l'expressió es va confirmar en utilitzar el vector pUBS (figura 5.2.14). No obstant, el pes molecular de la proteïna obtinguda continuà sent, en tots els assajos, aproximadament 13 kDa inferior a l'esperat.

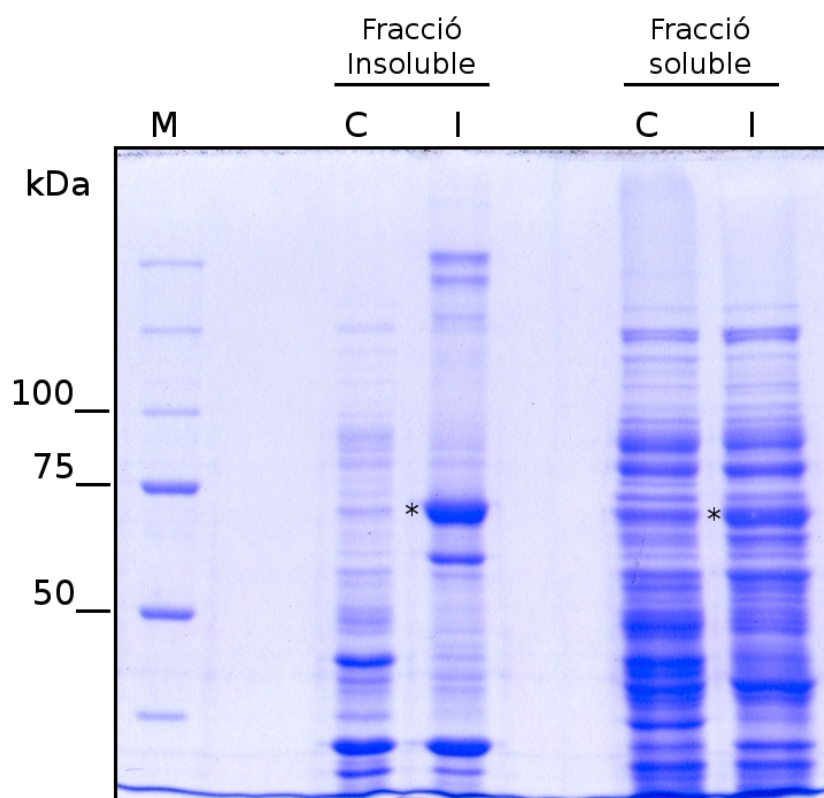


Figura 5.2.14. SDS-PAGE al 10% de l'expressió de SnonEST1 amb pGEX i en presència del vector pUBS. **M:** marcador de pesos moleculars, **C:** control negatiu (no induït), **I:** cultiu induït durant 16 h a 20 °C. Els asteriscs mostren les bandes de sobreexpressió majoritàries.

Assajos utilitzant el vector pMAL

La regió de la seqüència Snon-EST1 compresa entre les bases 58 i 1593 (ambdues incloses) es va clonar satisfactòriament entre les dianes XbaI i HindIII dels vectors pMALc2x i pMALp2x. L'anàlisi de les seqüències inserides no va mostrar cap mutació ni error d'inserció, codificant per una proteïna de fusió de 100 kDa formada per la MBP (codificada pel gen *malE*) i Snon-EST1.

Els assajos duts a terme amb el vector pMALc2x, d'expressió citosòlica, van mostrar un resultat equivalent a l'observat amb el vector pGEX. La proteïna de sobreexpressió (aquest cop amb un pes molecular esperat de 100 kDa) tenia un pes molecular en el SDS-PAGE d'aproximadament 89 kDa (figura 5.2.15). Així mateix, la proteïna únicament s'observava en la fracció insoluble de l'extracte proteic, malgrat l'addició de Tritó X-100 a una concentració final de l'1% en el procés d'extracció.

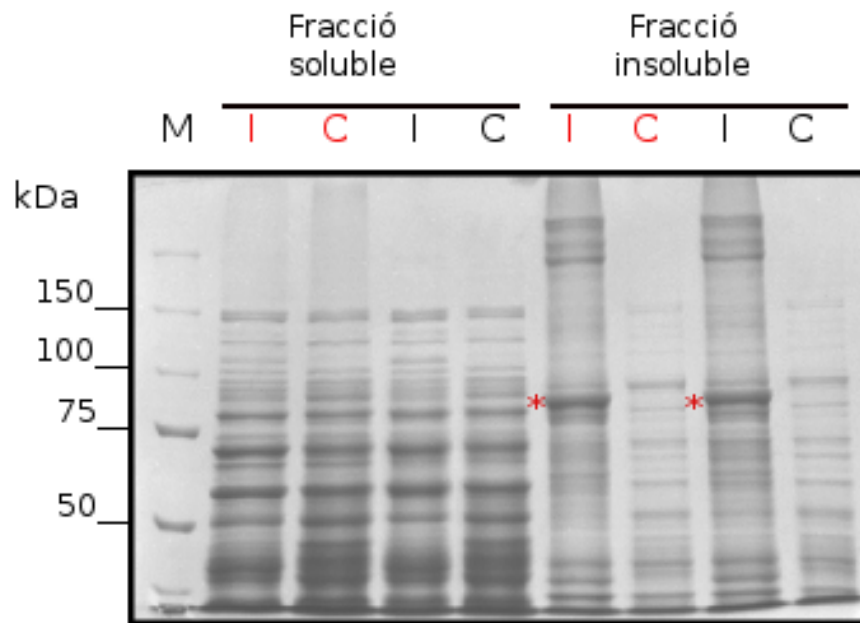


Figura 5.2.15. SDS-PAGE de l'assaig d'expressió de l'esterasa Snon-EST1 amb el vector pMALc2x. **M:** marcador de pesos moleculars. **I:** cultiu induït. **C:** cultiu control (no induït). En lletres vermelles s'indiquen les mostres extretes en presència d'un 1% de Tritó X-100. Els asteriscs indiquen la banda de sobreexpressió majoritària observada.

En el cas del vector pMALp2x, no es van observar bandes de sobreexpressió significatives de la proteïna recombinant Snon-EST1. Addicionalment al cultiu control no induït, es va utilitzar l'expressió de la MBP per tal de verificar la correcta extracció de la fracció periplasmàtica (figura 5.2.16). Aquest resultat es va reproduir quan l'expressió de la proteïna recombinant es va assajar amb la soca d'*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS.

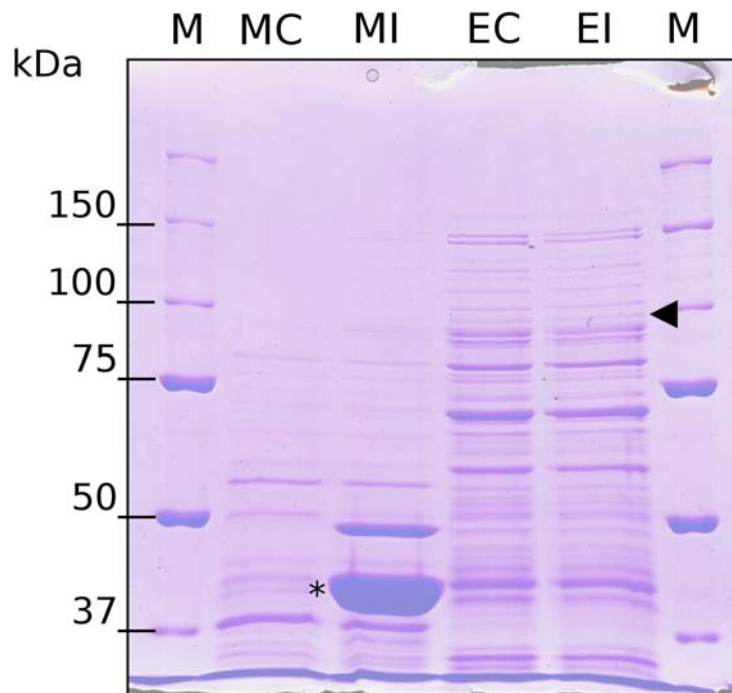


Figura 5.2.16. SDS-PAGE de l'assaig d'expressió de l'esterasa Snon-EST1 amb el vector pMALp2x. **M:** Marcador de pesos moleculars. **MC** i **MI:** fraccions periplasmàtiques dels cultius control i induït de l'expressió de la MBP. **EC** i **EI:** fraccions periplasmàtiques dels cultius control i induït de l'expressió de Snon-EST1. L'asterisc mostra la banda corresponent a la MBP, mentre que el triangle indica la posició esperada per a la construcció MBP+Snon-EST1.

Assajos amb cèl·lules d'insecte en cultiu.

Metodologia: 3.5.3.

Per als assajos d'expressió recombinant d'esterases antenals utilitzant cèl·lules d'insecte en cultiu infectades amb baculovirus es van utilitzar les esterases SICXE7 i SICXE10 de *S. littoralis*. Aquests assajos es van dur a terme en col·laboració amb la unitat *Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication* (UPMC-INRA, France). Les etapes d'expressió final de la proteïna i purificació van ser realitzades íntegrament pel Dr. Nicolas Durand en tots dos casos.

Ambdues esterases van ser clonades al vector pBlueBac a partir d'un fragment de PCR i utilitzant el sistema TOPO-TA, descrit per al vector pCRII. L'orientació de la inserció del DNA va ser confirmada per PCR (amb un oligonucleòtid que s'hibridava a la seqüència de l'esterasa i un altre a la regió del vector), i l'absència de mutacions va ser verificada per seqüenciament.

Expressió de l'esterasa SICXE7

Per a la obtenció de la proteïna recombinant SICXE7 es van infectar 25×10^6 cèl·lules Sf21 amb una MOI de 20. L'electroforesi amb SDS-PAGE dels sobrenedants del cultiu van mostrar una banda de pes molecular proper a l'esperat (61,6 kDa) en les cèl·lules infectades i incubades durant 96h (figura 5.2.17 A). Si bé el cultiu control (no infectat) tenia també una proteïna d'un pes molecular proper, les electroforesis natives, tenyides amb acetat de naftil, no mostraven cap proteïna amb activitat esterasa en el sobrenedant de les cèl·lules control transcorregudes 96 h (figura 5.2.17 B). Les cèl·lules infectades amb el virus recombinant, en canvi, expressaven una proteïna amb activitat esterasa, visible a partir de les 48 h. El temps d'incubació postinfecció seleccionat per a la producció final de la proteïna va ser de 72 h. Un cop purificada, el gel SDS-PAGE no va mostrar cap banda a part de la corresponent a SICXE7.

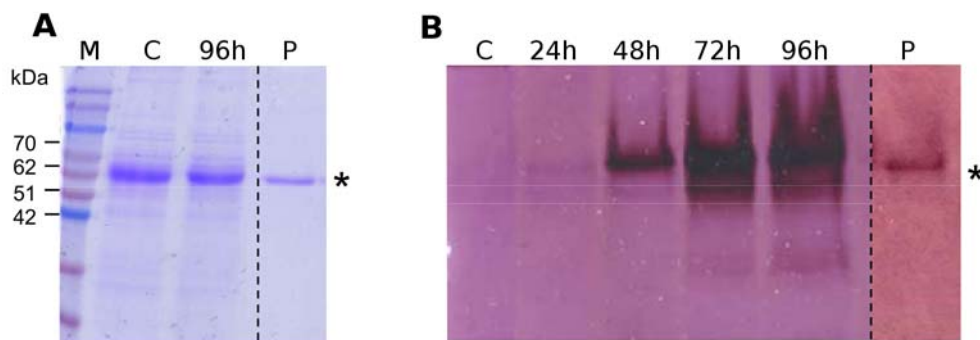


Figura 5.2.17. SDS-PAGE (A) i PAGE natiu amb tinció d'acetats de naftil (B) corresponent a l'expressió de l'esterasa SICXE7. **M:** marcador de pesos moleculars. **C:** cultiu control a les 96 h. **24 h, 48 h, 72 h i 96 h:** temps postinfecció amb el virus recombinant. **P:** proteïna purificada.

Expressió de l'esterasa SICXE10

De forma anàloga a SICXE7, per a l'expressió de SICXE10 es van infectar 25×10^6 cèl·lules amb una MOI de 20. Donat que SICXE10 no té un pèptid senyal d'excreció extracel·lular, el seguiment de l'expressió i l'obtenció de la proteïna final es van dur a terme a partir de la fracció soluble del lisat de les cèl·lules en cultiu. La banda corresponent a l'expressió de la proteïna recombinant tenia un pes molecular proper a l'esperat (61,5 kDa) i va aparèixer a partir de les 48 h postinfecció. Com a control negatiu es va utilitzar tant un cultiu de cèl·lules no infectades (C a la figura 5.2.18), com un cultiu de cèl·lules infectades amb el virus no recombinant (CV a la figura 5.2.18). En aquest darrer cas, la proteïna que va aparèixer sobreexpressada era proper al pes molecular calculat de la proteïna vírica polihedrina (29 kDa). Finalment, la integritat de la proteïna purificada va ser comprovada amb una electroforesi no desnaturant tenyida amb la tinció d'acetats de naftil (figura 5.2.18).

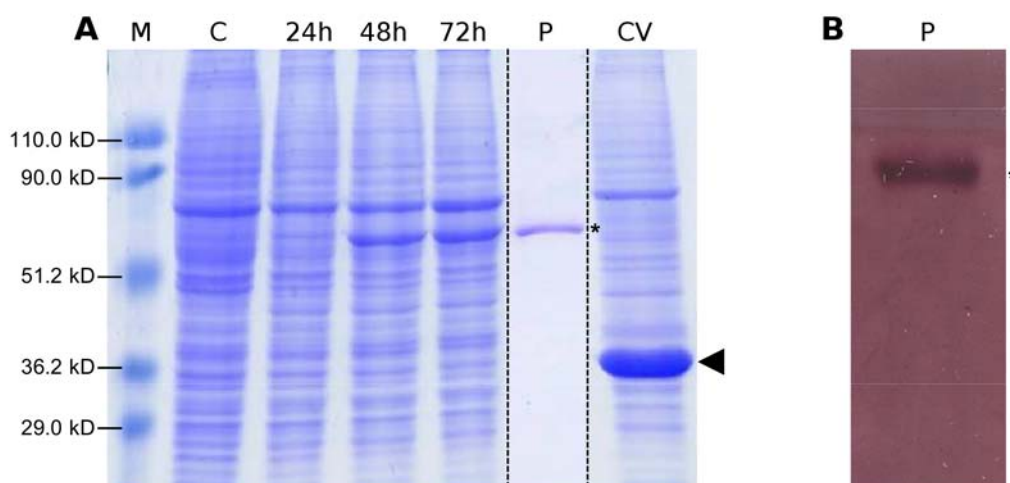


Figura 5.2.18. SDS-PAGE (A) i PAGE natiu amb tinció d'acetats de naftil (B) corresponents a l'expressió de l'esterasa SICXE10. **M:** marcador de pesos moleculars. **C:** cultiu control. **CV:** control amb el virus no recombinant. **P:** proteïna purificada.

5.2.6. Assajos d'activitat amb carboxil esterases antenals

Metodologia: 3.7.

Els assajos d'activitat amb CEs antenals es van dur a terme també en col·laboració amb la unitat *Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication* (UPMC-INRA, France). Si bé el disseny experimental i l'anàlisi dels productes obtinguts fou realitzat conjuntament, la incubació i extracció dels productes de les reaccions van ser dutes a terme íntegrament pel Dr. Nicolas Durand.

Assajos amb SICXE7

Per als assajos d'activitat amb l'esterasa SICXE7 es van utilitzar els compostos feromonal (*Z,E*)-9,11-14:OAc i (*Z,E*)-9,12-14:OAc (majoritari i minoritari respectivament a la feromona de *S. littoralis*), així com el volàtil de plantes (*Z*)-3-6:OAc, detectat per la femella de l'insecte, tal i com es justifica a l'apartat de discussió d'aquest capítol (5.3.5).

La capacitat de l'enzim per hidrolitzar tots tres compostos va ser inicialment verificada per GC-MS. En tots tres casos, les fraccions orgàniques provinents de l'extracció dels productes de reacció van mostrar la presència d'un compost d'igual temps de retenció i espectre de masses que l'estàndard sintètic utilitzat per a la comparació (figura 5.2.19). D'altra banda, cap dels pics que apareixien al cromatograma control va mostrar un espectre de masses coincident amb els productes de la reacció.

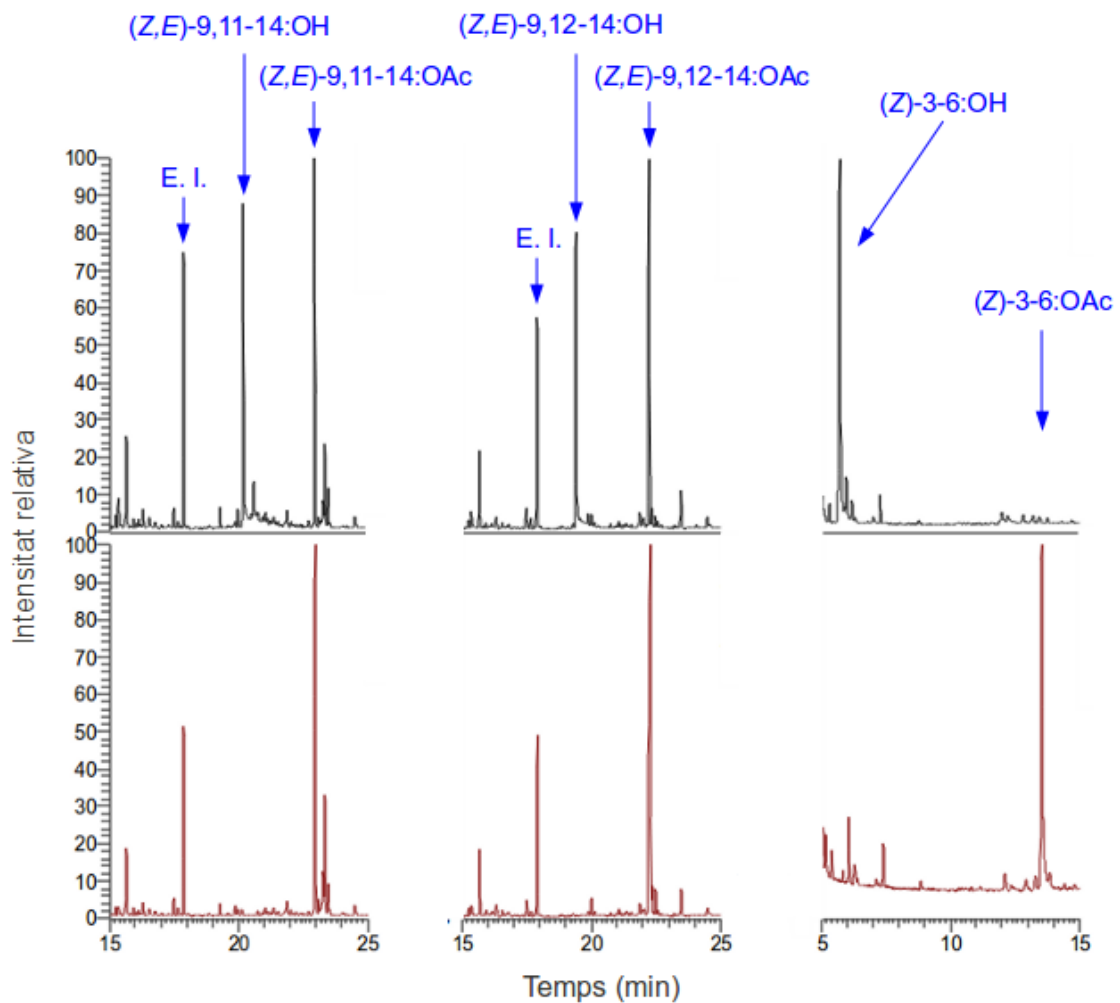


Figura 5.2.19. A dalt, cromatogrames dels assajos d'activitat amb els substrats (Z,E)-9,11-14:OAc, (Z,E)-9,12-14:OAc i (Z)-3-6:OAc. A baix, cromatogrames dels corresponents controls (duts a terme en absència d'enzim SICXE7). **E.I.:** estàndard intern. En el cas de la reacció amb el (Z)-3-6:OAc l'estàndard intern no es mostra, ja que surt d'escala respecte al substrat i al producte (tant de temps de retenció, com d'intensitat).

L'estudi de l'evolució de la reacció al llarg del temps es va dur a terme únicament amb el substrat (Z,E)-9,11-14:OAc, que havia mostrat una activitat superior en l'assaig preliminar. D'acord amb els resultats obtinguts en incubar la reacció durant 10, 20, 40 i 80 min, el temps escollit per a dur a terme les següents reaccions va ser de 10 min (figura 5.2.20).

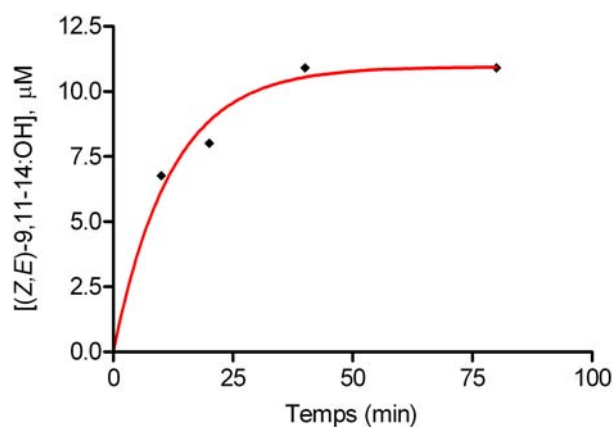


Figura 5.2.20. Evolució de la hidròlisi del (Z,E)-9,11-14:OAc per l'enzim SICXE7.

Finalment, es va dur a terme una exploració de les concentracions de cadascun dels substrats per tal d'identificar el rang òptim per al càlcul dels paràmetres cinètics. En tots tres casos, la representació de les concentracions de substrat escollides respecte les velocitats obtingudes va mostrar un perfil de tipus Michaelis-Menten (figura 5.2.21).

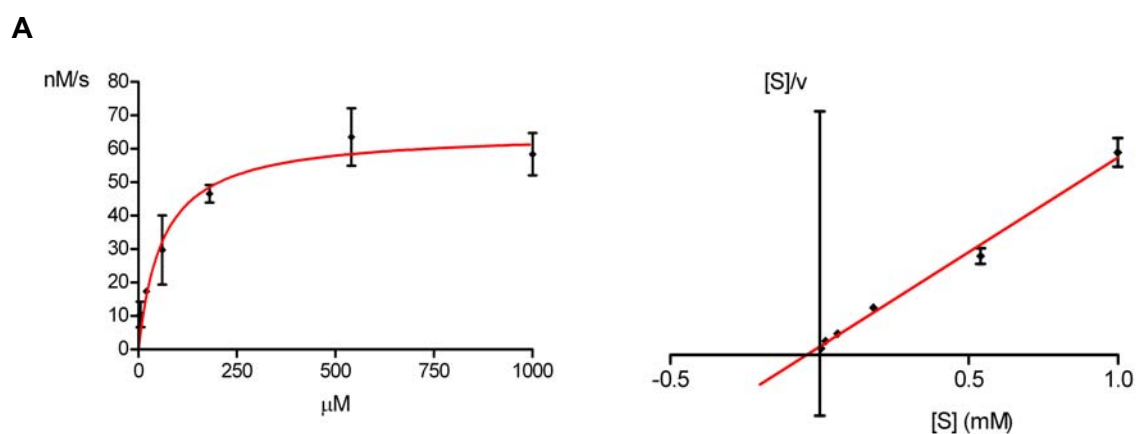
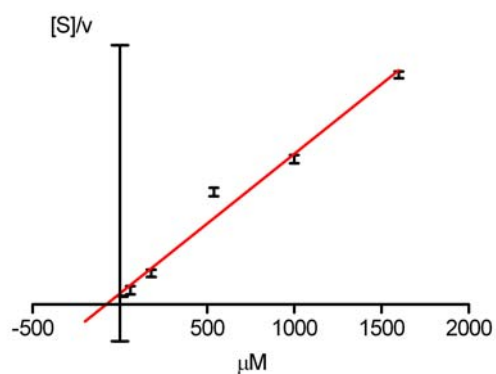
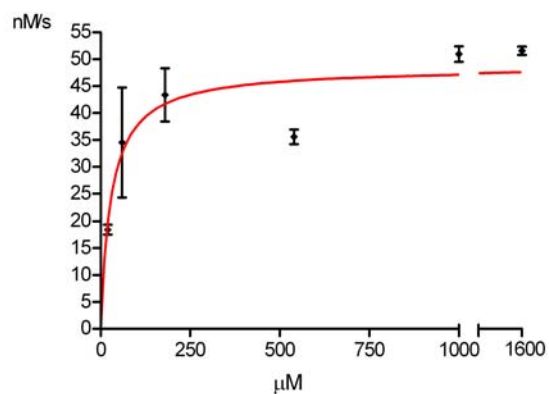
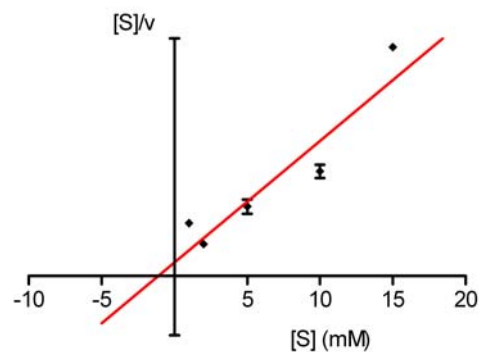
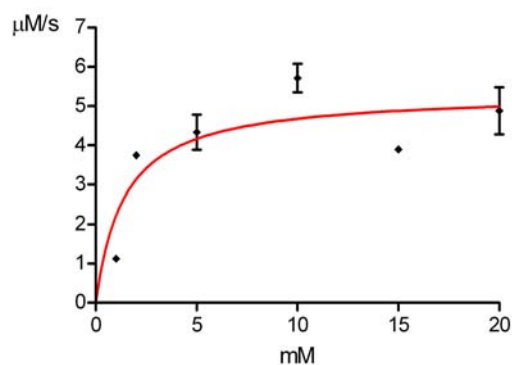


Figura 5.2.21. Representacions de Michaelis-Menten (esquerra) i Hanes-Woolf (dreta) de les reaccions d'hidròlisi dels substrats (Z,E)-9,11-14:OAc (**A**), (Z,E)-9,12-14:OAc (**B**) i (Z)-3-6:OAc (**C**) per l'enzim SICXE7. (Continua a la pàgina següent)

B



C



Continuació **Figura 5.2.21**

El càlcul dels paràmetres cinètics per als tres substrats, dut a terme tant pel mètode d'ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten, com per la linealització de Hanes-Woolf, es mostren a la taula 5.2.5.

Taula 5.2.5. Paràmetres cinètics obtinguts per als substrats (Z,E)-9,11-14:OAc, (Z,E)-9,12-14:OAc i (Z)-3-6:OAc amb l'esterasa SICXE7.

	Ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten			Linealització de Hanes-Woolf		
	Km	Vmax	Kcat (s ⁻¹)	Km	Vmax	Kcat (s ⁻¹)
(Z,E)-9,11-14:OAc	62 μM	65 nM/s	0,4	49 μM	62 nM/s	0,3
(Z,E)-9,12-14:OAc	29 μM	48 nM/s	0,3	79 μM	53 nM/s	0,3
(Z)-3-6:OAc	1,4 mM	5,3 μM/s	33,1	1,1 mM	4,9 μM/s	30,6

Assajos amb SICXE10

Per a l'estudi de l'activitat de l'esterasa SICXE10 es va utilitzar únicament el volàtil de plantes (Z)-3-6:OAc, la hidròlisi del qual per part de l'enzim va ser verificada per GC-MS. Després d'una hora d'incubació, la fracció orgànica de l'extracte contenia un producte d'igual temps de retenció i espectre de masses que el (Z)-3-6:OH sintètic (figura 5.2.22). Si bé el cromatograma mostrava algun pic proper al temps de retenció del (Z)-3-6:OH, l'espectre de masses no es corresponia amb el d'aquest compost.

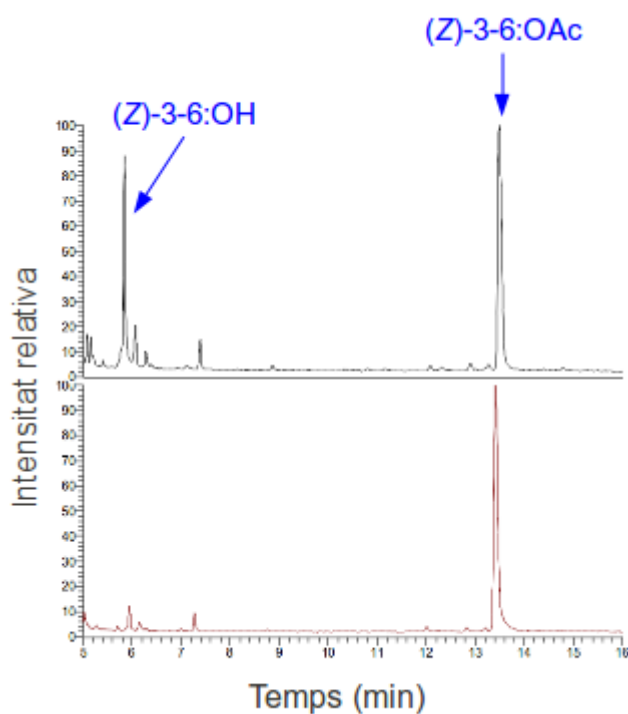


Figura 5.2.22. Cromatograma de l'assaig d'activitat amb el substrat (Z)-3-6:OAc (a dalt) i el corresponent control en absència d'enzim (a baix).

Un cop confirmada l'activitat, es va estudiar el curs de la reacció, quantificant el producte obtingut a diferents temps d'incubació (figura 5.2.23).

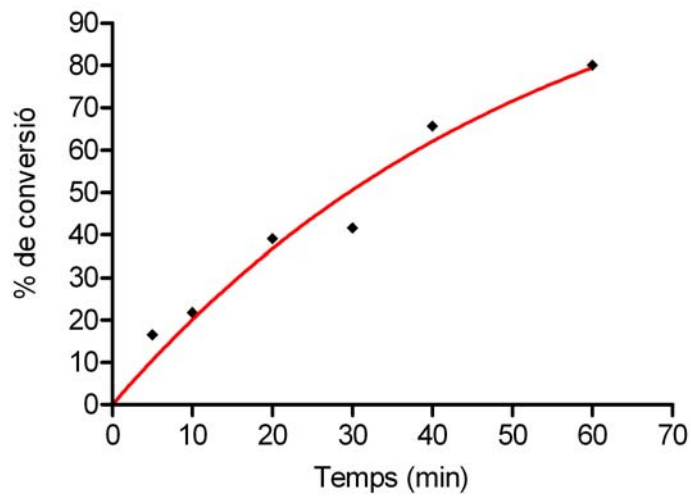


Figura 5.2.23. Evolució de la hidròlisi del (Z)-3-6:OAc per l'enzim SICXE10.

D'acord amb els resultats obtinguts, les incubacions en les reaccions posteriors es van dur a terme durant 5 min. Amb aquestes condicions, i un cop explorades diferents concentracions de substrat, es va dur a terme una bateria de reaccions per tal d'obtenir els paràmetres cinètics de la parella enzim-substrat. La representació de les velocitats en funció de la concentració de substrat utilitzada va mostrar una corba de tipus Michaelis-Menten (figura 5.2.24), a partir de la qual se'n van obtenir els valors de K_m , V_{max} i K_{cat} .

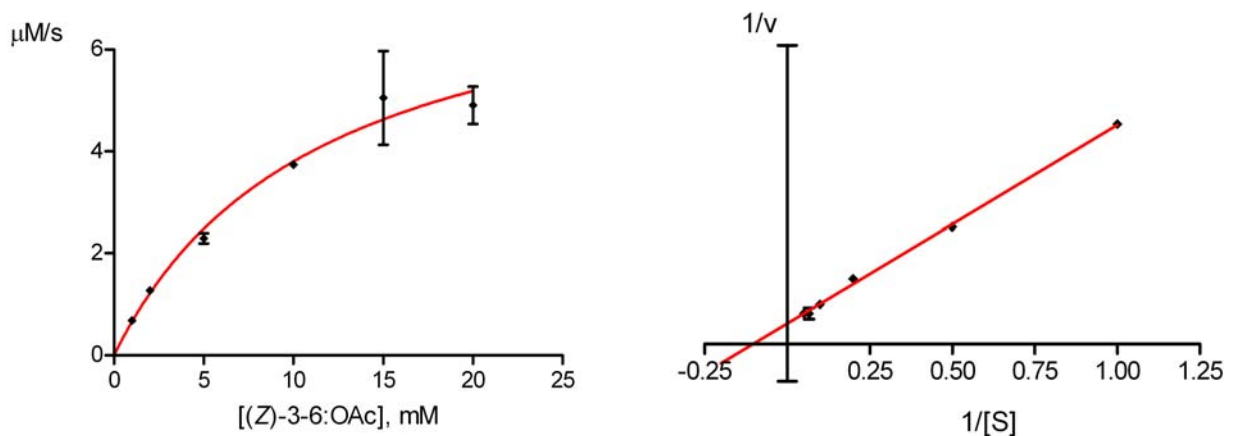


Figura 5.2.24. Representacions de Michaelis-Menten (esquerra) i Lineweaver-Burk (dreta) de la reacció d'hidròlisi del (Z)-3-6:OAc amb l'enzim SICXE10.

La taula 5.2.6 mostra els diferents valors obtinguts per K_m , V_{max} i K_{cat} , calculats mitjançant

l'ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten i la linealització de Lineweaver-Burk.

Taula 5.2.6. Paràmetres cinètics obtinguts en la hidròlisi del substrat (Z)-3-6:OAc amb l'esterasa SICXE10.

Mètode de càlcul utilitzat	Constants cinètiques		
	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{M/s}$)	Kcat (s^{-1})
Ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten	11,4	8,1	50,6
Linealització de Lineweaver-Burk	9,6	7,3	45,6

5.3. Discussió

5.3.1. Identificació d'esterases en *S. nonagrioides* i *S. littoralis*

Electroforesi nativa

L'electroforesi no desnaturalitzant de proteïnes seguida d'una tinció específica de carboxil esterases (CEs) va permetre identificar diferents proteïnes amb aquesta activitat en les anes *S. nonagrioides* i *S. littoralis*. L'assaig va revelar la presència d'una banda majoritària de les antenes en cadascuna de les espècies. En el cas de *S. littoralis* aquesta especificitat únicament s'observava en analitzar la mateixa quantitat de proteïna total per a cada teixit, mentre que en el cas de *S. nonagrioides* l'especificitat antenal de la banda s'observava fins i tot en augmentar la quantitat de proteïna per a altres teixits.

L'electroforesi en condicions no desnaturalitzants és una tècnica de separació de proteïnes altament empírica i que no aporta informació concreta sobre cap propietat o característica de la proteïna. En aquesta tècnica les proteïnes són separades en funció d'una combinació entre el seu pes molecular, el punt isoelèctric (que en determinarà la càrrega global al pH al qual es du a terme l'electroforesi) i la seva estructura, tant terciària com quaternària. El resultat és que una mateixa proteïna que estigui en equilibri entre dues formes oligomèriques (com és el cas de la CE humana, que es troba en equilibri entre una forma tetramèrica i una d'hexamèrica (Fleming et al. 2005)) donarà lloc a dues bandes diferents. D'altra banda, diverses proteïnes amb punts isoelèctrics i pesos moleculars propers poden migrar amb una mobilitat electroforètica propera, mostrant-se com una sola banda en el gel. Finalment, el tipus de revelat que s'utilitza per a la detecció de proteïnes tampoc permet obtenir-ne una informació quantitativa, doncs la intensitat relativa de les bandes no dependrà tant de la quantitat de proteïna, com de la major o menor capacitat de l'enzim per hidrolitzar els acetats de naftil. Finalment, cal assenyalar que, si bé en la bibliografia cercada per a la realització d'aquest treball no es troba cap exemple d'una CE incapaç de degradar aquests acetats, les estructures cristal·logràfiques descrites fins al moment no situen el centre actiu en una cara externa de la proteïna, sinó al final d'un canal hidrofòbic (Camps et al. 2009; Fleming et al. 2005). Així, tenint en compte l'estructura aromàtica dels acetats de naftil, seria possible l'existència de CEs amb una activitat prou baixa per aquests com per no donar lloc a una banda visible.

No obstant totes les limitacions de la tècnica, els resultats obtinguts tenen un valor qualitatiu comparatiu, doncs si bé la presència de la mateixa banda en dos teixits diferents no té perquè ser

degut a una mateixa proteïna, sí que caldria esperar que la presència d'una mateixa proteïna en dos teixits diferents mostrés bandes amb el mateix patró de migració electroforètica. En aquest sentit, la presència d'una banda específica o majoritària a les antenes sí que permet suggerir l'existència d'una CE també específica o preferent en aquest teixit.

Isoelectroenfoc natiu

En una segona anàlisi, la tècnica escollida per a la separació de proteïnes va ser l'isoelectroenfoc no desnaturalitzant. De la mateixa manera que en la tècnica anterior, en l'isoelectroenfoc no desnaturalitzant diferents proteïnes poden mostrar una mateixa migració electroforètica. No obstant, aquesta tècnica sí que aporta informació sobre una qualitat específica de la proteïna: el punt isoelèctric natiu, que tot i no ser coincident amb el punt isoelèctric de la proteïna desnaturalitzada, és també una propietat característica de la proteïna. Quan les proteïnes van ser analitzades mitjançant aquesta tècnica, es va observar novament la presència d'una banda específica o majoritària de les antenes en ambdós lepidòpters (punts isoelèctrics nadius 6,2 i 7,7 per *S. littoralis* i *S. nonagrioides*, respectivament). Pels motius exposats a l'apartat anterior sobre les limitacions de l'electroforesi no desnaturalitzant, resulta impossible concloure (amb les dades recollides fins al moment) si la CE específica de les antenes observada en ambdues tècniques és la mateixa isoforma o correspon, en canvi, a dues proteïnes diferents que, en funció de les condicions de la separació, migren amb una mobilitat diferent de la resta. D'altra banda, la feble intensitat d'aquesta banda observada únicament a les antenes tampoc pot ser atribuïda a un sol factor, sinó a una combinació de la quantitat de proteïna present i la capacitat d'aquesta per hidrolitzar l'acetat de naftil.

Pel que fa a la resta de proteïnes amb activitat CE observades a l'antena, cal destacar que es trobaven agrupades en un rang de pl d'entre 4 i 6. La informació existent a la literatura sobre les propietats de les CEs d'insecte és encara escassa i la única CE antenal de lepidòpter de la qual se'n té informació fins al moment és la d'*Antheraea polyphemus* (ApoIPDE) (Ishida & Leal 2005). ApoIPDE té un pl natiu de 3,5, més proper a la regió de les CEs no específiques de *S. nonagrioides* i *S. littoralis*, que no pas a la banda majoritàriament expressada a les antenes en aquestes dues arnes. Òbviament, amb una sola CE degradadora de la feromona d'un lepidòpter degudament caracteritzada, no es pot fer cap generalització sobre la relació entre el pl i la funció de la proteïna. En qualsevol cas, però, el fet que la única banda observada només a les antenes tingui un punt isoelèctric tan diferenciat (especialment en el cas de *S. nonagrioides*) és una particularitat afegida a la seva distribució tissular aparent.

5.3.2. Aïllament i caracterització de cDNA d'esterases de *S. nonagrioides*

Aïllament i caracterització de Snon-EST1

El primer intent per aïllar un cDNA potencialment codificant per a una CE antenal de *S. nonagrioides* es va dur a terme mitjançant una estratègia basada en PCR amb oligonucleòtids degenerats. Aquesta tasca fou duta a terme en col·laboració amb les doctores Christine Merlin i Martin Maïbèche (Merlin et al. 2007). En el moment d'iniciar aquest treball, la informació present a la literatura sobre aquest grup d'enzims era encara escassa, i els oligonucleòtids van ser dissenyats a partir d'un alineament de només 3 seqüències: dues esterases identificades a les antenes de l'arna *A. polyphemus* (Ishida & Leal 2002) i una tercera aïllada de les antenes de *Mamestra brassicae* (Maïbèche-Coisne et al. 2004). L'amplificació mitjançant aquests oligonucleòtids va donar lloc a una presumible CE antenal (SnonEST, renombrada com Snon-EST1 en el present treball) amb una identitat en seqüència d'aminoàcids del 70% de mitjana respecte de les fins aleshores identificades Apol-ODE, Apol-IE i Mbra-EST. Posteriorment, l'aparició a la literatura d'altres CEs d'insecte ha permès enriquir les anàlisis filogenètiques i establir possibles relacions entre Snon-EST1 i altres CEs d'insecte. Així, en la classificació més acceptada fins al moment per a esterases d'insecte (Oakeshott et al. 2005), Snon-EST1 es situa en el mateix grup que Apol-ODE i Mbra-EST (figura 5.2.12 de l'apartat de resultats). Tot i tractar-se d'un grup heterogeni, en el qual s'hi inclouen també algunes CEs degradadores de l'hormona juvenil, les tres CEs antenals de lepidòpter apareixen en un subgrup clarament diferenciat.

Donada l'absència de dades funcionals sobre la CE antenal de *S. nonagrioides*, l'especulació sobre el seu possible paper en la degradació feromonal només pot ser basat en dades provinents de la seqüència mateixa o de les característiques del transcrit. Per una banda, en un experiment d'hibridació *in situ* dut a terme pel grup de les doctores Emmanuelle Jacquin-Joly i Martine Maïbèche-Coisne, el transcrit mostrava una clara localització a la base de les sensiles implicades en la percepció feromonal (Merlin et al. 2007). Aquest resultat, juntament amb la deducció d'un pèptid senyal d'excreció extracel·lular de la proteïna, situarien Snon-EST1 molt probablement a la limfa sensilar, espai on tenen lloc els esdeveniments anomenats "perireceptors" en la detecció feromonal. D'altra banda, però, a diferència d'altres seqüències properes com Apol-ODE o Mbra-EST, que presenten una expressió selectiva o preferent pel teixit olfactiv (Ishida & Leal 2002; Maïbèche-Coisne et al. 2004), Snon-EST1 mostrava una distribució ubiqua, no essent ni tan sols l'antena el teixit on els nivells de transcrit eren més elevats.

A priori, les úniques condicions necessàries i suficients per a que una esterase estigui implicada en la finalització de la senyal feromonal són la seva ubicació a la limfa sensilar i la seva capacitat

per hidrolitzar l'acetat feromonal. Tot i que la prova definitiva per a definir la localització de la proteïna seria l'immunohistològica, les dades recollides fins al moment suggereixen la presència de Snon-EST1 a la limfa sensilar. No obstant, davant l'absència de proves funcionals, i sobretot davant la presència d'una banda específica de les antenes en l'electroforesi nativa de CEs i l'isoelectroenfoc natiu, es considerarà interessant l'intent d'aïllament d'aquesta CE en particular.

Aïllament i caracterització de Snon-EST2p i Snon-EST3p

L'estratègia plantejada per a la identificació d'una CE específica de les antenes consistia en aïllar la proteïna, obtenir-ne seqüències parcials mitjançant una anàlisi per espectrometria de masses i finalment utilitzar aquestes seqüències per al disseny d'oligonucleòtids degenerats dirigits a amplificar el cDNA de la proteïna en qüestió. Amb aquesta finalitat es va posar a punt una separació de proteïnes bidimensional, que consistia en una primera electroforesi en condicions no desnaturalitzants, seguida d'una electroforesi en condicions desnaturalitzants. D'entre les dificultats que es van trobar en aquesta tècnica, cal destacar la transferència entre les dues dimensions, que depenia en gran mesura de la correcta desnaturalització de la proteïna a l'interior del gel i la conseqüent interacció amb el dodecil sulfat sòdic, i que es va dur a terme finalment tal i com es descriu en l'apartat de mètodes (pàg. 81).

Si bé el resultat d'aquesta electroforesi va mostrar proteïnes amb un pes molecular al voltant de 60 kDa, compatible amb el de les CEs (Myers et al. 1988), l'anàlisi per ESI-Q/TOF d'aquestes va revelar que només una contenia pèptids amb identitat per proteïnes de la família de les CEs. Això no obstant, tenint en compte que la major part dels pèptids identificats en aquella porció del gel corresponien a una proteïna no relacionada amb les CEs, es pot concloure que la CE era una part molt minoritària de la banda observada en la tinció de nitrat de plata.

El fet que la banda analitzada per espectrometria de masses correspongués a una barreja de proteïnes, en la qual la CE no semblava ser ni tan sols majoritària, suposava una limitació important en l'estratègia de clonatge plantejada. Per una banda, només aquells pèptids pertanyents a regions altament conservades podien ser atribuïts a una CE (i utilitzats, per tant, com a patró per al disseny d'oligonucleòtids), però per l'altra els oligonucleòtids dissenyats a partir de seqüències conservades serien susceptibles d'amplificar qualsevol altra CE present a les antenes de *S. noagrioides*. No obstant aquesta limitació, l'amplificació per PCR amb els oligonucleòtids dissenyats a partir dels pèptids obtinguts va resultar en una seqüència parcial anomenada Snon-EST2p. Malauradament, tot i que els dos pèptids identificats per espectrometria de masses es trobaven presents a la seqüència, Snon-EST2p no contenia el motiu GX SXG, altament conservat en la família de les CEs i necessari per a l'activitat hidrolasa. Si bé s'han descrit diverses CEs no funcionals en aquesta família de proteïnes (Oakeshott et al. 2005), en la

major part dels casos només la serina n'és absent, trobant-se les dues glicines en posicions conservades en un alineament general amb altres CEs. Així, tot i que el grau d'identitat entre Snon-EST2p i altres CEs (52% amb SICXE10 i 41% amb SICXE3) estaria dins del rang observat en la família, cap la possibilitat de que la seqüència amplificada sigui un artefacte resultant dels processos d'amplificació i que no correspongui a la seqüència real d'un transcrit. En qualsevol cas, l'absència d'activitat seria totalment incompatible amb la identitat de la CE objecte d'estudi, que mostrava una banda en el gel de l'electroforesi no desnaturalitzant i, per tant, activitat sobre l'acetat de naftil.

Les PCR dutes a terme amb els oligonucleòtids dissenyats a partir de les seqüències proteïques, en combinació amb un oligonucleòtid dissenyat a partir d'una regió conservada en diferents CEs, va donar lloc a una segona seqüència parcial (Snon-EST3p). Tot i que Snon-EST3p sí que contenia el motiu GX SXG, associat al centre actiu de les proteïnes d'aquesta família, les seqüències proteïques identificades per espectrometria de masses no tenien una correspondència exacta a la seqüència d'aminoàcids deduïda per a Snon-EST3p, suggerint que Snon-EST3p era una CE diferent a la identificada per ESI-Q/TOF.

Donat que les dues seqüències obtingudes corresponien a un percentatge molt elevat del possible ORF, es va poder seleccionar una regió apropiada per estudiar la distribució tissular dels transcrits. Aquest estudi, dut a terme per RT-PCR, va mostrar una distribució ubiqua per part de totes dues CEs. Tot i que han estat descrites nombroses proteïnes en les que no hi ha una correspondència entre els nivells de transcrit i els del seu producte de traducció (Brockmann et al. 2007), les limitacions i riscos del procés utilitzat per al clonatge poden haver conduït fàcilment a l'aïllament d'un cDNA que no es correspongui amb la proteïna majoritària de les antenes observada en el gel. El principal inconvenient de l'estratègia emprada és la baixa concentració a que es troben les CEs a la limfa sensilar. Segons els càlculs realitzats en *A. polyphemus*, en el qual únicament s'han pogut identificar tres esterases antenals, aquests enzims es trobarien a una concentració d'entre 0,5 i 1 μ M (Vogt et al. 1985; Ishida & Leal 2005), mentre que altres molècules olfactives com ara les PBPs podrien assolir concentracions properes a 10 mM (Leal et al. 2005). A banda d'aquests càlculs experimentals publicats a la literatura, l'intent de tenyir un gel natiu de proteïnes antenals amb blau de coomassie o nitrat de plata, ambdós menys sensibles que la tinció per activitat, no va permetre detectar cap banda amb el mateix patró de migració que les bandes amb activitat CE. Aquesta baixa concentració obligava a dur a terme l'electroforesi bidimensional amb una quantitat de proteïna total al voltant de 300 μ g, molt per sobre de l'habitual (40-50 μ g). En aquestes condicions, la migració de les proteïnes a través del gel es veu alterada, podent-se modificar lleugerament la mobilitat electroforètica d'alguna proteïna. Donat que la transferència de

la proteïna es feia a partir d'un carril no tenyit, i tenint en compte la presència d'altres CE properes a la desitjada, resultaria probable la transferència de més d'una CE de la primera a la segona dimensió. Per aquest motiu es va optar per utilitzar l'isoelectroenfoc com a alternativa en la primera dimensió. Tal com es comenta a l'apartat 5.2.1 de resultats, la separació i tinció de CEs antenals mitjançant aquesta tècnica mostrava una banda majoritària a les antenes amb un punt isoelèctric natiu allunyat de la resta. L'electroforesi bidimensional en aquestes condicions va donar lloc a 4 bandes visibles en la tinció de nitrat de plata. Tot i que tan sols una d'aquestes bandes (iPA2, figura 5.2.7.) tenia un pes molecular en el rang de l'esperat per a una CE, les quatre bandes van ser seqüenciades per espectrometria de masses. No obstant, cap dels pèptids obtinguts tenia una seqüència conservada entre les CEs.

Els dos principals inconvenients a l'hora de purificar una CE antenal d'un lepidòpter com *S. nonagrioides* són la baixa concentració relativa d'aquestes proteïnes a l'extracte antenal i la dificultat d'obtenir grans quantitats de teixit per a l'extracció de proteïnes. Existeixen a la literatura dues experiències satisfactòries de purificació de CEs a partir d'antenes d'insecte, ambdues dutes a terme mitjançant dues cromatografies d'intercanvi iònic consecutives. El fet de poder detectar l'activitat CE mitjançant una electroforesi facilita la selecció de les fraccions obtingudes en la cromatografia; no obstant, per tal de poder dur a terme una purificació amb aquest tipus de tècnica es requereix una enorme quantitat de material biològic. La primera esterasa (Apol-PDE) es va purificar de les antenes de *A. polyphemus* i, tot i la gran diferència de tamany respecte *S. nonagrioides*, es va requerir l'extracció proteica de 900 antenes de l'insecte (Ishida & Leal 2005). En el segon cas (Pjap-PDE, del coleòpter *P. japonica*, força més petit que el primer) el nombre d'antenes utilitzades per a l'extracte proteic va superar les 100.000 (Ishida & Leal 2008). En el present treball es va utilitzar una estratègia d'electroforesi bidimensional per tal d'aïllar una CE antenal en particular de *S. nonagrioides*. No obstant, tot i haver assolit l'aïllament parcial i la seqüenciació d'una proteïna de la família de les CEs, la caracterització del transcrit obtingut a partir d'aquesta seqüència suggereix que es tracta d'una proteïna diferent a la inicialment considerada.

5.3.3. Identificació i caracterització de cDNAs de carboxil esterases de *S. littoralis*

La identificació de CEs antenals en el lepidòpter *S. littoralis* va partir de l'anàlisi d'una llibreria de cDNA antenal, elaborada per les doctores Emmanuelle Jaquin-Joly i Martine Maïbèche-Coisne i que contenia 20.000 ESTs. Tenint en compte les consideracions anteriors sobre la identificació de

proteïnes amb activitat CE en gels de poliacrilamida, el nombre esperat d'isoformes era superior a les 7 bandes observades en l'electroforesi no desnaturalitzant de l'extracte proteic d'antenes. De fet, el nombre de transcrits finalment identificats com a potencials CEs (20 en total) va superar aquestes expectatives. En un treball similar al dut a terme en *S. littoralis*, l'exploració de 5739 ESTs d'un banc de cDNA antenal de *Epiphyas postvittana* va permetre identificar únicament 5 seqüències de cDNA potencialment codificants per CEs (Jordan et al. 2008). Tot i que aquesta xifra era superior a les 3 identificades a les antenes de *A. polyphemus* mitjançant estratègies basades en PCR amb oligonucleòtids degenerats o en seqüenciació directa de la proteïna (Ishida & Leal 2005; Ishida & Leal 2002), quedava lluny de les 20 isoformes identificades en el present treball. D'altra banda, les anàlisis genòmiques dutes a terme en altres espècies, suggereixen que el nombre de seqüències codificants per CEs podria ser fins i tot superior. Així, tot i que les dades genòmiques no aporten informació referent al teixit que expressa cada gen, s'han identificat fins a 35 gens de tipus CE en *D. melanogaster* i 51 en *Anopheles gambiae* (Oakeshott et al. 2005), 49 en *Aedes aegypti* (Strode et al. 2008), i 24 en *Apis mellifera* (Claudianos et al. 2006). Molt probablement, aquest gran nombre d'isoformes trobades en espècies diferents, respon al fet que els èsters (més específicament els acetats) representen una part molt important tant dels compostos volàtils emesos per les plantes (kairomones) i pels propis insectes conespecífics (feromones) (<http://www.pherobase.com>), com dels xenobiòtics que entren en contacte amb l'insecte a través de la dieta o de l'aire.

Les dades funcionals existents sobre les CEs d'insecte són encara escasses i, per tant, resulta difícil establir relacions directes entre les característiques de la seqüència primària i el seu possible paper en el metabolisme d'aquests compostos volàtils. Aquesta limitació es fa especialment evident en l'anàlisi filogenètica, estructurada en base als grups proposats prèviament a la literatura (Oakeshott et al. 2005) i definits a partir d'un nombre limitat de dades funcionals. No obstant, algunes característiques de la seqüència condicionen, en certa manera, la possible funció de la proteïna.

Així, per exemple, l'absència de la Ser catalítica en la CE SICXE19 impossibilitaria a aquesta proteïna d'ésser funcional des d'un punt de vista enzimàtic. Aquesta característica es correspon amb l'anàlisi filogenètica obtinguda (figura 5.2.12 de resultats), que ubica SICXE19 en un grup de proteïnes no catalítiques, la funció de les quals ha estat relacionada amb la construcció de sinapsis neuronals (Biswas et al. 2008). Tot i que aquestes proteïnes han estat generalment associades al cervell (teixit amb major quantitat de sinapsis neuronals), l'estudi de la distribució del transcrit en diferents teixits de l'insecte va posar de manifest que SICXE19 no s'expressava al cervell. Aquest fet atribuiria a SICXE19 una funció en el sistema nerviós perifèric, tal i com va ser proposat per la neuroglina 1 de l'abella *A. mellifera*, que tenia una expressió més pronunciada a

les ales i a les potes, que no pas al cervell (Biswas et al. 2008).

Una altra característica que restringeix la possible funció de les CEs és l'absència d'un pèptid senyal d'excreció cel·lular. Així, per exemple, les CEs SICXE3, SICXE9, SICXE10, SICXE11 i SICXE12 no estarien presents a la limfa sensilar, sinó a l'interior de la cèl·lula (ja sigui al mitocondri o al citosol). A excepció de SICXE12, les altres 4 CEs van ser ubicades per l'anàlisi filogenètica en grups amb presència d'altres CEs intracel·lulars. Així SICXE3 i SICXE10 es troben en el sí d'un grup designat pròpiament com a esterases mitocondrials i citosòliques, mentre que SICXE9 i SICXE11 es situen en el grup de les α -esterases, entre les quals s'han descrit CEs implicades en la detoxificació de pesticides i èsters de la dieta (Strode et al. 2008). Tot i que cap d'aquestes esterases s'expressa de forma exclusiva a les antenes, l'estudi sobre la distribució del transcrit mostra com en la major part dels casos sembla ser en aquest teixit on els nivells de transcrit són més abundants. Alguns dels acetats presents a l'ambient (ja siguin semioquímics o xenobiòtics), tenen un caràcter lipòfil degut a la longitud de la seva cadena hidrocarbonada, fet que els podria donar accés a l'interior de la cèl·lula mitjançant un transport passiu a través de la membrana. Així doncs, no resulta estranya l'existència d'un catabolisme d'aquests compostos també a l'interior de la cèl·lula.

Finalment, pel que fa a la resta de CEs (aquelles que contenen la Ser catalítica i que són potencialment extracel·lulars per la presència d'un pèptid senyal), la informació addicional que n'aporta la seqüència primària és limitada i convida a la prudència a l'hora d'extreure'n conclusions.

En l'estudi de la distribució tissular del transcrit, per exemple, s'observa com algunes d'aquestes CEs s'expressen de forma exclusiva a l'òrgan olfatiu (l'antena), suggerint una possible especialització d'aquests enzims en la degradació d'odorants i/o feromones. Aquesta idea és consistent amb els estudis duts a terme amb els enzims degradadors de feromones de l'arna *A. polyphemus* (Ishida & Leal 2005) o del coleòpter *P. japonica* (Ishida & Leal 2008), ambdós d'expressió específica a les antenes. No obstant, l'absència de dades funcionals sobre altres enzims amb patrons d'expressió tissular heterogenis no permet establir una relació directa entre l'especificitat antenal d'un enzim i una major contribució d'aquest en la degradació feromonal. De forma similar, tampoc es pot establir una relació clara entre la localització d'una determinada seqüència en un grup filogenètic i una major implicació d'aquest enzim en el procés de degradació feromonal. De fet, en combinar les característiques de distribució tissular del transcrit i l'agrupament filogenètic, s'observen manques de correspondència, com ara el cas de l'esterasa SICXE13, que tot i compartir un 58% d'identitat amb ApolPDE, té un patró de distribució ubic (diametralment oposat a ApolPDE, que s'expressa únicament a les antenes). D'altra banda,

l'agrupament proposat inicialment per Oakeshott i col·laboradors ha incrementat la seva complexitat a mesura que s'han aportat noves seqüències a la literatura, generant grups mixtos que podrien correspondre's, en realitat, a dos grups independents. El cas més evident és el del grup G (figures 5.1.7 de la introducció i 5.2.12 de resultats), suportat per un valor de *bootstrap* de 77% i que inclou dos subgrups. Un d'aquests està format per CEs de l'hormona juvenil (JHE), que comparteixen una funció bioquímica molt particular i un percentatge d'identitat força elevat dins la família CEs (45 al 60%), i que podrien ser considerades com un grup amb entitat pròpia. De la mateixa manera, algun dels grups que es consideren diferenciats podrien combinar-se en un de sol. Així, per exemple, en l'anàlisi filogenètica d'Oakeshott i col·laboradors (figura 5.1.7), el grup B conté una gran quantitat de seqüències de la mateixa espècie (*A. gambiae*). Aquest fet pot haver propiciat la formació d'un grup propi (que ha estat considerat independent del grup C) que es caracteritzi per incloure seqüències d'una mateixa espècie, i no pas per agrupar enzims amb característiques similars.

Considerats globalment, els resultats obtinguts aporten 19 noves seqüències de CEs de l'arna *S. littoralis*, incrementant el total de CEs antenals d'insecte identificades fins al moment. La informació disponible sobre aquest tipus de proteïnes és encara escassa per poder assignar diferents funcions o graus de participació en un determinat procés biològic en base a la seqüència primària. No obstant, el fet de trobar seqüències distribuïdes per diferents grups filogenètics, amb patrons de distribució tissular diferenciats i amb evolucions diferents al llarg del desenvolupament de l'insecte, suggereix que podria existir cert grau d'especialització d'aquests isoenzims en diferents processos biològics.

5.3.4. Expressió recombinant de carboxil esterases antenals

Expressió en el bacteri *E. coli*

En una altra etapa en la caracterització dels enzims identificats es va intentar l'expressió recombinant d'una o més de les CEs obtingudes. Degut l'interès inicial en caracteritzar i desenvolupar inhibidors de CEs per a l'insecte plaga *S. nonagrioides*, el primer enzim escollit per a l'expressió recombinant (per a la qual es va utilitzar l'organisme *E. coli*) va ser Snon-EST1. L'expressió heteròloga de proteïnes d'origen eucariota en aquest microorganisme ha demostrat presentar certes dificultats, com ara un incorrecte plegament de la proteïna, la presència majoritària en el gen de codons de baixa freqüència en *E. coli* i/o la possibilitat de degradació per proteases (Smith 1996; Makrides 1996). No obstant, l'elevat rendiment obtingut habitualment en les expressions amb aquest sistema, així com la facilitat a nivell d'inversió i infraestructures encoratjaven a utilitzar-lo per a l'expressió recombinant.

Per tal de salvar les dificultats anteriorment descrites, es va utilitzar una estratègia d'expressió amb proteïnes de fusió (característica que aporten pels vectors pGEX i pMAL). Aquesta estratègia, en que la proteïna és traduïda a continuació d'una altra proteïna pròpia d'*E. coli*, facilita un correcte plegament i solubilització de la proteïna recombinant, i redueix les possibilitats de que aquesta sigui degradada per les proteases del microorganisme (Sørensen & Mortensen 2005). Addicionalment, es van utilitzar vectors que aportessin tRNAs de baixa freqüència en *E. coli*, com el vector pUBS i la soca d'*E. coli* Rosetta(DE3)pLys, que conté un vector d'aquestes característiques. Finalment, es va explorar també l'estratègia d'expressió de la proteïna al periplasma de la cèl·lula, fet que ha demostrat millorar el plegament de la proteïna en aquelles que requereixen la formació d'un o més ponts disulfur (Lauritzen et al. 1991). No obstant, en totes les estratègies utilitzades, en combinació amb les diferents condicions de temps d'inducció i temperatura, la proteïna de sobreexpressió observada apareixia únicament (o majoritàriament) a la fracció insoluble i tenia un pes molecular aparent inferior a l'esperat.

El conjunt de processos que tenen lloc durant la sobreexpressió d'una proteïna recombinant és altament complex, i qualsevol interpretació dels resultats obtinguts sense un estudi més detallat és especulativa i poc conclouent. No obstant, en el nostre cas, un cop verificada la integritat de la seqüència utilitzada per a l'expressió, una de les hipòtesis més coherents amb els resultats obtinguts és l'existència d'una degradació de tipus proteolític. La proteòlisi és un sistema complex (alguns dels aspectes del qual encara no han estat elucidats) i altament regulat, que elimina proteïnes anòmales mitjançant les nombroses proteases presents al citosol, al periplasma o a la membrana externa del microorganisme (Makrides 1996). Les soques d'*E. coli* utilitzades en aquest treball són deficitàries en proteases, especialment en la que ha estat identificada com a major responsable de la degradació proteica durant el procés de purificació OmpT (Sørensen & Mortensen 2005). No obstant, l'absència d'aquestes proteases no inactiva completament l'activitat proteolítica del microorganisme (que, d'altra banda, li resulta necessària per a molts processos biològics). Finalment, tot i que tradicionalment s'havia considerat que les proteïnes recombinants que s'expressaven en forma de cossos d'inclusió (agregats insolubles) estaven protegides de l'acció de les proteases, estudis de degradació proteica *in situ* (que tenen lloc durant el procés d'expressió de la proteïna), han demostrat que no resulta necessària la solubilització de la proteïna per tal que aquesta sigui degradada proteolíticament (Carbonell & Villaverde 2002).

Les dificultats trobades durant l'expressió en *E. coli*, així com altres intents frustrats d'expressió de CEs en aquest microorganisme publicats a la literatura (Morton & Potter 2000; Delroisse et al. 2005), posaven en tela de judici la idoneïtat d'aquest sistema d'expressió recombinant per a CEs d'origen eucariota. D'altra banda, si bé una proteïna recombinant obtinguda mitjançant *E. coli* hagués aportat una informació valuosa sobre els aspectes mecànics de l'enzim i la seva

inhibició, s'ha observat que determinades glicosilacions, pròpies dels organismes eucariotes, són necessàries per a la integritat de l'activitat de les CEs (Fleming et al. 2005). Per tots aquests motius, es va decidir abandonar l'expressió recombinant de CEs antenals d'insecte en el microorganisme *E. coli*.

Expressió en cèl·lules d'insecte en cultiu

Com a alternativa a l'expressió recombinant en *E. coli* es va seleccionar el sistema d'expressió en cèl·lules d'insecte en cultiu, infectades amb un baculovirus recombinant, portador del cDNA de la proteïna a expressar. Tot i que els rendiments esperats per aquest tipus d'expressió són en general menors que els obtinguts amb *E. coli*, aquest sistema ha demostrat ser efectiu en l'expressió heteròloga de proteïnes d'origen eucariota. A més, les cèl·lules d'insecte en cultiu contenen la maquinària necessària per a dur a terme les modificacions postraduccionals que requereixi la proteïna, així com el reconeixement del pèptid senyal d'excreció extracel·lular, present en moltes de les CEs identificades.

Simultàniament als anteriors intents d'expressió duts a terme amb *E. coli*, diverses seqüències de CEs havien estat identificades en *S. littoralis*, mostrant una riquesa en la varietat de característiques de seqüència i patrons d'expressió. Aquest fet va motivar la utilització de CEs antenals de *S. littoralis* per a l'expressió recombinant en cèl·lules d'insecte. D'entre les 20 CEs antenals identificades en aquesta arna, les dues seleccionades per a la transfecció i expressió van ser SICXE7 i SICXE10. L'esterasa SICXE7 contenia un pèptid d'excreció extracel·lular i tenia un patró de distribució del transcrit força específic per l'òrgan olfactiv, expressant-se de forma clarament majoritària a les antenes i en l'estadi adult. Si bé SICXE8 compartia també aquestes característiques, la quantificació del transcrit per PCR en temps real va mostrar com els nivells d'RNA missatger de SICXE7 eren tres vegades superiors en l'antena del mascle, que a la de la femella, mentre que en el cas de SICXE8 els nivells de transcrit eren pràcticament iguals a les antenes d'ambdós sexes (Durand et al. 2010a). Per la seva banda, SICXE10 no tenia cap pèptid senyal, suggerint una ubicació intracel·lular, apartada de la limfa sensilar, on tenen lloc els processos anomenats "perireceptors" relacionats amb la detecció feromonal. A més, tot i mostrar uns nivells de transcrit superiors a la fase adulta que en els altres estadis del cicle biològic de l'insecte (Durand et al. 2010b), l'esterasa SICXE10 tenia un patró d'expressió heterogeni, no detectant-se transcrit al cervell i les ales, però sí als altres teixits de l'insecte. D'acord amb les propietats extracel·lular i intracel·lular de cadascuna de les proteïnes, l'esterasa SICXE7 va ser purificada del medi de cultiu, mentre que SICXE10 fou extreta a partir d'una lisi cel·lular.

5.3.5. Assajos d'activitat amb carboxil esterases antenals recombinants

Les dades presents a la literatura referents a l'especificitat per substrat de les CEs suggerien que tant SICXE7 com SICXE10 podien tenir capacitat per hidrolitzar (amb major o menor eficàcia) diferents compostos de tipus èsters (Wadkins et al. 2001; Hosokawa 2008). D'entre tots els èsters a que està exposat l'insecte, se'n van seleccionar tres: dos components de la mescla feromonal de *S. littoralis* (el (Z,E)-9,11-14:OAc com majoritari i el (Z,E)-9,12-14:OAc com minoritari), i un compost volàtil emès per diferents espècies vegetals i que és detectat tant pel mascle com per la femella de *S. littoralis*, el (Z)-3-6:OAc (Durand et al. 2010b).

Carboxil esterasa SICXE7

L'esterasa SICXE7 va demostrar capacitat d'hidrolitzar els tres substrats estudiats. Les constants cinètiques per als diferents substrats, calculades en unes condicions de reacció properes a la velocitat inicial, no van mostrar diferències importants entre els dos components feromonals (el (Z,E)-9,11-14:OAc i el (Z,E)-9,12-14:OAc). Aquest resultat confirma l'elevada flexibilitat de les CEs a l'hora d'acomodar substrats diferents, doncs si bé en algun cas han demostrat ser específiques fins i tot per un enantiòmer determinat (Ishida & Leal 2008), en general les constants cinètiques obtingudes són poc sensibles a petites variacions en la estructura del substrat (Imai 2006). Els valors numèrics van ser calculats tant pel mètode clàssic d'ajustament lineal (en aquest cas, utilitzant la linealització de Hanes-Woolf), com mitjançant un ajustament no lineal a l'equació de Michaelis-Menten. Tot i que actualment es considera més acurat dur a terme l'ajustament no lineal mitjançant un programa informàtic apropiat (Copeland 2000; Cornish-Bowden 2004), el nombre de concentracions diferents analitzades va ser relativament baix, donant lloc a marges d'error relativament elevats en aquest ajustament (els intervals de confiança del 95% per a les Km del component majoritari i minoritari van ser de 16 a 106 μM i de 4 a 60 μM , respectivament). En qualsevol cas, sigui quin sigui el mètode de càlcul considerat, els valors de Km obtinguts per als dos components feromonals es trobaven en un punt intermedi entre els obtinguts per les dues CEs degradadores de feromona caracteritzades cinèticament fins al moment, l'esterasa Apol-PDE d'*A. polyphemus* (Km de 1,2 μM , (Ishida & Leal 2005)) i l'esterasa Pjap-PDE de *P. japonica* (Km de 754 μM , (Ishida & Leal 2008)). D'altra banda l'eficiència catalítica de SICXE7 per als components feromonals, definida pel quocient entre la Kcat i la Km, va ser de $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, més proper al de Pjap-PDE ($2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que no pas al de Apol-PDE ($1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), calculats ambdós a partir de les dades presentades en les referències bibliogràfiques anteriors.

Pel que fa al substrat (Z)-3-6:OH, l'afinitat d'aquest compost per SICXE7 va resultar ser força més baixa que la dels compostos feromonals (Km d'1,1 mM). No obstant, aquesta baixa afinitat es veia compensada per una elevada constant catalítica (Kcat de 30,6 s^{-1}), que permetia assolir velocitats

màximes de reacció de quasi dos ordres de magnitud superiors a les assolides pels components feromonals a la mateixa concentració d'enzim. La combinació d'aquests dos paràmetres donava com a resultat una eficiència catalítica de l'enzim per aquest substrat de $28 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, superior a la observada per als components feromonals.

Les dades recollides fins a dia d'avui sobre l'activitat esterasa a les antenes d'insectes no permeten treure gaires conclusions d'aquests resultats. Segons les seqüències identificades, SICXE7 podria coexistir amb unes altres 14 CEs a la limfa sensilar, aquelles que tenien un pèptid senyal d'excreció cel·lular (taula 5.2.4 de resultats) i que, per tant, es troben presumiblement a la limfa sensilar. Així doncs, caldria conèixer l'activitat de la resta de CEs per tal de poder especular sobre la participació o el pes específic de SICXE7 en la degradació d'odorants.

Pel que fa a les diferències de K_m observades entre els acetats feromonals i el volàtil de planta, sembla que aquestes podrien ser coherents amb les condicions en que aquests compostos es troben a la natura. Per una banda, tot i que no hi ha dades sobre l'emissió de (Z)-3-6:OAc, és possible que la concentració a l'aire dels volàtils produïts per les plantes en un camp de conreu sigui major que la de la feromona. D'altra banda, la solubilitat en medi aquós del (Z)-3-6:OAc és superior a la dels compostos feromonals. Aquests dos factors suggereixen que la fracció lliure del (Z)-3-6:OAc a la limfa sensilar podria ser força superior a la dels compostos feromonals, fet que permetria hidrolitzar eficientment aquest acetat, tot i la baixa afinitat per l'enzim.

Carboxil esterasa SICXE10

En el cas de l'esterasa SICXE10, el primer compost en ser caracteritzat des d'un punt de vista cinètic (i l'únic fins a la data d'elaboració del present treball) va ser el (Z)-3-6:OAc. En una anàlisi dels nivells de transcrit per PCR en temps real es va observar que l'exposició de l'insecte a altes dosis de (Z)-3-6:OAc provocava un augment significatiu dels nivells de transcrit de l'enzim, mentre l'exposició al component majoritari de la feromona (Z,E)-9,11-14:OAc no provocava cap variació significativa en els nivells de transcrit (Durand et al. 2010b). Aquesta observació suggeria que SICXE10 podia estar involucrada de forma més activa o específica en el metabolisme d'acetats de cadena curta alliberats per les plantes. D'altra banda, un experiment d'hibridació *in situ* va localitzar el transcrit a la base de la sensila, la qual cosa li permetria participar en els processos de degradació d'odorants detectats per l'antena (Durand et al. 2010b).

Els resultats obtinguts dels assajos d'activitat van mostrar una eficiència catalítica de l'enzim de $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en la degradació del (Z)-3-6:OAc, propera a la observada en altres parelles enzim-substrat. No obstant, l'afinitat del substrat per l'enzim va resultar baixa (K_m d'11 mM), fent necessària una concentració local relativament elevada per tal que l'enzim pugui treballar a

velocitats properes a la V_{max} . En aquest sentit cal tenir present que, així com SICXE7 tenia una localització extracel·lular, SICXE10 es troba molt probablement al citosol cel·lular. Molts dels compostos volàtils que arriben a les antenes de l'insecte són suficientment lipòfils com per travessar parcialment les membranes cel·lulars mitjançant una difusió passiva. De fet, s'ha descrit la participació d'altres enzims intracel·lulars (com ara el citocrom P450 o la glutatí S-transferasa) en el metabolisme d'odorants (Wojtasek & Leal 1999; Rogers et al. 1999), però a priori resulta poc probable que un compost odorant assoleixi concentracions tan elevades a l'interior de la cèl·lula.

En el seu conjunt, les dades obtingudes sobre l'esterasa SICXE10 no permeten definir una funció específica per aquest enzim. Pels motius exposats anteriorment, sembla poc probable que el (Z)-3-6:OAc sigui el substrat preferent de SICXE10, però a priori no es pot descartar la participació d'aquest enzim en la degradació de molècules d'odorant (incloent el (Z)-3-6:OAc) que accedeixin a l'interior del citosol de les neurones sensorials.

CONCLUSIONS

6. Conclusions

1. Ha estat identificat el primer cDNA codificant per una reductasa d'àcids grassos de la glàndula feromonal de *S. littoralis*. La proteïna recombinant obtinguda a partir d'aquest cDNA (anomenada Slit-FAR1) ha demostrat capacitat per reduir els precursors feromonal (àcids carboxílics activats en forma d'acil-CoAs) de *S. littoralis* als seus corresponents alcohols.
2. En les condicions de treball utilitzades, la reductasa Slit-FAR1 presenta valors d'eficiència catalítica en el rang de $6,8 \times 10^{-4}$ a $24,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ en actuar sobre els diferents precursors feromonal, indicant una baixa preferència per algun substrat en particular. D'altra banda, aquestes diferències no tenen una correspondència amb les proporcions dels diferents components en la mescla feromonal d'aquesta arna.
3. Tant l'acetil transferasa de meló (CmAAT1), com la cera sintasa/diacil glicerol acil transferasa de *Acinetobacter sp.* (ATF) tenen capacitat per acetilar el precursor feromonal (Z,E)-9,11-tetradecadienol amb una K_m^{ap} de 7,8 i 163 μM , i una $K_{\text{cat}}^{\text{ap}}$ de $1,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ i $2,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivament.
4. Mitjançant tècniques de separació de proteïnes en condicions no desnaturalitzants s'han pogut identificar un mínim de 7 proteïnes amb activitat carboxil esterasa a les antenes dels lepidòpters *S. littoralis* i *S. nonagrioides*. Si bé la major part de les proteïnes identificades tenien patrons d'expressió heterogenis, com a mínim una d'elles mostrava una expressió majoritària a les antenes en cadascuna de les espècies.
5. Han estat identificats 19 cDNAs codificants per carboxil esterases antenals en *S. littoralis* i 3 en *S. nonagrioides*. Els diferents cDNAs identificats presenten diferències en els patrons de distribució tissular, localització cel·lular i agrupament filogenètic.
6. Dues carboxil esterases antenals de l'arna *S. littoralis* han estat expressades en un sistema recombinant i caracteritzades cinèticament.
 - L'esterasa SICXE7 ha demostrat capacitat per hidrolitzar eficaçment els components feromonal de *S. littoralis* (Z,E)-9,11-14:OAc (majoritari) i (Z,E)-9,12-14:OAc (minoritari), així com el (Z)-3-6:OAc, emès per les plantes i detectat per la femella de l'insecte. Les constants cinètiques de l'enzim per als components feromonal han estat de 49 i 79 μM (per a la K_m dels components majoritari i minoritari, respectivament) i 0,3 s^{-1} per la K_{cat} d'ambdós compostos. En el cas del compost (Z)-3-6:OAc, les constants

Conclusions

cinètiques s'han establert en 1 mM per la K_m i $30,6 \text{ s}^{-1}$ per la K_{cat} .

- L'esterasa SICXE10 ha demostrat igualment la capacitat per degradar el (Z)-3-6:OAc, amb una K_m d'11 mM i una K_{cat} de $50,6 \text{ s}^{-1}$

BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografia

- Abo-El-Ghar, M.; Nassar, M.; Riskalla, M. & Abd-El-Ghafar, S. **1986**. Rate of development of resistance and pattern of cross-resistance in fenvalerate and decamethrin-resistant strains of *Spodoptera littoralis*. *Agricultural Research Review*, 61, 141-145.
- Ache, B.W. & Young, J.M. **2005**. Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48, 417-430.
- Albajes, R.; Konstantopoulou, M.; Etchepare, O.; Eizaguirre, M.; Frérot, B.; Sans, A.; Krokos, F.; Améline, A. & Mazomenos, B. **2002**. Mating disruption of the corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) using sprayable formulations of pheromone. *Crop Protection*, 21(3), 217-225.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. & Lipman, D.J. **1990**. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-10.
- Antony, B.; Fujii, T.; Moto, K.; Matsumoto, S.; Fukuzawa, M.; Nakano, R.; Tatsuki, S. & Ishikawa, Y. **2009**. Pheromone-gland-specific fatty-acyl reductase in the adzuki bean borer, *Ostrinia scapularis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2), 90-5.
- Arsequell, G.; Fabriàs, G. & Camps, F. **1990**. Sex pheromone biosynthesis in the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* by delta-13 desaturation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14(1), 47-56.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) **1991**. Current protocols in Molecular Biology. John Wiley. & Sons, New York.
- Babilis, N.A. & Mazomenos, B.E. **1992**. Pheromone production in *Sesamia nonagrioides*: Diel periodicity and effect of age and mating. *Journal of Insect Physiology*, 38(8), 561-564.
- Bartelt, R.J.; Schaner, A.M. & Jackson, L.L. **1985**. cis-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology*, 11(12), 1747-1756.
- Bendtsen, J.D.; Nielsen, H.; Heijne, G. von & Brunak, S. **2004**. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340(4), 783-95.
- Benton, R.; Vannice, K.S. & Vosshall, L.B. **2007**. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, 450(7167), 289-93.
- Berg, M.J.; Tymoczko, J.L. & Stryer, L. **2002**. Biochemistry (5th ed.). W. H. Freeman & Co., New York.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. **1979**. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523.
- Biswas, S.; Russell, R.J.; Jackson, C.J.; Vidovic, M.; Ganeshina, O.; Oakeshott, J.G. & Claudianos, C. **2008**. Bridging the synaptic gap: neuroligins and neurexin I in *Apis mellifera*. *PLoS One*, 3(10), e3542.

- Bjostad, L.B. & Roelofs, W.L. **1986**. Sex pheromone biosynthesis in the red-banded leafroller moth, studied by mass-labeling with stable isotopes and analysis with mass spectrometry. *Journal of Chemical Ecology*, 12(2), 431–450.
- Bradford, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.
- Brinkmann, U.; Mattes, R.E. & Buckel, P. **1989**. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene*, 85(1), 109–114.
- Brockmann, R.; Beyer, A.; Heinisch, J. & Wilhelm, T. **2007**. Posttranscriptional expression regulation: What determines translation rates? ". *PLoS Computational Biology*, 3(3).
- Brown, N.F.; Anderson, R.C.; Caplan, S.L.; Foster, D.W. & McGarry, J.D. **1994**. Catalytically important domains of rat carnitine palmitoyltransferase II as determined by site-directed mutagenesis and chemical modification. Evidence for a critical histidine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 269(29), 19157-62.
- Buck, L. & Axel, R. **1991**. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175-87.
- Buist, P.H. **2004**. Fatty acid desaturases: Selecting the dehydrogenation channel. *Natural Product Reports*, 35(26).
- Butenandt, A.; Beckmann, R.; Stamm, D. & Hecker, E.Z. **1959**. Über den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori* - Reindarstellung und konstitution. *Zeitschrift für Naturforschung*, 14, 283-284.
- Campion, D.G.; Bettany, B.W.; Nesbitt, B.F.; Beevor, P.S.; Lester, R. & Poppi, R.G. **1974**. Field studies of the female sex pheromone of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research*, 64(01), 89-96.
- Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Muñoz-Torrero, D.; Ramírez, L.; Gómez, E.; Isambert, N.; Lavilla, R.; Badia, A.; Clos, M.V.; et al. **2009**. Pyrano[3,2-c]quinoline-6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase- and beta-amyloid-directed anti-Alzheimer compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(17), 5365-79.
- Cao, C.-W.; Zhang, J.; Gao, X.-W.; Liang, P. & Guo, H.-L. **2008**. Overexpression of carboxylesterase gene associated with organophosphorous insecticide resistance in cotton aphids, *Aphis gossypii* (Glover). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90(3), 175-180.
- Carbonell, X. & Villaverde, A. **2002**. Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion. *Biotechnology Letters*, 24(23), 1939–1944.
- Cardé, R.T. **1976**. Utilization of pheromones in the population management of moth pests. *Environmental Health Perspectives*, 14, 133-144.
- Cardé, R.T.; Roelofs, W.L.; Harrison, R.G.; Vawter, A.T.; Brussard, P.F.; Mutuura, A. & Munroe, E. **1978**. European corn borer: Pheromone polymorphism or sibling species? *Science*, 199(4328), 555-556.

- Chevallet, M.; Luche, S. & Rabilloud, T. **2006**. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4), 1852-8.
- Choi, J.Y.; Stuke, J.; Hwang, S.Y. & Martin, C.E. **1996**. Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3581-9.
- Claudianos, C.; Ranson, H.; Johnson, R.M.; Biswas, S.; Schuler, M. A; Berenbaum, M.R.; Feyereisen, R. & Oakeshott, J.G. **2006**. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 615-36.
- Copeland, R.A. **2000**. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis (2nd Ed.). John Wiley & Sons, New York.
- Cornish-Bowden, A. **2004**. Fundamentals of enzyme kinetics (3rd E.). Portland Press, London.
- Delroisse, J.M.; Dannau, M.; Gilsoul, J.J.; El Mejdoub, T.; Destain, J.; Portetelle, D.; Thonart, P.; Haubruge, E. & Vandenberghe, M. **2005**. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 42, 286-294.
- Donkin, S.S.; Velez, J.C.; Totten, A.K.; Stanisiewski, E.P. & Hartnell, G.F. **2003**. Effects of feeding silage and grain from glyphosate-tolerant or insect-protected corn hybrids on feed intake, ruminal digestion, and milk production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1780-1788.
- Downham, M.C.A.; McVeigh, L.J. & Moawad, G.M. **1995**. Field investigation of an attracticide control technique using the sex pheromone of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 85(04), 463-472.
- Durand, N.; Carot-Sans, G.; Chertemps, T.; Montagné, N.; Jacquin-Joly, E.; Debernard, S. & Maibèche-Coisne, M. **2010a**. A diversity of putative carboxylesterases are expressed in the antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Molecular Biology*, 19(1), 87-97.
- Durand, N.; Carot-Sans, G.; Chertemps, T.; Bozzolan, F.; Party, V.; Renou, M.; Debernard, S.; Rosell, G. & Maibèche-Coisne, M. **2010b**. Characterization of an antennal carboxylesterase from the pest moth *Spodoptera littoralis* degrading a host plant odorant. *PLoS One*, 5(11), e15026.
- D'Auria, J.C.; Chen, F. & Pichersky, E. **2002**. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiology*, 130(1), 466-476.
- El-Sharkawy, I.; Manriquez, D.; Flores, F.B.; Regad, F.; Bouzayen, M.; Latché, A. & Pech, J.C. **2005**. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, 59(2), 345-362.

- Emanuelsson, O.; Brunak, S.; Heijne, G. von & Nielsen, H. **2007**. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*, 2(4), 953-971.
- Fabriàs, G.; Marco, M. & Camps, F. **1994**. Effect of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide on sex pheromone biosynthesis in *Spodoptera littoralis* isolated glands. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 27(2), 77-87.
- Fabriàs, M. **1986**. Actividad antagonista de dos derivados precocénicos con propiedades antagonistas de la hormona juvenil sobre *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). Tesina, Universitat de Barcelona.
- Fleming, C.D.; Bencharit, S.; Edwards, C.C.; Hyatt, J.L.; Tsurkan, L.; Bai, F.; Fraga, C.; Morton, C.L.; Howard-Williams, E.L.; Potter, P.M.; et al. **2005**. Structural insights into drug processing by human carboxylesterase 1: tamoxifen, mevastatin, and inhibition by benzil. *Journal of Molecular Biology*, 352(1), 165-77.
- Forstner, M.; Breer, H. & Krieger, J. **2009**. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkworm *Antheraea polyphemus*. *International Journal of Biological Sciences*, 5(7), 745-57.
- Gilbert, L.I.; A. Granger, N. & Roe, R.M. **2000**. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(8-9), 617-644.
- Gilbert, M.M. & Auld, V.J. **2005**. Evolution of clams (cholinesterase-like adhesion molecules): structure and function during development. *Frontiers in Bioscience*, 10, 2177-92.
- Gurvitz, A.; Mursula, A.M.; Firzinger, A.; Hamilton, B.; Kilpeläinen, S.H.; Hartig, A.; Ruis, H.; Hiltunen, J.K. & Rottensteiner, H. **1998**. Peroxisomal Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-enoyl-CoA isomerase encoded by EC11 is required for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids. *Biochemistry*, 273(47), 31366-31374.
- Ha, T.S. & Smith, D.P. **2008**. Insect odorant receptors: Channeling scent. *Cell*, 133, 761-763.
- Hansson, B.S. & Anton, S. **2000**. Function and morphology of the antennal lobe: new developments. *Annual Review of Entomology*, 45, 203-31.
- Hashimoto, T. **1996**. Peroxisomal beta-oxidation: enzymology and molecular biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 804, 86-98.
- Henikoff, S. & Henikoff, J.G. **1992**. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89(22), 10915.
- Holmquist, M. **2000**. Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: Structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 209-235.
- Hosokawa, M. **2008**. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules*, 13(2), 412-31.

- Hyone-Myong, E. **1996**. Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology. Academic press, San Diego.
- Imai, T. **2006**. Human carboxylesterase isozymes: Catalytic properties and rational drug design. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21(3), 173-185.
- Ish-Horowicz, D. & Burke, J.F. **1981**. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research*, 9(13), 2898-2989.
- Ishida, Y. & Leal, W.S. **2008**. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(26), 9076-9080.
- Ishida, Y. & Leal, W.S. **2002**. Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkworm, *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1775-1780.
- Ishida, Y. & Leal, W.S. **2005**. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 14075-14079.
- Issa, Y.; Keddis, M.; Abdel-Sattar, M.; Ayad, F. & El-Guindy, M. **1984**. Survey of resistance to organophosphorus insecticides in field strains of the cotton leafworm during 1980-1984 cotton-growing seasons. *Bulletin of the Entomological Society of Egypt*, 14, 399-404.
- Jin, X.; Ha, T.S. & Smith, D.P. **2008**. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(31), 10996-1001.
- Jordan, M.D.; Stanley, D.; Marshall, S.D.G.; De Silva, D.; Crowhurst, R.N.; Gleave, A.P.; Greenwood, D.R. & Newcomb, R.D. **2008**. Expressed sequence tags and proteomics of antennae from the tortricid moth, *Epiphyas postvittana*. *Insect Molecular Biology*, 17(4), 361-373.
- Jordan, M.D.; Anderson, A.; Begum, D.; Carraher, C.; Authier, A.; Marshall, S.D.G.; Kiely, A.; Gatehouse, L.N.; Greenwood, D.R.; Christie, D.L.; et al. **2009**. Odorant receptors from the light brown apple moth (*Epiphyas postvittana*) recognize important volatile compounds produced by plants. *Chemical Senses*. 34(5), 383-394
- Jurenka, R.A. **2003**. In "Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology", G. J. Blomquist & R. G. Vogt, eds. Elsevier Academic Press, London. 53-80.
- Jurenka, R.A.; Haynes, K.F.; Adlof, R.O.; Bengtsson, M. & Roelofs, W.L. **1994**. Sex pheromone component ratio in the cabbage looper moth altered by a mutation affecting the fatty acid chain-shortening reactions in the pheromone biosynthetic pathway. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(4), 373-381.
- Jurenka, R.A. & Roelofs, W.L. **1989**. Characterization of the acetyltransferase used in pheromone biosynthesis in moths: specificity for the Z isomer in Tortricidae. *Insect Biochemistry*, 19(7), 639-644.

- Kain, P.; Chandrashekar, S.; Rodrigues, V. & Hasan, G. **2009**. Drosophila mutants in phospholipid signaling have reduced olfactory responses as adults and larvae. *Journal of Neurogenetics*, 23(3), 303-12.
- Kaissling, K. **2009a**. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model revised. *Journal of Comparative Physiology*. 195(10), 895-922.
- Kaissling, K. **1998**. Pheromone deactivation catalyzed by receptor molecules: a quantitative kinetic model. *Chemical Senses*, 23(4), 385-95.
- Kaissling, K. **2004**. Physiology of pheromone reception in insects (an example of moths). *Anir*, 6(2), 73-91.
- Kaissling, K. **2009b**. In "Biologically inspired signal processing for chemical" A. Gutiérrez & S. Marco, eds. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg. 45-52.
- Kaissling, K. & Priesner, E. **1970**. Smell threshold of the silkworm. *Naturwissenschaften*, 57(1), 23-8.
- Kamita, S.G.; Hinton, A.C.; Wheelock, C.E.; Wogulis, M.D.; Wilson, D.K.; Wolf, N.M.; Stok, J.E.; Hock, B. & Hammock, B.D. **2003**. Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12), 1261-1273.
- Kasang, G.; Nicholls, M. & Von Proff, L. **1989**. Sex pheromone conversion and degradation in antennae of the silkworm moth *Bombyx mori* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 45(1), 81-87.
- Klein, U. **1987**. Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antheraea polyphemus* (Saturniidae). *Insect Biochemistry*, 17(8), 1193-1204.
- Kolattukudy, P.E. & Rogers, L. **1986**. Acyl-CoA reductase and acyl-CoA: fatty alcohol acyl transferase in the microsomal preparation from the bovine meibomian gland. *Journal of Lipid Research*, 27(4), 404-11.
- Lassance, J.-M.; Groot, A.T.; Liénard, M.A.; Antony, B.; Borgwardt, C.; Andersson, F.; Hedenström, E.; Heckel, D.G. & Löfstedt, C. **2010**. Allelic variation in a fatty-acyl reductase gene causes divergence in moth sex pheromones. *Nature*, 466, 486–489.
- Lauritzen, C.; Tüchsen, E.; Hansen, P.E. & Skovgaard, O. **1991**. BPTI and N-terminal extended analogues generated by factor Xa cleavage and cathepsin C trimming of a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2(5-6), 372-8.
- Lazard, D.; Zupko, K.; Poria, Y.; Nef, P.; Lazarovits, J.; Horn, S.; Khen, M. & Lancet, D. **1991**. Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature*, 349(6312), 790-3.
- Leal, W.S.; Ishida, Y.; Pelletier, J.; Xu, W.; Rayo, J.; Xu, X. & Ames, J.B. **2009**. Olfactory proteins mediating chemical communication in the navel orangeworm moth, *Amyelois transitella*. *PLoS One*, 4(9), e7235.

- Leal, W.S.; Chen, A.M.; Ishida, Y.; Chiang, V.P.; Erickson, M.L.; Morgan, T.I. & Tsuruda, J.M. **2005**. Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 5386-5391.
- Lee, A.G. **2004**. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666(1-2), 62-87.
- Legeai, F.; Malpel, S.; Montagné, N.; C, M.; Cousseran, F.; Merlin, C.; François, M.C.; Maïbèche-Coisne, M.; Gavory, F.; Poulain, J.; et al. **2011**. An expressed sequence tag collection from the male antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*: A resource for olfactory and pheromone detection research. *BMC Genomics*, 12(86).
- Lilly, M.; Bauer, F.F.; Lambrechts, M.G.; Swiegers, J.H.; Cozzolino, D. & Pretorius, I.S. **2006**. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23(9), 641-59.
- Liénard, M. A; Hagström, A.K.; Lassance, J.-M. & Löfstedt, C. **2010**. Evolution of multicomponent pheromone signals in small ermine moths involves a single fatty-acyl reductase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(24), 10955-60.
- Locke, M. **1965**. Permeability of insect cuticle to water and lipids. *Science*, 147(3655), 295-298.
- Lund, A. H.; Duch, M. & Pedersen, F.S. **1996**. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Research*, 24(4), 800-1.
- Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li, M.; Doherty-Kirby, A. & Lajoie, G. **2003**. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(20), 2337-42.
- Makrides, S.C. **1996**. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60(3), 512.
- Mane, S.D.; Tompkins, L. & Richmond, R.C. **1983**. Male esterase 6 catalyzes the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females. *Science*, 222(4622), 419-21.
- Martinez, T.; Fabriàs, G. & Camps, F. **1990**. Sex pheromone biosynthetic pathway in *Spodoptera littoralis* and its activation by a neurohormone. *Journal of Biological Chemistry*, 265(3), 1381.
- Mas, E.; Llòria, J.; Quero, C.; Camps, F. & Fabriàs, G. **2000**. Control of the biosynthetic pathway of *Sesamia nonagrioides* sex pheromone by the pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 455-9.
- Mason, A.B. & Dufour, J.P. **2000**. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16(14), 1287-1298.
- Matsumoto, S.; Fónagy, A.; Yamamoto, M.; Wang, F.; Yokoyama, N.; Esumi, Y. & Suzuki, Y. **2002**. Chemical characterization of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(11), 1447-55.
- Mazomenos, B.E. **1989**. Sex pheromone components of corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.) isolation, identification, and field tests. *Journal of Chemical Ecology*, 15(4), 1241-1247.

- Maïbèche-Coisne, M.; Merlin, C.; François, M.-C.; Queguiner, I.; Porcheron, P. & Jacquín-Joly, E. **2004**. Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chemical Senses*, 29(5), 381-90.
- McGarry, J.D. & Brown, N.F. **1997**. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry*, 244(1), 1-14.
- F. Huang, L.L.; Buschman, R.A.; Higgins & McGaughey, W.H. **1999**. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*, 284(5416), 965-967.
- Meeusen, R.L. & Warren, G. **1989**. Insect control with genetically engineered crops. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 373-381.
- Merlin, C.; Rosell, G.; Carot-Sans, G.; François, M.C.; Bozzolan, F.; Pelletier, J.; Jacquín-joly, E.; Guerrero, A. & Maïbèche-Coisne, M. **2007**. Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation. *Insect Molecular Biology*, 16, 73-81.
- Metz, J.G.; Pollard, M.R.; Anderson, L.; Hayes, T.R. & Lassner, M.W. **2000**. Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed. *Plant Physiology*, 122(3), 635-44.
- Mitchel, E. & Doolittle, R. **1976**. Sex pheromones of *Spodoptera exigua*, *S. eridania*, and *S. frugiperda*: bioassay for field activity. *Journal of Economic Entomology*, 69, 324-326.
- Morse, D.; Szittner, R.; Grant, G.G. & Meighen, E.A. **1982**. Rate of pheromone release by individual spruce budworm moths. *Journal of Insect Physiology*, 28(10), 863-866.
- Morton, C.L. & Potter, P.M. **2000**. Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression - Application to a rabbit liver carboxylesterase. *Molecular Biotechnology*, 16, 193-202.
- Moto, K.; Yoshiga, T.; Yamamoto, M.; Takahashi, S.; Okano, K.; Ando, T.; Nakata, T. & Matsumoto, S. **2003**. Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(16), 9156-61.
- Musser, F.R. & Shelton, A.M. **2003**. Bt sweet corn and selective insecticides: Impacts on pests and predators. *Journal of Economic Entomology*, 96(1), 71-80.
- Muñoz, L.; Rosell, G.; Quero, C. & Guerrero, A. **2008**. Biosynthetic pathways of the pheromone of the Egyptian armyworm *Spodoptera littoralis*. *Physiological Entomology*, 33(4), 275-290.
- Myers, M.; Richmond, R.C. & Oakeshott, J.G. **1988**. On the origins of esterases. *Molecular Biology and Evolution*, 5(2), 113-9.
- Nakagawa, T.; Sakurai, T.; Nishioka, T. & Touhara, K. **2005**. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, 307(5715), 1638-42.

- Nakagawa, T. & Vosshall, L.B. **2009**. Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(3), 284-292.
- Navon, A.; Wysoki, M. & Keren, S. **1983**. Potency and effect of *Bacillus thuringiensis* preparations against larvae of *Spodoptera littoralis* and *Boarmia (Asocotis) selenaria*. *Phytoparasitica*, 11(1), 3-11.
- Nesbitt, B.F.; Beevor, P.S.; Cole, R.A.; Lester, R. & Poppi, R.G. **1973**. Sex pheromones of two noctuid moths. *Nature*, 244(137), 208-9.
- Neu, H.C. & Heppel, L.A. **1965**. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 240(9), 3685-3692.
- Nègre, V.; Hôtelier, T.; Volkoff, A.-N.; Gimenez, S.; Cousserans, F.; Mita, K.; Sabau, X.; Rocher, J.; López-Ferber, M.; D'Alençon, E.; et al. **2006**. Spodobase: an EST database for the lepidopteran crop pest *Spodoptera*. *BMC Bioinformatics*, 7, 322.
- Oakeshott, J.G.; Claudianos, C.; Russell, R.J. & Robin, G.C. **1999**. Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, 21(12), 1031-42.
- Oakeshott, J.G.; Johnson, R.M.; Berenbaum, M.R.; Ranson, H.; Cristino, A.S. & Claudianos, C. **2010**. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 19 Suppl 1, 147-63.
- Oakeshott, J.G.; Claudianos, C.; Campbell, P.; Newcomb, R.D. & Russell, R. J. **2005**. In "Comprehensive molecular insect science". I. G. Lawrence, I. Kostas, & S. G. Sarjeet, eds. Elsevier, Amsterdam. 309-381.
- Ohnishi, A.; Hull, J.J. & Matsumoto, S. **2006**. Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(12), 4398-4403.
- Pan, Y.; Guo, H. & Gao, X. **2009**. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 152(3), 266-270.
- Perkins, D.N.; Pappin, D.J.C.; Creasy, D.M. & Cottrell, J.S. **1999**. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), 3551-3567.
- Prestwich, G.D.; Graham, S.M.; Handley, M.; Latli, B.; Streinz, L. & Tasayco, M.L.J. **1989**. Enzymatic processing of pheromones and pheromone analogs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 45(3), 263-270.
- Quero, C.; Bau, J.; Guerrero, A. & Renou, M. **2004**. Responses of the olfactory receptor neurons of the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* to components of the pheromone blend and their inhibition by a trifluoromethyl ketone analogue of the main component. *Pest Management Science*, 60(7), 719-26.

- Quero, C.; Lucas, P.; Renou, M. & Guerrero, A. **1996**. Behavioral responses of *Spodoptera littoralis* males to sex pheromone components and virgin females in wind tunnel. *Journal of Chemical Ecology*, 22(6), 1087–1102.
- Quero, C.; Rosell, G.; Jiménez, O.; Rodríguez, S.; Bosch, M. & Guerrero, A. **2003**. New fluorinated derivatives as esterase inhibitors. Synthesis, hydration and crossed specificity studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11, 1047-1055.
- Raae, A.J.; Kleppe, R.K. & Kleppe, K. **1975**. Kinetics and effect of salts and polyamines on T4 polynucleotide ligase. *European Journal of Biochemistry*, 60(2), 437-443.
- Ramsay, R.R.; Gandour, R.D. & Van der Leij, F.R. **2001**. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1546(1), 21-43.
- Redinbo, M. & Potter, P. **2005**. Mammalian carboxylesterases: From drug targets to protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, 10(5), 313-325.
- Ridgway, R.L.; Silverstein, R.M. & Inscoe, M.N., eds. **1990**. Behavior-modifying chemicals for insect management. M. Dekker, New York.
- Riendeau, D. & Meighen, E. **1985**. Enzymatic reduction of fatty acids and acyl-CoAs to long chain aldehydes and alcohols. *Experientia*, 41(6), 707-13.
- Robzyk, K. & Kassir, Y. **1992**. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Research*, 20(14), 3790.
- Rodríguez, S.; Guixia, H.; Liu, W.; Piña, B.; Rooney, A.P.; Camps, F.; Roelofs, W.L. & Fabriàs, G. **2004**. Expression and evolution of Δ^9 and Δ^{11} desaturase genes in the moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 1315-1328.
- Roelofs, W.L. & Jurenka, R.A. **1996**. Biosynthetic enzymes regulating ratios of sex pheromone components in female redbanded leafroller moths. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 4(3), 461–466.
- Rogers, M.E.; Jani, M.K. & Vogt, R.G. **1999**. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology*, 202(Pt 12), 1625-37.
- Rogers, M.E.; Sun, M.; Lerner, M.R. & Vogt, R.G. **1997**. SNMP-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14792-9.
- Rogers, M.E.; Steinbrecht, R. A & Vogt, R.G. **2001**. Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Cell and Tissue Research*, 303(3), 433-446.
- Rosa, E.; Barata, C.; Damásio, J.; Bosch, M.P. & Guerrero, A. **2006**. Aquatic ecotoxicity of a pheromonal antagonist in *Daphnia magna* and *Desmodesmus subspicatus*. *Aquatic Toxicology*, 79(3), 296-303.

- Rosell, G.; Hospital, S.; Camps, F. & Guerrero, A. **1992**. Inhibition of a chain shortening step in the biosynthesis of the sex pheromone of the Egyptian armyworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(7), 679-685.
- Rosler, Y.; Ravins, E. & Gomes, P.J. **2000**. Sterile insect technique (SIT) in the near east - a transboundary bridge for development and peace. *Crop Protection*, 19(8-10), 733-738.
- Ruhf, M.L. & Meister, M. **1999**. The *Drosophila* homologue of ribosomal protein L8. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(4), 349-53.
- Rybczynski, R.; Vogt, R.G. & Leners, M.R. **1990**. Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *Journal of Biochemical Chemistry*, 265(32), 19712-19715.
- Salama, H.; Foda, M. & Sharaby, A. **1989**. A proposed new biological standard for bioassay of bacterial insecticides vs. *Spodoptera spp.* *Tropical Pest Management*, 35(3), 326-330.
- Sambrook, J. & Russell, D. **2001**. Molecular Cloning. A Laboratory Manual (3rd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sans, A.; Riba, M.; Eizaguirre, M. & López, C. **1997**. Electroantennogram, wind tunnel and field responses of male Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, to several blends of its sex pheromone components. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82(2), 121-127.
- Schneider, W.C. & Hogeboom, G.H. **1950**. Intracellular distribution of enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 183(1), 123-128.
- Serra, M. **2006**. Estudi de Δ^{11} acil-CoA desaturases implicades en la biosíntesi de feromones sexuals de lepidòpters. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona.
- Serra, M.; Piña, B.; Bujons, J.; Camps, F. & Fabriàs, G. **2006**. Biosynthesis of 10,12-dienoic fatty acids by a bifunctional Δ^{11} desaturase in *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 634-641.
- Shuman, S. **1994**. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(51), 32678-84.
- Simpson, R.J. **2003**. Proteins and Proteomics. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sinha, P.; Poland, J.; Schnölzer, M. & Rabilloud, T. **2001**. A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 1(7), 835-840.
- Smart, R.; Kiely, A.; Beale, M.; Vargas, E.; Carraher, C.; Kralicek, A.V.; Christie, D.L.; Chen, C.; Newcomb, R.D. & Warr, C.G. **2008**. *Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(8), 770-80.
- Smith, D.W.E. **1996**. Problems of translating heterologous genes in expression systems: The role of tRNA. *Biotechnology Progress*, 12, 417-422.

- Solé, J.; Sans, A.; Riba, M.; Rosa, E.; Bosch, M.P.; Barrot, M.; Palència, J.; Castellà, J. & Guerrero, A. **2008**. Reduction of damage by the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, and the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, in maize fields by a trifluoromethyl ketone pheromone analog. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126, 28-39.
- Souleyre, E.J.F.; Greenwood, D.R.; Friel, E.N.; Karunairetnam, S. & Newcomb, R.D. **2005**. An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS Journal*, 272, 3132-3144.
- Steinbrecht, R.A. **1987**. In "Pheromone Biochemistry". G. D. Prestwich & G. J. Blomquist, eds. Academic Press, Orlando. 353-383.
- Strode, C.; Wondji, C.S.; David, J.-P.; Hawkes, N.J.; Lumjuan, N.; Nelson, D.R.; Drane, D.R.; Karunaratne, S.H.P.P.; Hemingway, J.; Black IV, W.C.; et al. **2008**. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 113-123.
- Sturm, A.; Wogram, J.; Segner, H. & Liess, M. **2000**. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(6), 1607-1615.
- Sørensen, H.P. & Mortensen, K.K. **2005**. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113-28.
- Tabata, J.; Minamishima, M.; Sugie, H.; Fukumoto, T.; Mochizuki, F. & Yoshiyasu, Y. **2009**. Sex pheromone components of the pear fruit moth, *Acrobasis pyrivorella* (Matsumura). *Journal of Chemical Ecology*, 35(2), 243-249.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. **2007**. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-9.
- Ullmann, A.; Jacob, F. & Monod, J. **1967**. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 24(2), 339-343.
- Uthoff, S.; Stoveken, T.; Weber, N.; Vosmann, K.; Klein, E.; Kalscheuer, R. & Steinbuchel, A. **2005**. Thio wax ester biosynthesis utilizing the unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 790.
- Vaeck, M.; Reynaerts, A.; Hofte, H.; Jansens, S.; De Beuckeleer, M.; Dean, C.; Zabeau, M.; Montagu, M.V. & Leemans, J. **1987**. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328(6125), 33-37.
- Vaughn, J.; Goodwin, R.; Tompkins, G. & McCawley, P. **1977**. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 13(4), 213-217.
- Vogel, H.; Heidel, A.J.; Heckel, D.G. & Groot, A.T. **2010**. Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *BMC Genomics*, 11, 29.

Bibliografia

- Vogt, R.G. & Riddiford, L.M. **1981**. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828), 161-3.
- Vogt, R.G.; Riddiford, L.M. & Prestwich, G.D. **1985**. Kinetic properties of a pheromone degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82, 8827–8831.
- Wadkins, R.M.; Morton, C.L.; Weeks, J.K.; Oliver, L.G.; Wierdl, M.; Danks, M.K. & Potter, P.M. **2001**. Structural constraints affect the metabolism of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin (CPT-11) by carboxylesterases. *Molecular Pharmacology*, 60(2), 355.
- Wicher, D.; Schäfer, R.; Bauernfeind, R.; Stensmyr, M.C.; Heller, R.; Heinemann, S.H. & Hansson, B.S. **2008**. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190), 1007-11.
- Witzgall, P.; Stelinski, L.; Gut, L. & Thomson, D. **2007**. Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 503-522.
- Wojtasek, H. & Leal, W.S. **1999**. Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chafer, *Phyllopertha diversa* (Coleoptera: Scarabaeidae), by an insect olfactory cytochrome P450. *FEBS Letters*, 458(3), 333-6.
- Yahyaoui, F.E.L.; Wongs-Aree, C.; Latche, A.; Hackett, R.; Grierson, D. & Pech, J.-C. **2002**. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *European Journal of Biochemistry*, 269(9), 2359-2366.

ANNEX: PUBLICACIONES

Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation

C. Merlin*, G. Rosell†, G. Carot-Sans‡, M.-C. François*, F. Bozzolan*, J. Pelletier*, E. Jacquin-Joly*, A. Guerrero‡ and M. Maibèche-Coisne*

*Unité 1272, UPMC–INRA–INA.PG, Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication, Centre INRA, France; †Unit of Medicinal Chemistry (Associated with CSIC). Faculty of Pharmacy. University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ‡Department of Biological Organic Chemistry, IIQAB (CSIC), Barcelona, Spain

Abstract

Rapid degradation of odours after interaction with olfactory receptors is a critical step of the signal reception process. However, the implied mechanisms are still largely unknown in vertebrates as well as in insects. Involvement of odourant-degrading enzymes in odourant degradation within the antennae has been shown in some insect species and, in particular, esterases could play a key role in degradation of sex pheromones from Lepidoptera. Using a PCR-based strategy, we isolated cDNAs encoding two new esterases from two moths which used acetates as pheromone compounds: the Egyptian armyworm *Spodoptera littoralis* and the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. In antennae, both transcripts were clearly restricted to olfactory sensilla, suggesting their involvement in the degradation of odourant acetate components.

Keywords: odourant-degrading enzymes, antennal esterases, olfaction, Lepidoptera.

Introduction

Sensitive and specific detection of volatile chemical cues is essential for insects to interpret their environment and

communicate with conspecifics. Detection of these chemical signals at the peripheral level takes place in the antennae, where several steps occur successively. While odourant solubilization and delivery by odourant-binding proteins (OBPs) and detection by membrane-bound odourant-receptors (ORs) were intensely studied and, in a large part, deciphered (review in Jacquin-Joly & Lucas, 2005), the last step of odourant degradation is still largely unknown. Efficient degradation of the signal is, however, an integral part of the signal reception and transduction processes. Among the different mechanisms potentially involved in this termination step, enzymatic degradation is certainly the most studied and some odourant-degrading enzymes (ODEs) have been identified in insects, particularly in Lepidoptera (Vogt, 2005). These insects are good models for this purpose because males possess a highly specific and sensitive olfactory system, allowing them to detect small amounts of the sex pheromone released by females. During their flight through the discontinuous pheromone trail, rapid deactivation of the pheromone appears to be crucial for males to obtain a spatial and temporal resolution of this intermittent signal (Vickers, 2006), and to allow the olfactory neurones to respond to frequent periodic stimulations (Vogt & Riddiford, 1981; Vogt, 2003). However, involvement of ODEs in fast pheromone deactivation is still debated, because some authors favour a rapid inactivation by OBPs, followed by enzymatic processes (review in Kaissling, 2001).

Nevertheless, biochemical approaches have led in the past to the identification of ODEs belonging to different families, such as esterases, aldehyde-oxidases, alcohol-oxidases/dehydrogenases or cytochromes P450 (review in Vogt, 2005), a diversity that could be correlated with the variety of chemical structures of pheromones. In pioneering works, esterases from the silkworm *Antheraea polyphemus* were studied two decades ago, and four esterase isozymes were isolated, one from the sensillum lymph (Apol-SE), two from its antennal integument and one from its scales (Vogt & Riddiford, 1981, 1986; Klein, 1987). As the four esterases were able to degrade the ester components of the pheromone blend, it was proposed that Apol-SE removes the

Received 13 June 2006; accepted after revision 1 August 2006; first published online 19 December 2006. Correspondence: Dr Martine Maibèche-Coisne, Unité 1272, UPMC–INRA–INA.PG, Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication, Route de Saint-Cyr, Bat A, 78026 Versailles Cedex, France. Tel.: +33 1 30 83 32 12; fax: +33 1 30 83 31 19; e-mail: maibeche@versailles.inra.fr

pheromone inside the sensillum lymph, thus maintaining the ability of the olfactory neurones to respond to new stimuli. The other esterases should participate in removing the hydrophobic pheromone from the integument and the cuticle of the insects, in order to reduce background noise (Vogt & Riddiford, 1981; Vogt, 2005).

Although the catabolic properties of ODEs towards pheromones were demonstrated biochemically many years ago, few antennal esterase genes have been characterized to date. Indeed, molecular data are available in only three species, two Lepidoptera (*A. polyphemus* and the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*), and one Hymenoptera (*Apis mellifera*). Three esterase cDNAs have been characterized from *A. polyphemus* antennae: a putative integumental esterase (Apol-IE) expressed in the antennae and legs of both sexes, and two male antennae specific esterases: a putative odourant-degrading enzyme (Apol-ODE; Ishida & Leal, 2002) and a pheromone-degrading enzyme (Apol-PDE; Ishida & Leal, 2005). Interestingly, purified Apol-PDE enzyme was shown to inactivate the pheromone with kinetic parameters compatible with male moth behaviour during its flight toward the pheromone plume, suggesting that it could thus correspond to the Apol-SE formerly characterized (Vogt *et al.*, 1985). In the noctuid moth *Mamestra brassicae*, we have cloned an esterase expressed in the antennae of both sexes (Maibèche-Coisne *et al.*, 2004) with an expression restricted to olfactory sensilla, including pheromone-sensitive ones. This localization is compatible with a function in the degradation of sex pheromone acetate components. Finally, in the bee *A. mellifera*, an antennal esterase overexpressed in drones, and potentially involved in the blockage of acetate pheromone signalling in this caste, has been also identified (Kamikouchi *et al.*, 2004). All of the antennal esterases characterized to date belong to the carboxyl/cholinesterase family, whose members present a great structural and functional diversity (Oakeshott *et al.*, 1999).

Despite the few biochemical and molecular data available, as many of the components identified to date in sex pheromone blends or in plant scents are esters (Vogt, 2005), we can suppose that olfactory esterases are widely present in insects, and particularly in moths. In order to improve our knowledge of this kind of enzyme, and to obtain a larger repertoire of candidate genes, we started a comparative study of the antennal esterases of two moths, *Spodoptera littoralis* (*Slit*) and *Sesamia nonagrioides* (*Snon*), which use two different types of acetates as main sex pheromone components. Esterase activities have been found previously in their antennae (Durán *et al.*, 1993; Quero *et al.*, 2003), and studies with esterase inhibitors revealed an inhibition of olfactory neurone responses to the pheromone blend (Quero *et al.*, 2004). We thus focused our work on the characterization of their antennal esterases using biochemical and molecular approaches. We first

investigated their diversity in the antennae and their distribution throughout the body by native PAGE and naphthyl acetate staining. In each species, a PCR-based strategy using degenerate primers led us to characterize two full-length cDNAs encoding esterases from male antennae, called *Slit-EST* and *Snon-EST*. Their expression patterns were studied by Northern-blot and *in situ* hybridization. Although the two transcripts were expressed in all of the tissues tested, their cellular localizations in the antennae at the base of olfactory sensilla, including the pheromone-sensitive ones, suggested that they could be involved in the degradation of acetate volatiles, including the components of the sex pheromones of these two species.

Results and Discussion

Esterase activities in various tissues of S. littoralis and S. nonagrioides

Because global esterase activity has been detected in *in vitro* experiments of hydrolysis of the pheromone acetates in male antennae of both species (Quero *et al.*, 2003), we investigated the presence of esterases responsible for this catabolism in the antennae of the two moths. After separation of male antennal homogenates by 10% native PAGE and staining with α - β -naphthyl acetate, at least seven bands were detected in the antennae of both species (Fig. 1A). These patterns are more complex than those observed in the antennae of *M. brassicae* and *A. polyphemus*, with five (Maibèche-Coisne *et al.*, 2004) and two bands (Vogt & Riddiford, 1981; Ishida & Leal, 2002), respectively. However, in this latter species, recent molecular data showed that these two bands could in fact correspond to three cloned esterases, Apol-IE, Apol-ODE (Ishida & Leal, 2002) and Apol-PDE (Ishida & Leal, 2005), leading to the hypothesis of a putative comigration of some of these proteins at the same level in native PAGE gels. If similar comigration of esterases could occur in *S. littoralis* and *S. nonagrioides*, we could expect that more than seven genes would be expressed in the antennae. Comparison of the migration patterns of male antennal esterases in both species on the same gel showed that five bands migrated similarly, suggesting that the corresponding proteins could share close structural features (Fig. 1A). On the other hand, esterase migrations in antennae and other tissues also revealed a great number of bands in non-olfactory tissues, but most of them were also present in the antennae (Fig. 1B). In *S. littoralis*, although one band seemed enriched in antennae and wings, there was no obvious olfactory-specific band, in contrast to *S. nonagrioides*, in which one band appeared antennae-specific (Fig. 1B; arrow and arrowhead, respectively). In the two moths, the esterase profiles of antennal extracts were comparable in both sexes, as previously observed for other noctuids such as *Trichoplusia ni* (Ferkovich *et al.*, 1980) and *M. brassicae* (Maibèche-Coisne

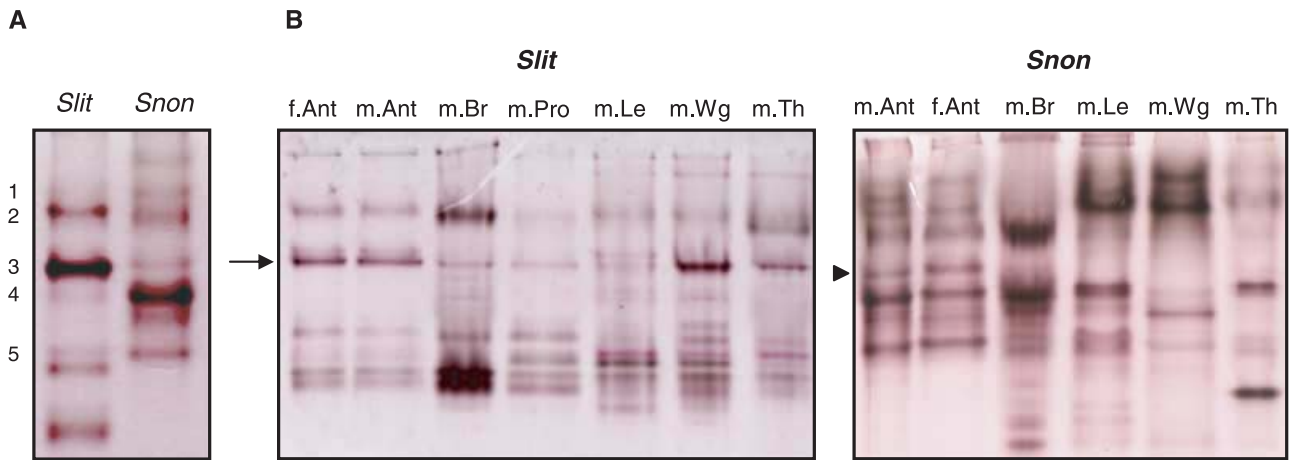


Figure 1. (A) Esterases from male antennae of *S. littoralis* (*Slit*) and *S. nonagrioides* (*Snon*) separated on a 10% native polyacrylamide gel and stained with α - β -naphthyl acetate. Numbers on left indicate bands with similar migration patterns between the two species. (B) Esterase patterns in different tissues of *S. littoralis* and *S. nonagrioides*. f: females; m: males; Ant: antennae; Br: brains; Pro: Proboscis; Le: Legs; Wg: Wings; Th: Thorax; Abd: Abdomens. Arrow indicates a band overexpressed in *Slit* antennae and wings, whereas arrowhead represents an antennal specific esterase in *Snon*.

et al., 2004). This lack of sex differences is in contradiction with the data from the saturniid moth *A. polyphemus*, where Apol-PDE and Apol-ODE are clearly male-specific (Ishida & Leal, 2002, 2005). As found in other moth species (reviewed in Callahan *et al.*, 2000), *S. littoralis* females are able to detect various acetate compounds, including their own pheromone (Ljungberg *et al.*, 1993). This auto-detection remains to be established in *S. nonagrioides*, but this, as shared by various Lepidoptera females, could explain the apparent lack of sex differences observed in esterase patterns. Contrary to the situation observed in *A. polyphemus*, the complex patterns of esterase bands in the antennae of these moths that use acetate compounds in their pheromonal and general odourant communication strongly suggests that the degradation of esters in the antennae could be performed by the intervention of numerous esterases.

Characterization of two antennal esterase cDNAs from both species

To further investigate the antennal esterases in *S. littoralis* and *S. nonagrioides*, we have undertaken the cDNA cloning of these genes in the two species. Two cDNA products were amplified by RT-PCR from male antennae using different strategies. In *S. littoralis*, a 950-bp cDNA product was amplified using two degenerate primers deduced from highly conserved regions of various insect esterase sequences. After cloning and sequencing, the deduced amino acid sequence appeared to belong to the esterase family. It was then extended to the 5' and 3' region by 5' and 3' RACE-PCR. In *S. nonagrioides*, a 1340-bp cDNA product was directly amplified by 3' RACE using a degenerate primer deduced from a conserved region of insect esterases, and then extended to the 5' region. This led us to

obtain two full-length cDNAs of 2835 and 1854 bp, called *Slit-EST* and *Snon-EST*, respectively. *Slit-EST* sequence analysis revealed that it contained a 1683-bp ORF, with a 119-bp 5' untranslated region (UTR) and a 1033-bp 3' UTR. *Snon-EST* was composed of a 1593-bp ORF, with a 41-bp 5' UTR and a 220-bp 3' UTR. The complete ORFs of the two putative esterases were amplified with a high fidelity Taq DNA polymerase and sequenced, confirming that the sequences obtained did not correspond to chimeras. *Slit-EST* and *Snon-EST* sequences were deposited into the GENBANK database under accession numbers DQ680828 and DQ680829, respectively. *Slit-EST* and *Snon-EST* encode proteins of 558 and 530 amino acids (Fig. 2) with calculated molecular masses of 63 kDa and 60.0 kDa and isoelectric points of 8.4 and 7.0 (MWCALC; Infobiogen). Signal sequence cleavage sites were predicted between Gln-16 and Gln-17 for *Slit-EST* and between Ala-19 and Val-20 for *Snon-EST* (SignalP 3.0; Bendtsen *et al.*, 2004), adding support to the theory that they could be secreted proteins, as known for other antennal esterases. *Slit-EST* showed five potential N-glycosylation sites predicted by NetNGlyc 1.0 Server, as Apol-ODE (Ishida & Leal, 2002), whereas *Snon-EST* exhibited only four potential N-glycosylation sites. Moreover, the two deduced polypeptides *Slit-EST* and *Snon-EST* displayed the Ser-active site (Ser-195 in both sequences) included in the conserved pentapeptide Gly-X-Ser-X-Gly common in enzymes of the α - β -hydrolase family (Oakeshott *et al.*, 1999) (Fig. 2). Comparison of *Slit-EST* and *Snon-EST* sequences with known antennal esterases revealed that *Slit-EST* was very close to Apol-ODE, with 63.5% of sequence identity, whereas *Snon-EST* was quite different from other known antennal esterases, with a maximum of 25% of identity with *Slit-EST*. As shown in the phylogenetic analysis, these three esterases clustered

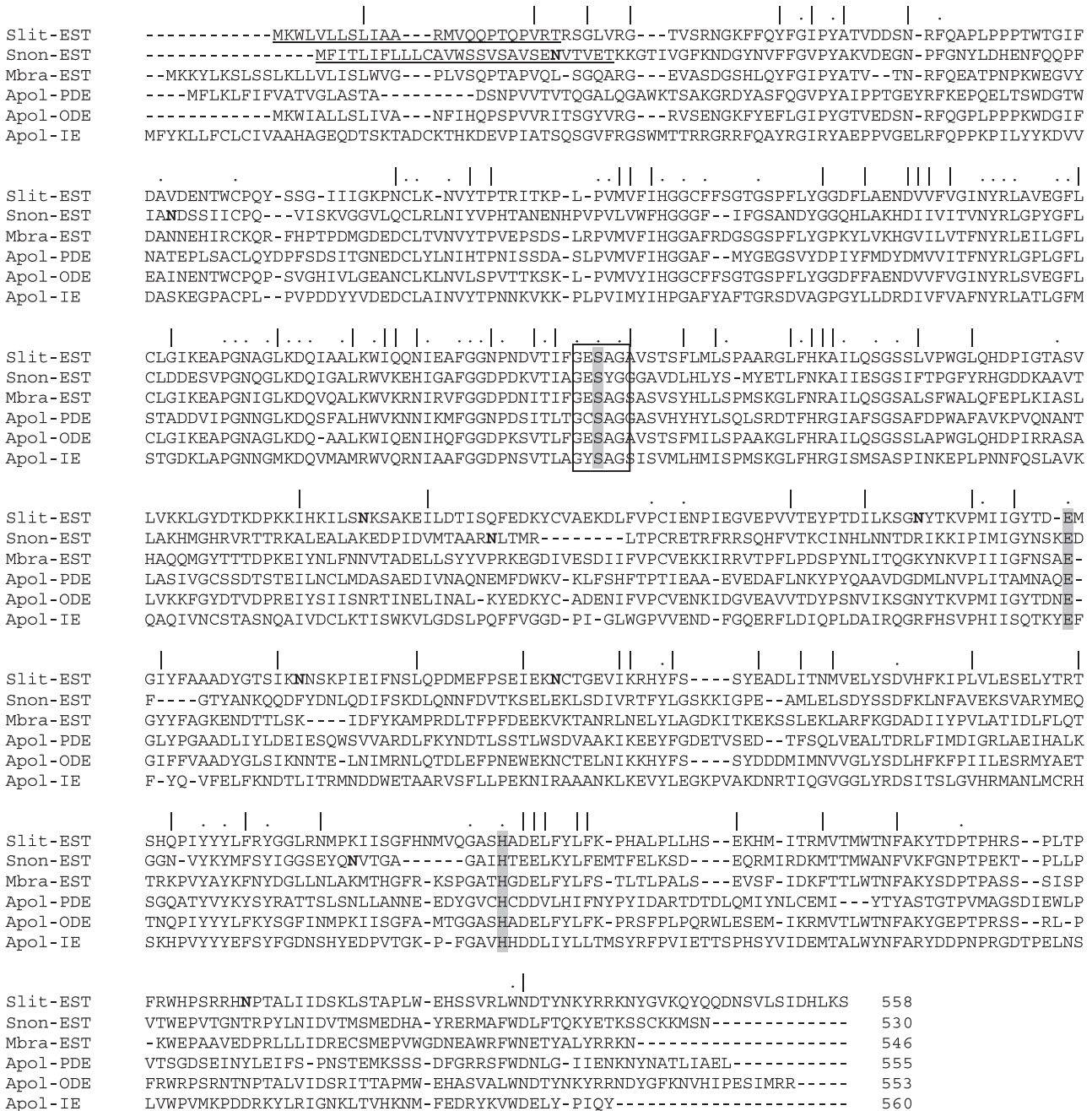


Figure 2. Alignment of Slit-EST and Snon-EST predicted amino acid sequences with *M. brassicae* antennal esterase (Mbra-EST; GENBANK accession no. AY390258), *A. polyphemus* pheromone-degrading enzyme (Apol-PDE; AY866480), odourant-degrading enzyme (Apol-ODE; AAM14415) and integumental esterase (Apol-IE; AAM14416). The residues of the catalytic triad (Ser¹⁹⁵, Glu³²⁷ and His⁴⁵⁰) are highlighted in grey and the Ser catalytic sites boxed. The putative signal peptides are underlined and the potential glycosylation sites are in bold. Identical and similar amino acids are indicated by dots and vertical lines, respectively.

with the antennal esterase from *M. brassicae* (Fig. 3). This group of antennal esterases was separated from another one in which Apol-PDE clustered with insect β -esterases and Apol-IE with a dipteran homologue. Carboxyl/cholinesterase members are known to show a great diversity in their substrate recognition as well as in their catalytic parameters (Satoh *et al.*, 2002). Consistent

with their functional diversity, their sequences are also highly divergent (Cygler *et al.*, 1993), and the olfactory members of the family do not appear to be an exception to the rule.

Tissue distribution of Slit-Est and Snon-Est

Slit-Est and *Snon-Est* transcriptions in various tissues were examined by Northern blot using *rpL8*, a gene encoding an

Figure 3. Phylogenetic analysis of Slit-EST and Snon-EST with various insect esterases, aligned using Multalign program (Corpet, 1988). GENBANK accession numbers are as follows: *Amel-EST*, *Apis mellifera* antennal esterase D-AP1, AB083009; *Bmor-JHE*, *Bombyx mori* juvenile hormone esterase, AF287267; *Cqui-E2*, *Culex quinquefasciatus* esterase α -2, CAA88030; *DmeICG4757*, *Drosophila melanogaster* esterase-6, CG4757; *Dmel-EST6*, *D. melanogaster* esterase-6, CG6917; *Lcup-E7*, *Lucilia cuprina* esterase, AAB67728; *Msex-JHE*, *Manduca sexta* JHE, AF327882; *Mper-FE4*, *Myzus persicae* E4 esterase, P35502; *Nlug-COE*, *Nilaparvata lugens* carboxylesterase, AF302777. The consensus tree was built in Paup 4.0b10 software (Sinauer associates, USA) using maximum parsimony. Bootstrap support values (in percent) based on 1000 replicates are indicated. Antennal esterases are underlined.

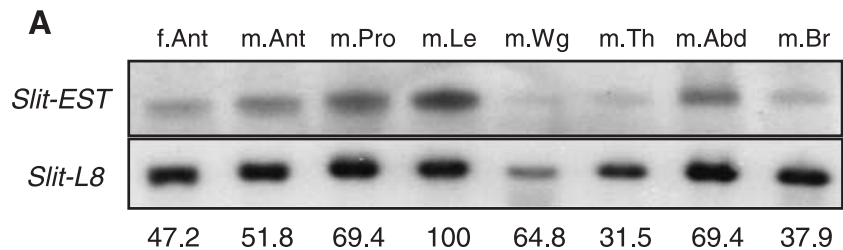
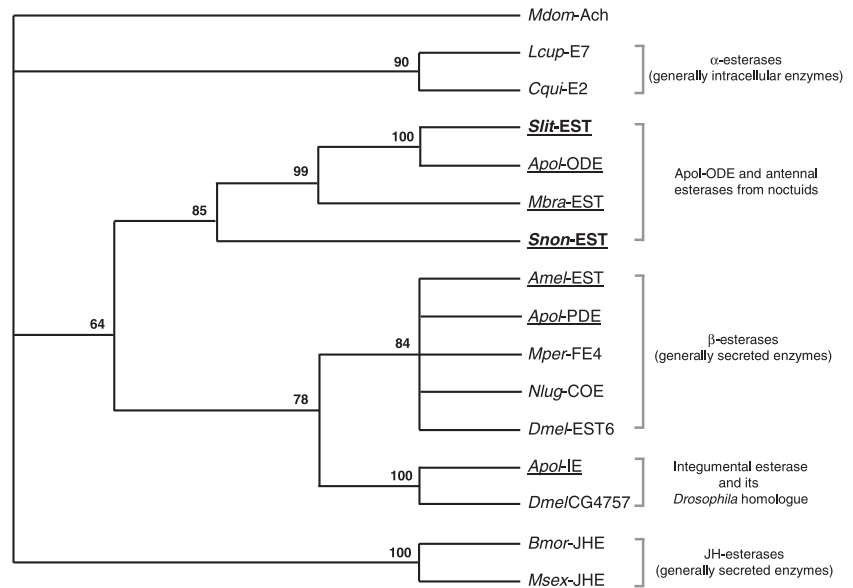
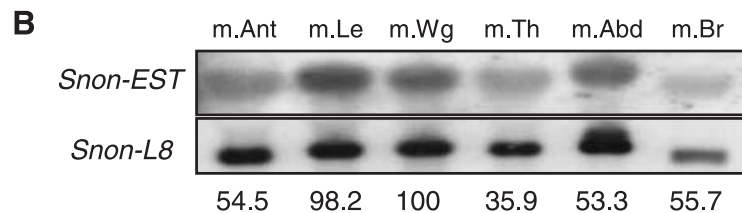


Figure 4. Analysis of *Slit-EST* (A) and *Snon-EST* (B) expression throughout the body by Northern-blot with templates from female antennae (f.Ant), male antennae (m.Ant), proboscis (m.Pro), legs (m.Le), wings (m.Wg), thorax (m.Th), abdomen (m.Abd) and brains (m.Br). The numbers under figures represent the relative expression level referring to ratios of *EST* vs. *rpl8* intensities then converted to percentages of maximal level.



ubiquitous ribosomal protein, as positive control (Fig. 4). The sizes observed for the two transcripts (~2800 bp for *Slit-EST* and ~1900 bp for *Snon-EST*) were in agreement with the corresponding cDNA lengths. The two genes were expressed in male antennae but also in all other tissues tested. In particular, *Slit-EST* and *Snon-EST* presented higher expression in legs (Fig. 4A) and legs and wings (Fig 4B), respectively. In both species, the two genes were expressed in female antennae. This was demonstrated by RT-PCR in *S. nonagrioides* (data not shown). In *S. littoralis*, the ratio of *Slit-EST* to *rpl8* was quite the same between male and female antennae, confirming the lack of sex differences previously observed after native-PAGE. The ubiquitous expression pattern of these two esterases was not incompatible with a putative function in odourant

molecule degradation, as they were also expressed in olfactory organs. Indeed, in spite of its expression in all tissues of *A. polyphemus*, including the antennae (Ishida & Leal, 2002, 2005), integument esterase was demonstrated also to efficiently degrade the acetate components of the pheromone (Vogt & Riddiford, 1981).

Expression of Slit-Est and Snon-Est within the male antennae

The cellular localizations of *Slit-EST* and *Snon-EST* in antennae have been specified by *in situ* hybridization (Fig. 5). The male antennae of the two species present different morphologies, filiform in *S. littoralis* (Ljungberg *et al.*, 1993) and comb-like (bipectinate) in *S. nonagrioides* (Solinas & Trona, 2002). They are dorsally covered with scales and

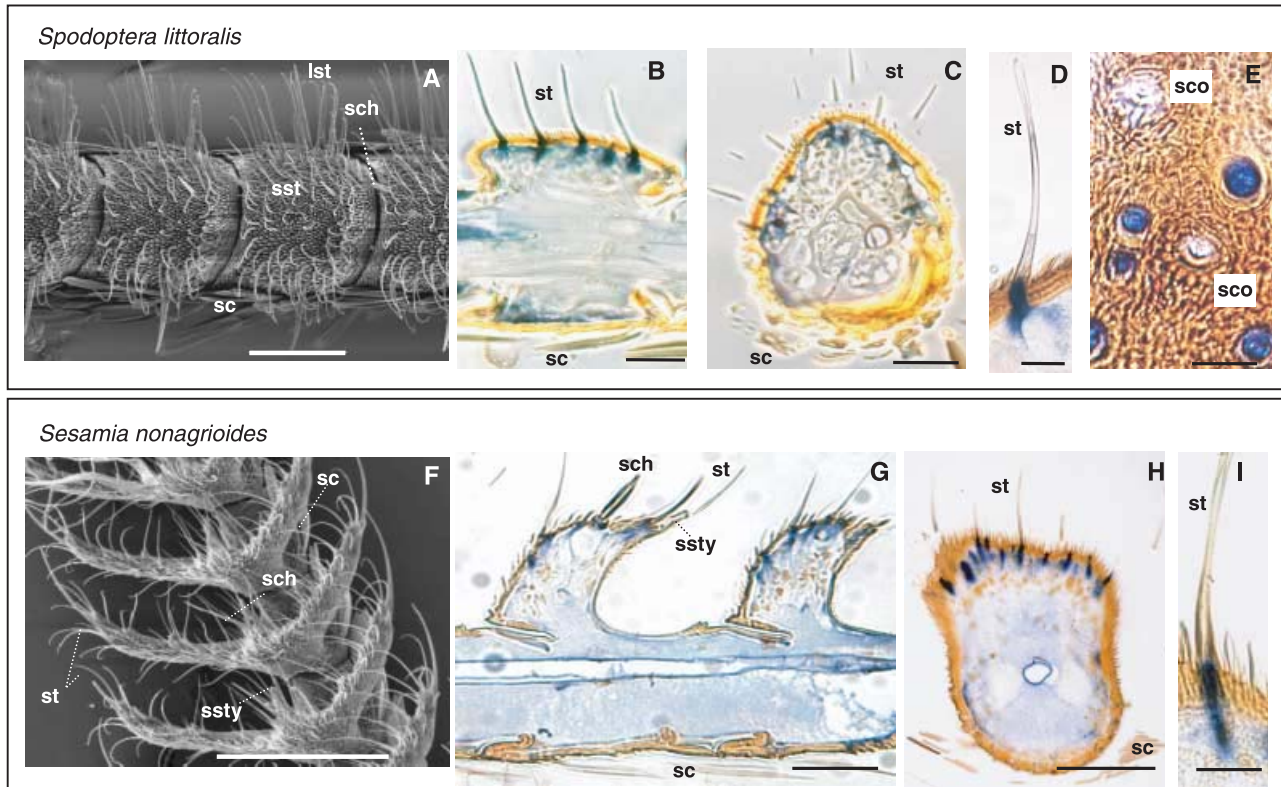


Figure 5. Expression patterns of *Slit-EST* (B, C, D, E) and *Snon-EST* (G, H, I) after *in situ* hybridization on sections of male antennae. SEM ventral views of *S. littoralis* (A) and *S. nonagrioides* (F) male antennal segments showing the localization of scales (sc), long (lst) and short (sst) sensilla trichodea, sensilla chaetica (sch) and sensilla styloconica (ssty). Longitudinal (B, G) and transversal (C, H) sections with labelling restricted to the ventral side carrying olfactory sensilla. (D, I) Details of sensilla trichodea showing intense labelling at the base. (E) Section through the cuticle with unlabelled sensilla coeloconica (sco) that resemble flowers. Bars: 200 μ m in F; 100 μ m in A; 50 μ m in B, C, G, H; 10 μ m in D, E, I.

carry olfactory sensilla on the ventral side. *S. littoralis* male antennae support long and short sensilla trichodea (Ljungberg *et al.*, 1993), with the larger situated more laterally and the smaller more ventrally (Fig. 5A). In *S. non-agrioides*, olfactory hairs are distributed across both portions of the lateral and the medial processes; the former carrying a great number of sensilla trichodea (Fig. 5F). In both species, the responses of these different olfactory sensilla to the components of the pheromone blend have been characterized by single cell recordings. In *S. littoralis*, the most lateral long sensilla respond to (Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate (Z9E12-14Ac) and (Z)-9-tetradecenyl alcohol (Z9-14OH), whereas the other long and the short sensilla trichodea respond to Z9E11-14:Ac (Ljungberg *et al.*, 1993). In *S. nonagrioides*, two functional types of sensilla trichodea have been described: type A responds to (Z)-11-hexadecenylacetate (Z11-16Ac) and to the corresponding aldehyde (Z11-16Ald), and type B to Z11-16Ac and to Z11-16OH (Quero *et al.*, 2004). After *in situ* hybridization, *Slit-EST* and *Snon-EST* signals were restricted to the sensilla side of the antennae, with no labelling on the scale side (Fig. 5B,C,G,H). For the two genes, signals were located just below the cuticle, at the base of the sensilla

trichodea (Fig. 5B,C,D,G-I), in cells that could be accessory cells surrounding sensory neurones, or the neurones themselves. On the longitudinal sections, the distinction between long and short sensilla trichodea was not possible. However, in transversal sections of *S. littoralis* male antennae, the labelling was observed all over the ventral and lateral surface suggesting an expression of *Slit-EST* in both long and short olfactory sensilla (Fig. 5C). Sensilla coeloconica, typical structures that resemble flowers in scanning microscopy and known as olfactory in some species (Pophof, 1997), but whose function is still unknown in *S. littoralis*, were not labelled (Fig. 5E). In male antennae of *S. nonagrioides*, olfactory sensilla were labelled but no labelling was observed in sensilla chaetica, which are thought to function in gustation in other Lepidoptera (Jørgensen *et al.*, 2006), nor in sensilla styloconica, a thermo-hygro receptor (Fig. 5G). In transversal sections of antennae, a great number of spots were observed, probably corresponding to labelling of long and short sensilla trichodea (Fig. 5H). Our results suggested that *Slit-EST* and *Snon-EST* were expressed in sensilla types involved in responses to different acetate components of the pheromone blend, and could consequently be implicated in

Table 1. Primers used for the molecular cloning of two antennal esterase cDNAs from *S. littoralis* and *S. nonagrioides*

Primer name	Primer sequence	Amino acid motif
<i>Spodoptera littoralis</i>		
SIESTUp1	5'-AACTTTGGMCTNAARGAYCA-3'	NAGLKDQ
SIESTDo1	5'-AAAGTTRGYCCACAKWGT-3'	TMWTFN
3'ESTSIUp	5'-GAGCCCGTGGTGACGGAATACCCGACC-3'	EPVVTEYPT
5'ESTSIDo	5'-GAAGACCCACGGGACCAATGAAGAGCC-3'	GSSLVPWGL
SIESTorfUp	5'-ATGAAGTGGTTAGTGCTGCTGTGCGC-3'	MKWLVLLS
SIESTorfDo	5'-TTATGACTTTAAGTGATCTATAGAGAGTACGCT-3'	MHARAA
SIESTUpSP	5'-ATACTACAAAGTGGCTCTTCATTGGTC-3'	ILQSGSSLV
SIESTDoSP	5'-CTTGAAACAGGTAACAGCTCGTC-3'	DELFLYLFK
<i>Sesamia nonagrioides</i>		
3'ESTSnUp	5'-AACTTTGGMCTNAARGAYCA-3'	NQGLKDQI
5'ESTSnDo	5'-TGCCCCACCACCATAGCTTTTCGCCAG-3'	GESYGGGA
SnESTorfUp	5'-ATGCATGCTCGAGCGGCC-3'	SVLSIDHLKS
SnESTorfDo	5'-TTAATTGTACATCTTCTTACATGAACTCTTTGT-3'	TKSSCKKMYN
SnESTUp	5'-ATGATTGGCTACAATAGTAAAGAAGACTTT-3'	MIGYNSKEDF
SnESTDo	5'-TGTCTTTTCAGGCGTTGGGTTCCC-3'	GNPTPEKT

degradation of acetate pheromone components. In addition, we can not exclude a role for these enzymes in the degradation of plant volatiles with an ester functional group.

In conclusion, we have highlighted in the present work the occurrence, in the male moths *S. littoralis* and *S. nonagrioides*, of a greater number of antennal esterases than previously observed in other Lepidoptera. In each species, one cDNA encoding a putative extracellular esterase expressed in all tissues tested has been characterized. As in other noctuid moths, no sexual dimorphism was observed in the expression patterns of the two genes. In male antennae, the expression of *Slit-EST* and *Snon-EST* were precisely localized at the base of olfactory sensilla, compatible with a function in the degradation of volatile acetate compounds, either pheromones or plant volatiles. The screening of an antennal cDNA library from male *S. littoralis*, in progress in our laboratory, will certainly allow us to identify other olfactory esterases in this species, as revealed by the biochemical approach used in the present study. All of these esterases could contribute together to the degradation of acetate odourants, in agreement with their substrate specificities.

Experimental procedures

Animals and tissue collection

The two species were reared in the laboratory, sexed as pupae and maintained at 20 °C and 60% humidity until emergence. Dissected tissues from sexually mature males (antennae, brain, proboscis, wings, legs, thorax and abdomen) and females (antennae) were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. For *in situ* hybridization, male antennae were removed from adults, cut into pieces and fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4 °C.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted with TRIzol reagent (Gibco, BRL, USA) and treated with DNase (Promega, France). Single-stranded

cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNAs from various tissues using 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Advantage™ RT-for-PCR kit, Clontech, USA). For 3' and 5' RACE-PCR, antennal cDNAs were synthesized from 1 µg of male antennal total RNAs at 42 °C for 1.5 h using the SMART™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech) with 200 U of Superscript II (Gibco, BRL, USA), 5'-CDS-primer and SMART II oligonucleotide.

Cloning of a putative esterase antennal cDNA in male antennae of the two moths

For *S. littoralis* esterase amplification, two degenerate primers, SIESTUp1 and SIESTDo1 (Table 1) were designed according to highly conserved regions of various insect esterase sequences. PCR was carried out with 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) using an annealing temperature of 50 °C and 40 cycles of amplification. The 950-bp PCR product obtained was gel purified (GenElute™ Minus EtBr Spin Columns, Sigma, USA) and cloned into pCR II-Topo plasmid (Invitrogen). Recombinant plasmids were isolated by mini preparation (QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen, France) and sequenced (GenomeExpress). For *S. nonagrioides*, 3' RACE-PCR was achieved with Universal Primer Mix (UPM; Clontech) and a degenerate primer (3'ESTSnUp, Table 1) corresponding to a consensus sequence conserved in various insect esterases. Touchdown PCR was performed as follows: after 5 min at 94 °C, three cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C, three cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C and 30 s at 72 °C, then three cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 54 °C and 30 s at 72 °C, followed by 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C and 30 s at 72 °C, with a final elongation step of 5 min at 72 °C. The 1340-bp PCR fragment generated was purified, cloned and sequenced as described above.

The sequences of the 950 bp and 1340 bp PCR products from *S. littoralis* and *S. nonagrioides*, respectively, were analysed using BLAST (Altschul *et al.*, 1990) and GeneJockey software (Biosoft, Cambridge, UK), leading to the identification of these two fragments as putative esterases. The 3' and 5' regions of the corresponding cDNA from *S. littoralis* were obtained by 3'-5' RACE using two specific primers (3'ESTSIUp and 5'ESTSIDo, respectively). For *S. nonagrioides*, the 5' part of the corresponding cDNA was obtained by 5' RACE, using a specific antisense primer, 5'ESTSnDo. Touchdown PCR was performed as described in

Maibèche-Coisne *et al.* (2002). The different PCR products obtained were purified and cloned as described above.

By merging the overlapping sequences obtained by PCR amplification, 3' and 5' RACE, two putative full-length cDNAs of 2835 bp and 1854 bp, called *Slit-EST* and *Snon-EST*, respectively, were generated in each species. In order to confirm the complete sequences, two pairs of specific primers (Table 1) were designed according to the Open Reading Frame (ORF) of the putative esterases of both species: SIESTorf Up/Do for *S. littoralis* and SnESTorf Up/Do for *S. nonagrioides*. Thirty-five cycles of PCR were performed with the high fidelity Taq DNA polymerase PHUSION (1 U; Finnzymes, Finland) and 1 µl of 3'-ready cDNA, with annealing temperatures of 58 °C for *Slit-EST* and 50 °C for *Snon-EST*. cDNA fragments were cloned and sequenced as described above for sequence confirmation.

Tissue distribution of *Slit-EST* and *Snon-EST* by Northern blot analysis

Two specific and two control digoxigenin labelled probes were synthesized by PCR on antennal cDNAs using the Dig-DNA labelling mix (Roche Diagnostics, France) and four specific primers: in *S. littoralis* (1) a 701 bp fragment of the *Slit-EST* cDNA (SIEST-Upsp and SIESTDosp) and (2) a ~500 bp fragment of the *rpL8* cDNA (*rpL8* primers described in Maibèche-Coisne *et al.*, 2004), and in *S. nonagrioides* (3) a 540 bp fragment of the *Snon-EST* cDNA (SnESTUp and SnESTorfDo) and (4) a ~500 bp fragment of the *rpL8* cDNA. Total RNAs (20 µg) from different tissues collected from male and female *S. littoralis* and *S. nonagrioides* were separated on a 1% formaldehyde gel and transferred on to a positively charged nylon membrane. Equal loading was monitored by comparing the density of the ribosomal RNA band under UV on the agarose gel and membrane, before and after transfer. For each species, sequential overnight hybridization at 45 °C of the two genes, *EST* and *rpL8* control, washes and chemiluminescent detection were performed as described previously (Maibèche-Coisne *et al.*, 2002).

In situ hybridization

A cDNA fragment of 471 bp for *S. littoralis* and another one of 483 bp for *S. nonagrioides* were obtained by PCR strategy using, respectively, 3'ESTSIUp/SIESTDosp primers and SnESTUp/SnESTDo, and cloned into pCR-II Topo plasmid. The recombinant plasmids obtained were used for PCR using M13 reverse and forward primers. The amplification products were used as matrix for *in vitro* transcription. RNA sense and antisense probes were performed using T7 and SP6 RNA polymerase (Promega) using the Riboprobe® kit (Promega). Probes were purified with RNA G50 sephadex columns (Quick Spin columns, Roche). The hybridization protocol was performed on whole-mount pieces of antennae, as described in Jacquín-Joly *et al.* (2000). Longitudinal and transversal sections were performed at 6 µm, counter-stained with acridine orange and photographed. Pictures were digitized and processed using Adobe Photoshop 7.0 (Adobe, USA).

Native PAGE separation of extracts from different tissues and esterase staining

Male and female tissues from *S. littoralis* and *S. nonagrioides* were homogenized on liquid nitrogen in 10 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 and pH 8.0, respectively. Homogenates were centrifuged

at 18 500 g for 5 min at 4 °C and supernatants were used immediately for electrophoresis. Separation of proteins by native PAGE on a 10% acrylamide gel and esterase's staining using a substrate mixture of α- and β-naphthyl acetate were done as described (Vogt & Riddiford, 1981).

Acknowledgements

This work was supported by Université Paris VI, INRA, an Ile-de-France region graduate fellowship to C. Merlin, and a PICASSO API fellowship. We also thank CICYT (Project AGL2003-06599-C02-01), Generalitat de Catalunya (ACI, 2002) and MEC (HF2004-0272) for financial support. We are also grateful to D. Tauban and A. Popescu (INRA, Versailles) for the SEM on male antennae of *S. littoralis*.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Von Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783–795.
- Callahan, F., Vogt, R.G., Tucker, M., Dickens, J. and Mattoo, A. (2000) High level expression of 'male-specific' pheromone binding proteins in the antennae of female noctuid moths. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 507–514.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* **16**: 10881–10890.
- Cyglér, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K. and Doctor, B.P. (1993) Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci* **2**: 366–382.
- Durán, I., Parrilla, A., Feixas, J. and Guerrero, A. (1993) Inhibition of antennal esterases of the Egyptian armyworm *Spodoptera littoralis* by trifluoromethyl ketones. *Bioorg Med Chem Lett* **3**: 2593–2598.
- Ferkovich, S., Van Essen, F. and Taylor, T.R. (1980) Hydrolysis of sex pheromone by antennal esterases of the cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Chem Senses* **5**: 33–46.
- Ishida, Y. and Leal, W.S. (2002) Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkmoth, *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1775–1780.
- Ishida, Y. and Leal, W.S. (2005) Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14075–14079.
- Jacquín-Joly, E., Bohbot, J., Francois, M.C., Cain, A.H. and Nagnan-Le Meillour, P. (2000) Characterization of the general odorant-binding protein 2 in the molecular coding of odorants in *Mamestra brassicae*. *Eur J Biochem* **267**: 6708–6714.
- Jacquín-Joly, E. and Lucas, P. (2005) Pheromone reception and transduction: common importance and converging mechanisms across phyla. *Cur Top Neurochem* **4**: 75–105.
- Jørgensen, K., Kvellø, P., Almaas, T.J. and Mustaparta, H. (2006) Two closely located areas in the suboesophageal ganglion and the tritocerebrum receive projections of gustatory receptor neurons located on the antennae and the proboscis in the moth *Heliothis virescens*. *J Comp Neurol* **496**: 121–134.

- Kaissling, K.E. (2001) Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model. *Chem Senses* **26**: 125–150.
- Kamikouchi, A., Morioka, M. and Kubo, T. (2004) Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. *Zool Sci* **21**: 53–62.
- Klein, U. (1987) Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antheraea polyphemus* (Saturniidae). *Insect Biochem* **17**: 1193–1204.
- Ljungberg, H., Anderson, P. and Hansson, B.S. (1993) Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol* **39**: 253–260.
- Maibèche-Coisne, M., Jacquin-Joly, E., François, M.C. and Nagnan-Le Meillour, P. (2002) Characterization of biotransformation enzymes belonging to the P450 family in the antennae of the noctuid moth *Mamestra brassicae*. *Insect Mol Biol* **11**: 273–281.
- Maibèche-Coisne, M., Merlin, C., François, M.C., Queguiner, I., Porcheron, P. and Jacquin-Joly, E. (2004) Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chem Senses* **29**: 381–390.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J. and Robin, G.C. (1999) Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays* **21**: 1031–1042.
- Pophof, B. (1997) Olfactory responses recorded from sensilla coeloconica of the silkworm *Bombyx mori*. *Physiol Entomol* **22**: 239–248.
- Quero, C., Bau, J., Guerrero, A. and Renou, M. (2004) Responses of the olfactory receptor neurons of the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* to components of the pheromone blend and their inhibition by a trifluoromethyl ketone analogue of the main component. *Pest Manag Sci* **60**: 719–726.
- Quero, C., Rosell, G., Jiménez, O., Rodríguez, S., Pilar Bosch, M. and Guerrero, A. (2003) New fluorinated derivatives as esterase inhibitors. Synthesis, hydration and crossed specificity studies. *Bioorg Med Chem* **11**: 1047–1055.
- Satoh, T., Taylor, P., Bosron, W., Sanghani, S., Hosokawa, M. and La Du, B. (2002) Current progress on esterases: from molecular structure to function. *Drug Metab Disp* **30**: 488–493.
- Solinas, M. and Trona, F. (2002) Antennal sensilla of *Sesamia nonagrioides* (Lef.) (Lepidoptera: Noctuidae). Morphology and possible behavioural significance. *Bull Zool Agr Bachic, Series II* **34**: 321–345.
- Vickers, N.J. (2006) Winging it: moth flight behavior and responses of olfactory neurons are shaped by pheromone plume dynamics. *Chem Senses* **31**: 155–166.
- Vogt, R.G. (2003) Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. In: *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* (Blomquist, G.J. and Vogt, R.G., eds), pp. 391–445. Elsevier, Oxford, UK.
- Vogt, R.G. (2005) Molecular basis of pheromone detection in insects. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*, Vol. 3. *Endocrinology*. (Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S., eds), pp. 753–804. Elsevier, London, UK.
- Vogt, R.G. and Riddiford, L.M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* **293**: 161–163.
- Vogt, R.G. and Riddiford, L.M. (1986) Scale esterase: a pheromone-degrading enzyme from the scales of the silk moth *Antheraea polyphemus*. *J Chem Ecol* **12**: 469–482.
- Vogt, R.G., Riddiford, L.M. and Prestwich, G. (1985) Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8827–8831.

A diversity of putative carboxylesterases are expressed in the antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*

N. Durand*§, G. Carot-Sans†§, T. Chertemps*,
N. Montagné*, E. Jacquin-Joly‡, S. Debernard* and
M. Maïbèche-Coisne*

*UMR-A 1272 Université Paris 6 – INRA, Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication, Paris, France;

†Department of Biological Chemistry and Molecular Modelisation, IQAC (CSIC), Barcelona, Spain; and

‡UMR-A 1272 Université Paris 6 – INRA, Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication, Route de Saint-Cyr, Versailles, France

Abstract

Recent studies have suggested that pheromone-degrading enzymes belonging to the carboxylesterase family could play a role in the dynamics of the olfactory response to acetate sex pheromones in insects. Bioinformatic analyses of a male antennal expressed sequence tag library allowed the identification of 19 putative esterase genes expressed in the antennae of the moth *Spodoptera littoralis*. Phylogenetic analysis revealed that these genes belong to different insect esterase clades, defined by their putative cellular localization and substrate preferences. Interestingly, two of the 19 genes appeared to be antennal specific, suggesting a specific role in olfactory processing. This high esterase diversity suggested that the antennae are the location for intense esterase-based metabolism, against potentially a large range of exogenous and endogenous molecules.

Keywords: odorant-degrading enzyme, esterases, olfaction, Lepidoptera.

Introduction

In insects, odorant reception takes place mainly in the antennae, within hair-like structures called olfactory sen-

First published online 25 November 2009.

Correspondence: Martine Maïbèche-Coisne, UMR-A 1272, Université Paris 6, 7 Quai St-Bernard, BC 1211, F-75005 Paris, France. Tel.: + 33 14427 6592; fax: + 33 14427 6509; e-mail: martine.maibeche@snv.jussieu.fr

§Both authors contributed equally to the work

silla. These morphofunctional units enclose the olfactory receptor neurones, which are surrounded by a protein-enriched lymph. Detection of olfactory molecules at the peripheral level is a complex process involving numerous molecular actors. This process includes the binding and transport of hydrophobic odorant molecules by odorant-binding proteins (OBPs), their recognition by odorant receptors and their inactivation through hydrolysis by specific enzymes, the odorant-degrading enzymes (ODEs) (reviewed by Leal, 2003; Rutzler & Zwiebel, 2005; Vogt, 2005; Vosshall, 2008).

Despite the large background of knowledge on these molecular steps, accumulated mainly in the fruit fly *Drosophila melanogaster* and in several moth species, the odorant inactivation step is still not clearly understood (Jacquin-Joly & Maïbèche-Coisne, 2009). The first studies of odorant degradation were focused on the male moth pheromonal system, because of its extreme sensitivity and selectivity. Biochemical studies revealed esterase, aldehyde-oxidase or alcohol-dehydrogenase activities in antennae of moths that used acetates, aldehydes or alcohols as components of their sex pheromone blends (Vogt & Riddiford, 1981; Vogt *et al.*, 1985; Kasang *et al.*, 1989; Rybczynski *et al.*, 1989), leading to the commonly accepted hypothesis in which each moth species should possess pheromone-degrading enzymes (PDEs) that could degrade incoming conspecific sex pheromone compounds (Vogt & Riddiford, 1981; Vogt, 2005; Jacquin-Joly & Maïbèche-Coisne, 2009). Several studies reported very brief pheromone half-lives, around a few milliseconds, when incubating moth sensillar preparations with pheromone components (Vogt *et al.*, 1985; Rybczynski *et al.*, 1989). Similar results were recently obtained *in vitro* using purified recombinant antennal enzymes (Ishida & Leal, 2005; Ishida & Leal, 2008), supporting the participation of PDEs in the dynamic of signal inactivation.

Amongst the insect putative ODEs/PDEs, various enzyme families were described, such as carboxylesterases, aldehyde-oxidases/dehydrogenases, alcohol-oxidases/dehydrogenases, epoxide hydrolases,

glutathione-S-transferases or cytochrome P450 (reviewed in Vogt, 2005; Jacquin-Joly & Maïbèche-Coisne, 2009). The carboxylesterase family has been the most studied (Ferkovich *et al.*, 1980; Vogt & Riddiford, 1981; Vogt *et al.*, 1985; Prestwich *et al.*, 1989; Vogt, 2005) and esterase activities were identified in several species that use acetates in their sex pheromone blends (review in Vogt, 2005). Carboxylesterases belong to the α/β hydrolase's fold superfamily that catalyses the hydrolysis of ester bonds of various substrates and most of these enzymes use a reaction mechanism based on a catalytic triad including a serine (Oakeshott *et al.*, 1999).

The first described PDE was such an esterase, whose activity has been revealed in the antennae of the silkworm *Antheraea polyphemus* (Vogt & Riddiford, 1981). This specific sensillar enzyme, named Apol-SE, has been studied in great detail from a biochemical point of view (Vogt *et al.*, 1985; Klein, 1987). Three antennal esterase cDNAs were later identified in this species (Ishida & Leal, 2002, 2005): one encoding a putative integumental esterase (Apol-IE) and the two others encoding esterases specifically expressed in male antennae (Apol-ODE and Apol-PDE). Recombinant Apol-PDE has been clearly demonstrated *in vitro* to degrade the main *A. polyphemus* pheromone component, suggesting that it corresponds to the previously biochemically characterized Apol-SE (Ishida & Leal, 2005). In other insect species, few molecular data are available on antennal esterase genes. Through molecular cloning, only one gene has been identified in each of the following species: the noctuid moths *Mamestra brassicae*, *Sesamia nonagrioides* and *Spodoptera littoralis* (Maïbèche-Coisne *et al.*, 2004; Merlin *et al.*, 2007), the Japanese beetle *Popillia japonica* (Ishida & Leal, 2008) and the bee *Apis mellifera* (Kamikouchi *et al.*, 2004), whereas five genes have been identified in the tortricid *Epiphyas postvittana* (Jordan *et al.*, 2008) by antennal expressed sequence tag (EST) analysis. None of these genes appeared to be antennal specific, excepted for *P. japonica*, and their precise expression patterns were not established.

In *S. littoralis*, we have previously identified esterase activities in the antennae using native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and naphthyl acetate staining, revealing at least seven reactive bands, suggesting the occurrence of more than one cDNA encoding esterase expressed in the antenna (Merlin *et al.*, 2007). To investigate better this diversity at the molecular level, we screened by BLAST analysis a normalized EST library prepared from *S. littoralis* male antennae (Jacquin-Joly *et al.*, 2007). This approach led us to characterize 19 new genes of carboxylesterases expressed in male and female antennae and to reveal for the first time a high diversity of esterases expressed in the olfactory organ of an insect. Such diversity sheds new light on the multiple metabolic pathways using esterases that may coexist in this highly

specialized tissue. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative PCR (qPCR) were further used in an attempt to identify antennal-specific genes amongst the ones identified as good candidates involved in the olfactory/pheromone termination processes. Indeed, such restricted expression is a useful criterion that has already been helpful in identifying specific olfactory genes such as receptors and OBPs in various species (Benton *et al.*, 2007).

Results

Identification of 19 putative carboxylesterase genes

Twenty thousand ESTs from *S. littoralis* male antennae were sequenced (Jacquin-Joly *et al.*, 2007). Amongst them, 95 were identified as putative carboxylesterases through BioEdit local BLAST using as query our previously identified *S. littoralis* esterase gene [*Slit-EST*, renamed SICXE1 (where CXE is carboxylesterase) in this study for homogeneity with Jordan *et al.*, 2008]. Assembling the ESTs led to 19 partial contigs, named SICXE2 to SICXE20. Complete coding regions were then isolated using 3'/5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR, leading to 19 open reading frames (ORFs) of putative esterases. The complete ORFs were then amplified from antennal cDNA with a high fidelity *Taq* DNA polymerase and sequenced, in order to confirm that the assembled sequences were not chimeric. These sequences have been deposited in the GenBank database under the successive accession numbers FJ652445 to FJ652463 for SICXE2 to SICXE20, respectively.

The structural features of the putative SICXE encoded proteins are summarized in Table 1. Their calculated molecular masses ranged from 56.5 to 68.2 kDa. Their isoelectric points ranged from 5.17 to 9.2 (ProtParam, Gasteiger *et al.*, 2005), most of them being acidic. These data are in agreement with the characteristics of already known insect esterases. Except for SICXE4 and SICXE19, which lacked the histidine or the serine from the catalytic site, respectively, all the other SICXEs displayed the catalytic triad (Ser-His-Glu) with the serine active site included in the conserved pentapeptide characteristic of esterases Gly-X-Ser-X-Gly (Oakeshott *et al.*, 1999). This suggests that they could be active enzymes, except for SICXE4 and SICXE19. Putative oxyanion hole residues (Gly132, Gly133 and Ala214 according to their position in *D. melanogaster* juvenile hormone esterase: Oakeshott *et al.*, 1999) are conserved except for SICXE5, 6, 9 and 12 (Table 1). They are thought to stabilize the transition states of the reaction and their partial or complete absence could impact on the functioning of the corresponding enzymes. Signal sequence cleavage sites were predicted for 14 of the 19 sequences (SIGNALP 3.0,

Table 1. Motif analysis and biochemical characteristics of the putative antennal carboxylesterases from *Spodoptera littoralis*, including *SICXE1* (Merlin *et al.*, 2007)

			Catalytic motifs (amino acids)				Predicted		
	RF	DQ	GxSxG version	E	H	Oxyanion hole version	MW (kDa)	pI	SP
SICXE1	+	+	GESAG	+	+	GGC	63	8.44	+
SICXE2	+	+	GQSAG	+	+	GGA	60.6	5.44	+
SICXE3	+	+	GESAG	+	+	GGA	60.7	5.92	–
SICXE4	–	+	GYSAG	+	–	GGA	60.3	5.23	+
SICXE5	+	+	GCSAG	+	+	PGA	61.1	7.79	+
SICXE6	–	+	GESYG	+	+	AGY	57.7	6.81	+
SICXE7	+	+	GFSAG	+	+	GGA	61.6	5.97	+
SICXE8	+	+	GTSAG	+	+	GGA	58.6	6.27	+
SICXE9	+	–	GSSSG	+	+	SFS	62.5	5.33	–
SICXE10	+	+	GESAG	+	+	GGA	61	6.44	–
SICXE11	+	+	GISAG	+	+	GGA	60.1	5.59	–
SICXE12	–	+	GQSYG	+	+	GGY	56.5	9.02	–
SICXE13	+	+	GCSAG	+	+	GGA	60.1	5.81	+
SICXE14	–	+	GYSAG	+	+	GGA	61.4	5.53	+
SICXE15	+	+	GQSAG	+	+	GGA	63.4	5.17	+
SICXE16	+	+	GYSAG	+	+	GGA	62.4	6.92	+
SICXE17	+	+	GESAG	+	+	GGA	60	5.86	+
SICXE18	+	+	GQSAG	+	+	GGA	58.6	5.66	+
SICXE19	+	+	GHDAG	+	+	GGA	68.2	5.35	+
SICXE20	–	+	GESAG	+	+	GGA	58.4	6.47	+

MW, molecular weight; pI, isoelectric point; SP, signal peptide.

Bendtsen *et al.*, 2004) suggesting that the corresponding enzymes were secreted.

Phylogenetic analysis

In order to assign putative functions to the 19 newly identified *S. littoralis* esterases, the sequences were included in a phylogenetic analysis, together with CXEs from *D. melanogaster*, *A. mellifera* and several Lepidoptera and Coleoptera species (Fig. 1). The classification system described in Oakeshott *et al.* (2005) was retained to designate the clades. The phylogeny revealed that SICXEs distribute into the three classes previously described: the intracellular one (A–C), the extracellular one (D–G) and the catalytically inactive one (K–M). Four SICXEs clustered within the intracellular group, one within the neuro-signalling class and the 17 other sequences were found within the extracellular group. Inside this last group, most of the *S. littoralis* sequences clustered within a group related to juvenile hormone esterases (JHEs) from Lepidoptera, with a bootstrap value of 86% at this node.

Tissue-related expression of SICXEs

Tissue-related expression of the 19 putative CXEs was determined by RT-PCR in order to identify the antennal-specific or antennal-enriched genes that are more probably to be involved in odorant degradation. In addition to antennae, various non-olfactory tissues were tested. The putative *S. littoralis* esterases showed a wide range of

patterns of expression: some were restricted to the antennae or to the antennae and few other tissues, whereas others were widely distributed (Fig. 2). Interestingly, all putative esterases were expressed in antennae of both sexes. *SICXE7* and *SICXE8* expression was restricted to the antennae, whereas *SICXE14* presented an expression restricted to chemosensory organs.

Expression studies of SICXE7, 8 and 14 with respect to the sex and the developmental stages

The expression patterns of these three genes were thus studied more precisely by qPCR to compare their expression levels between sexes (Fig. 3) and during development (Fig. 4). *SICXE7* showed more pronounced expression in male antennae (threefold more than in female antennae). *SICXE8* and *SICXE14* were equally expressed in both sexes. Moreover, temporal expression of *SICXE7* and *SICXE8* during postembryonic development revealed that both CXEs were predominantly expressed at the beginning of adult life (Fig. 4), with faint expression at the end of the pupal stage. *SICXE14* was on the contrary broadly expressed during the larval instar and the pupal life with a peak after adult eclosion.

Discussion

Diversity of *S. littoralis* antennal esterases

The number of antennal-expressed esterases in *S. littoralis* was higher than expected. Indeed, in *E. postvittana*,

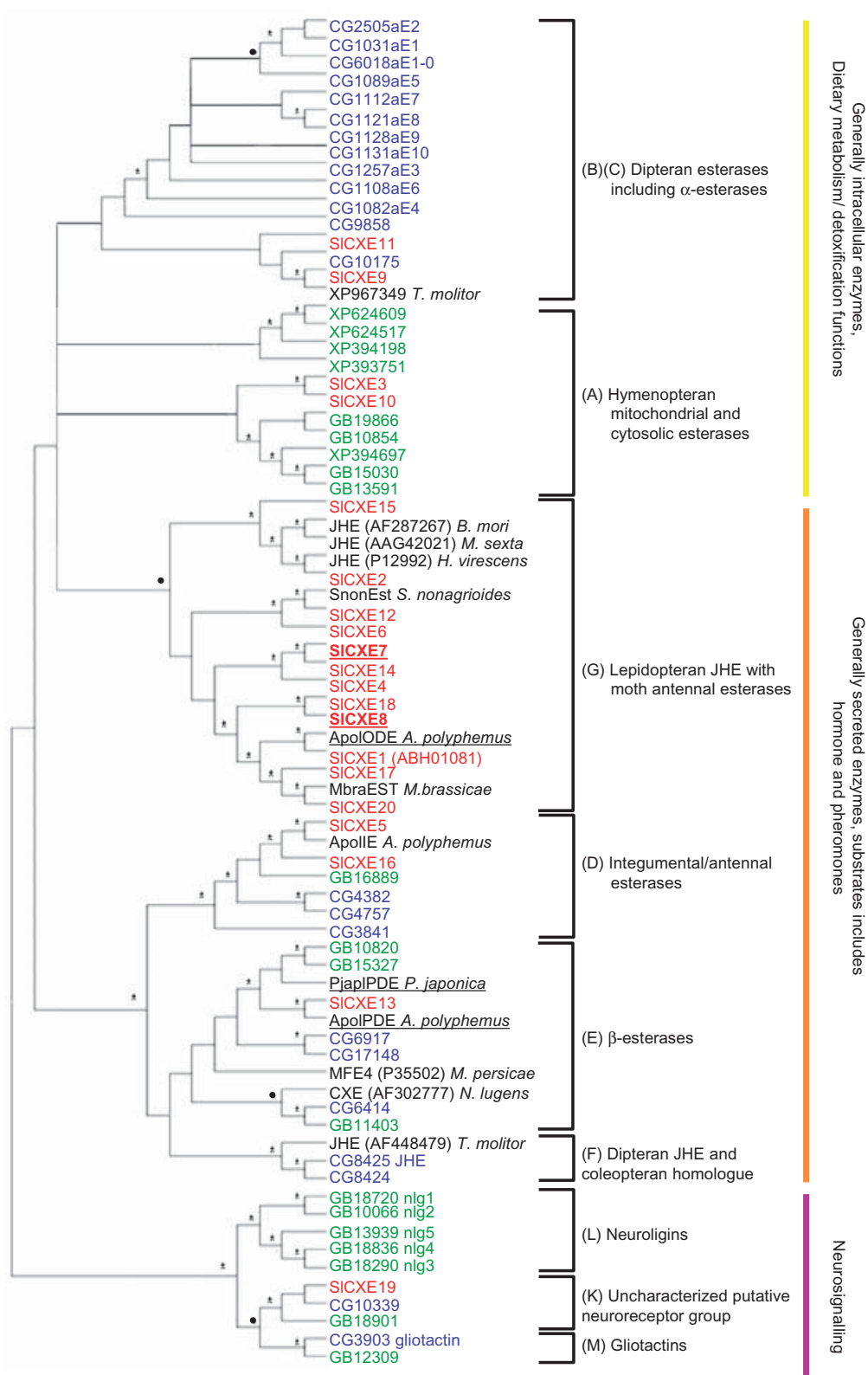


Figure 1. Neighbor-joining tree of the antennal esterases from *Spodoptera littoralis* and various insect esterases. *S. littoralis* sequences are in red, *Drosophila melanogaster* in blue and *Apis mellifera* in green. GenBank accession numbers are indicated. cDNAs selectively expressed in olfactory tissues are underlined. Bootstrap values of the nodes are indicated by an asterisk when between 90–100% and a dark circle when between 80–89%. No symbol indicates values between 50 and 79%. Branches with lower support values were collapsed.

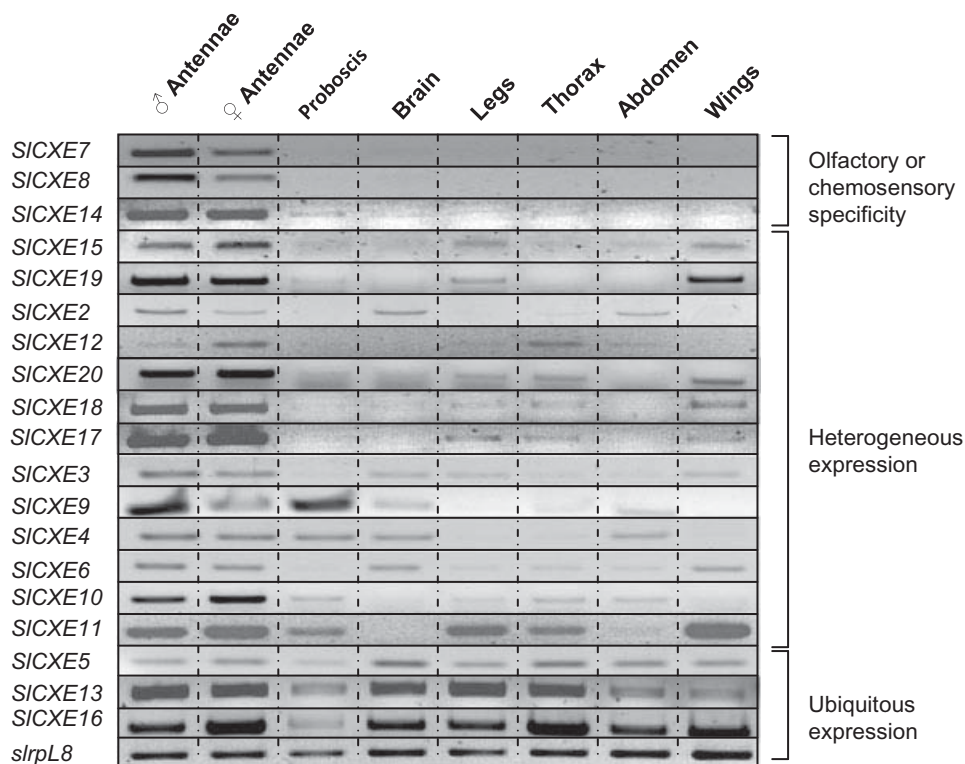


Figure 2. Analysis of *Spodoptera littoralis* esterase expression throughout the body by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). PCR products are visualized on agarose gel. Templates were from female antennae, male antennae, proboscis, brains, legs, thorax, abdomen and wings. *SlrpL8* was used as the control gene.

five CXEs were identified amongst the 5739 antennal ESTs analysed (Jordan *et al.*, 2008), whereas only three antennal-expressed CXEs have been isolated in *A. polyphemus* (Ishida & Leal, 2002, 2005). Moreover, after native PAGE and naphthyl acetate staining of *S. littoralis*

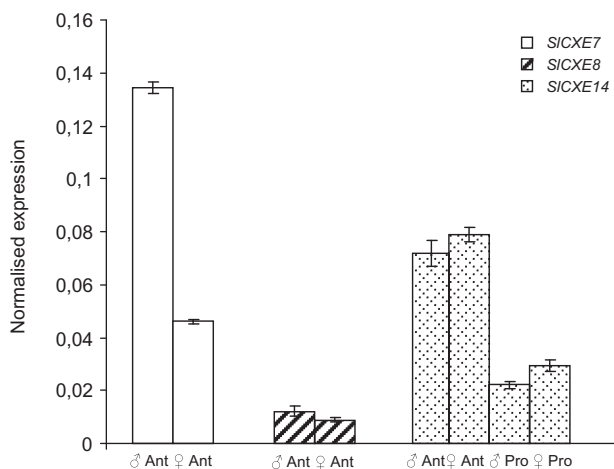


Figure 3. Normalized expression levels of *Spodoptera littoralis* carboxylesterase 7 (*SICXE7*), *SICXE8* and *SICXE14* in male and female chemosensory tissues after quantitative PCR (qPCR) analysis. Error bars represent standard errors generated from at least three technical replicates. Ant, antennae; Pro, proboscis.

antennal extracts, only seven reactive bands were previously revealed (Merlin *et al.*, 2007). This difference may be because of the closely related sizes and isoelectric points of several SICXEs (Table 1), leading to a co-migration of some esterases in native gels. Some of the genes may also encode enzymes that are not readily detectable as isozymes hydrolysing naphthyl esters. Alternatively, it may be that not all of the *SICXE* transcripts may be translated into active proteins.

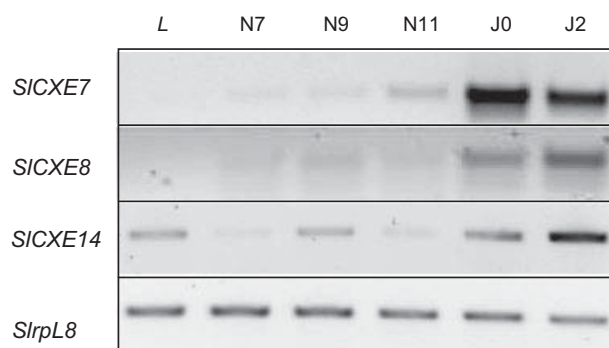


Figure 4. Expression of *Spodoptera littoralis* carboxylesterase 7 (*SICXE7*), *SICXE8* and *SICXE14* during development after reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. (L), sixth instar larvae; (N7 to N11), pupae from day 7 to day 11 before eclosion; (J0, J2), newly eclosed and 2-day-old adults.

Without genomic information, the total number of *CXE* genes from *S. littoralis* cannot be predicted. However, the genomic data available on several insect species suggest that the number of esterases isolated from *S. littoralis* male antennae could represent a large proportion of its *CXE* repertoire. Indeed, genome analyses have revealed 35 *CXE* genes in *D. melanogaster* and 51 in *Anopheles gambiae* (Oakeshott *et al.*, 2005), 49 in *Aedes aegypti* (Strode *et al.*, 2008) and only 24 for *A. mellifera* (Claudianos *et al.*, 2006), although their tissue distribution is not known. As 'only' 20 000 ESTs were sequenced from the *S. littoralis* antennal library, the existence of additional antennal *CXE* sequences cannot be excluded.

The high diversity of esterases expressed in antennae identified in this moth species may reflect the fact that esters are widespread amongst semiochemical signals in insects. These components are indeed frequently found in the sex pheromone blends of moths or in vegetal scents (Oakeshott *et al.*, 2005). *S. littoralis* sex pheromone is for example a mix of acetates, the number of which depends on the studies [Pherolist <http://www.nysaes.cornell.edu/pheronet/>; Ljündberg *et al.* (1993)]. Amongst them, the two components (Z,E)-9,11-tetradecadienyl acetate (Z9E11-14Ac) and (Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate (Z9E12-14Ac) are always found.

In a more general manner, the olfactory sensory neurones of insects and vertebrates are indirectly in contact with the external environment, via the sensillar lymph or the mucus layer, respectively. They are therefore exposed not only to odorants but also to volatile xenobiotics. In mammals, olfactory tissues are known to express numerous xenobiotic detoxifying enzymes, such as cytochrome P450 or UDP-glucuronosyl-transferases (Ding & Coon, 1990; Lazard *et al.*, 1990; Peng *et al.*, 1993; Ding & Kaminsky, 2003), leading to a tissue-selective response to chemical exposure. Many esterases in insects are implicated in insecticide detoxification and metabolic resistance (Oakeshott *et al.*, 2005; Claudianos *et al.*, 2006). In the antennae, this wide repertoire of esterases may thus participate in the termination of odorant signals, as well as in the protection of the olfactory neurones against potentially harmful compounds.

Putative S. littoralis antennal neurosignalling esterase

SICXE19, which lacked the catalytic serine, clustered with two *D. melanogaster* and *A. mellifera* orthologues inside an anonymous noncatalytic clade related to the neuroligins and gliotactins, known for their involvement in synapse formation and functioning (Oakeshott *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2008). SICXE19 was expressed in antennae, legs and wings but surprisingly not in the brain, where most of this kind of CXEs are typically expressed (Biswas *et al.*, 2008). However, in the bee, one of the

five neuroligin genes characterized, *neuroligin 1*, was expressed in tissues outside the brain, such as wings and legs, at a higher level than in the brain. This led the authors to suggest a putative function restricted to the peripheral nervous system, such as a role in the response of nerve endings to sensory input (Biswas *et al.*, 2008), an hypothesis that could be proposed for SICXE19.

Putative S. littoralis intracellular antennal esterases

SICXE3, 10, 9 and 11, which lacked a signal peptide, were found within the clades of intracellular esterases (A–C), which include the α -esterases, well known for their involvement in detoxification of insecticide/xenobiotics and digestion of dietary esters (Newcomb *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 2003; Strode *et al.*, 2008). In *D. melanogaster*, most of the α -esterases are expressed in the head (Campbell *et al.*, 2003). Here, we report the first identification of putative α -esterases expressed in the olfactory organs, where they may play a detoxification function.

Putative S. littoralis antennal extracellular esterases

The remaining SICXE genes presented predicted signal cleavage sites and were distributed within the clades of secreted esterases (D–G), suggesting that the corresponding proteins could be secreted in the sensillum lymph surrounding the sensory neurones or in the haemolymph filling the antennal lumen. Functional studies carried out on enzymes from these groups in various insect species suggested specific functions towards substrates such as hormones and pheromones (Ishida & Leal, 2005, 2008; Oakeshott *et al.*, 2005; Strode *et al.*, 2008).

Integumental esterases: Two sequences, SICXE5 and 16, sit in the clade (D) that includes Apol-IE, the integumental esterase from *A. polyphemus*. SICXE5 and SICXE16 presented the same ubiquitous pattern of expression as Apol-IE (Fig. 2). Indeed, Apol-IE is expressed all over the body, including male and female antennae, and is supposed to encode one of the integumental esterases that has been demonstrated to degrade the pheromone *in vitro* (Vogt & Riddiford, 1986; Klein, 1987; Vogt, 2005). These integumental esterases were proposed to participate in removing the hydrophobic pheromone from the integument and the cuticle of the animal, in order to reduce background noise (Vogt & Riddiford, 1981; Vogt, 2005).

β -esterase: Only one *S. littoralis* sequence, SICXE13, sits in the β -esterase clade (E), that includes Apol-PDE and Pjap-PDE from *A. polyphemus* and *P. japonica*. Apol-PDE and Pjap-PDE have been shown to be specifically expressed in male antennae and to degrade the

pheromone *in vitro* (Ishida & Leal, 2005, 2008), with estimated pheromone *in vivo* half-lives of a few milliseconds. These data on Apol-PDE and Pjap-PDE suggested that an extremely fast catabolism of odorant molecules may occur in the vicinity of the receptors and could account for the rapid dynamics of the male responses to sex pheromone. Indeed, while flying to a calling female, the male moth encounters a discontinuous signal but is able to respond in less than 0.5 s to the loss of the trail (Baker & Vogt, 1988), implying a reset of its sensory system in a few milliseconds. SICXE13, despite sharing 58% amino acid identity with Apol-PDE, has a ubiquitous expression pattern that is not entirely consistent with a specific role in pheromone processing, although it does not exclude the possibility that the corresponding enzyme could degrade the pheromone, as already demonstrated for *A. polyphemus* integumental esterases.

JHE-like and JHE-related sequences: SICXE2 and SICXE15 were closely related to lepidopteran JHEs and presented the Gly-Gln-Ser-Ala-Gly (GQSAG) motif, which is considered as a canonical distinctive element of insect JHEs (Mackert *et al.*, 2008). Different insect species have been shown to possess several JHE-like genes, such as *D. melanogaster*, *A. gambiae* or *A. aegypti*, which contain two, five or six JHE-like genes, respectively (Strode *et al.*, 2008). These JHE-like genes could have evolved functions other than JH hydrolysis to break down JH-like compounds (Oakeshott *et al.*, 2005). Moth pheromone compounds and JH present some structural similarities in the chain length and the aliphatic nature of the long chain portion ends by a charged group. These chemical similarities suggest that the esterases involved in the hydrolysis of these compounds could have evolved from a common ancestor. Interestingly, most of the diversification of the *S. littoralis* CXEs thus occurs in a group closely related to lepidopteran JHEs. Indeed, more than half of the CXEs from *S. littoralis* antennae clustered with several moth antennal esterases and formed a sister group to lepidopteran JHEs. The other moth esterases found in this group are the male antennal-specific esterase from *A. polyphemus*, Apol-ODE, whose substrate is unknown, and the antennal esterases previously characterized in *M. brassicae*, *S. nonagrioides* and *S. littoralis* (Maïbèche-Coisne *et al.*, 2004; Merlin *et al.*, 2007). These noctuid esterase genes are also expressed outside the antennae; however, *in situ* hybridization revealed that their expression in antennae was restricted to olfactory sensilla, a localization compatible with a function in odorant catabolism. It is noteworthy that inside this JHE-related group, three putative esterases, SICXE4, 7 and 14, share very high percentages of sequence identity (87% between SICXE7 and 14), suggesting recent duplication events. Interestingly, these three genes presented differ-

ent patterns of expression. SICXE7 was restricted to antennae, suggesting an olfactory specific function. SICXE14 was expressed in antennae and faintly in proboscis, suggesting a possible role in olfaction and gustation. SICXE4, which lacks the catalytic histidine, was also expressed in brain and abdomen. This suggests that these three genes could have evolved different functions after duplication, in agreement with their respective tissue distribution.

In addition to SICXE7, another gene from this JHE-related group, SICXE8, was also restricted to the antennae, with no signal in all other tissues tested (Fig. 2). These two genes were expressed at the beginning of the adult life stage (Fig. 4), as was Apol-PDE, whose expression was indeed first detectable at the end of the pupal stage, with a maximum in adults (Ishida & Leal, 2005). In the moth *Manduca sexta*, the activity of an antennal aldehyde-oxidase, able to degrade the sex pheromone, was also first detectable about 3 days before eclosion, with a maximum in adults (Rybczynski *et al.*, 1989). These expression patterns were concomitant with the electrophysiological responsiveness to sex pheromone components and with the expression of other olfactory genes such as pheromone binding proteins (PBPs; Györgyi *et al.*, 1988; Ishida & Leal, 2005), suggesting a common regulatory pathway for the genes involved in sex pheromone detection in mature adults.

Like all of the other SICXEs, SICXE7 and SICXE8 were expressed in male and female antennae. This expression pattern in both sexes was also observed for SICXE1 from *S. littoralis* (Merlin *et al.*, 2007) and for antennal cDNA esterases from other noctuid moths, including *S. nonagrioides* and *M. brassicae* (Maïbèche-Coisne *et al.*, 2004). This situation is different to that in *A. polyphemus* antennal esterases, as Apol-PDE and Apol-ODE are clearly male-specific (Ishida & Leal, 2002, 2005) and thus most probably involved in female sex pheromone degradation. However, contrary to *A. polyphemus*, females of *S. littoralis* (Ljündberg *et al.*, 1993) and of other moth species (reviewed in Callahan *et al.*, 2000) are able to detect, to some extent, their own pheromone. The sensitivity of the *S. littoralis* females to their sex pheromone could account for the absence of a clear sexual dimorphism in the SICXE antennal expression patterns. Nevertheless, male moth antennae carry more pheromone-sensitive sensilla than the female ones, and the over-expression of SICXE7 in male antennae thus suggests that it could play a preferential role in sex pheromone degradation. Other genes potentially involved in sex pheromone detection, such as PBPs and pheromone receptors, have also shown over-expression in *S. littoralis* male antennae (E. Jacquin-Joly, pers. comm.)

In the present work we have revealed the occurrence of a high diversity of esterase genes expressed in the

olfactory organ of a noctuid moth. Amongst this large repertoire, two genes, *SICXE7* and *SICXE8*, are of particular interest in regard to the question of the degradation of behaviourally relevant odours. As they are antennal specific, they are likely to be involved in olfactory mechanisms. In particular, *SICXE7*, enriched in males, could potentially be specifically involved in the degradation of the sex pheromone. Phylogenetic analysis showed that these *SICXE* genes were distributed amongst eight of the 14 clades of carboxylesterases defined previously by Oakeshott *et al.* (2005), in agreement with presumptively different cellular and subcellular localization. The *SICXE* structural diversity together with their different spatial distribution probably reflects their functional divergence and substrate specificities. The diversity of esterases in *S. littoralis* suggests that the olfactory organs, at least in this noctuid moth, are potentially the site of a complex set of esterase-mediated hydrolytic events, potentially acting on a wide range of endogenous as well as exogenous compounds, including odorants, hormones and xenobiotics.

Experimental procedures

Animals and tissue collection

Spodoptera littoralis were reared on semi-artificial diet (Hinks & Byers, 1976) at 24 °C, 60–70% relative humidity and under a 16:8 h light : dark cycle until emergence and were sexed as pupae. Tissues from male and female adults (antennae, proboscis, brains, legs, thoraces, abdomens and wings) were dissected and frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until use.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) then treated with DNase I (Roche, Basel, Switzerland) in accordance with the manufacturers' protocols and quantified with a spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Single-stranded cDNAs were synthesized from total RNAs (5 µg) from various tissues with Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL, Invitrogen) with the oligo(dT)₁₈ primer according to the manufacturer's instructions. For 5' and 3'-RACE PCR, antennal cDNAs were synthesized from 1 µg male antennal RNA at 42 °C for 1.5 h using the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) with 200 U of Superscript II, 3'-cDNA synthesis-primer and SMART II oligonucleotide.

Identification and cloning of *SICXEs*

Putative carboxylesterase sequences were identified from a *S. littoralis* male antennal EST library (Jacquin-Joly *et al.*, 2007) by local TBLASTN analysis with the BioEdit Sequence Alignment Editor software and using the sequence of a previously characterized antennal esterase from *S. littoralis*: *Slit-EST* (Merlin *et al.*, 2007). This normalized library was made from 12 000 male antennae by Clontech (BD Creator, San Diego, CA, USA) and high throughput sequencing was performed by Génoscope (Evry,

France). ESTs were assembled and for five sequences, the missing regions of the corresponding contigs (3' or 5' or both) were then obtained by 5'- and/or 3'-RACE-PCR (SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech). For 5'-RACE, we used 2.5 µl of 5'-RACE-ready cDNA with specific reverse primers and Universal Primer Mix (UPM, Clontech) as anchor primer. 3'-RACE amplifications were carried out with UPM as reverse primer and specific forward primers. Sequences of the specific primers used for RACE-PCR are indicated in Table 2. Touchdown PCR were performed using hot start as follows: after 1 min at 94 °C, five cycles of 30 s at 94 °C and 3 min at 72 °C, then five cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 70 °C and 3 min at 72 °C, then 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 68 °C and 3 min at 72 °C, then 10 min at 72 °C. The PCR products were purified (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and cloned into pCRII-TOPO plasmid (Invitrogen). After isolation (Nucleospin Plasmid, Macherey-Nagel), recombinant plasmids were sequenced (GATC Biotech, Marseille, France) and the overlapping sequences manually assembled to obtain full-length cDNAs.

Expression profiles of the putative *CXEs* by RT-PCR

Primer pairs were chosen in the less conserved regions of the various sequences in order to avoid cross-amplification and are indicated in Table 2. A ribosomal control gene *RpL8* (Maibèche-Coisne *et al.*, 2004) was used to check the quality of the cDNAs and to determine for each tissue or developmental stage the quantity of cDNA required for amplification. Several dilutions of the cDNAs were tested in order to obtain a comparable amplification of *RpL8* in each sample. PCRs were then performed with the *SICXE* specific primers to establish for each set of primers the numbers of cycles required to fit the linear range of amplification. Depending upon the gene, PCRs were thus carried using 27–39 cycles of amplification and annealing temperatures between 45 and 65 °C, as indicated in Table 2. PCR products were loaded on 1.5% agarose gels and visualized using ethidium bromide (BET)/SYBR safe fluorescence.

Expression of chemosensory specific *CXE* in male and female chemosensory tissues by qPCR

For qPCR experiments, total RNAs were extracted as described above from two distinct pools of male and female antennae and proboscis then reverse transcribed as previously described using Superscript II. Each reaction was then diluted 15-fold with sterile water.

In order to find an appropriate reference gene with stable expression levels between sample groups, four control genes were selected for the analysis: *RpL8*, *RpL13* (FJ979921), *GAPDH* (FJ979922) and *β-actin* (CAA86953). Based on sequences available in our EST database, specific primers for both reference genes and candidate esterase genes were designed using EPRIMER3 software (<http://mobyte.pasteur.fr/cgi-bin/MobytePortal/portal.py?form=eprimer3>). Primer optimal annealing temperature and PCR conditions were optimized using standard RT-PCR tests. The list of primers used for qPCR analysis is provided in Table 1.

All real-time quantitative RT-PCR reactions were performed on the iCycler iQ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Each 25 µl reaction consisted of 12.5 µl Absolute Blue SYBR Green Fluor (Thermo Scientific,

Table 2. List of the primers used for 5'/3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative PCR (qPCR) analyses indicating their sequences, annealing temperatures (Temp.) and the number of cycles (Nb) used

Primer	Purpose	Sequence 5'–3'	Temp. (°C)	Nb
SICXE7-qF	qPCR – forward	CTTTTCTGACGTTCTTTTATGCACC	60	40
SICXE7-qR	qPCR – reverse	TGATTCTTCTGAATGACTTTTATGGGTC	60	40
SICXE8-qF	qPCR – forward	TGCTCTCCTCAACGGATAAAGAG	60	40
SICXE8-qR	qPCR – reverse	CGCTTCAAATATTACTGGCATCTC	60	40
SICXE14-qF	qPCR – forward	CGCATAAAGATGAATCTTTGGCG	60	40
SICXE14-qR	qPCR – reverse	CAATTCAGAGTGAGGTTTGGGTGG	60	40
rpL13qF	qPCR – forward	GTACCTGCCGCTCTCCGTGT	60	40
rpL13qR	qPCR – reverse	CTGCGGTGAATGGTGTCTGTC	60	40
rpL8qF	qPCR – forward	ATGCCTGTGGGTGCTATGC	60	40
rpL8qR	qPCR – reverse	TGCCTCTGTTGCTTGATGGTA	60	40
GAPDHqF	qPCR – forward	GAGGACCCAACTGTGCCAAAA	60	40
GAPDHqR	qPCR – reverse	GCTTACCAGGCTGAACACG	60	40
Actin-qF	qPCR – forward	CGGCATGGGACAGAAGGACT	60	40
Actin-qR	qPCR – reverse	CTCTGTTGGCCTTGGGGTTG	60	40
SICXE2-3'	3'RACE-PCR	CCGCATCACCAGAACC GAATCCGAACCC	68	40
SICXE7-5'	5'RACE-PCR	ATTCAGTTGAAGTTGCGGAAATGGGAACACCGG	68	40
SICXE7-3'	3'RACE-PCR	CCGGTGTCCCATTTCGGAACCTCAACTGAAT	68	40
SICXE8-3'	3'RACE-PCR	GCTTACGTTCTTGAAATGGAGGAAAAATGGTCATAGGA	68	40
SICXE9-5'	5'RACE-PCR	ACAATTACCCGGTGTGTAAAGTCATTGAT	68	40
SICXE9-3'	3'RACE-PCR	GTTCTATTTGGGTGGTGAAGAACACCTAACGGCAGAG	68	40
SICXE20-3'	3'RACE-PCR	TGCAAGTCGGCTGGCTCAAGAAATG	68	40
SICXE2-F	RT-PCR	GAGGGACGGGAAGGGGGCC	57	32
SICXE2-R	RT-PCR	GGGCAAGTTGTGCAAGAA	57	32
SICXE3-F	RT-PCR	ATGGTGAAGTTAAAGTGGAACAAGGA	55	28
SICXE3-R	RT-PCR	GCCGTGTGGGACCAGGAAGTC	55	28
SICXE4-F	RT-PCR	ATG CAG TGG CAG ACG TGT GTG TTA	55	30
SICXE4-R	RT-PCR	GATCATGTCTTTTGTGTCCAACAG	55	30
SICXE5-F	RT-PCR	ATG TTG TAC GCG CTG CTG TGT GCA	60	27
SICXE5-R	RT-PCR	TGCATATCGTATCCCGCGGTAAGC	60	27
SICXE6-F	RT-PCR	ATTCCTTGGTCCCTATG	57	29
SICXE6-R	RT-PCR	CAGCGATGGTGATTTGATTG	57	29
SICXE7-F	RT-PCR	CCGGTGTTCCTATTTCCCGAA	60	30
SICXE7-R	RT-PCR	ATAAATATTATCTACGTTAGTAAAGTTAAGTTGTCGAGC	60	30
SICXE8-F	RT-PCR	TGTGGTAAAAAGTAGTTTTATTACGCTCTTC	57	39
SICXE8-R	RT-PCR	TTTCTCCATTTCCAAGAACGTAAGC	57	39
SICXE9-F	RT-PCR	ATCAATGACTTTACAGCACCGGGTAATTGT	60	35
SICXE9-R	RT-PCR	AAGAAATCGAGGTTGACCTTCAAACCTCAAC	60	35
SICXE10-F	RT-PCR	CGGACGACCGGTCAGTTGTA	65	35
SICXE10-R	RT-PCR	TACCAGGGACCAGCGTGTTG	65	35
SICXE11-F	RT-PCR	CACTGGGCTCATAAGATAG	50	30
SICXE11-R	RT-PCR	AGGTGCATTATGTTTGGAAA	50	30
SICXE12-F	RT-PCR	GAATTTTTGGTGGCGATC	50	30
SICXE12-R	RT-PCR	CTCCAATTCGCAAGTTTTTC	50	30
SICXE13-F	RT-PCR	ATGGACTGCCTCAAGTATAGGCC	50	30
SICXE13-R	RT-PCR	CATCAAGTTGGACAGACTGG	50	30
SICXE14-F	RT-PCR	AAAAAAAAGAGACCCTGTGGAGGTT	50	30
SICXE14-R	RT-PCR	CTTTATGCGTTATATTTTTACCATCCA	50	30
SICXE15-F	RT-PCR	ACTCCCAAGATCCCTGG	50	30
SICXE15-R	RT-PCR	AATCCGACCCAAAATATCAATGTATA	50	30
SICXE16-F	RT-PCR	CGCCACCAGCGCCAC	50	30
SICXE16-R	RT-PCR	GGACTGCCGCGCCGC	50	30
SICXE17-F	RT-PCR	AACATGATCTTCTACGGCCCG	50	30
SICXE17-R	RT-PCR	CTTTCTCCAGCAGCTCG	50	30
SICXE18-F	RT-PCR	ACTAGGAACGTTAGGGTTTCTTTG	50	35
SICXE18-R	RT-PCR	CATCCCTCTTTACTAGTTGTTCCATA	50	35
SICXE19-F	RT-PCR	ATGATCCGTGTGTTTGTATTGTTAATTG	45	35
SICXE19-R	RT-PCR	GATATCTGCAAGAATAATTTCTTCTCTCAT	45	35
SICXE20-F	RT-PCR	GCTCCTGACGGCACGTACCTA	65	35
SICXE20-R	RT-PCR	TCTGGCCGATGGTCTCCATT	65	35

Sl, *Spodoptera littoralis*; CXE, carboxylesterase.

Waltham, MA, USA), 5 µl of 15-fold diluted cDNA (or water for negative control), 2.5 µl of each primer and 2.5 µl of sterile water. The PCR programme consisted of an initial 95 °C for 13.5 min, then 40 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s. This was followed by the measurement of fluorescence during a 55 to 95 °C melting curve in order to detect a single gene-specific peak and to check the absence of primer dimer peaks. Under these conditions, a single and discrete peak was detected for all primers tested. A negative control and a fivefold dilution series protocol of pooled cDNA (from all conditions) were included in each run. The fivefold dilution series were used to construct a relative standard curve to determine the PCR efficiencies and for further quantification analysis. In all experiments, all primers gave amplification efficiencies of 90–100%. Each reaction was run in triplicate (technical replicate). Two independent pools of cDNA were tested.

Data were analysed with iCycler software (Bio-Rad) and the cycle threshold values (Ct-values) were first determined for the reference genes with a run formed by the fivefold dilution series, the five measuring points and three negative controls. The average Ct value of each triplicate reaction was then used for subsequent analysis with the GENORM (Vandesompele *et al.*, 2002), NORMFINDER (Andersen *et al.*, 2004) and BESTKEEPER (Pfaffl *et al.*, 2004) programs. Using these algorithms, the Rpl13 gene, tightly followed by *RpL8*, can be considered as displaying consistent expression and is suitable for downstream analysis. Subsequently, the expression of esterase genes was normalized to geometric means of this reference and the normalized gene expression was then calculated with Q-Gene software (Simon, 2003).

Sequence and phylogenetic analysis

A dataset of esterase sequences from insects was created, including sequences of carboxylesterases from *D. melanogaster* and *A. mellifera*. Fifty-six amino acid sequences were selected and added to the 20 sequences from *S. littoralis*. Alignment was performed with CLUSTALW and used to create an entry file for phylogenetic analysis. An unrooted tree was calculated by the neighbor-joining method with Poisson correction of distances using the MEGA 3.1 program (Kumar *et al.*, 2004) with default settings. Branch support was assessed by a bootstrap analysis based on 1000 replicates.

Acknowledgements

This work was supported by Université Pierre et Marie Curie-Paris6, INRA, a 6 month Marie Curie fellowship to G. Carot-Sans and a fellowship from the Research Ministry to N. Durand. We thank Marie-Christine François and Françoise Bozzolan for technical help.

References

Andersen, C., Jensen, J. and Orntoft, T. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**: 5245–5250.

- Baker, T. and Vogt, R. (1988) Measured behavioural latency in response to sex-pheromone loss in the large silk moth *Antheraea polyphemus*. *J Exp Biol* **137**: 29–38.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783–795.
- Benton, R., Vannice, K.S. and Vosshall, L.B. (2007) An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* **450**: 289–293.
- Biswas, S., Russell, R.J., Jackson, C.J., Vidovic, M., Ganeshina, O., Oakeshott, J.G. *et al.* (2008) Bridging the synaptic gap: neuroligins and Neurexin I in *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **3**: e3542.
- Callahan, F.E., Vogt, R.G., Tucker, M.L., Dickens, J.C. and Mattoo, A.K. (2000) High level expression of 'male specific' pheromone binding proteins (PBPs) in the antennae of female noctuid moths. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 507–514.
- Campbell, P.M., Robin, G.C., Court, L.N., Dorrian, S.J., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G. (2003) Developmental expression and gene/enzyme identifications in the alpha gene cluster of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* **12**: 459–471.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R., Biswas, S., Schuler, M., Berenbaum, M. *et al.* (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* **15**: 615–636.
- Ding, X. and Coon, M. (1990) Immunochemical characterization of multiple forms of cytochrome P-450 in rabbit nasal microsomes and evidence for tissue-specific expression of P450s NMa and NMb. *Mol Pharmacol* **37**: 489–496.
- Ding, X. and Kaminsky, L. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 149–173.
- Ferkovich, S., van Essen, F. and Taylor, T.R. (1980) Hydrolysis of sex pheromone by antennal esterases of the cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Chem Senses* **5**: 33–46.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. *et al.* (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (Walker, J.M., ed.), pp. 571–607. Humana Press, Totowa, NJ.
- Györgyi, T.K., Roby-Shemkovitch, A.J. and Lerner, M.R. (1988) Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: a tissue-specific developmentally regulated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9851–9855.
- Hinks, C.F. and Byers, J.R. (1976) Biosystematics of the genus *Euxoa* (Lepidoptera, Noctuidae). V. Rearing procedures and life cycles of 36 species. *Can Entomol* **108**: 1345–1357.
- Ishida, Y. and Leal, W.S. (2002) Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkworm, *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1775–1780.
- Ishida, Y. and Leal, W.S. (2005) Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14075–14079.
- Ishida, Y. and Leal, W.S. (2008) Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 9076–9080.

- Jacquín-Joly, E. and Maïbèche-Coisne, M. (2009) Molecular mechanisms of sex pheromone reception in Lepidoptera. In *Short Views on Insect Molecular Biology*, Vol. 1. (Chandrasekar, R., ed.), pp. 147–158. International Book Mission, South India.
- Jacquín-Joly, E., Merlin, C., Malpel, S., Pelletier, J., Brigaud, I., François, M.C. *et al.* (2007) An EST approach for the molecular dissection of olfactory reception in a crop pest, the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *J Insect Sci* **7**: 22–23.
- Jordan, M., Stanley, D., Marshall, S., De Silva, D., Crowhurst, R., Gleave, A. *et al.* (2008) Expressed sequence tags and proteomics of antennae from the tortricid moth, *Epiphyas postvittana*. *Insect Mol Biol* **17**: 361–373.
- Kamikouchi, A., Morioka, M. and Kubo, T. (2004) Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. *Zoolog Sci* **21**: 53–62.
- Kasang, G., Nicholls, M. and von Proff, L. (1989) Sex-pheromone conversion and degradation in antennae of the silk moth *Bombyx mori*. *Experientia* **45**: 81–87.
- Klein, U. (1987) Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antheraea polyphemus* (Saturniidae). *Insect Biochem* **17**: 1193–1204.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**: 150–163.
- Lazard, D., Tal, N., Rubinstein, M., Khen, M., Lancet, D. and Zupko, K. (1990) Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450IIA and UDP-glucuronosyl transferase. *Biochem Biophys Res Commun* **29**: 7433–7440.
- Leal, W.S. (2003) Proteins that make sense. In *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* (Blomquist, G.J. and Vogt, R.G., eds), pp. 447–476. Elsevier Academic Press, London.
- Ljündberg, H., Anderson, P. and Hansson, B.S. (1993) Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female *Spodoptera littoralis*. *J Insect Physiol* **39**: 253–260.
- Mackert, A., do Nascimento, A.M., Bitondi, M.M., Hartfelder, K. and Simões, Z. (2008) Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera*: expression analysis and functional assays. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **150**: 33–44.
- Maïbèche-Coisne, M., Merlin, C., François, M.C., Queguiner, I., Porcheron, P. and Jacquín-Joly, E. (2004) Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chem Senses* **29**: 381–390.
- Merlin, C., Rosell, G., Carot-Sans, G., François, M.C., Bozzolan, F., Pelletier, J. *et al.* (2007) Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Sesamia nonagrioides* and *Spodoptera littoralis*, potentially involved in odorant degradation. *Insect Mol Biol* **16**: 73–81.
- Newcomb, R., Campbell, P., Ollis, D., Cheah, E., Russell, R. and Oakeshott, J.G. (1997) A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7464–7468.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J. and Robin, G.C. (1999) Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays* **21**: 1031–1042.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Campbell, P., Newcomb, R. and Russell, R. (2005) Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 5 (Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S.S., eds), pp. 309–381. Elsevier, London.
- Peng, H.M., Ding, X. and Coon, M. (1993) Isolation and heterologous expression of cloned cDNAs for two rabbit nasal microsomal proteins, CYP2A10 and CYP2A11, that are related to nasal microsomal cytochrome P450 form a. *J Biol Chem* **268**: 17253–17260.
- Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper, Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**: 509–515.
- Prestwich, G.D., Graham, S.M., Handley, M., Latli, B., Streinz, L. and Tasayco, J. (1989) Enzymatic processing of pheromones and pheromone analogs. *Experientia* **45**: 263–270.
- Rutzler, M. and Zwiebel, L. (2005) Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **191**: 777–790.
- Rybczynski, R., Reagan, J. and Lerner, M. (1989) A pheromone-degrading aldehyde-oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *J Neurosci* **9**: 1341–1353.
- Simon, P. (2003) Q-gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* **19**: 1439–1440.
- Strode, C., Wondji, C., David, J., Hawkes, N., Lumjuan, N., Nelson, D. *et al.* (2008) Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 113–123.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- Vogt, R.G. (2005) Molecular basis of pheromone detection in insects. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*, Vol. 3. (Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S., eds), pp. 753–804. Elsevier, London.
- Vogt, R.G. and Riddiford, L.M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* **293**: 161–163.
- Vogt, R.G. and Riddiford, L.M. (1986) Scale esterase: a pheromone-degrading enzyme from the scales of the silk moth *Antheraea polyphemus*. *J Chem Ecol* **12**: 469–482.
- Vogt, R.G., Riddiford, L.M. and Prestwich, G.D. (1985) Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8827–8831.
- Vosshall, L.B. (2008) Scent of a fly. *Neuron* **59**: 685–689; doi 10.1016/j.neuron.2008.08.014.

Characterization of an Antennal Carboxylesterase from the Pest Moth *Spodoptera littoralis* Degrading a Host Plant Odorant

Nicolas Durand¹, Gerard Carot-Sans², Thomas Chertemps¹, Françoise Bozzolan¹, Virginie Party¹, Michel Renou¹, Stéphane Debernard¹, Gloria Rosell³, Martine Maïbèche-Coisne^{1*}

1 UMR-A 1272 UPMC-INRA Physiologie de l'Insecte, Université Pierre et Marie Curie and INRA, Paris and Versailles, France, **2** Department of Biological Chemistry and Molecular Modelling, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain, **3** Unit of Medicinal Chemistry (associated with CSIC), Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Carboxyl/cholinesterases (CCEs) are highly diversified in insects. These enzymes have a broad range of proposed functions, in neuro/developmental processes, dietary detoxification, insecticide resistance or hormone/pheromone degradation. As few functional data are available on purified or recombinant CCEs, the physiological role of most of these enzymes is unknown. Concerning their role in olfaction, only two CCEs able to metabolize sex pheromones have been functionally characterized in insects. These enzymes are only expressed in the male antennae, and secreted into the lumen of the pheromone-sensitive sensilla. CCEs able to hydrolyze other odorants than sex pheromones, such as plant volatiles, have not been identified.

Methodology: In *Spodoptera littoralis*, a major crop pest, a diversity of antennal CCEs has been previously identified. We have employed here a combination of molecular biology, biochemistry and electrophysiology approaches to functionally characterize an intracellular CCE, SICXE10, whose predominant expression in the olfactory sensilla suggested a role in olfaction. A recombinant protein was produced using the baculovirus system and we tested its catabolic properties towards a plant volatile and the sex pheromone components.

Conclusion: We showed that SICXE10 could efficiently hydrolyze a green leaf volatile and to a lesser extent the sex pheromone components. The transcript level in male antennae was also strongly induced by exposure to this plant odorant. In antennae, SICXE10 expression was associated with sensilla responding to the sex pheromones and to plant odours. These results suggest that a CCE-based intracellular metabolism of odorants could occur in insect antennae, in addition to the extracellular metabolism occurring within the sensillar lumen. This is the first functional characterization of an Odorant-Degrading Enzyme active towards a host plant volatile.

Citation: Durand N, Carot-Sans G, Chertemps T, Bozzolan F, Party V, et al. (2010) Characterization of an Antennal Carboxylesterase from the Pest Moth *Spodoptera littoralis* Degrading a Host Plant Odorant. PLoS ONE 5(11): e15026. doi:10.1371/journal.pone.0015026

Editor: Walter S. Leal, University of California Davis, United States of America

Received: August 27, 2010; **Accepted:** October 12, 2010; **Published:** November 29, 2010

Copyright: © 2010 Durand et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Université Pierre et Marie Curie (UPMC), INRA, ANR-07-NEURO-037-01 funding and a fellowship from the Research Ministry to N. Durand. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: martine.maibèche@snv.jussieu.fr

Introduction

Carboxyl/cholinesterase (CCE, EC 3.1.1.1) is a multigene family widespread in prokaryotes and eukaryotes. It includes diverse proteins that hydrolyze a broad range of carboxylic esters to their component alcohols and acids. Despite their structural and functional diversity, most of these enzymes use a same reaction mechanism based on a catalytic triad including a serine [1,2]. Insects have multiple CCEs, as revealed by recent genome analyses [1,3,4,5,6,7,8,9]: 24 genes in the bee *Apis mellifera* [3]; up to 70 in the silkworm *Bombyx mori* [5,6]. However, the physiological role of most insect CCEs is unknown.

Based on phylogenetic analysis and substrate specificities, insect CCE genes have been classified into 33 major clades [10] and three major classes [3]. The first class contains proteins implicated in neuro/developmental functions [11]. This group includes

acetylcholinesterases, neuroligins [11], gliotactins and other uncharacterized proteins [1]. Except acetylcholinesterases, proteins of this class are generally considered to be non-catalytic, such as neuroligins involved in cell-cell interactions in synapses [11].

The second class contains mostly secreted and generally catalytically active enzymes. For a few, functional data suggest their involvement in hormone or odorant processing. Juvenile hormone (JH) esterase (JHE) is involved in the degradation of JH, a key hormone regulating development, metamorphosis and reproduction in insects [12] and is one of the few insect esterases other than acetylcholinesterases to have a clearly defined substrate. CCEs potentially involved in sex pheromone degradation have been identified in several insect species, especially in moths [13,14,15,16,17,18,19]. These Pheromone Degrading Enzymes (PDEs) are generally specifically expressed in the antennae, the insect olfactory organs. Antennae carry hair-like structures called

olfactory sensilla, which enclose olfactory receptor neurons (ORNs) embedded by accessory cells and surrounded by a protein-enriched lymph [20]. Extracellular PDEs are supposed to degrade the pheromone components within the lymph, in the vicinity of the olfactory receptors located in the ORN membrane [13]. Rapid degradation of female sex pheromone in male antennae is believed to play an essential role during male flight towards pheromone trail [18]. However, ability of PDEs belonging to the CCE family to hydrolyze sex pheromone components has been demonstrated in only two species, the moth *Antheraea polyphemus* and the beetle *Popillia japonica* [17,18,19]. Moreover, CCEs able to hydrolyze other odorants than sex pheromones have not been characterized yet.

The third class contains predominantly intracellular active enzymes. Few functional data are available on these enzymes. Most of them have been proposed to have digestive or detoxification function, based on their expression in insect midgut, or have been implicated in insecticide resistance [1,10]. CCE-related insecticide resistance has been intensely studied in insects and two mechanisms have been demonstrated, i.e. mutation in amino acid sequences and gene overexpression [21,22]. The role of CCEs in the adaptation of insects to ingested plant chemicals has not been so greatly documented (reviewed in [23]).

In *Spodoptera littoralis*, a worldwide pest of cotton and vegetable crops, analysis of an Expressed Sequence Tag collection from male antennae has revealed a high diversity of CCEs expressed in the olfactory organs [24]. Among them, a gene belonging to the third CCE class and encoding a putative intracellular esterase (*SICXE10*, GenBank accession number FJ652453) was of particular interest, as preliminary RT-PCR experiment revealed that it was strongly expressed in antennae of both sexes. As the involvement of this class of CCEs in olfaction was unknown, we investigated if *SICXE10* could have a role in odorant hydrolysis. In our study, we characterized the tissue specific and developmental expression patterns of *SICXE10*, and we expressed recombinant *SICXE10* protein and tested its activity *in vitro* towards physiological relevant odorants. For our functional studies, we focused on the pheromone components (*Z,E*-9,11-tetradecadienyl acetate (*Z9E11-14:Ac*) and (*Z,E*-9,12-tetradecadienyl acetate (*Z9E12-14:Ac*) and the plant volatile (*Z*-3-hexenyl acetate (*Z3-6:Ac*). The sex pheromone of female *S. littoralis* is a mix of two esters, *Z9E11-14:Ac* and *Z9E12-14:Ac*. Responses of males to these compounds have been well characterized at the electrophysiological [25] and behavioural levels [26] and females were also able, to some degree, to detect them [25]. *S. littoralis* also responds to the host plant volatile *Z3-6:Ac*. The ability to detect green leaf volatiles was mostly described in females [27,28], because these components play a crucial role for host plant selection before egg laying. Few esters from *S. littoralis* host plants have been identified and tested in electrophysiology. Among those which have been tested, *Z3-6:Ac* induced clear antennal responses in *S. littoralis* females; male responses were not studied. We thus confirmed that males are electrophysiologically responsive to *Z3-6:Ac* to validate its use as a potential substrate for recombinant *SICXE10*.

Our results demonstrated for the first time, that an insect intracellular CCE, predominantly expressed in antennae of both sexes and associated with olfactory sensilla, was able to hydrolyze a plant volatile and to a lesser degree the sex pheromone components. We also showed that the transcript level in males was up regulated by the exposition to this plant odorant. These results open a new range of potential substrates for CCEs belonging to the class 3, in addition to insecticides and dietary plant chemicals.

Results

Tissue-related and temporal expression of *SICXE10*

We determined the tissue distribution and expression levels of the *SICXE10* transcripts in adults by a quantitative PCR (qPCR) method. The expression levels of *SICXE10* in various tissues were shown as relative amounts compared with the *Rpl13* transcripts (Fig. 1A). The *SICXE10* transcripts were highly expressed in the antennae of both sexes, with a slightly higher level in males than in female antennae (1.2-fold). *SICXE10* expression was at least 15-fold higher in antennae than in non-olfactory tissues. *SICXE10* was expressed in abdomen at a relatively low level. The expression in other tissues was barely detectable. In last instar larvae, expression was clearly detected in antennae but not in midguts, as revealed by RT-PCR analysis (Fig. 1B).

In antennae, the expression of *SICXE10* during male post-embryonic development and adult life was studied more precisely by qPCR (Fig. 2). *SICXE10* expression was again detected in the antennae of last instar larvae then its level decreased at the beginning of pupal development. RNA levels increased steadily from the end of the pupal stage until adult emergence, reaching a maximum three days after emergence and then decreasing abruptly.

SICXE10 localization within antennae

The cellular localization of *SICXE10* transcripts in male antennae was characterized by *in situ* hybridization (Fig. 3). *S. littoralis* male antennae are filiform, with olfactory sensilla on the ventral side and only scales on the dorsal side [25]. Male antennae have both long and short trichoid sensilla: the longest ones are distributed in the medial and lateral ventral region while the shortest are predominantly in the medial ventral region. Some short basiconic sensilla are also located in the medial ventral region [29]. After *in situ* hybridization, *SICXE10* signals were restricted to the sensilla side of the antennae, with no labelling on the scale side (Fig. 3, A, C). Labelling was located in cells at the base of the olfactory sensilla (Fig. 3, C, D). On longitudinal sections, the distinction between long and short sensilla was not possible. However, in some antennal segment with intact cuticle (Fig. 3, B), the labelling was observed all over the ventral and lateral surface suggesting an expression of *SICXE10* in both long and short olfactory sensilla. Sense probes gave no signals.

Production and purification of *SICXE10* recombinant protein

Recombinant *SICXE10* was produced using a baculovirus expression system in lepidopteran *Sf21* cells. The expression of the recombinant protein was analyzed by SDS PAGE of infected insect cells at different times after viral infection (Fig. 4A). Expression of the recombinant protein occurred after 48 h post-infection (p.i.), corresponding to the time of activation of the “very late polyhedrin promoter” which was driving expression. Non-infected cells were used as negative control as well as cells infected with a non recombinant virus, which produced polyhedrin normally. Recombinant *SICXE10* had a molecular mass of about 60 kDa, consistent with the predicted molecular mass of 61 kDa based on translation of the complete ORF [24]. Using western-blot analysis, a single band with the same molecular mass was observed before and after the purification steps (Fig. 4B). A single band was also detected by Coomassie staining following purification. Native PAGE followed by an α/β -naphthyl acetate assay on purified recombinant *SICXE10* confirmed that the enzyme was still active following purification (Fig. 4C).

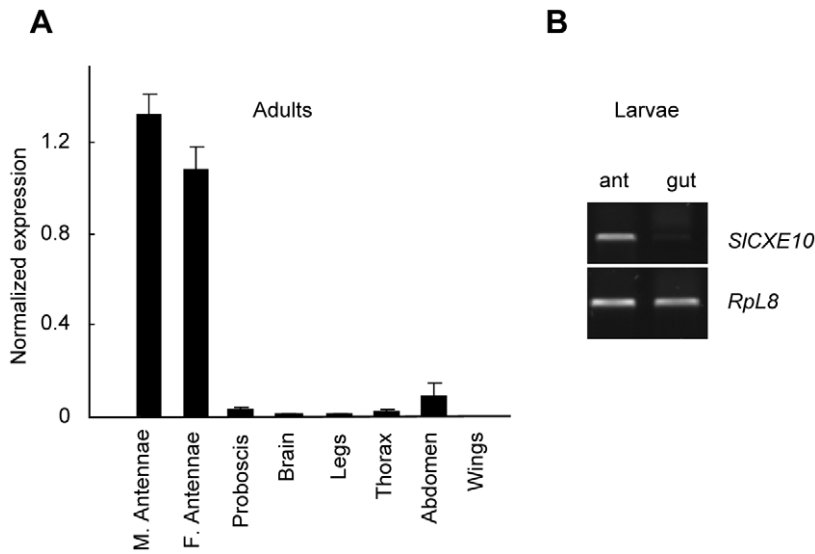


Figure 1. Analysis of *SICXE10* expression in *S. littoralis* tissues. **A**) Quantitative PCR (qPCR) analysis on cDNAs from male adult tissues and from female adult antennae. The expression level of *SICXE10* was normalized to that of *Rpl13* transcript, which was measured in the same cDNAs. Data were obtained from triplicate experiments and are given as the mean \pm SD. M: male; F: female. **B**) RT-PCR analysis on cDNAs from last instar larval antennae and midguts.

doi:10.1371/journal.pone.0015026.g001

Antennal response to Z3-6:Ac

To test if males were responsive to Z3-6:Ac, we performed an electrophysiological study. Responses were quantified by measuring the amplitude of antennal depolarization after odorant stimulation. Antennae of both sexes responded to Z3-6:Ac in a dose-dependent manner (Fig. 5). Male responses were slightly weaker than the female ones for odorant doses ranging from 10^{-3} to 2×10^{-2} μ g. At higher doses (10^{-1} μ g), the responses were comparable in both sexes. When using mineral oil alone, antennal responses were of -0.03 mV in males and 0 mV in females.

Kinetic study

The ability of recombinant SICXE10 to degrade the sex pheromone components (Z9E11-14:Ac and Z9E12-14:Ac) and the plant volatile Z3-6:Ac was analyzed by GC and GC-MS; crude antennal extracts were used as positive controls. Hydrolysis was indicated by the percentage of conversion of the acetates to the corresponding alcohols after 1 h of incubation. For the crude

antennal extract, hydrolysis of Z9E11-14:Ac and Z9E12-14:Ac was around 40%, as previously reported [30], while hydrolysis of Z3-6:Ac was nearly 100% (Fig. 6). For recombinant SICXE10, hydrolysis of Z9E11-14:Ac and Z9E12-14:Ac was 7.63% and 8.98% respectively, while hydrolysis of Z3-6:Ac was 89.2%. The high level of activity allowed the calculation of kinetic values for recombinant SICXE10 and Z3-6:Ac; a K_m of 11.4 ± 4.8 mM and a V_{max} of 8.2 ± 1.6 μ M/s was determined by non-linear fitting ($R^2 = 0.9145$) and a K_m of 9.6 ± 2.26 mM and a V_{max} 7.2 ± 1.48 μ M/s, respectively, using the Lineweaver-Burk method ($R^2 = 0.996$), (Fig. 7).

Effect of odorant exposure on *SICXE10* expression level in males

To test the hypothesis that *SICXE10* expression could be induced by exposing animals to odorants, males were exposed for 48 h to high doses of Z3-6:Ac (plant volatile) and Z9E11-14:Ac (pheromone component). Levels of *SICXE10* transcripts were compared between naive and exposed males by quantitative PCR (Fig. 8). Male antennae exposed to Z3-6:Ac expressed 3.63 times more *SICXE10* than the controls ($p = 0.0021$, Student t-test). The transcript levels were comparable when males were exposed to Z9E11-14:Ac.

Discussion

SICXE10 was strongly and predominantly expressed in the adult antennae compared to all other tissues tested. This expression pattern suggested that SICXE10 could be implicated in a specific olfactory function. Indeed, such restricted expression is a useful criterion that has already been helpful in identifying specific olfactory genes such as olfactory receptors and Odorant-Binding Proteins (OBPs) in various species [31].

During development, *SICXE10* expression level increased from the end of the pupal stage and reached a maximum in 3-day-old adults. Apol-PDE, a CCE clearly involved in sex pheromone degradation in the moth *Antheraea polyphemus* presented a similar profile [18]. These expression patterns were concomitant with the

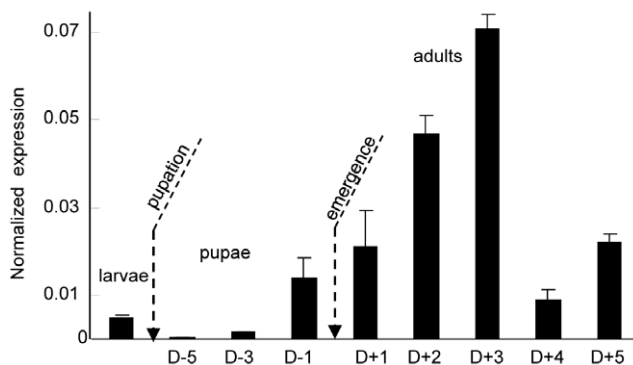


Figure 2. qPCR analysis of *SICXE10* expression in male antennae during development and adult life. The expression level of *SICXE10* was normalized to that of *Rpl13*. Data were obtained from triplicate experiments and are given as the mean \pm SD.

doi:10.1371/journal.pone.0015026.g002

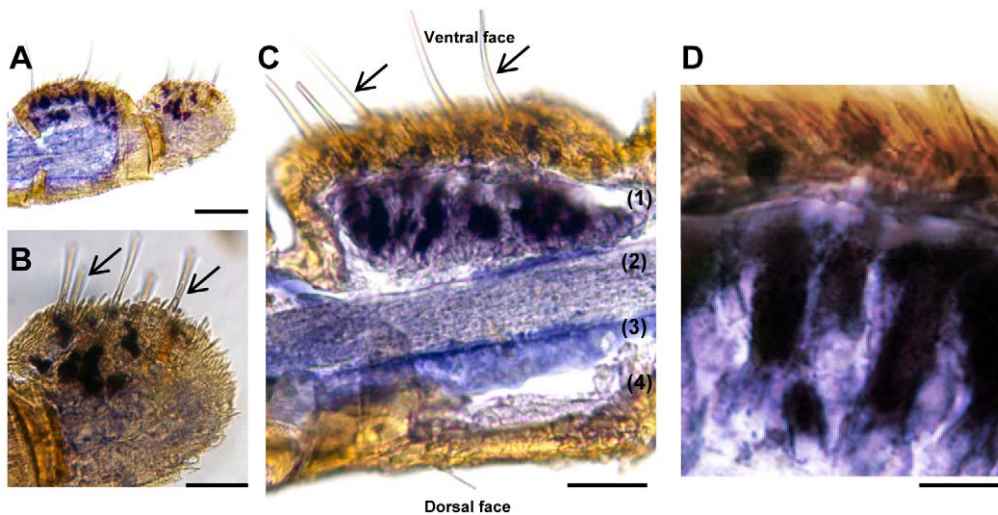


Figure 3. Expression patterns of *SICXE10* after *in situ* hybridization on longitudinal sections of *S. littoralis* male antennae. Arrows show the olfactory sensilla. **A)** Global view of two antennal segments, one sectioned and the other one with intact cuticle. **B)** Higher magnification of A, showing labeling at the base of the olfactory sensilla. **C)** Longitudinal section through a segment showing the disposition of the olfactory epithelium (1), the antennal nerve (2), the antennal lumen filled with haemolymph (3) and the epidermis (4). **D)** Higher magnification of C showing labeled cells (accessory cells and/or neurons). Scale: 100 μm in A; 50 μm in B and C, 20 μm in D. doi:10.1371/journal.pone.0015026.g003

electrophysiological responsiveness to odorant components and with the expression of other olfactory genes such as OBPs [18,32,33] or ODEs [34], suggesting a common regulatory pathway for the genes involved in odorant detection in mature adult moths. The life of *S. littoralis* males is short: they are able to mate rapidly after emergence; they survive as adults for 5 to 6 days in our rearing conditions. Maximum levels of *SICXE10* expression in males were thus consistent with their short adult lifespan.

Interestingly, *SICXE10* transcripts were also clearly detected in antennae from last instar larvae but not from the larval midgut. This is the first observation of expression of a presumptive ODE in insect larval antennae. The majority of CCEs identified during this stage were indeed generally associated with the digestive tract [6,10], suggesting a role in detoxification of noxious substances in larval diet. In many insect larvae, olfactory stimuli play a role for food location and studies in *Drosophila melanogaster* showed that the

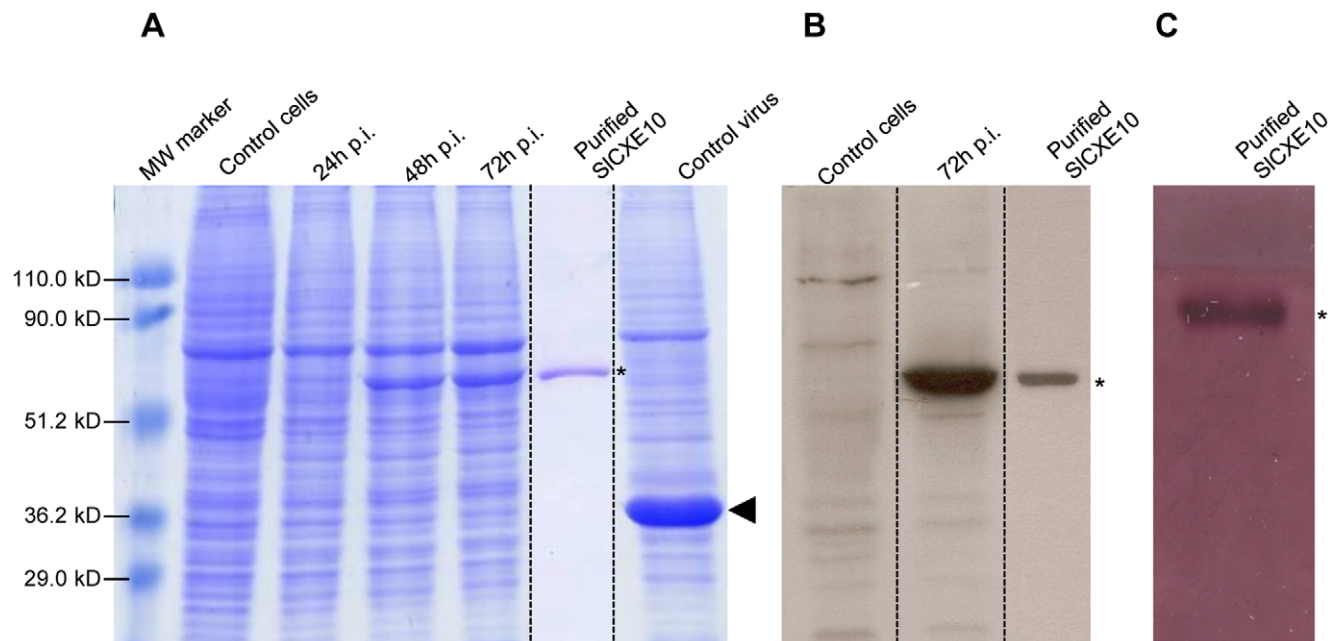


Figure 4. *SICXE10* recombinant protein expression and purification. **A)** SDS PAGE analysis of total proteins extracted from infected insect cells at different times after infection (24, 48, 72 h p.i.). Non-infected cells and cells infected by a non-recombinant virus were used as controls. **B)** Western-blot analysis. **C)** α/β -naphthyl acetate staining. *SICXE10* are indicated by asterisks on the right side of the gel, polyhedrin is indicated with an arrowhead. The sizes of the molecular-mass markers are shown on the left hand side of the gel. doi:10.1371/journal.pone.0015026.g004

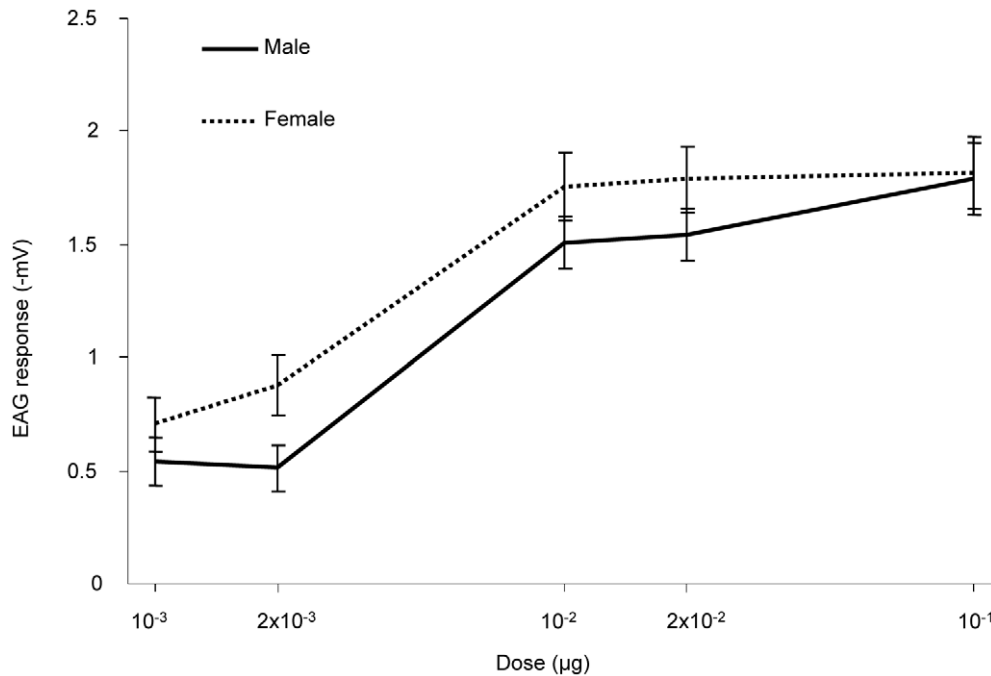


Figure 5. Electroantennographic responses to Z3-6:Ac. Full line and dotted line represent male and female responses, respectively (mean \pm SEM, $n = 17$ and 12 , respectively). doi:10.1371/journal.pone.0015026.g005

organization and functioning of the olfactory system from larvae is simpler than but similar to the adult system, from the odorant reception to the odorant-driven behavior (reviewed in [35]). Antennal larval CCEs could thus play a role in odorant degradation, as assumed in adults.

In the adult male antennae, *SICXE10* expression was restricted to the olfactory sensilla, as revealed by *in situ* hybridization. Expression was associated with long and short olfactory sensilla, in cells that could correspond to accessory cells and/or to the olfactory neurons. In male *S. littoralis*, most of the olfactory sensilla

are long trichoid sensilla narrowly specialized in $\zeta 9E11-14:Ac$ and $\zeta 9E12-14:Ac$ detection [25]. Short olfactory sensilla (trichoid and basiconic) are tuned to various plant odours [28] but their responses to plant esters were not tested in males. On the contrary, most of the sensilla from female antennae are short and specialized in the detection of plant odours, including $\zeta 3-6:Ac$ [27,28]. Our electrophysiological study demonstrates that males can also detect $\zeta 3-6:Ac$ presumably via the short sensilla. In male antennae, *SICXE10* expression was thus observed to associate with olfactory sensilla which respond to either sex pheromone or host-plant esters. Therefore, we hypothesize that *SICXE10* has a role in the hydrolysis of both pheromone and plant volatile compounds.

In our *in vitro* conditions, recombinant *SICXE10* was indeed able to degrade these three esters but with a strong preference to $\zeta 3-6:Ac$ compared to $\zeta 9E11-14:Ac$ and $\zeta 9E12-14:Ac$. The differences in terms of carbon chain length, unsaturations and hydrophobicity between $\zeta 3-6:Ac$ and sex pheromone compounds could easily account for this difference. Towards $\zeta 3-6:Ac$, recombinant *SICXE10* is fast, with a *in vitro* turnover number of 45 s^{-1} . This turnover number is higher than of insect JHE ($0.6\text{--}4.3\text{ s}^{-1}$, reviewed in [1]). It ranged between the k_{cat} values of the two CCEs previously characterized as PDEs in *A. polyphemus* (Apol-PDE) and in *P. japonica* (Pjap-PDE): k_{cat} values for the sex pheromone of 127 s^{-1} [18] and 1.36 s^{-1} (calculated from [17]), respectively. *SICXE10* affinity for $\zeta 3-6:Ac$ is quite low, leading to a moderate specific activity (K_m/k_{cat}) of $4.7 \times 10^3\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$. This activity is smaller than that of ApolPDE ($1 \times 10^8\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$), of insect JHEs ($6\text{--}501 \times 10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$, [1]) or of a malathion-CCE from *Lucilia cuprina* ($2.7 \times 10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) [36] but is higher than that of Pjap-PDE ($2 \times 10^3\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$, calculated from [17]).

This high K_m towards $\zeta 3-6:Ac$ revealed that the affinity of *SICXE10* for $\zeta 3-6:Ac$ is low and suggested that other exogenous or endogenous compounds might be additional substrates for the native enzyme. *SICXE10* expression level in adult male antennae was nevertheless clearly induced by $\zeta 3-6:Ac$ exposition *in vivo* and

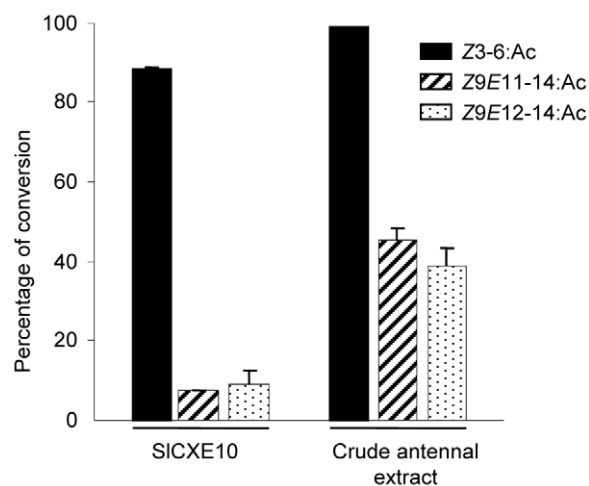


Figure 6. Hydrolysis of Z3-6:Ac, Z9E11-14:Ac and Z9E12-14:Ac by recombinant SICXE10 and crude antennal extracts. Hydrolysis was indicated by the percentage of conversion of the esters in the corresponding alcohols after 1 h of incubation. Data were obtained from triplicate experiments and are given as the mean \pm SD. doi:10.1371/journal.pone.0015026.g006

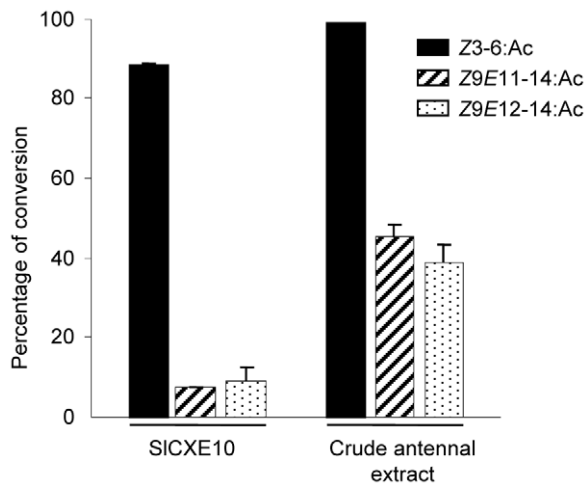


Figure 7. Kinetics of Z3-6:Ac hydrolysis by SICXE10. A) Nonlinear regression analysis. **B)** Lineweaver-Burk representation. doi:10.1371/journal.pone.0015026.g007

not by the sex pheromone component Z9E11-14:Ac. As many studies showed that the enzyme substrates are capable of inducing the expression of those enzymes, this suggested that Z3-6:Ac might be a physiological substrate for SICXE10 in adult males. Induction of detoxification enzymes, including CCEs, by xenobiotics or plant allelochemicals present in the diet has been well studied in insects (reviewed in [23,37]). We demonstrate here for the first time that an odorant molecule could also be an effective CCE inducer in insects. Enzyme over-expression may increase odorant clearance and thus avoid adaptation/habituation to the odorant signals. This mechanism could participate to maintaining the specificity of olfactory communication in a noisy environment, e.g. when males have to detect minute amounts of sex pheromone in a high background of various plant volatiles.

SICXE10 lacks a secretory signal peptide as well as the C-terminal endoplasmic retrieval signal [1], suggesting a localization into the cytosol of the accessory cells (and/or ORNs) of the sensilla. In contrast to the extracellular PDEs present in the sensillar lymph, SICXE10 can thus presumably act on Z3-6:Ac and putatively other odorants only after their entry to the cells. It has been suggested that the complexes OBP-odorant and OR-odorant are internalized into the support cells and ORNs, respectively [38,39]. Because of their hydrophobicity, the odorant molecules tested here may also directly enter the cells across their plasma membranes. Our results strongly suggest that a CCE-based intracellular metabolism of odorants could occur in insect antennae, in addition to the extracellular metabolism already proposed. Antennal intracellular cytochromes P450 and glutathione S-transferases involved in pheromone or odorant degradation have been described [40,41]. This complex metabolism could participate in the clearance of odours within the antennae.

Further studies will allow to precise the catalytic properties of SICXE10 to establish if this enzyme may also detoxify xenobiotics entering the sensilla, as suggested for intracellular CCEs expressed in larval midgut.

Materials and Methods

Chemicals

Z9E11-14:Ac and Z9E12-14:Ac were synthesized in the laboratory (courtesy of Martine Lettère, >97% purity checked by gas chromatography, CAS 50767-79-8 and 30507-70-1, respectively). Z3-6:Ac was purchased from Lancaster Synthesis (Alpha Aesar,

USA; 99% purity, CAS 3681-71-8). (Z)-3-hexenol (Z3-6:OH, 99% purity, CAS 928-96-1) and 5-methyl-1-hexanol (99% purity, CAS 627-98-5) were purchased from Sigma-Aldrich. Substrates were diluted in hexane (>98% purity, CAS 110-54-3, Carlo-Erba).

Animals and tissue collection

Insects were reared on semi-artificial diet at 24°C, 60–70% relative humidity, and under a 16:8 h light:dark (LD) photoperiod till emergence. Sexes were separated at pupal stage. Adults were kept under an inverted LD regime and provided with a 10% sucrose solution. For SICXE10 expression analysis by polymerase chain reaction (PCR), various tissues were dissected: antennae and midguts from last instar feeding larvae, antennae from male pupae and from adults, male proboscis, brains, legs, thorax, abdomens and wings. For odorant exposure experiments, 15 one-day-old males were set during 48 h into hermetically sealed boxes containing either 1 µg of Z3-6:Ac or Z9E11-14:Ac loaded onto a filter paper. Insects were also provided with a 10% sucrose solution. Control animals were kept in the same conditions except that the filter paper was only loaded with hexane. Antennae were then dissected. For *in situ* hybridization, male antennae were fixed overnight at 4°C in 4% PFA-3% Tween 20, rinsed in PBS (0.85% NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7.1; Sigma) and then cryoprotected in PBS-18% sucrose at 4°C before use. For kinetic studies, two-day-old male antennae were dissected and immediately used for crude antennal extracts preparation.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), then treated with DNase I (Roche, Basel, Switzerland) and quantified with a spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Single-stranded cDNAs were synthesized from total RNAs (5 µg) from various tissues using Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL, Invitrogen) with the oligo(dT)₁₈ primer according to the manufacturer's instructions.

Expression analysis of SICXE10 by quantitative RT-PCR (qPCR) and RT-PCR

Two specific primers, SICXE10-q.F (5'-CGGACGACCGGT-CAGTTGTA) and SICXE10-q.R (5'-TACCAGGGACCAGC-GTGTG) were designed using EPRIMER3 software (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=eprimer3>). The reference genes (*RpL13*, *RpL8*, *GAPDH* and *β-actin*) and their corresponding primers were described in [24]. All reactions were performed on the LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland). Each 16 µl reaction consisted of 8 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Basel, Switzerland), 6 µl of 12-fold diluted cDNA (or water for negative control) and 1 µl of each primer. The qPCR program consisted of 95°C for 13.5 min, then 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s. This was followed by the measurement of fluorescence during a 55 to 95°C melting curve in order to detect a single gene-specific peak and to check the absence of primer dimer peaks. A negative control and a fivefold dilution series of pooled cDNAs (from all conditions) were included in each run. The fivefold dilution series were used to construct a relative standard curve to determine the PCR efficiencies and for further quantification analysis. Each reaction was run in triplicate (technical replicate) with at least three independent biological replicates. Data were analysed with LightCycler 480® Software (Roche, Basel, Switzerland) and the crossing point values (Cp-values) were first determined for the reference genes with a run

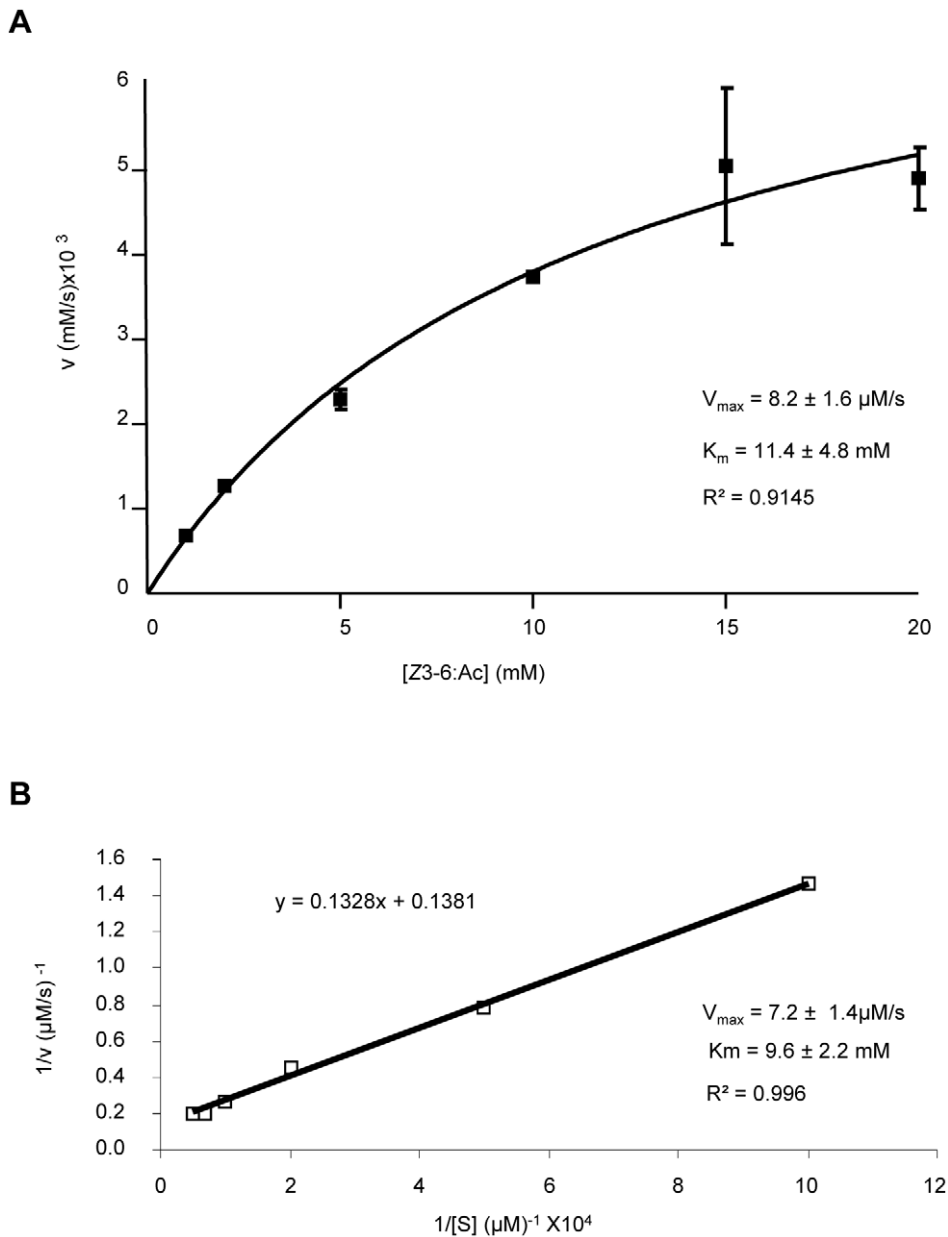


Figure 8. Quantitative analysis of SICXE10 transcripts in male antennae after Z3-6:Ac and Z9E11-14:Ac exposition by qPCR. The expression level of *SICXE10* was normalized to that of *RpL13*. Data were obtained from triplicate experiments and are given as the mean \pm SD. doi:10.1371/journal.pone.0015026.g008

formed by the fivefold dilution series, the measuring points and three negative controls. The *RpL13* gene was considered as displaying consistent expression and was suitable for downstream analysis, as previously described in [24]. Subsequently, the expression of *SICXE10* was normalized to geometric means of this reference and the normalized gene expression was then calculated with Q-Gen software [42].

Non-quantitative RT-PCR was performed on 100 ng of cDNAs from larval antennae and midguts, using SICXE10-q.F/q.R and *RpL8* primers. 30 cycles of amplification were realized for *SICXE10* and 25 for *RpL8* in order to fit the linear range of amplification.

In situ hybridization

A cDNA fragment of 601 bp was amplified by PCR using SICXE10-ish.F (5'-AGCTATTTAGGTGAACACTATAGTG-

AATTCTTCAAAAAACAACCTTGTG) and SICXE10-ish.R (5'-ATTGTAATACGACTCACTATAGGGTCTCCGTAAGATGGCC) primers and was used as template for *in vitro* transcription to generate DIG-labeled RNA sense and antisense probes. Antennae from 2-day-old male moths were embedded in Tissue-Tek medium™ compound (CellPath, Newtown Powys, UK). Cryosections (7 μm) were set in cell culture insert (Greiner Bio-one, Monroe, USA) and rinsed twice in PBS for 5 min and twice in 2xSSC for 5 min. Sections were first incubated for 1 h at 45°C in hybridization solution (50% formamide, 5x SSC, 5x Denhart's solution, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ yeast tRNA, 4 mM EDTA, 2.5% Dextran), then hybridization was conducted overnight at 45°C in the same solution containing the labeled probe. Post-hybridization, sections were washed 10 min in 2xSSC, incubated 30 min at 37°C with RNase, rinsed twice in 0.1xSSC for 30 min at 65°C and

5 min in PBS. After blocking with 0.5% blocking reagent (Roche) for 30 min at RT, sections were incubated with anti-Dig AP conjugated antibody diluted 1:500 for 30 min at RT. After 5 min washing in detection buffer (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% tween 20, 20 mM levamisole), hybridized probes were visualized by incubation in the dark with NBT-BCIP as substrates in detection buffer. Reaction was stopped by rinsing sections in detection buffer. Sections were mounted on slides and pictures were acquired (Olympus BX61 microscope, ImagePro software) and digitalized using Adobe Photoshop® 7.0 (Adobe, USA).

Construction of recombinant baculovirus SICXE10-AcMNPV

The *SICXE10* coding region was amplified from male antennal cDNA by PCR using Expand High Fidelity PCR system (Roche, Bazel, Switzerland) and two specific primers (SICXE10-ORF.F: 5'-GCGATGGTGCAAGTGAGAGTGAGCGAGGGTGTA and SICXE10-ORF.R: 5'-TTGATTTAGCGTACTAAATTTAGGC-AGGTG). The 1.63 kb PCR product was cloned into pBlueBac4.5/V5-His TOPO transfer plasmid (Invitrogen). The presence of the insert, in-frame with the polyhedrin promoter from *Autographa californica* multi nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), as well as the presence of the carboxy-terminal hexahistidine tag (6His-tag), were confirmed by sequence analysis (GATC Biotech, Marseille, France). This plasmid DNA was cotransfected with viral DNA into *Spodoptera frugiperda* Sf21 cells using the bacmid DNA-CellFECTIN mixture (Bac'N'Blue, Invitrogen). Recombinant viruses were isolated from the transfection supernatant by plaque purification. Occlusion-positive plaques, representing recombinant viruses, were picked and plaque purified. Single isolated recombinant viruses were amplified to obtain high-titre virus stocks. Virus titres were determined by plaque assays. A concentrated viral stock (1×10^7 pfu/ml) was stored at 4°C for further experiments.

Expression and purification of recombinant SICXE10

Sf21 cells (5×10^5 cells/ml) in 5 ml of Sf-900 II (Invitrogen) were infected with the viral stock at a multiplicity of infection of 20 and grown at 27°C for 72 h. Cells were washed twice with PBS, then cell pellet was diluted with a lysis buffer (1% Nonidet P40, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8) and incubated on ice for 10 min. Cells debris were removed by centrifugation, the supernatant was isolated and 200 µl of nickel-charged resin (Ni-NTA Agarose, Qiagen) was added before 1 h incubation at 4°C under agitation. Suspension was loaded into a polypropylene column, washed twice with wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8) and eluted with elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8). Protein purification was controlled by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western-blot analyses. Elution fractions were separated by SDS PAGE and either visualized by Coomassie staining or transferred to a nitrocellulose membrane for western-blot: after blocking in TBST-10% blocking reagent (Invitrogen), membranes were incubated overnight at 4°C with anti-6His-tag primary antibody (Sigma-Aldrich, 1:10,000), then incubated with horseradish-peroxidase-labelled antibody (Sigma-Aldrich, 1:10,000). Blots were washed and incubated with chemoluminescent substrate for 1 min (ECL Plus Western Detection Kit, GE Healthcare). To check enzyme activity, elution fractions were subjected to native PAGE and esterase activities were visualized by α/β -naphthyl acetate assay, as described in [16].

Electrophysiology

Two-day-old male and female moths were anesthetized with CO₂ and restrained in a styrofoam holder. A chlorinated silver

wire was inserted into the abdomen to serve as reference electrode. One antenna was fixed with small strips of adhesive tape on the surface of the holder and the tip of the antenna was cut off. The recording electrode, filled with sensillum saline (10^{-3} M Ca²⁺ solution after [43] modified from [44]) was slipped over the end of the cut antenna. Both electrodes were connected to a preamplifier NL 102 (Digitimer, Hertfordshire, UK). The signal was amplified ($\times 1000$) and filtered from DC to 10 kHz and digitized at 10 kHz and 12 bits with a Data Translation DT3001 board (Data Translation, Malboro, USA). The amplitude of electroantennograms was measured using Awave software [45]. Olfactory stimuli were delivered with a programmable olfactometer that used distinct sources of Z3-6:Ac for different dilutions as described in [46]. White mineral oil from Sigma (CAS 8042-47-5) (Sigma-Aldrich, L'Isle-d'Abeau, France) was used to prepare 1/1000, 1/500, 1/100, 1/50, 1/10 volume to volume dilutions. The antenna was permanently bathed by pure air at 440 ml/min. During stimulation periods, pure air was replaced by Z3-6:Ac or control (mineral oil). Every antenna was challenged with a series of six stimulations: mineral oil, 1/1000, 1/500, 1/100, 1/50 and 1/10 Z3-6:Ac solution. Odorant or control was applied as a short pulse of 500 ms. Experiments were repeated on 17 males and 12 females.

Kinetic study

Crude antennal extracts were prepared by homogenization of antennae on liquid nitrogen in 20 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4. Homogenates were briefly sonicated, centrifuged at 12000 rpm for 5 min and the supernatants were stored at 4°C until rapid use. To study the kinetics of odorant hydrolysis by antennal extracts and recombinant SICXE10, the production of the corresponding alcohols was monitored. 500 ng of freshly purified recombinant protein or 4 µg of male antennal extract were incubated during 1 h at 28°C in 50 µl of 20 mM Tris buffer (pH 7.4) with either Z3-6:Ac, Z9E11-14:Ac or Z9E12-14:Ac (final concentration: 40 µM). No detergent was used. Substrate and product were extracted immediately with a mix of ether and hexane (1:1 v/v). The organic phase was separated and concentrated before injection of the totality of the sample in gas chromatography (GC, Thermo Finnigan Trace GC; HP-5 Agilent column). Identification of the product was confirmed by mass spectrometry analysis (Thermo Finnigan Trace GC-MS). The GC conditions for the sex pheromone components were as follows: injection at 80°C, hold for 1 min, 5°C/min up to 220°C, 10°C/min up to 300°C and 5 min of hold at this temperature. For Z3-6:Ac, injection was performed at 50°C, hold for 1 min, followed by 1°C/min up to 65°C, 5°C/min up to 80°C, 10°C/min up to 300°C and 5 min of hold at this temperature. Three replicates for each substrate were analyzed. The percentage of conversion was calculated by the relative amount of the derived alcohol with regard to the parent acetate. For K_m and V_{max} determination, 2 µg of purified recombinant SICXE10 were incubated in a 200 µl reaction mixture with various concentrations of Z3-6:Ac (1 mM to 20 mM). After 5 min of incubation, substrate and product were extracted immediately with 400 µl of ether/hexane mix (1:1 v/v) containing 5-methyl-1-hexanol as internal standard. The GC detector was calibrated with a wide range of concentrations of Z3-6:OH and standard diluted in hexane. Experiments were replicated twice for each concentration. Kinetic parameters were determined by fitting the experimental activity data to the one site binding equation of GraphPad Prism 5 as well as by Lineweaver-Burk plots (double reciprocal, $1/v$ versus $1/[S]$).

Acknowledgments

We thank David Siauassat for helping in qPCR experiment, Pascal Roskam for insect rearing and Marthe Solvar for histological preparations. We are grateful to Pr R.G. Vogt for critical reading and English improvement of the manuscript.

References

- Oakeshott J, Claudianos C, Campbell P, Newcomb R, Russell R (2005) Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In *Comprehensive Molecular Insect Science* Gilbert L, Latrou K, Gill S, eds. Elsevier: Oxford, UK, 5 Pharmacology: 309–381.
- Oakeshott J, Claudianos C, Russell R, Robin G (1999) Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays* 21: 1031–1042.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson R, Biswas S, Schuler M, et al. (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* 15(5): 615–636.
- Oakeshott J, Johnson R, Berenbaum M, Ranson H, Cristino A, et al. (2010) Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol* 19(Suppl 1): 147–163.
- Yu Q, Lu C, Li W, Xiang Z, Zhang Z (2009) Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 40(2): 100–112.
- Tsubota T, Shiotsuki T (2010) Genomic analysis of carboxyl/cholinesterase genes in the silkworm *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 11: 377–387.
- Strode C, Wondji C, David J, Hawkes N, Lumjuan N, et al. (2008) Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38(1): 113–123.
- Ramsey J, Rider D, Walsh T, De Vos M, Gordon K, et al. (2010) Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. *Insect Mol Biol* 19(Suppl 2): 155–164.
- Lee S, Kang J, Min J, Yoon K, Strycharz J, et al. (2010) Decreased detoxification genes and genome size make the human body louse an efficient model to study xenobiotic metabolism. *Insect Mol Biol* doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01024.x.
- Teese M, Campbell P, Scott C, Gordon K, Southon A, et al. (2010) Gene identification and proteomic analysis of the esterases of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol* 40(1): 1–16.
- Biswas S, Reinhard J, Oakeshott J, Russell R, Srinivasan M, et al. (2010) Sensory regulation of neuropeptides and neurexin I in the honeybee brain. *PLoS One* 5(2): e9133.
- Kamita S, Hinton A, Wheelock C, Wogulis M, Wilson D, et al. (2003) Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific? *Insect Biochem Mol Biol* 33(12): 1261–1273.
- Vogt RG, Riddiford LM (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293: 161–163.
- Ishida Y, Leal WS (2002) Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkworm, *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1775–1780.
- Maibèche-Coisne M, Merlin C, Francois M-C, Queguiner I, Porcheron P, et al. (2004) Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chem Senses* 29: 381–390.
- Merlin C, Rosell G, Carot-Sans G, François MC, Bozzolan F, et al. (2007) Antennal Esterase cDNAs from two pest moths, *Sesamia nonagrioides* and *Spodoptera littoralis*, potentially involved in odorant degradation. *Insect Mol Biol* 16: 73–81.
- Ishida Y, Leal WS (2008) Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9076–9080.
- Ishida Y, Leal WS (2005) Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14075–14079.
- Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD (1985) Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8827–8831.
- Steinbrecht RA (1987) Functional morphology of pheromone-sensitive sensilla. In: Prestwich GD, Blomquist GJ, eds. *Pheromone biochemistry*: Academic Press: Orlando, pp 353–384.
- Small G, Hemingway J (2000) Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol Biol* 9(6): 647–653.
- Newcomb R, Campbell P, Ollis D, Cheah E, Russell R, et al. (1997) A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14): 7464–7468.
- Després L, David J, Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22(6): 298–307.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ND TC GC-S MR SD GR MM-C. Performed the experiments: ND GC-S TC FB VP GR. Analyzed the data: ND TC GC-S VP SD GR MM-C. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR GR MM-C. Wrote the paper: ND TC VP MM-C.

- Durand N, Carot-Sans G, Chertemps T, Montagné N, Jacquin-Joly E, et al. (2010) A diversity of putative carboxylesterases is expressed in the antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Mol Biol* 19(1): 87–97.
- Ljüngberg H, Anderson P, Hansson BS (1993) Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol* 39: 253–260.
- Quero C, Lucas P, Renou M, Guerrero A (1996) Behavioral responses of *Spodoptera littoralis* males to sex pheromone components and virgin females in wind tunnel. *J Chem Ecol* 22: 1087–1102.
- Jonsson M, Anderson P (1999) Electrophysiological response to herbivore-induced host plant volatiles in the moth *Spodoptera littoralis*. *Physiological Entomology* 24: 377–385.
- Anderson P, Hansson BS, Lofqvist J (1995) Plant-odour-specific receptor neurones on the antennae of female and male *Spodoptera littoralis*. *Physiol Entomol* 20: 189–198.
- Laue M (2000) Immunolocalization of general odorant-binding protein in antennal sensilla of moth caterpillars. *Arthropod Struct Dev* 29: 57–73.
- Quero C, Rosell G, Jiménez O, Rodríguez S, Pilar Bosch M, et al. (2003) New fluorinated derivatives as esterase inhibitors. Synthesis, hydration and crossed specificity studies. *Bioorg Med Chem* 11: 1047–1055.
- Benton R, Vannice KS, Voshall LB (2007) An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450: 289–293.
- Györgyi TK, Roby-Shemkoviitch AJ, Lerner MR (1988) Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: a tissue-specific developmentally regulated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9851–9855.
- Vogt RG, Kohne AC, Dubnau JT, Prestwich GD (1989) Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the gypsy moth *Lymantria dispar*. *J Neurosci* 9: 3332–3346.
- Rybczynski R, Vogt RG, Lerner MR (1990) Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 265: 19712–19715.
- Gerber B, Stocker R (2007) The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. *Chem Senses* 32(1): 65–89.
- Rybczynski R, Heidari R, Huang H, Hammock B, Russell R, et al. (2007) Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 37(9): 891–902.
- Feyerisen R (1999) Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 44: 507–533.
- Steinbrecht RA, Osaki M, Ziegelberger G (1992) Immunological localization of pheromone-binding proteins in moth antennae. *Cell Tissue Res* 270: 287–302.
- Vogt RG (2005) Molecular basis of pheromone detection in insects. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology* Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, eds. Elsevier: London, 3 Endocrinology: 753–804.
- Wojtasek H, Leal WS (1999) Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chafer, *Phyllopertha diversa* (Coleoptera: Scarabaeidae), by an insect olfactory cytochrome P450. *FEBS Lett* 458: 333–336.
- Rogers M, Jani M, Vogt R (1999) An olfactory-specific glutathione S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *J Exp Biol* 202: 1625–1637.
- Simon P (2003) Q-gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19: 1439–1440.
- Pezier A, Acquistapace A, Renou M, Rospars JP, Lucas P (2007) Ca²⁺ stabilizes the membrane potential of moth olfactory receptor neurons at rest and is essential for their fast repolarization. *Chem Senses* 32: 305–317.
- Kaissling KE, Thorson J (1980) Insect olfactory sensilla: structural, chemical and electrical aspects of the functional organization. In: Satelle DB, Hall LM, Hildebrand JG, eds. *Receptors for neurotransmitters, hormones and pheromones in insects*. Amsterdam: Elsevier-North Holland, pp 261–282.
- Marion-Poll F (1995) Object-oriented approach to fast display of electrophysiological data under MS-Windows. *Journal of Neuroscience Methods* 63: 591–592.
- Party V, Hanot C, Said I, Rochat D, Renou M (2009) Plant terpenes affect intensity and temporal parameters of pheromone detection in a moth. *Chem Senses* 34(9): 763–774.

