



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TTIK
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
GENETIKA INTÉZET



**A *Drosophila melanogaster* FMRF-amid rokon
neuropeptidjeinek és GPCR receptorainak genetikai analízise**

Ph.D. értekezés tézisei

Kiss Brigitta

Témavezető: Dr. Kiss István

Tudományos tanácsadó

Szeged, 2019

1. Bevezetés

A neuropeptidok vagy neurohormonok az egész állatvilágban széles körben megtalálható, kis tagszámú peptidok, melyeket a központi idegrendszer területén (KIR) specifikus neuroszekréción sejtjei termelnek és szekretálnak. A Burbach által megfogalmazott általános definíció szerint „olyan, idegsejtek által termelt kisméretű peptidok, amelyek szabályozott szekréción útvonalon szabadulnak fel, és idegsejtekre gyakorolnak hatást.” Hormonhatásuk révén olyan fontos folyamatokat irányítanak, mint a központi és a perifériális idegrendszer fejlődése, az alapvető hormonok termelése, a szaporodás, a táplálkozás, a cirkadián ritmus és a viselkedés.

A neuropeptidok egyik legnagyobb csoportját az FMRF-amid rokon neuropeptidok (FaRPs) alkotják, melyek nevüket a Phe-Met-Arg-Phe szekvenciáról kapták, mely a peptid C-terminális részén található és nagyfokú konzerváltságot mutat. A FaRP neuropeptidok és receptoraik közé tartoznak az *Fmrf*, *Ms* és *Dsk* peptid gének, illetve az *FR*, *MsRI* és -2, valamint *Dsk-RI* és -2 receptorgének. Az *Fmrf* expresszióját a központi idegrendszer, a szív és a bélrendszer területén írták le, és hatással van az idegi működésre, a viselkedésre, a stresszválaszra, a táplálkozásra és a reprodukcióra. A DSK mioaktív hatásáról ismert. Az *Ms* a vizcerális izmokra hat, az expressziós mintázata alapján az agyban és bélrendszerben termelődik, ezért nevezték el agy-bél peptidnek.

Az elmúlt évtizedek során a FaRP neuropeptidok biokémiai azonosítása már megtörtént, részletes funkcionális és genetikai vizsgálatok azonban még várat magára. A magasabbrendűek körében a muslica genetikai rendszere a legismertebb, ami jelentős előnyöket biztosít a FMRFa-rokon neuropeptidok genetikai vizsgálatában is.

2. Célkitűzések

Munkám célja, hogy tanulmányozzam a FaRP neuropeptideknek (Fmrf, Ms és Dsk peptidek), valamint receptoraiknak (FR, MsR1 és -2, Dsk-R1 és -2 receptorok) a *Drosophila melanogaster* életfolyamataiban betöltött szerepét.

A cél érdekében a muslica genetika és molekuláris biológia eszköztárából három kísérleti megközelítést vettem tervbe: géncsendesítés kettős szálú RNS segítségével, intragénikus deléciós mutánsok létrehozása P-elem remobilizálással, valamint specifikus peptid termelő neuronok ablációja.

1. A **géncsendesítéses** kísérletekben a FaRP neuropeptid gének és receptoraik törzsközpontokban rendelkezésre álló RNSi konstrukcióinak fenotípusos hatását kívántam vizsgálni.
2. Mivel a géncsendesítés hatása részleges funkcióvesztésnek megfelelő gyenge, hipomorf fenotípust eredményez, ezért **intragénikus deléciók izolálását** is terveztem P-elem inszerciók remobilizálásával, a fenotípus megerősítésére, illetve a géncsendesítés esetleges „off target” hatásainak kiszűrése érdekében.
3. Célul tűztem ki **új Fmrf neuron-specifikus Gal4 driverek** létrehozását is, melyek segítségével az Fmrf-termelő neuronok ablációját, valamint az Fmrf expressziós mintázat tanulmányozását terveztem.
4. A **FaRP neuropeptidek viselkedésre gyakorolt hatását** stresszindukált viselkedési tesztben terveztem vizsgálni egyrészt a géncsendesítésből származó, másrészt intragénikus deléciót ill. specifikus Fmrf-termelő neuronok ablációját hordozó adult állatokon.

3. Alkalmazott módszerek

1. Klasszikus *Drosophila* genetika
2. Géncsendesítés RNS interferencia segítségével
3. Mutánsok izolálása P-elem remobilizálással
4. RNS izolálás és QRT-PCR
5. Kromoszómális deléciók tesztelése PCR technikával
6. Rekombináns DNS technikák
7. Immunhisztokémiai festés
8. Konfokális mikroszkópia
9. Viselkedési vizsgálatok
 - a. Stressz-indukált viselkedési teszt
 - b. Negatív geotaxis teszt

4. Eredmények

4.1. Géncsendesítés RNS interferencia segítségével

A FaRP neuropeptid- és receptor-géneket a megfelelő RNSi transzgenek *Act5C-Gal4* driverrel indukált expressziójával csendesítettük. Eredményként az *Fmrf*, *Ms*, *MsR1*, *MsR2*, és *DskR1* géneknél letalitást tapasztaltunk. A többi gén esetében (*FR*, *Dsk*, és *DskR2*) a csendesítés nem befolyásolta az állatok életképességét és fertilitását. Az *Act5C-Gal4* driver minden szövetben/szervben állandóan működik, a neuropeptidek expressziója pedig főként a központi idegrendszerre (KIR) összpontosul, ezért következő lépésben az idegrendszer-specifikus *elav-Gal4* driverrel is csendesítettük a FaRP neuropeptid- és receptor-géneket. Ebben az esetben viszont minden kombináció életképes és fertilis állatokat eredményezett. QRT-PCR-rel ellenőrizve a géncsendesítés hatékonyságát bizonyos receptorok esetében csak kismértékű mRNS csökkenést tapasztaltunk. Feltételezhető tehát, hogy a letalitás oka a FaRP gének idegrendszeren kívüli, más szervekben történt globális csendesítése, és/vagy az un. „off-target” hatás volt.

4.2. Mutánsok izolálása P-elem remobilizálással

A FaRP neuropeptideket ill. receptoraikat kódoló génekben P-elem remobilizálásával intragénikus deléciókat indukáltunk. Mivel a géncsendesítés hatása a részleges funkcióvesztésnek megfelelő, úgynevezett hipomorf fenotípust eredményez, ezért P-elem inszerciók remobilizálásával előállított intragénikus deléciós mutánsokkal terveztük a géncsendesítéssel kapott fenotípust megerősíteni, illetve az esetleges „off target” hatásokat kiszűrni. A *Myosuppressin receptor 1 (MsR1, CG8985)* génjében 8 független intragénikus

delécióit izoláltunk, köztük két null-mutánst. Az *Fmrf* (CG23461) génben 2 delécióit sikerült izolálni, melyek közül a nagyobb kiterjedésű teljesen eltávolította a gén kódoló szakaszát. Minden homozigóta deléciós mutáns életképes és fertilis volt, vagyis az *Fmrf* és *MsRI* aktivitásának teljes hiánya sem befolyásolja az életképességet. Az *MsRI* és *Fmrf* deléciós mutánsok életképessége nehezen egyeztethető össze a *MsRI-RNSi*; *Act5-Gal4* és *Fmrf-RNSi*; *Act5-Gal4* csendesítő kombinációk letalításával. Ez ismét felveti a csendesítés során jelentkezett „off target” hatás lehetőségét: az *Fmrf* gén esetében pl. a *Tango1* (*Transport and Golgi organization 1*) és a *wit* (*wishful thinking*) gének a lehetséges off-target jelöltek. Utóbbiról ismert, hogy *Drosophilában* részt vesz az *Fmrf* expresszió szabályozásában is.

4.3. Új *Fmrf*-*Gal4* driverek létrehozása

Benveniste és Taghert leírták az *Fmrf* gén 5' upstream és intronikus szekvencia-darabjainak szabályozó hatását a gén központi idegrendszerben történő kifejeződésére. Az általuk tanulmányozott szekvenciák közül hármat választottunk ki (pWF-8, -11, -17), melyek kisszámú, jól meghatározott neuronokban adtak jelet. Ezen szekvenciákat felhasználva létrehoztunk három új neuron-specifikus drivert (*RS8*-, *RS 11*-és *RS17-Gal4*), amiknek az *UAS-GFP* transzgén segítségével jellemeztük a központi idegrendszerben történő és az azon kívüli kifejeződési mintázatát. Új eredményként a lárvális agykomplexben eddig le nem írt *Fmrf* pozitív neuronokat mutattunk ki, illetve a KIR-en kívül eső expressziót találtunk a középbél enteroendokrin sejtjeiben és az imágókorongokban. Az apoptózist indukáló *UAS-reaper* transzgént az új driverekkel kifejeztetve elimináltuk a megfelelő neuronokat és az egyéb enteroendokrin sejteket. Az *RS11* és *-17* esetében az abláció nem csökkentette az adult állatok életképességét és fertilitását. Az *RS8*-at hordozó állatok nagy

része viszont farát adult állapotban elpusztult, illetve a túlélők egy része szárnyfejlődési zavarokat és torzulásokat mutatott, ami összefügghet az *RS8* fent említett szárny imágó-korongbeli expressziójával.

4.4. Viselkedési vizsgálatok

4.4.1 FaRP peptidek és receptorok hiányának hatása a stressz-indukálta viselkedésre

Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy az FMRF-amid neuropeptideknek fontos szerepük lehet az izomműködés, a mozgás és a viselkedés szabályozásában. Ezért stressz indukált viselkedési tesztben vizsgáltunk meg olyan állatokat, amelyekben RNSi transzgénnel csendesítettük a FaRP géneket és/vagy receptorokat. A csendesítések általában csökkentették a stressz által kiváltott mozgási reakciót. A legalacsonyabb stresszválaszt az *Ms* és *Ms*-receptor gének, ill. a *Dsk* és receptorának csendesítésénél tapasztaltuk. Az azonos géneket csendesítő különböző kombinációk stresszválasz fenotípusa között kisebb-nagyobb különbségek mutatkoztak, akár nemtől függően is. Miután az általunk használt harmadik kromozómára inszertálódott RNSi konstrukciók a VDRC 'GD' sorozatba tartoztak, amelyek véletlenszerű helyre épültek be, ezért valószínűsíthető, hogy a fent említett fenotípusos eltérésekért a 'GD' konstrukciók eltérő kromozómális környezetéből adódó pozíció effektus a felelős. Összességében megállapíthatjuk, hogy a FaRP neuropeptid- és receptorgének RNSi csendesítése –a vizsgált kombinációk esetében – befolyásolja a mozgási aktivitást, és hatással van az állatok stressz-indukált viselkedésére.

4.4.2 Fmrf-specifikus idegsejtek ablációjának hatása az állatok viselkedésére

Ezek után megvizsgáltuk azoknak az állatoknak a stressz indukált viselkedését is, amelyekben az Fmrf peptid-termelő sejteket az *RS8-Gal4*, *RS11-Gal4*, *RS17-Gal4* és *Fmrf-Gal4* driverek expressziós mintázatának megfelelően ejtettük ki az apoptózist indukáló *UAS-reaper* konstrukció meghajtásával. Az *RS8-Gal4* és *RS17-Gal4* driverekkel végzett abláció eredményeként a nőstények alacsonyabb mozgási aktivitást mutattak, mint a megfelelő kontrolljaik, miközben az *RS11-Gal4* és *Fmrf-Gal4* driverek által irányított ablációnak nem volt ilyen hatása. A géncsendesített állatok mozgás-aktivitásában tapasztaltakhoz hasonlóan az ablációt szenvedett állatoknál is megfigyelhettünk különbségeket a nőstények és hímek viselkedése között. Az *RS8-Gal4* driver esetében a hímek, a nőstényekkel ellentétben, nem mutattak szignifikáns stressz-indukált mozgás-aktivitási fenotípust. Hasonlóképpen, az *RS17-Gal4* driveres abláció is gyengébb fenotípust eredményezett hímekben, mint nőstényekben, habár ebben az esetben a kontroll állatokhoz viszonyított különbség még mindig szignifikáns volt. Az *RS11-Gal4* és *Fmrf-Gal4* driveres hímek, a nőstényekhez hasonlóan, nem mutattak fenotípust. Az *Fmrf-Gal4* drivert hordozó állatok fenotípusának hiánya mindenképpen meglepő volt, hiszen ebben az esetben az összes olyan sejt ablációjára sor került, ami a teljes Fmrf peptid-termelő mintázatban megtalálható, így elméletileg ettől a konstrukttól volt várható a legerősebb fenotípus. Egyik lehetséges magyarázata lehet ennek az ellentmondásnak, ha feltételezzük, hogy a különböző Fmrf peptideket termelő sejtek egyfajta funkcionális egyensúlyt alakítanak ki egymással. Amennyiben a teljes mintázat kiesik az abláció következtében, a hiányok mintegy kiegyenlítik egymás hatását, és az egyensúly továbbra is megmarad. Ha viszont a mintázatból csak bizonyos sejtek esnek ki, mint pl. a nőstényeknél az *RS8-Gal4* és *RS17-Gal4* driverek esetében, akkor az egyensúly

megbomlik, ami a megfigyelt stressz-indukált mozgás-aktivitási fenotípushoz vezet.

A legerősebb fenotípust adó *RS8-Gal4* driveres nőstényeket megvizsgáltuk negatív geotaxis tesztben is, de nem figyeltünk meg lényeges eltérést a kontroll állatokhoz képest. Ez az eredmény azt valószínűsíti, hogy a negatív geotaxis és a stressz-indukált mozgási aktivitás szabályozása eltérő módon történik az állatokban.

5. Összefoglalás

A dolgozatomban bemutatott eredmények összefoglalásaképpen megállapíthatjuk, hogy a FaRP neuropeptid- és receptorgének expressziója nem korlátozódik a központi idegrendszerre, illetve ezen gének funkcióvesztése, vagy bizonyos *Fmrf*-termelő sejtek kiesése hatással van a stresszindukált viselkedésre és a mozgási aktivitásra.

6. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

B. Kiss, T. Szlanka, Z. Agnes, Ž. Michal, S. Michal, K. Štefan, R. Beáta, H. Zoltán, L. Tamás, P. László, F. Adrien, and K. István, “Selective elimination/RNAi silencing of FMRF-related peptides and their receptors decreases the locomotor activity in *Drosophila melanogaster*,” *GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY*, vol. 191, pp. 137–145, 2013.
IF: 2,674

Egyéb közlemények:

K. Krizsán, É. Almási, Z. Merényi, N. Sahu, M. Virágh, T. Kószó, S. Mondo, **B. Kiss**, B. Bálint, U. Kües, K. Barry, J. Cseklye, B. Hegedüs, B. Henrissat, J. Johnson, A. Lipzen, R. A. Ohm, I. Nagy, J. Pangilinan, J. Yan, Y. Xiong, I. V. Grigoriev, D. S. Hibbett, and L. G. Nagy, “Transcriptomic atlas of mushroom development reveals conserved genes behind complex multicellularity in fungi.,” *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 116, no. 15, pp. 7409–7418, 2019.
IF: 9,504

T. Varga, K. Krizsán, C. Földi, B. Dima, M. Sánchez-García, S. Sánchez-Ramírez, G. J. Szöllösi, J. G. Szarkándi, V. Papp, L. Albert, W. Andreopoulos, C. Angelini, V. Antonín, K. W. Barry, N. L. Bougher, P. Buchanan, B. Buyck, V. Bense, P. Catcheside, M. Chovatia, J. Cooper, W. Dämon, D. Desjardin, P. Finy, J. Geml, S. Haridas, K. Hughes, A. Justo, D. Karasiński, I. Kautmanova, **B. Kiss**, S. Kocsubé, et al, “Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution.,” *NATURE ECOLOGY & EVOLUTION*, vol. 3, pp. 668–678, 2019.

G. Sipos, A. N. Prasanna, M. C. Walter, E. O’Connor, B. Bálint, K. Krizsán, **B. Kiss**, J. Hess, T. Varga, J. Slot, R. Riley, B. Bóka, D. Rigling, K. Barry, J. Lee, S. Mihaltcheva, K. LaButti, A. Lipzen, R. Waldron, N. M. Moloney, C. Sperisen, L. Kredics, C. Vágvolgyi, A. Patrignani, D. Fitzpatrick, I. Nagy, S. Doyle, J. B. Anderson, I. V. Grigoriev, U. Güldener, M. Münsterkötter, and L. G. Nagy, “Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi *Armillaria*,” *NATURE ECOLOGY & EVOLUTION*, vol. 2017, no. 1, pp. 1931–1941, 2017.

M. Kiss, I. Kelemen-Valkony, A. Kiss, **B. Kiss**, K. Csiszár, M. Mink, “Muscle dystrophy is triggered by type IV collagen alleles affecting integrin binding sites directly or indirectly in *Drosophila*,” *ACTA BIOCHIMICA POLONICA*, vol. 59, no. Suppl. 1., pp. 26–26, 2012.

Összesített IF: 12,178