

# Doktori értekezés tézisei

A feszültség-függő Shal/Kv4 ioncsatorna szerepe a *D.melanogaster* élethosszában, motoros aktivitásában, tanulásában és memóriájában

Girma Waro Biru

Témavezető: Komonyi Orbán, PhD

Konzultáns: Susan Tsunoda, PhD

Colorado State University, Department of Neuroscience

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Genetika Tanszék

Biologia Doktori Iskola

Szeged, 2013

## Bevezetés

Az emberhez hasonló élőlények sok millió sejtből állnak. A sejteket membrán veszi körül, ami fizikailag egybetartja a sejt alkotóit. A membrán a sejt számára ideális körülményeket biztosít a szerkezet fennmaradásához, és a külső környezethez való alkalmazkodáshoz. A sejt optimális belső környezetének fenntartásához elektromosan töltött molekuláknak kell távozni és bejutni speciális nyílásokon és ioncsatornákon keresztül.

Az ioncsatornákat membránon átívelő pórusképző fehérjék alkotják. Az ioncsatornák között a feszültségfüggő  $K^+$  ion csatornák a leggyakoribbak és legsokfélebbek. Az emlősökben, a két alcsaládra bontható a  $K^+$  ioncsatornákat több mint 60 különböző gén kódolja. Az A-típusú  $K^+$  ioncsatorna alcsaládot például az egér látókérgében sok gén kódolja. A *Drosophilának* négy  $K^+$  csatorna alcsaládjá van. Ezek közül két alcsalád kódol A-típusú csatornát.

Az idegsejtekben az A-típusú csatornák az ismétlődő tüzelés frekvenciájában játszanak szerepet. A szívben az akciós potenciál gyors vagy korai fázisának repolarizációjában játszanak szerepet és megszabják a szív akciós potenciál amplitudóját és hosszát. Feltehetőleg szerepet játszanak a ritmikus viselkedésekben, mint a helyváltoztatás, élethossz és szinaptikus plaszticitás, olyan mechanizmusokban, amelyek mögött a hosszan tartó potenciáció (LTP) húzódik meg. Mivel a *Drosophila* motorosneuronjai és

hozzájuk tartozó izmokhoz vezető nyúlványaik, és ezek tanuló és memória központjai az agyban (gombatest), és ezek input és output neuronjai jól ismertek, ez jó modell szervezet, hogy tisztázzuk a tranziens A-típusú csatornák szerepét a muslica ritmikus viselkedéseiben, mint a helyváltoztatás, tisztálkodás, tanulás és memória.

### Célkitűzés

Vizsgálatunk célja hogy részletesen megismerjük (feltárjuk) az egyik a *Drosophilában* azonosított, Shal/Kv4-szerű neuron  $I_A$  áramot, az általunk előállított transzgénikus Shal/Kv4 törzs segítségével, amiben a csatorna pórus képző  $\alpha$ -alegység mutáns. Mivel ez a mutáns Shal/Kv4  $\alpha$ -alegység csak a Shal/Kv4 alcsalád  $\alpha$ -alegység tagjai  $\alpha$ -alegységeivel képez tetramert, domináns-negatív módon akadályozza meg a csatorna működését és ezért lehetővé teszi, hogy vizsgáljuk, hogyan befolyásolja az  $I_A$  hiánya a *Drosophila* viselkedését. Vizsgálatainkkal, azt reméljük, jobban megértjük a Shal/Kv4 ion csatorna szerepét a helyváltoztatásban, az élettartamban és a tanulás/memória folyamatokban.

## Módszerek és anyagok

### Domináns-negatív konstrukt (DNKv4) előállítás

Shal/Kv4 domináns negatív  $\alpha$ -alegység konstruktot a Shal2  $\alpha$ -alegység 362 helyzetű triptofán (W) aminosav fenilalaninre (F)-re cserélésével (W362F) állítottuk elő in vitro a Shal2  $\alpha$ -alegység cDNS-ében [GenScript, Inc, [Piscataway, NJ] és pUAST expressziós vektorba klónoztuk.

### Az inszert méret meghatározása

A DNKv4  $\alpha$ -alegység szakasz méretét a pUAST-DNKv4 plazmid EcoRI-HindIII restrikciós enzim emésztési terméke és a DNS létra sávok (1KB) összehasonlításával igazoltuk agaróz elektroforézist követően.

### Transzgénikus törzs előállítása

DNKv4 transzgénikus törzs előállításához a pUAST-DNKv4 vektort *p $\pi$  25.7wc* (wing clipped delta 2-3 transposase) segítő plazmiddal kevertük össze és dekarionizált  $w^{1118}; +; +$  (fehér szemű) *Drosophila* embriókba injektáltuk. A DNKv4 inszerciós helyét meghatároztuk, majd második és harmadik kromoszómás dupla balanszerrel balanszíroztuk a törzset.

### Fehérje extrakció és Western blot analízis

A DNKv4 fehérje tisztítása céljából transzgénikus legyek fejét gyűjtöttük és ultrahangoztuk 20  $\mu$ l 2X SDS minta pufferben. Anti-  $\alpha$ -HA.11 elsődleges és anti-egér IgG másodlagos

ellenanyagokkal használtunk a DNKv4 kifejeződési szint meghatározásához.

### **Embrió sejt immunfestés**

Szinkronizált, 5 óra korú egyetlen DNKv4 embriót sejtekre bontottuk és 20 µl Schneider táptalajban tartottuk körülbelül 7 napig 60% nedvességtartalmú tenyészedényben szobahőmérsékleten. A sejteket azután fixáltuk 4% PBS-ben oldott paraformaldehiddel, és anti  $\alpha$ -HA:11 elsődleges ellenanyaggal kezeltük éjszakán át 4 °C-on, mostuk 0,1% szaponint tartalmazó PBS-el, majd FITS- vagy rhodamin-konjugált másodlagos ellenanyaggal kezeltük és glicerinben fedtük le.

### **Embrió sejtenyészet elektrofiziológiához**

9-10 fejlődési állapotú egyetlen DNKv4 embrió belsejét vékony mikropipettával kiszívtuk és fedőlemezre cseppentettük, hogy Schneider *Drosophila* táptalajban szétterítettük. A sejteket 20 °C-on és 60% páratartalomban tartottuk 3-5 napig.

### **Élettartam vizsgálat adult legyeken**

Nyolcvan – száz frissen kikelt legyet gyűjtöttünk 25 °C-on növesztett tenyészetből, majd tízes csoportokra osztottuk. Minden 10 legyet tartalmazó csoportot minden ötödik napon új tenyészedénybe helyeztünk át, amíg az utolsó légy elpusztult. Sigma plot programcsomaggal állapítottuk meg az adult legyek közepes túlélési idejét.

### **Lárvák mozgásának értékelése**

A lárvák helyváltoztatása méréséhez, szobahőmérsékleten (21 °C) nevelt egyedi 3-ik stádiumú DNKv4 lárvákat 1% agaróz lemezre helyeztünk, amik alá a petricsésze aljára 0,5x0,5 cm négyzethálót ragasztottunk. Számoltuk, hogy a lárva 5 perc alatt hány négyzetet keresztez. A több lárva által keresztezett négyzetek számát átlagoltuk és az adatokat átalakítottuk percenként keresztezett négyzetek számára.

### **Lárva tanulási és memória teszt**

A memória és a tanulás vizsgálatára szoba hőmérsékleten nevelt, 3-ik stádiumú DNKv4 lárvákat 60 mm átmérőjű petricsészeiben asszociáltattuk a fruktóz (íz-érzés) és a OCT (AM-/OCT+) szagingert. Ugyanilyen genotípusú állatokkal asszociáltattuk a fruktóz és az AM (AM+/OCT-) szagingert. A tanulási index értéket, mint a reciprok módon tanított lárvák szaginger preferencia különbsége felét számoltuk ki [ $LI = \text{PREF (AM+/OCT-)} - \text{PREF (AM-/OCT+)}/2$ ].

### **Eredmények és következtetések**

Az átmenetileg gyors aktiváló és inaktiváló A-típusú ( $I_A$ ) áramot az akciós potenciál repolarizációjának tulajdonítják, ami az akciós potenciálhullámok közötti intervallumot szabályozza és az akció potenciálnak a dendritbe visszafele történő terjedésnek

korlátozásában játszik szerepet. Emlősökben az átmeneti külső  $I_A$  áram több  $K^+$  csatorna gén szabja meg. Az egér kérgi piramis sejtjeiben, például, három tranziens  $I_A$  -t három  $K^+$  csatorna gén,  $Kv1.4$ ,  $Kv4.2$  és  $Kv4.3$  kódolja. Az  $I_A$  áramok egyikének vagy mindegyikének drogokkal, toxinokkal, vagy genetikai eszközökkel végzett inaktiválása emlősökben más ion csatorna gének kifejeződését vagy hatását változtatja meg, vagy kompenzálja. Ezért a tranziens  $I_A$  áramok szerepének tisztázása nehéz. Az emlősökkel szemben a *Drosophilában* csak két gén okoz tranziens  $I_A$  áramot. Ezek egyike, a *Shal* ( $Kv4.2$ ) gén, *Shal/Kv4* áramot kódol az idegi szomatodendritikus területen, a másik, a *Shaker* ( $Kv1.4$ ) gén az axonokban és az izmokban felelős a *Shaker/Kv1* áramért.

Több mint húsz független transzgenikus törzset állítottunk elő, amik a *Shal/Kv4* domináns negatív  $\alpha$ -alegység transzmembrán fehérjét (DNKv4) fejezik ki. SDS-PAGE felhasználásával vizsgáltuk a DNKv4  $\alpha$ -alegység transzgenikus törzseket, 52 kD méretű fehérjeként azonosítottuk a DNKv4  $\alpha$ -alegység fehérjét, ami különböző mértékben fejeződik ki, és ami megfelel a *Shal/Kv4* fehérje méretének. Voltage-clamp elvezetéssel kimutattuk, hogy a *Shal/Kv4* domináns-negatív  $\alpha$ -alegység megszünteti az  $I_A$  áramot és a *Shal/Kv4* funkciót anélkül, hogy más ion csatorna funkciók, például a késői rektifikáló K ion csatorna, kompenzálódna, vagy megváltozna. A DNKv4  $\alpha$ -alegységgel járó endogén  $I_A$  áram

megszűnés ezért lehetővé teszi, hogy alaposan vizsgáljuk az idegsejtek tüzelési mintázatát és a repetitív viselkedéseket, pl. a lárvák mozgását, az adult legyek falra mászását, az élettartamot és egy ezeknél bonyolultabb lárvaviselkedést, a szag-asszociált tanulást. Ezekben a transzgéniikus törzsekben vizsgáltuk a DNKv4  $\alpha$ -alegység sejten belüli lokalizációját a sejt testben és a puncta-ban neurális folyamatok során embrionális neuronok HA immunfestésével (HA-DNKv4). A DNKv4 csatornát hordozó állatok a gyenge Shaker<sup>[ks133]</sup> mutáns törzshöz hasonló anesztézia-függő láb-és testreszketés fenotípust (hiperexitabilitást) mutatnak. A DNKv4 törzsek élethosszát a kontrollénál rövidebbnek találtuk; azonban az életciklusuk hosszában nem találtunk változást, ami azt sugallja, hogy a *Kv4/Shal* a *Drosophila* élettartamában játszik szerepet. A DNKv4 törzsek rendellenességeket mutattak a lárvák mászásában, az adult legyek mozgásában és tisztálkodásában és a lárvák szaglász-asszociált tanulásában. Lárva és adult helyváltoztatás tesztekkel kimutattuk, hogy a DNKv4 állatok mind a lárva mind az adult tesztekben rosszabbul teljesítenek a mászási sebességben, a fal mászásban a kontroll törzsekhez képest. Az adult DNKv4 legyek tisztálkodási viselkedése hatékonysága alacsony.

A lárvák szaglással-kapcsolatos tesztjeiben először megállapítottuk, hogy a DNKv4-nek nincs befolyása a DNKv4 legyek szag érzékelésére, azaz, az hasonló a vad típusú lárvákéhoz, a



DNKv4 lárvák képesek voltak megkülönböztetni a két használt feltételt (jobban kedvelik a fruktózt az agaróznál). Ugyancsak igazoltuk, hogy nem mutatnak preferenciát a semleges illatokra (amilacetát és oktanol). A tanulási tesztben azonban a DNKv4 lárvák nem tudták összekapcsolni az íz (fruktóz) és a szagingert (amilacetát vagy oktanol), ami arra utal, hogy *Shal/Kv4* szerepet játszik a tanulásban és a memóriában.

DNKv4 neuronok elnyúlt akciós potenciált mutatnak, kisebb (after)hiperpolarizációt, az első tüzelésig rövidebb látenciát, az ismételt tüzelésben hibákat amiket gyorsan adaptálnak (Ping and Waro et al, 2011). A viselkedési fenotípusok összhangban vannak a tapasztalt ismételt tüzelés hiánnyal, és érthetőbbé teszik  $I_A/Kv4$  jelentőségét.

A tézis a szerző az alábbi közleményben bemutatott kutatási eredményein alapszik:

\*Ping, Y., \*Waro, G., Licursi, A., Smith, S., Vo-Ba, D. A., & Tsunoda, S. (2011). *Shal/Kv4* channels are required for maintaining excitability during repetitive firing and normal locomotion. *PLoS One*. Vol.6.

\* These authors contributed equally to this work.

**Közlemények**

1. Ping, Y., Waro, G., Licursi, A., Smith, S., Vo-Ba, D. A., & Tsunoda, S. (2011). Shal/Kv4 channels are required for maintaining excitability during repetitive firing and normal locomotion. *PLoS One*. Vol.6. Impact factor = 4.092.
2. Diao, F., Chaufy, J., Waro, G., Tsunoda, S. (2010). SIDL Interacts with the Dendritic Targeting Motif of Shal (Kv4) K<sup>+</sup> channels in Drosophila. *Molecular and Cellular Neuroscience* 45, (2010). Impact factor = 3.861.
3. Diao, F., Waro, G., Tsunoda, S. (2009). Fast inactivation of Shal (Kv4) K<sup>+</sup> channels is regulated by the novel interactor SKIP3 in Drosophila neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 42 (2009). Impact factor = 3.569.
4. Sanxaridis, P. D., Cronin, M. A., Rawat, S. S., Waro, G., Acharya, U. & Tsunoda, S. (2007). Light-induced recruitment of INAD-Signaling complexes to Detergent-Resistant Lipid Rafts in Drosophila Photoreceptors. *Molecular and Cellular Neuroscience* 36 (2007). Impact factor = 3.994.
5. Molnar, J., Ujfaludi, Zs., Fong, S.F.T., Bollinger, J.A., Waro, G., Fogelgren, B., Dooley, D. M., Mink, M., Csiszar, K. (2005). Drosophila lysyl oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 are differentially expressed and the active DmLOXL-1 influences gene expression and development. *Journal of Biological Chemistry* V. 280 (2005). Impact factor = 5.854.

**Konferencia szereplések:**

1. Ping, Y., Waro, G., Licursi, A., Smith, S., Vo-Ba, D. A., & Tsunoda, S (2010). Kv4 is essential for maintaining excitability during repetitive firing of *Drosophila* neurons and normal locomotion. [*Annual Meetings/Society of Neuroscience, 2010*].
2. Ping, Y., Waro, G., Licursi, A., Smith, S., Vo-Ba, D. A., & Tsunoda, S (2010). Shal/Kv4 channels are required for maintaining excitability during repetitive firing and normal locomotion and grooming in *Drosophila*. [*Colorado State University, Fort Collins, CO/ Front Range Neuroscience Group, 2010*].
3. Diao, F., Chaufy, J., Waro, G., Tsunoda, S. L. (2007). (Boston Univ., Boston, MA) SIDLS and SKIP, two newly identified proteins required for the trafficking and localization of Shal (Kv4) channels in *Drosophila* neurons. [*Annual Meetings/Society of Neuroscience, 2007*].
4. Chaufy, J., Diao, F., Waro, G., Tsunoda, S. L. (2008). (Boston Univ., Boston, MA). Dendritic localization of Shal (Kv4) K<sup>+</sup> channels is mediated by the novel interactor SIDL. [*Annual Meetings/Society of Neuroscience, 2008*].