

37. OTDK Biológia Szekció

Szezon hatása a génexpresszióra nagyfejű csajkókban (*Lethrus apterus*)

Készítette: **Kozma Ferenc Sándor**

Biológia MSc hallgató (évf.: 2)

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék

Témavezető: **Dr. Nagy Nikoletta Andrea**

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	3
I.1. Megküzdési stratégiák az állatvilágban	3
I.2. A génexpressziós mintázatok jelentősége az állatok válaszreakcióiban és viselkedésük megértésében	6
I.3. A génexpressziós mintázatok feltérképezésének lehetősége a differenciális expressziós analízisek segítségével	8
I.4. Az idősor analízisek jelentősége a génexpressziós mintázatok feltérképezésében	8
I.5. A nagyfejű csajkó, mint erős szezonalitást mutató faj, mely differenciált ivari szerepekkel bír.....	10
II. Célkitűzések.....	11
III. Anyag és módszertan.....	12
III.1. Mintagyűjtés	12
III.2. RNS kivonás és szekvenálás	12
III.3. Transzkriptom összeszerelés és annotáció	12
III.4. Statisztikai elemzés	13
III.4.1. Bemeneti fájlok	14
III.4.2. Adathalmazok elkészítése	14
III.4.3. Differenciálisan expresszáldott gének meghatározása	14
III.4.4. Az ivarok differenciálisan expresszáldott génkészletének összehasonlítása.....	15
III.4.5. Génexpressziós mintázatok vizualizációja	15
III.4.6. Géndúsulási vizsgálat	15
IV. Eredmények	17
IV.1. DGE analízis.....	17
IV.2. Génexpressziós mintázatok	17
IV.3. Géndúsulások.....	18
V. Diskusszió	25
VI. Összefoglalás	30
VII. Köszönetnyilvánítás.....	31
VIII. Irodalomjegyzék.....	32

I. Bevezetés

Környezetünk folyamatos változása lehetőségek és kihívások folytonos és rendezett megjelenését eredményezi, ami kiváló táptalaja az élet sokszínűségét fokozatosan kitermelő evolúciós folyamatoknak. Ezek a periodikus környezeti változások a mérsékelt égövben és az egyenlítő mentén is ugyanúgy fellelhetők. Az éves ciklusokhoz történő alkalmazkodás tehát igen fontos és széles körben elterjedt az élőlények között (Battey 2000).

I.1. Megküzdési stratégiák az állatvilágban

A szezonális változásokhoz való alkalmazkodás során az állatok eltérő stratégiákat követhetnek, amelyek segítségével az adott startégiát alkalmazó egyedek maximalizálhatják fitneszüket (Stearns 2000; Varpe 2017). Ilyen módon tehát az eltérő fajok (vagy akár fajon belüli populációk) eltérő stratégiai evolúciósan rögzülhetnek (Varpe 2017; McNamara és Houston 2007; Reppert és De Roode 2018). Ezek a stratégiák bizonyos mértékben plasztikusak, vagyis az egyedek képesek finomhangolni a viselkedés megkezdésének idejét, annak hosszát, vagy éppen a viselkedéses reakció erősségét és az abba fektetett energiát. Ezen felül a stratégiák sok esetben egymástól nem függetleníthető viselkedések, kizárhatják egymást (mint a vonulás és a dormancia), vagy csereviszony ("trade-off") is kialakulhat köztük (Varpe 2017; McNamara és Houston 2007).

A legnagyobb kihívások egyike, a környezet szélsőséges szezonális megváltozása (száraz évszak, tél). Ehhez a kihíváshoz is eltérő stratégiákkal viszonyulnak a különböző fajok. A vándorlás során egy faj egyedei környezetüket változtatják meg oly módon, hogy egy kedvezőtlené vált környezetből egy aktuálisan (az éves ciklusnak ebben az időszakában) kedvezőbb környezetbe vándorolnak, ahol kivárik a kedvezőtlen időszak végét (Somveille, Rodrigues, és Manica 2015; Winger és mtsai. 2019; Reppert és De Roode 2018; Dufour és mtsai. 2020).

A madarak észak–déli irányú vándorlása talán a legismertebb példa a vándorlás jelenségére. Abban, hogy ezt a vándorlást a fészkelési időszakban meglévő kompetíció elkerülése végett a délről történő fokozatos kolonizáció, vagy az északon élő fajok a hidegebb és élelemben is szegény téli hónapok alatti délre húzódása alakította ki, mai napig nincs teljes konszenzus (Somveille, Rodrigues, és Manica 2015; Winger és mtsai. 2019; Dufour és mtsai. 2020). Az viszont látható, hogy a komplex viselkedésnek mindenképpen mozgatórugója a

szezonális változás, amit jól mutat az enyhébb telek révén vonulásukat lerövidítő vagy kihagyó egyedek megjelenése (Van Doren és mtsai. 2021). Hasonló észak–déli irányú vonulást ismerünk rovarok esetében is. A pompás királylepke (*Danaus plexippus*) egyedei mintegy 4800 kilométert tesznek meg a Nagy-tavaktól egészen mexikói telelőhelyükig, hogy elkerüljék a hideg téli hónapokat, viszont hozzájussanak a nyáron bőséges forrásokhoz (Reppert és De Roode 2018). A pompás királylepke különösen figyelemre méltó faj, ugyanis nem minden populációjában van jelen ez a vándorlás. A faj eredendően Észak-Amerikában élhetett, ahonnan egyedek eljuthattak Hawaii, Új-Zéland, Ausztrália, Dél-Amerika és a mai Spanyolország területére. Az ezeken a helyeken élő populációk nem vonulnak, ez a jelenség kizárólag Észak-Amerikában figyelhető meg (Reppert és De Roode 2018). A faj tehát jó példa arra, hogy a szezonális környezeti változásokra kifejlesztett stratégiák nem csak fajok, de populációk között is jelentősen eltérhetnek.

Vannak azonban olyan fajok, akik a vándorlás helyett viselkedésük szélsőséges változtatásával alkalmazkodnak a kedvezőtlené váló környezethez. Ez történik dormancia során, mikor az egyed lelassítja anyagcsere folyamatait és nyugalomba helyezi szervezetét (Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). Az északi féltekén leggyakrabban a dormanciával az egyedek a téli hónapok zord körülményeit igyekeznek elkerülni, de ismert több eset, mikor a szárazabb nyári időszakot (is) így vészelik át. A dormancia az állatvilágban igen elterjedt, feltételezhetően a különböző taxonokban többször, függetlenül jelent meg az evolúciós történet során (Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). A tüskésbőrűek (Echinodermata) jelenleg az állatvilág egyetlen törzse, amelyben még nem mutatták ki ezt a jelenséget (Hand 1991). Annak ellenére, hogy a dormancia az evolúció során többször függetlenül alakulhatott ki, a viselkedéshez szükséges génexpressziós és metabolikus folyamatok mégis jelentős egyezést mutatnak taxonok között is (Hand és mtsai. 2016; Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). A dormanciának alapvetően két kategóriáját különböztetjük meg, azonban ezek a kategóriapárok eltérőek a különböző rendszertani csoportokban. Míg a madarak és emlősök esetében hibernáció- és napi torpor-, addig a rovaroknál diapauza- és kvieszcencia típusú dormanciát különböztetünk meg (Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). A hibernáció és napi torpor között elsősorban a dormans állapot hosszában és az anyagcsere lassulás mértékében van különbség. Ezzel szemben a diapauza és a kvieszcencia leginkább a dormanciát kiváltó szignálokban tér el (Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). A kvieszcenciát egy adott környezeti tényező (pl.: hőmérséklet) váltja ki, és az állapotot az egyed a kedvezőtlen környezeti feltételek megszűnéséig tartja fenn. A diapauza esetében a folyamat sokkal inkább

genetikailag determinált, és az év bizonyos szakaszában jelentkezik (Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). Evolúciós szempontból tehát a kvieszcencia valószínűleg a kiszámíthatatlan, rendszertelen környezeti változásokhoz, míg a diapauza a szezonális környezeti változásokhoz történő alkalmazkodás eredménye. A diapauza és hibernáció jelenségét (mély, programozott dormancia) vizsgálva Észak-Amerikában az északi szélességi körök növekedésével nőtt a dormancia stratégiáját mutató fajok aránya. Ez alól csak a hegyvidéki területek voltak kivételek, ahol a tengerszint feletti magasság növekedése volt pozitív összefüggésben a dormanciára képes fajok arányával (Lehmann és mtsai. 2015; Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). Mindezekből következtethetünk arra, hogy a mély, programozott dormancia megjelenése és a szezonális erőssége (például hidegebb tél) között pozitív összefüggés található (Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021).

A szezonális előnyök kihasználására és hátrányainak mérséklésére eredményes stratégia lehet párzási időszak megléte is. A párzási időszakokkal rendelkező fajok többsége a tavaszi hónapokra időzíti azt, de vannak olyan fajok is, melyek ősszel szaporodnak. Hormonrendszerük összehangolásával tehát a faj egyedei nagyjából egyszerre szaporodhatnak a számukra valamilyen szempontból kedvező időszakban (Verhulst és Nilsson 2007; Vasantha 2016). A viselkedést gerinceseknél elsősorban a melatonin hormon eltérő jelenléte alakítja ki (Vasantha 2016; West és Wood 2018). Az év során a nappalok (megvilágított órák) hosszának változása eltérő melatonin termelést vált ki az agyalapi mirigyben. Attól függően, hogy az adott faj párzási időszaka tavaszra vagy őszi tehető, a sötét periódusban termelt melatonin gátló, vagy éppen serkentő hatást vált ki a hipotalamusz gonadotropin-felszabadító hormon ("gonadotropin-releasing hormone", GnRH) termelésére. A GnRH pedig serkenti az agyalapi mirigy folliculus-stimuláló hormon ("follicle-stimulating hormone", FSH) és a luteinizáló hormon ("luteinizing hormone", LH) termelését, mely hormonok a párzási és szaporodási időszak beindításához szükségesek (Vasantha 2016). Ízeltlábúaknál az aktív periódus (ami sok esetben egybefügg a szaporodási időszakkal) szabályozásáért egy belső ciklikus-éves ritmus ("circannual rhythm", CA ritmus) lehet a felelős (Nakanishi, Kaneda, és Nakamuta 2017; Miyazaki 2023). Bár ízeltlábúak esetében még kevésbé feltárt a jelenség, az tudható, hogy a nappalok hossza mellett a hőmérséklet és a páratartalom nagy szerepet játszanak a ciklus időzítésben. Míg a hőmérséklet inkább a mérsékeltövi fajoknál játszik nagyobb szerepet, addig az egyenlítőhöz közeledve hangsúlyosabbá válik a páratartalom és az esőzés (Wolda 1988; Nakanishi, Kaneda, és Nakamuta 2017). A pusztító múzeumbogár (*Anthrenus verbasci*) esetében azt találták, hogy az egyedek CA ritmusára a hőmérséklet és a nappalok hossza volt

hatással. Ezen felül sok hasonlóságot találtak a CA és cirkadián ritmus mechanizmusai között. Kiemelték azt is, hogy egyelőre keveset tudunk az ízeltlábúak éves ciklusáról, de feltételezhető, hogy más fajoknál is hasonló CA ritmus szabályozza az egyedek szezonális viselkedését (Miyazaki 2023).

Egy másik fontos stratégia, az utódgondozás időzítése. Az utódok rendelkezhetnek egy optimális nevelkedési időszakkal, mely után a kedvezőtlen időjárás, vagy a predáció csökkenti a túlélésüket (Verhulst és Nilsson 2007; Öberg és mtsai. 2014). Ilyen módon csereviszony alakulhat ki a gondozó szülők és a gondozott utódok között azáltal, hogy az optimális időszak előtt a szülők is nehezebben tudnak felkészülni párzási és utódgondozási időszakra (Verhulst és Nilsson 2007; Öberg és mtsai. 2014). Vannak persze olyan fajok is, melyek nem gondozzák utódaikat, ellenben ezek a fajok is igazíthatják párzási időszakukat az utódok túlélési esélyeinek optimalizálásához (P. J. Wright és Trippel 2009).

Az élőlények tehát különböző stratégiákat alkalmaznak, hogy megküzdjenek a környezet szezonális változásaival. Azt is láthatjuk, hogy ezek a stratégiák plasztikusak, egyedenként eltérhetnek, így a populáció egésze jobban képes alkalmazkodni az éves ciklusok kisebb-nagyobb eltéréseihez (hidegebb tavasz, rövidebb tél). Az eddig leírtak azt is jól mutatják, hogy ezen folyamatok szabályozásában és finomhangolásában kiemelt szerepe van a hormonális szabályozásnak.

I.2. A génexpressziós mintázatok jelentősége az állatok válaszreakcióiban és viselkedésük megértésében

A fehérje és peptid hormonokat gének kódolják, így termelődésük a gének expressziós szintjének változtatásával befolyásolható. A gének eltérő kifejeződése tehát lehetővé teszi az élőlények számára, hogy alkalmazkodjanak többek között a környezet szezonális változáshoz is. A génexpresszió alapvetően a vizsgált gén kifejeződését jelenti, tehát elsősorban a génről átíródott mRNS kópiák számát (Brazma és Vilo 2000). Ennek oka, hogy a képződött fehérjék vizsgálata technológiailag sokkal nehezebben kivitelezhető, ezért a legtöbb esetben az átíródott mRNS-ek szintjét vizsgálják. Az ilyen vizsgálatok eredményei csak limitált következtetések levonására adnak lehetőséget, mivel a képződő működőképes fehérjék és az mRNS-ek aránya közötti kapcsolat nem egyértelmű (Brazma és Vilo 2000). Ezzel együtt a génexpressziós vizsgálatok kiváló lehetőséget biztosítanak arra, hogy jobban megértsük és feltérképezzük az élőlények viselkedéseinek szabályozását. A párzási időszakokkal és a dormanciával

kapcsolatosan is születtek génexpressziós tanulmányok, melyeknek eredményei nagyban hozzájárultak a háttér mechanizmusok pontosabb megértéséhez.

A párzási időszak alatt madarak esetében fontos jelenség az éneklés. Korábban kimutatták, hogy a párzási időszakra bizonyos agyterületek mérhetően megnövekednek, amik az éneklésben segítik az egyedet (Schwartz és Andrews 2013). A párzási időszakot követően ezek az agyterületek le is épülnek, hiszen fenntartásuk költségesebb, mint később újból megnöveszteni őket. A folyamat génexpressziós hátterének vizsgálata során kiderült, hogy a hosszú nappalok kezdetekor több olyan génnek is megemelkedett az expressziója, amelyek az agysejtek átszerveződését és képződését teszik lehetővé. A hatás csupán a hosszú nappalok beállta utáni 2 hétben volt kimutatható, ezt követően a hosszú nappalok ellenére sem volt emelkedett expressziós szintje a szükséges géneknek, akárcsak az év többi szakában (Schwartz és Andrews 2013). Összefoglalva, a génexpressziós mintázat változása az agyterület megnövelésén keresztül képes közvetve fokozni egy adott időszakban az egyedek performanciáját.

A dormancia szabályozásában is jelentős szerepet tölt be a génexpressziós mintázat változása (MacRae 2010). A Magyarországon is elterjedt dalos szúnyognál (*Culex pipines*) az sHSP és Hsp70 fehérjéket kódoló gének kismértékű emelkedett expresszióját tapasztalták (Robich és mtsai. 2007). Ezek a hősokkfehérjék a fehérjék fel- és letekeredését segítik és a sejtek stressz tűrését növelik (Füst, Prohászka, és Cervenak 2003). Ebből következik, hogy a dormans állapot során az egyed sejtjeinek megnövekedő AMP/ATP arányának és a lassuló vagy visszaforduló metabolikus folyamatoknak drasztikus hatását csökkenthetik az említett hősokkfehérjék (Füst, Prohászka, és Cervenak 2003; MacRae 2010). Jelentősebb emelkedést találtak azonban az antioxidáns szelén-proteint kódoló gén expressziójában, ami szintén a sejtek stresszválaszában kap kiemelt szerepet és fontos tulajdonsága, hogy képes befolyásolni a lipidek peroxidációját (Robich és mtsai. 2007). Ezek az eredmények arra világítottak rá, hogy a dormancia ideje alatt kiemelten fontos a redox állapot kontrollja a sejtekben (Robich és mtsai. 2007; MacRae 2010).

Láthatjuk tehát, hogy a génexpressziós mintázatok megmagyarázhatnak ismert szabályozási folyamatokat, vagy irányt mutathatnak a kutatók számára eddig ismeretlen szabályozási folyamatok felfedéséhez. Ehhez viszont, ezeket a mintázatokat valamilyen megközelítés szerint fel kell tárni.

I.3. A génexpressziós mintázatok feltérképezésének lehetősége a differenciális expressziós analízisek segítségével

Egy nagyon gyakran használt módszer a génexpressziós mintázatok feltárására a differenciális génexpressziós (“differential gene expression”, DGE) analízis. A DGE analízisek lényege, hogy minták génexpressziós adatait összevetve meghatározzuk, mely gének kifejeződése volt magasabb (“up-regulated genes”, up-regulált gének) és melyeké alacsonyabb (“down-regulated genes”, down-regulált gének) az egyik mintában a másikhoz képest (Zhang és mtsai. 2014; McDermaid és mtsai. 2019). Érdemes megemlíteni, hogy a DGE analízisekben, ha egy gén az egyik mintában up-regulált, ugyanaz a gén a másik mintában down-regulált lesz. Az tehát, hogy egy gén egy vizsgált mintában up- vagy down-regulált nagymértékben viszonyítás kérdése, ezért különösen fontos az összehasonlítani kívánt minták megfelelő kiválasztása (Zhang és mtsai. 2014).

A DGE analízisek leggyakoribb esetben két minta génexpresszióját vetik össze. Ez lehet valójában egyetlen csoport két külön időpontban (kezelés előtt/után), vagy két eltérő körülményű csoport (kontroll/kezelt) egy időpontban vett mintájának összehasonlítása (Rapaport és mtsai. 2013; McDermaid és mtsai. 2019). Összességében elmondható, hogy a DGE analízisek sokrétűen alkalmazhatóak és alkalmasak lehetnek többek között az egyedek viselkedésnek szabályozását befolyásoló háttérmechanizmusok behatóbb tanulmányozására.

I.4. Az idősor analízisek jelentősége a génexpressziós mintázatok feltérképezésében

A kétmintás DGE megközelítés előnye, hogy egyértelmű, letisztult és könnyen átlátható kapcsolatokat ír le. Ezzel szemben a levonható következtetések meglehetősen limitáltak és fennáll az esélye, hogy a “pillanatkép”, amelyet az adott minták génexpressziójáról kapunk eltér a szervezetben zajló általános tendenciáktól (Bar-Joseph, Gitter, és Simon 2012; Spies és Ciaudo 2015). Például, ha egy kezelés hatását vizsgáljuk egy csoportra, melyből a kezelés előtt és után is mintát vettünk, valószínű, hogy a génexpressziós mintázat a kezelést követő időszak alatt folyamatában változik, van egy csúcspontja és egy lecsengése is. Látható tehát, hogy milyen limitációi lehetnek annak, ha egyetlen mintát kívánunk venni a kezelés után.

Az előbbi limitációk fényében van lehetőség egy eltérő megközelítésre, mely során több eltérő időpont génexpressziós állapotából állítjuk fel a génexpressziós mintázatot. Ehhez a feladathoz dolgozták ki a DGE analízis egy specifikált megközelítését az idősor (“time-course”,

TC) analízist (Spies és Ciaudo 2015; Spies és mtsai. 2019). A TC analízishez több eszköz is fellelhető a piacon és többségük ingyenes. A legismertebbek és talán legalkalmasabbak a ImpulseDE2 (Fischer, Theis, és Yosef 2018), splineTC (Michna és mtsai. 2016) és maSigPro (Nueda, Tarazona, és Conesa 2014; Spies és mtsai. 2019). Ezek a TC eszközök a gének expressziójának változását és a kapcsolatot a különböző időpontok között modellillesztés segítségével tárják fel. Ezzel szemben a hagyományos eljárás, mint például a DESeq2 esetében (Love, Huber, és Anders 2014), egy egyszerű páronkénti összehasonlítása az eltérő időpontoknak. Ez a páronkénti összehasonlítás szűken vett értelemben nem nevezhető TC analízisnek, viszont alkalmas TC adatsorok elemzésére. Korábban tesztelték a TC eszközök és a hagyományos eljárás hatékonyságát, mely során arra jutottak, hogy a splineTC és maSigPro eszközök csak több mint nyolc különálló időpont vizsgálatakor múlják fölül a DESeq2 páros összehasonlítását (Love, Huber, és Anders 2014; Spies és mtsai. 2019). Az ImpulseDE2 hasonlóan teljesített rövid és hosszútávon is, mint a DESeq2 hagyományos megközelítése, azzal a különbséggel, hogy az ImpulseDE2 hajlamosabb volt a zajosságra (Spies és mtsai. 2019). Ez alapján megállapítható, hogy nyolc vagy kevesebb időpontból álló TC analízis esetén robusztusabb és pontosabb eredményeket kaphatunk a DESeq2 hagyományos páronkénti összehasonlításával, mint más TC eszközök alkalmazásával. Ennek ellenére a TC adatsorok segítségével már most rengeteg vizsgálat tárt föl jelentős eredményeket.

Egy feketecsápú dögbogarakon (*Nicrophorus vespilloides*) végzett kutatás kiválóan mutatja azoknak az analíziseknek a hasznosságát, melyek több időpontot és akár több csoportot is összehasonlítanak (Parker és mtsai. 2015). A vizsgálat a fajnál fellelhető kétszülős és egyszülős utódgondozás és az abban résztvevő ivarok közötti különbségeket tárta fel. A feketecsápú dögbogárnál a hímek és a nőstények is részt vehetnek az utódgondozásban akár közösen, akár külön-külön. Az említett vizsgálat során mintát vettek minden egyedből az utódgondozás előtt, közben és után is. Így az egyedek saját génexpressziós változását tudták összehasonlítani a hímek és nőstények, valamint az egyszülős és kétszülős utódgondozást folytató egyedek között. Az utódgondozással kapcsolatos gének expressziós mintázata nagyban megegyezett a kétszülős utódgondozásban résztvevő nőstények, illetve az egyszülős utódgondozásban résztvevő hímek és nőstények között, míg a kétszülős utódgondozás hímjei nem fedtek át ezekkel a csoportokkal. Ez arra utal, hogy a kétszülős utódgondozás során a hímek kevésbé vagy egyáltalán nem gondoznak aktívan és ez a szerep a nőstényekre hárul. Az eredmények tehát egy erős ivari konfliktust sejtetnek a kétszülős utódgondozás esetében (Parker és mtsai. 2015).

I.5. A nagyfejű csajkó, mint erős szezonalitást mutató faj, mely differenciált ivari szerepekkel bír

A nagyfejű csajkó (*Lethrus apterus* Laxmann, 1770) egy, az álganajtúró-félék (Geotrupidae) családjába tartozó faj. A faj széles elterjedési területe a Kárpát-medencétől a Don folyó vízgyűjtő területéig tart (Král és mtsai. 2013).

A nagyfejű csajkó március eleje és május vége között aktív. Az évnek ebben a szakában kell táplálkozniuk, felhalmozniuk a tartalék tápanyagokat és ebben a periódusban van a párzási időszak is. Az egyedek ébredést követően táplálkoznak, és kisebb lakójáratokat ásnak maguknak éjszakai rejtékhely gyanánt. Az aktív szezon előrehaladtával megkezdődik a párzási időszak, mely során a hímek és a nőstények párban ássák ki fészüküket, amely többnyire a nőstények addigi járatainak továbbásával készül el (Frantsevich és mtsai. 1977; Kosztolányi és mtsai. 2015; Nagy és mtsai. 2021). A fészekben egy központi járat található, melyről költőjáratok ágaznak le, amik egy-egy bölcsőkamrákban végződnek (6-8 kamra). Minden bölcsőkamrába egy petét helyeznek le a nőstények, majd levágott (lerágott) friss hajtásokat halmoznak fel melléjük. A bölcsőkamrákban felhalmozott levelek táplálékkul szolgálnak a későbbiekben a lárva számára (Kosztolányi és mtsai. 2015; Kiss és mtsai. 2023). A növényi hajtásokat a nőstények gyűjtik be, míg a hímek feladata a nőstények és a fészkek védelmezése a többi hímtől, vagy más betolakodóktól (predátorok, paraziták) (Kosztolányi és mtsai. 2015). Az eltérő viselkedéssel összhangban a faj ivari dimorfizmust mutat. A hímek szarvval/agyarral rendelkeznek, mely egy ventrális kinövés a mandibulájukon, és amit a betolakodók elleni védekezés során hasznosíthatnak (Rosa, Barta, és Kosztolányi 2018; Kiss és mtsai. 2023). Az év többi részét (nyár, ősz, tél) a föld alatt töltik az egyedek, ezzel egy extrém hosszú dormanciának kitéve szervezetüket (Frantsevich és mtsai. 1977; Kosztolányi és mtsai. 2015; Nagy és mtsai. 2021).

Összefoglalva a nagyfejű csajkó egy erős szezonalitást mutató faj, mely alapvetően a dormancia stratégiáján keresztül kerüli el a számára kedvezőtlen környezeti feltételeket és okkal feltételezhetjük, hogy csak a számára legkedvezőbb időszakban aktív az év során. Ezen felül kiemелendő a faj utódgondozó viselkedése, melyben valamilyen mértékig mindkét szülő részt vesz, de nagyobbbrészt eltérő feladatokat látnak el. A nagyfejű csajkónak ezen jellemzői potenciális modellszervezetévé jelölik a fajt a dormanciát, szezonalitást, utódgondozást célzó kutatások számára is.

II. Célkitűzések

Kutatásunk célja az volt, hogy feltárjuk a nagyfejű csajkó génexpressziós mintázatát a szezon és az ivar függvényében, ezáltal segíteni a nagyfejű csajkók viselkedésének feltérképezését, a dormancia háttérében álló biológiai folyamatok jobb megértését és kiemelni a differenciális génexpresszió jelentőségét a szezonális kialakításában. Vizsgálatunk nullhipotézise szerint a szezon nem befolyásolta az adott gén expresszióját. Az alternatív hipotézisünk kapcsolatot feltételez a szezon és az adott gén expressziója között.

III. Anyag és módszertan

III.1. Mintagyűjtés

A mintavételezés 2018 május 30-án, valamint 2019 tavaszán március 22-e és május 17-e között zajlott, Magyarországon, egy Susa melletti populációban (48°16'27"N, 20°15'08"E). Az első mintavételi alkalmon, 2018 május 30-án, a szaporodási időszakot követően frissen elvermelt egyedeket mintáztunk, öt hím és egy nőstény egyedet. A 2019-es mintavételezés időszaka lefedte a nagyfejű csajkó közel teljes aktív periódusát. Az öt mintavételi nap mindegyikén (március 22, április 5, április 19, május 2, május 17) négy nőstény és négy hím egyedet gyűjtöttünk. Az egyedek ivarát a begyűjtéskor rögzítettük. Mintáinkhoz az egyedek fejéből eltávolítottuk a puha szöveteket (izom, idegsejtek, hemolimfa és zsírszövet). A szövettartalmat a kinyerése után rögtön 600 µl RNA/DNA Shield pufferbe (Zymo Research, USA) tettük, mely segít megőrizni a minták RNS/DNS tartalmának integritását, meggátolja azok széttöredezését. A mintákat -20°C-on tároltuk az RNS kivonásig.

A nagyfejű csajkó Magyarországon őshonos és védett faj. A mintagyűjtést az Észak-Magyarországi Környezetvédelmi Kft. engedélyezte (engedélyszám: 9007-8/2014).

III.2. RNS kivonás és szekvenálás

A mintákból történő RNS izolálást TRI Reagent Solution (Thermo Fisher Scientific, USA) használatával végeztük, mely során a gyártó utasításait követtük. A pelleteteket 30 µl RNáz-mentes vízben oldottuk. A minták nukleinsav koncentrációjának meghatározása NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) használatával történt. Az RNS integritását 1%-os agaróz gélen végzett gélelektroforézissel állapítottuk meg. A kivont RNS mintákat -20°C-on tároltuk a szekvenálásig. A cDNS könyvtár készítését, tisztítását, valamint a 150 bp páros-végű ("paired-end", PE) szekvenálást a Novogene Co. (Beijing, China) végezte. A szekvenálás egy Illumina HiSeq 4000 típusú gépen történt.

III.3. Transzkriptom összeszerelés és annotáció

A nyers olvasatok ("raw reads") minőségét FastQC használatával ellenőriztük (v0.11.8, Andrews 2010). Az adapter szekvenciák és rossz minőségű bázisok eltávolítása a Trimmomatic segítségével történt (v0.39, Bolger, Lohse, és Usadel 2014). Ehhez az eszköz által biztosított

Illumina adapter szekvenciákat (TruSeq3-PE-2.fa) és a következő paraméterezést vettük igénybe: "ILLUMINACLIP:2:30:10 LEADING:5 TRAILING:5 SLIDINGWINDOW:4:25 MINLEN:40", mellyel eltávolítottuk az Illumina specifikus szekvencia darabokat, az olvasatok mindkét végéről azokat a bázisokat, melyeknek minőségi értéke alacsonyabb volt, mint öt, valamint az olvasatok azon részeit, melyek 25-nél alacsonyabb minőségi értékkel rendelkeztek egy négy bázisból álló ablakban, és végül kiszűrtük a 40 bázisnál rövidebb szekvenciákat. A szűrt olvasatokat a HISAT2 programot (v2.2.1, Kim és mtsai. 2019) használva illesztettük a nagyfejű csajkó genomjára. Ezt követően referencia-alapú transzkriptom összeszerelést végeztünk StringTie szoftver alkalmazásával (v2.1.4, M. Pertea és mtsai. 2015). Elsőként minden mintának összeállítottuk a saját transzkriptomját. Ezt követően a minták transzkriptomjait összeolvasztottuk egy közös, nem-redundáns transzkriptomba (--merge flag), amit referenciaként használtunk a transzkriptumok kifejeződésének mintánként történő újrakalkulálásakor (-e opcióval). A DGE vizsgálathoz a génexpressziós mátrixot, ami a különböző minták expressziós értékeit tartalmazza, a prepDE.py szkript segítségével hoztuk létre, amit szintén a StringTie biztosított (v2.1.4, M. Pertea és mtsai. 2015).

Az összeszerelt transzkriptumok szekvenciáit a referencia genomból nyertük ki az összeolvasztott transzkriptom annotációs ("general transfer format", GTF) fájlja alapján. Ehhez a gffread parancsot használtuk (v0.12.3, G. Pertea és Pertea 2020). A potenciális nyitott olvasási keretek ("open reading frame", ORF) prediktálását a TransDecoder program segítségével végeztük (v5.7.1, Haas [2015] 2023). A prediktált fehérje szekvenciák funkcionális annotációjához a Pannzer2 webszervert vettük igénybe (Törönen és Holm 2022). Az eredményeket olyan gén ontológiai ("gene ontology", GO) funkciókra korlátoztuk, amelyek az ízeltlábúak törzsén belül manuálisan is ellenőrzött annotációval rendelkeztek (Ashburner és mtsai. 2000).

III.4. Statisztikai elemzés

Az adatokat R statisztikai környezetben kezeltük (v4.3.1, R Core Team 2023). Az adatkezeléshez a "tidyverse" és "lubridate" csomagokat használtuk (v2.0.0, Wickham és mtsai. 2019; v1.9.3, Golemund és Wickham 2011). A statisztikai elemzéseket a Bioconductor szoftverprojekt csomagjainak segítségével végeztük (Huber és mtsai. 2015).

III.4.1. *Bemeneti fájlok*

Az adatkezeléshez a gének expressziós mátrixát, a minták metaadatait tartalmazó és a géneket funkciójukkal társító adatkereteket használtuk fel. Az előfordulási mátrix sorai a vizsgált géneket, oszlopai a mintákat (46 minta) jelölték. A mintákhoz tartozó metaadat tartalmazta az adott egyed begyűjtésének időpontját és ivarát.

III.4.2. *Adathalmazok elkészítése*

Az adathalmazok elkészítéséhez a “DESeq2” csomagot használtuk (v1.42.1, Love, Huber, és Anders 2014). A DESeq2 képes az expressziós mátrixok feldolgozására és az azokban található génexpressziós különbségek statisztikai kiértékelésére. Azért, hogy az eltérő ivarú egyedek génexpresszióit egymástól függetlenül vizsgáljuk, külön adathalmazt készítettünk a hím és nőstény egyedekből vett mintáknak. Egy adathalmaz létrehozásához szükséges megadni a vizsgálni kívánt modellt. Mivel a szezonális hatást szeretnénk volna vizsgálni, így az alábbi modellt állítottuk fel mind a hím, mind a nőstény adathalmazban: “~dátum”. A 2018 tavaszán gyűjtött minták szolgáltak referenciaként, ugyanis a gyűjtéskor az egyedek már dormans állapotban voltak. Az elkészült adathalmazokat ezt követően megszürtük, és azokat a géneket tartottuk meg, melyek az adott ivarú egyedekben összesen legkevesebb 10-szer kifejeződtek. Erre azért volt szükség, mert az ilyen alacsony expressziójú gének esetében csökkenhet az elemzés biológiai relevanciája.

III.4.3. *Differenciálisan expresszáldott gének meghatározása*

Az eltérően expresszáldott gének meghatározásához szintén a DESeq2 csomaggal dolgoztunk. Az adatok statisztikai értékeléséhez a DESeq parancs módszerei közül a valószínűséghányados próbát (“likelihood ratio test”, LRT) használtunk. Azért, hogy a szezon hatását tudjuk vizsgálni, a számításához a csökkentett modelltől (“reduced model”) eltávolítottuk a dátumot: “~1”. Ezzel a teszttel azt vizsgáltuk, hogy a különböző gyűjtési időpontok befolyásolták-e egy adott gén expresszióját, tehát az első időponthoz képest (inaktív állapot) tapasztaltunk-e eltérést bármely más időpontban. A statisztikai elemzés során minden gén saját szignifikancia értékét (korrigált p-érték) kapott. Egy gént akkor tekintettünk az adott ivarra nézve szignifikánsan differenciálisan expresszáldónak, ha az LRT során kalkulált korrigált p-értéke nem haladta meg az 0,05-öt.

A korrigált p-értéket (“adjusted p-value”) a Benjamini-Hochberg korrekcióval számoltuk (Benjamini és Hochberg 1995). Erre azért volt szükség, hogy csökkentsük az elsőfajú hibák arányát, vagyis azokat az eseteket, amikor a statisztikai teszt tévesen vetette el a nullhipotézist és feltételezte, hogy az adott gén expressziós szintjére hatással volt a gyűjtési időpont.

III.4.4. *Az ivarok differenciálisan expresszáldott génkészletének összehasonlítása*

A hímekben és a nőstényekben talált differenciálisan expresszáldott gének összehasonlításához a “gplots” csomagot használtuk (v3.1.3.1, Warnes és mtsai. 2024). A szignifikáns génekből Venn-diagram ábrát készítettünk. Ezt azért tettük, hogy lássuk, hány nőstény- és hím-specifikus változással rendelkező gént találtunk, és hány olyat, amely mindkét ivarban szezonális változást mutatott.

Ezt követően az elkészült ábra adataiból leválogattuk azokat a géneket, amelyek mindkét ivarban szezonális változást mutattak és ezekkel dolgoztunk tovább. Erre azért volt szükség, hogy a továbbiakban meg tudjuk vizsgálni, hogy milyen expressziós mintázattal rendelkeztek azok a gének, amelyek mindkét ivar esetében szignifikáns változás volt megfigyelhető az expressziójukban a szezon előrehaladtával.

III.4.5. *Génexpressziós mintázatok vizualizációja*

A géneket expressziós mintázatuk alapján klaszterekbe rendeztük. A gének klaszterekbe rendezéséhez és a klaszterek ábrázolásához a “DEGreport” csomagot használtuk (v1.38.5, Pantano 2023). A klasztereket a gyűjtési dátum és az ivar függvényében hoztuk létre, az egy klaszterbe kerülő gének minimum számát pedig 15-re állítottuk. A klaszterek tehát azokat a géneket tartalmazzák, melyek génexpressziós mintázata ivaronként hasonlónak bizonyult. A funkcionális vizsgálathoz (géndúsulási vizsgálat) három olyan klasztert választottunk ki, melyek biológiai szempontból a legrelevánsabb mintázatot mutatták. Ezek mindegyike több mint 100 gént tartalmazott.

III.4.6. *Géndúsulási vizsgálat*

A klaszterek génkészlet-dúsulási analíziséhez a “clusterProfiler” csomagot használtuk (v4.10.1, Yu és mtsai. 2012). A génkészlet-dúsulási analízis célja, hogy megtudjuk, mely funkciójú gének aránya nagyobb a kiválasztott génhalmazokban a kiindulási adathalmazhoz

képest. Ilyenformán információt kaphatunk arról, hogy milyen funkciót láthatnak el többségében az adott klaszterbe tartozó, tehát hasonló génexpressziós mintázatot mutató gének. Mindhárom kiválasztott klaszterre külön génkészlet-dúsulási analízist végeztünk. A vizsgálatban azokat a géneket használtuk referencia adathalmazként, amelyeket a Pannzer2 a biológiai folyamat (“Biological process”, BP) GO kategóriába sorolt. Egy génhez több lehetséges funkciót is társítottunk. Az analízis során a klaszterek génkészletéből csak azokat a géneket vettük figyelembe, amelyek a referencia adathalmazban is szerepeltek.

IV. Eredmények

Vizsgálatunkban összesen 9000 gén differenciális expresszióját elemeztük. Ebből 5015 génhez sikerült GO funkciót társítani.

IV.1. DGE analízis

A DGE analízis során a nőstények esetében 5036, a hímek esetében 6027 gént találtunk, melyek differenciálisan expresszálódtak a szezon során, tehát szignifikáns eltérést mutattak az első, referencia időponthoz viszonyítva bármely későbbi időpontban. A nőstény és hím eredmény gének összevetése során 646 olyan gént találtunk, ami csak nőstényekben, 1637 gént, amely csak hímekben, és 4390 gént, ami mindkét ivarban egyaránt differenciálisan expresszált volt. A 4390 gén közül, mely mindkét ivarban szignifikáns volt, 2894 gén rendelkezett társított GO funkcióval.

IV.2. Génexpressziós mintázatok

A hímekben és nőstényekben is szignifikáns gének expressziós mintázatuk alapján 41 klaszterbe voltak sorolhatók. A klaszterek gén száma 13 klaszter esetében meghaladta a 100 gént. A három legrelevánsabb mintázatot mutató klaszter közül az “A” klaszter 259 (1. ábra), a “B” klaszter 138 (2. ábra), a “C” klaszter pedig 170 gént tartalmazott (3. ábra).

Az “A” klaszterbe tartozó gének esetében a kontroll időponthoz viszonyítva a gének expressziós szintje beesik a 9 hónap dormancia alatt, az ébredéshez legközelebbi időpontban pedig a hímek expressziós szintje átlagosan 150%-kal magasabb a nőstényekénél (1. ábra). A szezon során később kiegyenlítődik (második időpont), majd megfordul a génexpressziós különbség a két ivar között (harmadik és negyedik időpont). A szezon végére az ivari különbségek ismét kiegyenlítődni látszanak.

A “B” klaszterbe tartozó gének ivaronként hasonló szezonális lefutást mutattak (2. ábra). A kontroll időpont alacsony szintjéről a gének expressziója először megugrott az első időpontra (ébredés), majd onnan fokozatosan csökkent vissza az ötödik időpontig.

A “C” klaszternél az “A” klaszterhez hasonlóan szintén megfigyelhető volt egy kölcsönhatás az ivar és a szezon között (3. ábra). A kontroll időponthoz viszonyítva emelkedés

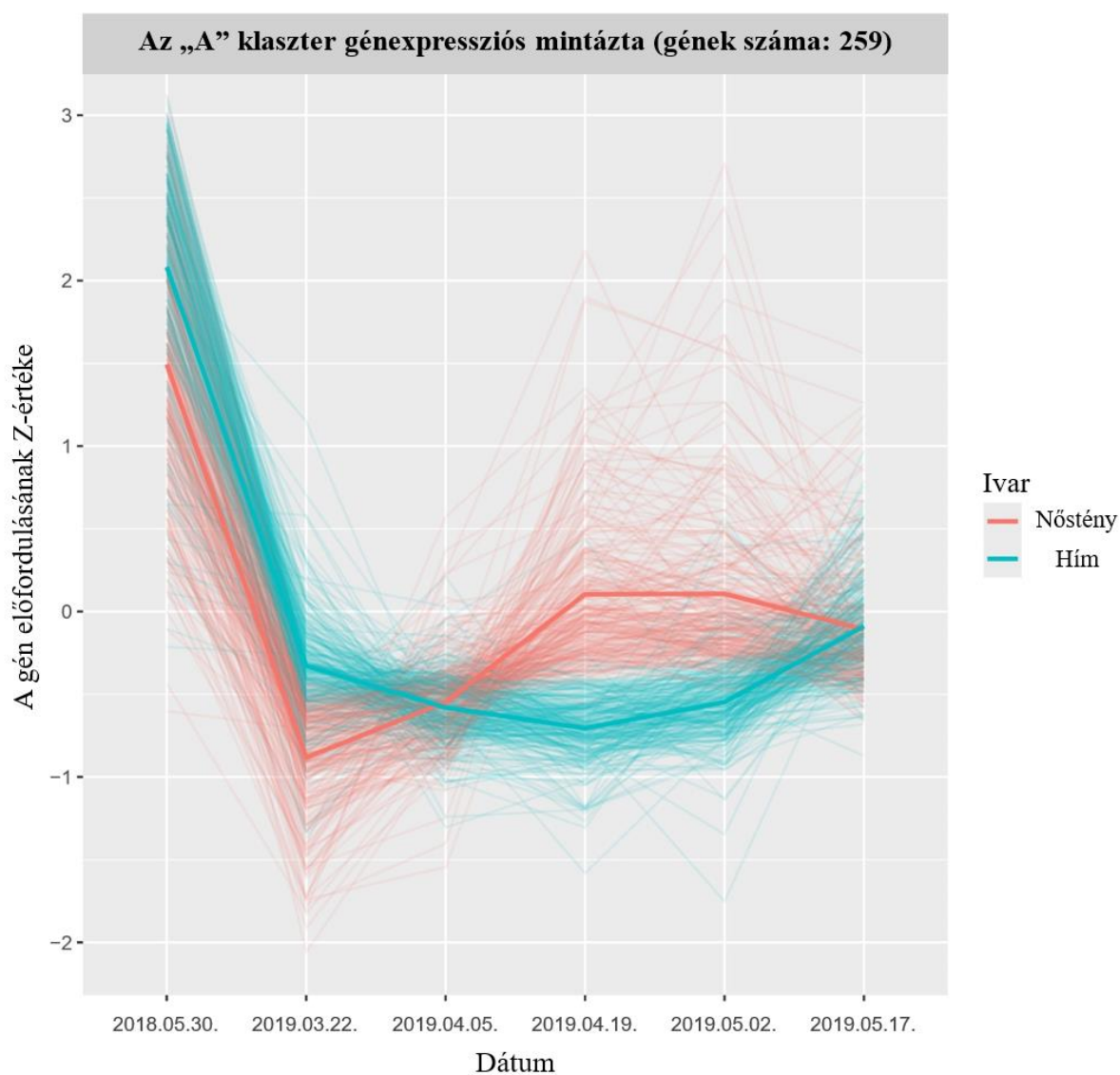
tapasztható az első időpontban, és mindkét esetben a hímek közel kétszeres expressziós szinttel rendelkeznek a nőstényekhez képest. A második időpontban ez az ivari különbség kiegyenlítődik, miközben mindkét ivarnál egy erős expressziós visszaesés tapasztalható. Ezt követően a nőstényekben újra megemelkedik a klaszterbe tartozó gének expressziója a harmadik és negyedik időpontra, míg a hímek ez idő alatt nem fokozzák ezeknek a gének az expresszióját. Az utolsó időpontban drasztikus emelkedés látható a “C” klaszter génjeinek kifejeződésében mindkét ivarban.

IV.3. Géndúsulások

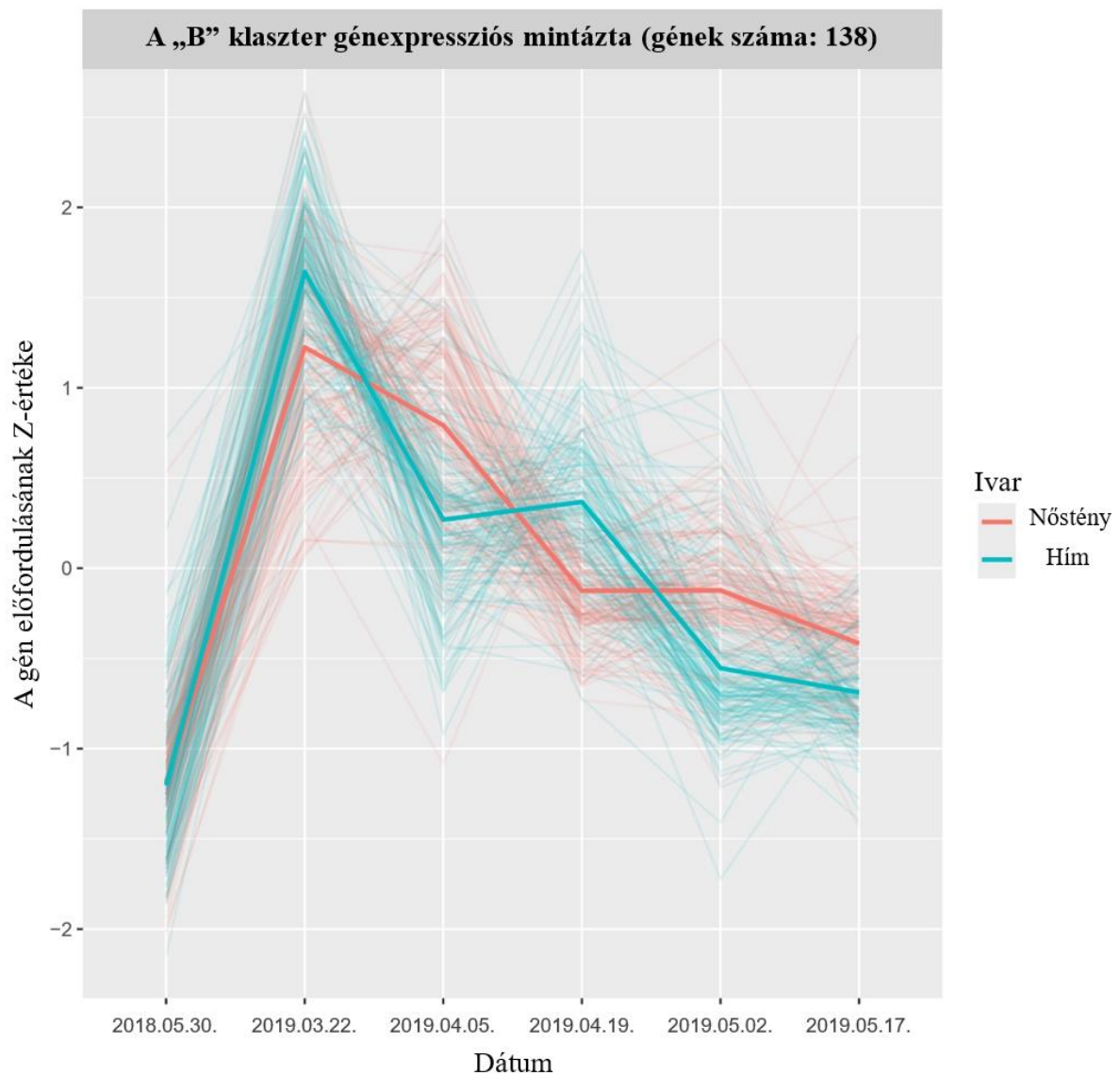
Az “A” klaszter esetében a peptid metabolikus folyamatok, válaszreakció stimulusra, vezikula mediált transzport és szagok szenzoros érzékelése GO funkciókba tartozó gének szignifikánsan felülreprezentáltak voltak (4. ábra). Ezeknél a GO funkcióknál tehát géndúsulást tapasztaltunk ($p < 0,05$). Az “A” klaszter génjei közül a peptid metabolikus folyamatokhoz négy, a válaszreakció stimulusra GO funkcióhoz hét, a vezikula mediált transzportához kilenc, a szagok szenzoros érzékeléséhez pedig szintén négy gén tartozott.

A “B” klaszter elemzése során a citromsav ciklus, elektrontranszportlánc, mitokondriális légzési lánc I. komplexének összeszerelése, oxidatív foszforiláció, mitokondriális elektrontranszport (NADH - ubikinon), transzmembrán proton transzport, glikolízis és a kifejlett élettartam meghatározása GO funkciók felülreprezentáltságát találtuk, vagyis ezekben a GO funkciókban volt szignifikáns géndúsulás ($p < 0,05$). A citromsav ciklushoz kilenc, az elektrontranszportláncához és a mitokondriális légzési lánc I. komplexének összeszereléséhez hét-hét, a mitokondriális elektrontranszport (NADH - ubikinon) GO funkcióhoz öt, az oxidatív foszforilációhoz is és a transzmembrán proton transzportához is hat, valamint a glikolízishez és a kifejlett élettartam meghatározásához mindkét esetben négy gént számoltunk a “B” klaszterben (5. ábra).

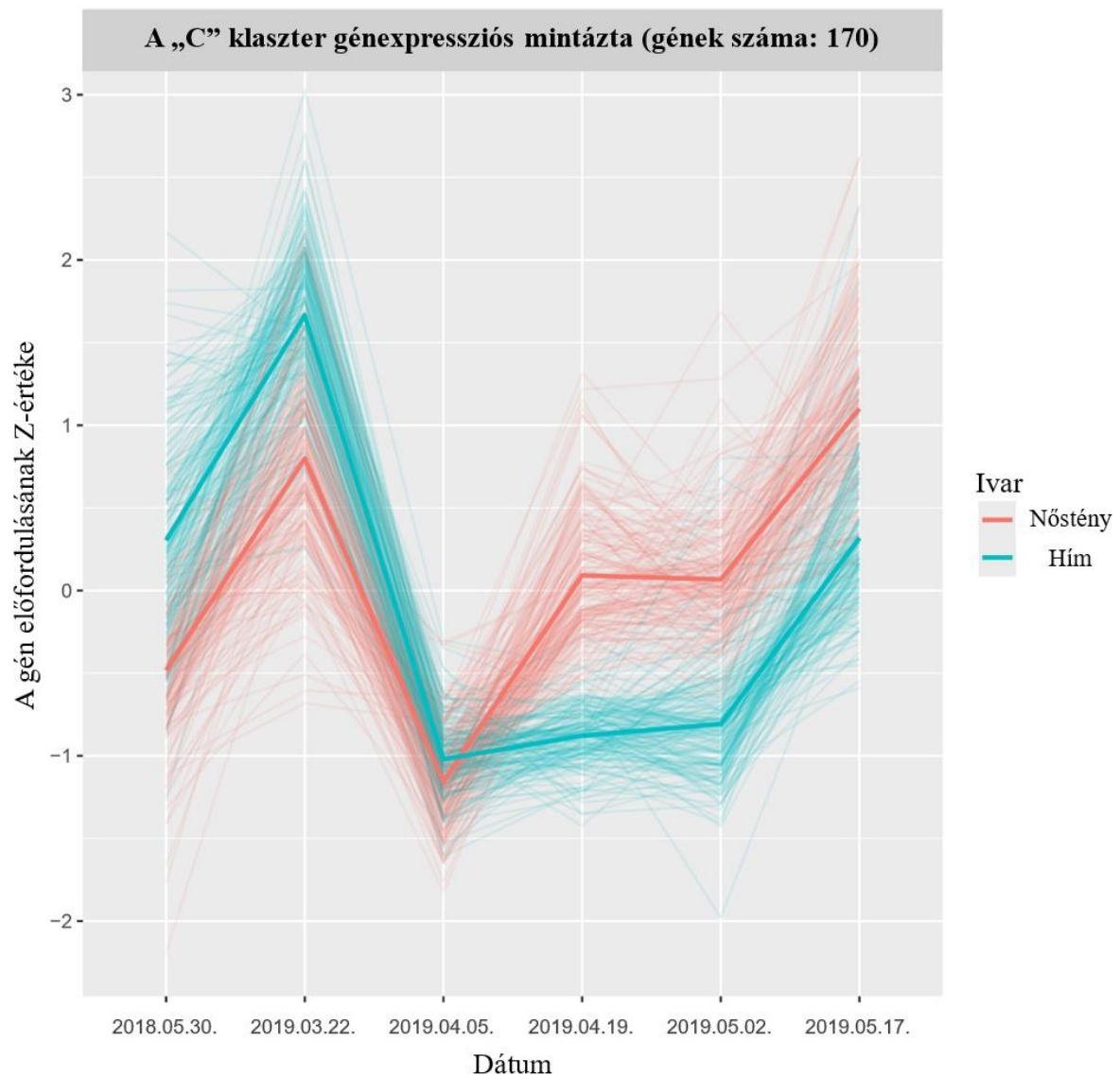
A “C” klaszternél négy felülreprezentált GO funkciót találtunk. Ezek a transzláció, riboszóma képzés, rRNS feldolgozás és a riboszomális kis alegység képzése voltak ($p < 0,01$). A transzlációhoz 29, a riboszomális kis alegység képzéshez négy, a riboszóma képzéshez és az rRNS feldolgozáshoz pedig hét gén tartozott a “C” klaszteren belül (6. ábra).



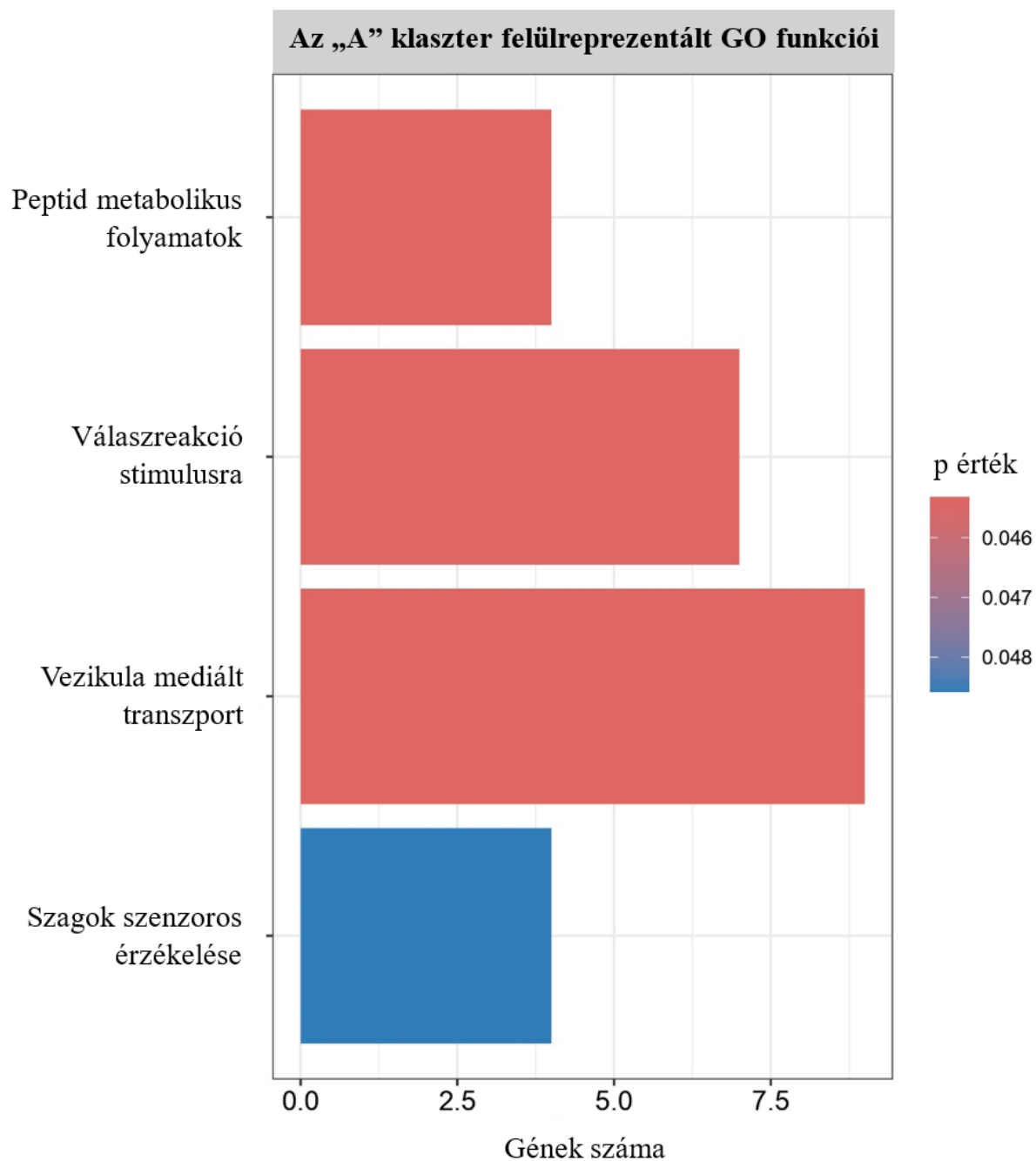
1. ábra: Az ábrán az “A” klaszterbe sorolt gének expressziós mintázatát láthatjuk. Az x tengelyen a minta gyűjtési dátuma látható. Kiemelendő, hogy az első és második időpontok között közel 9 hónap telt el. Az y tengelyen a gének előfordulásának Z-értéke található, mely minden gén saját expressziójához viszonyított relatív expressziós eltérését mutatja. A halvány vonalak az adott gének expresszióját, a vastag vonalak a gének expresszióinak átlagát ábrázolják. A piros vonalak a nőstények a kék vonalak a hímek génexpressziós szintjét jelzik. A klaszterbe összesen 259 gén került.



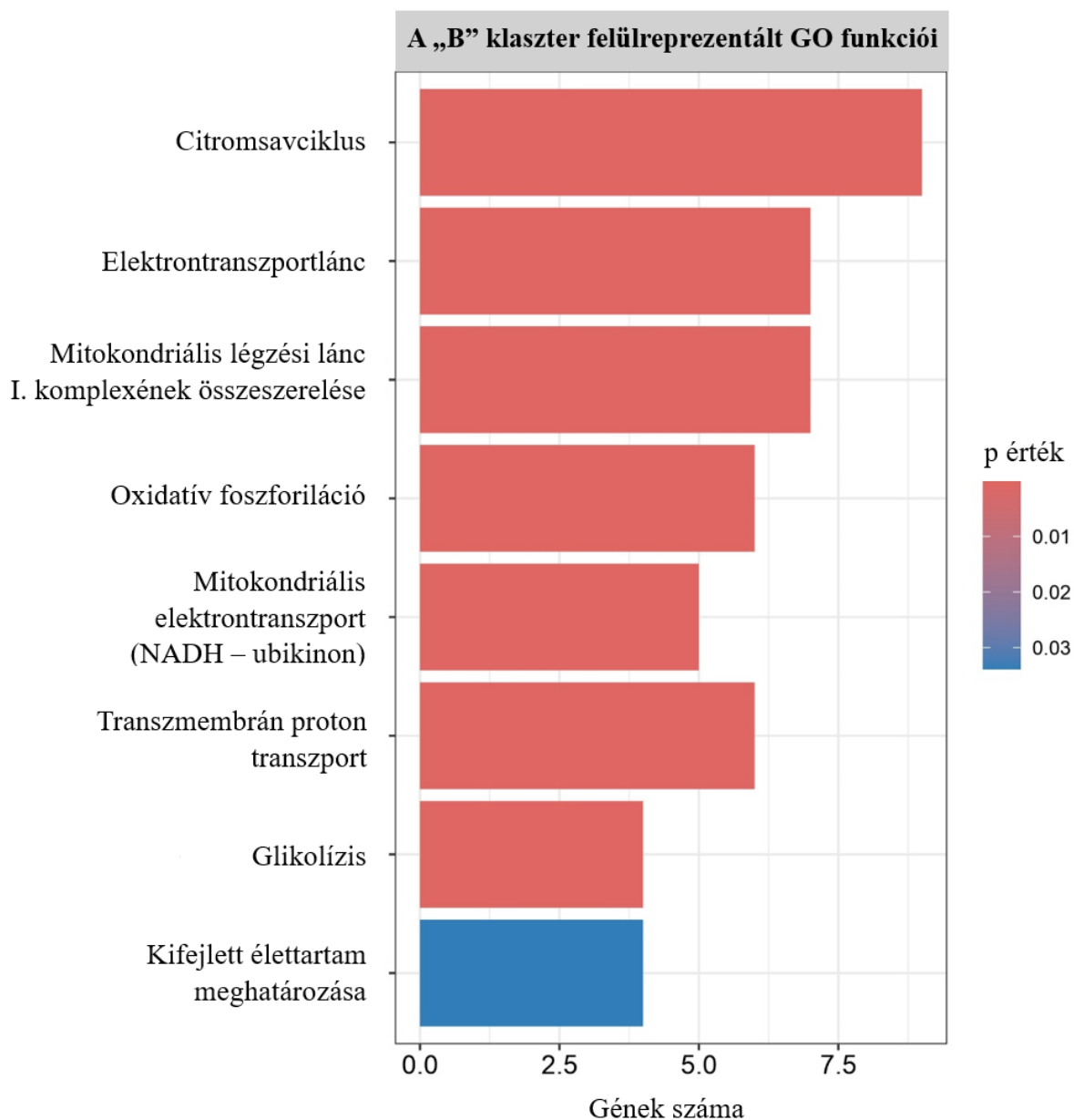
2. ábra: Az ábrán a “B” klaszterbe sorolt gének expressziós mintázatát láthatjuk. Az x tengelyen a minta gyűjtési dátuma látható. Kiemelendő, hogy az első és második időpontok között közel 9 hónap telt el. Az y tengelyen a gének előfordulásának Z-értéke található, mely minden gén saját expressziójához viszonyított relatív expressziós eltérését mutatja. A halvány vonalak az adott gének expresszióját, a vastag vonalak a gének expresszióinak átlagát ábrázolják. A piros vonalak a nőstények a kék vonalak a hímek génexpressziós szintjét jelzik. A klaszterbe összesen 138 gén került.



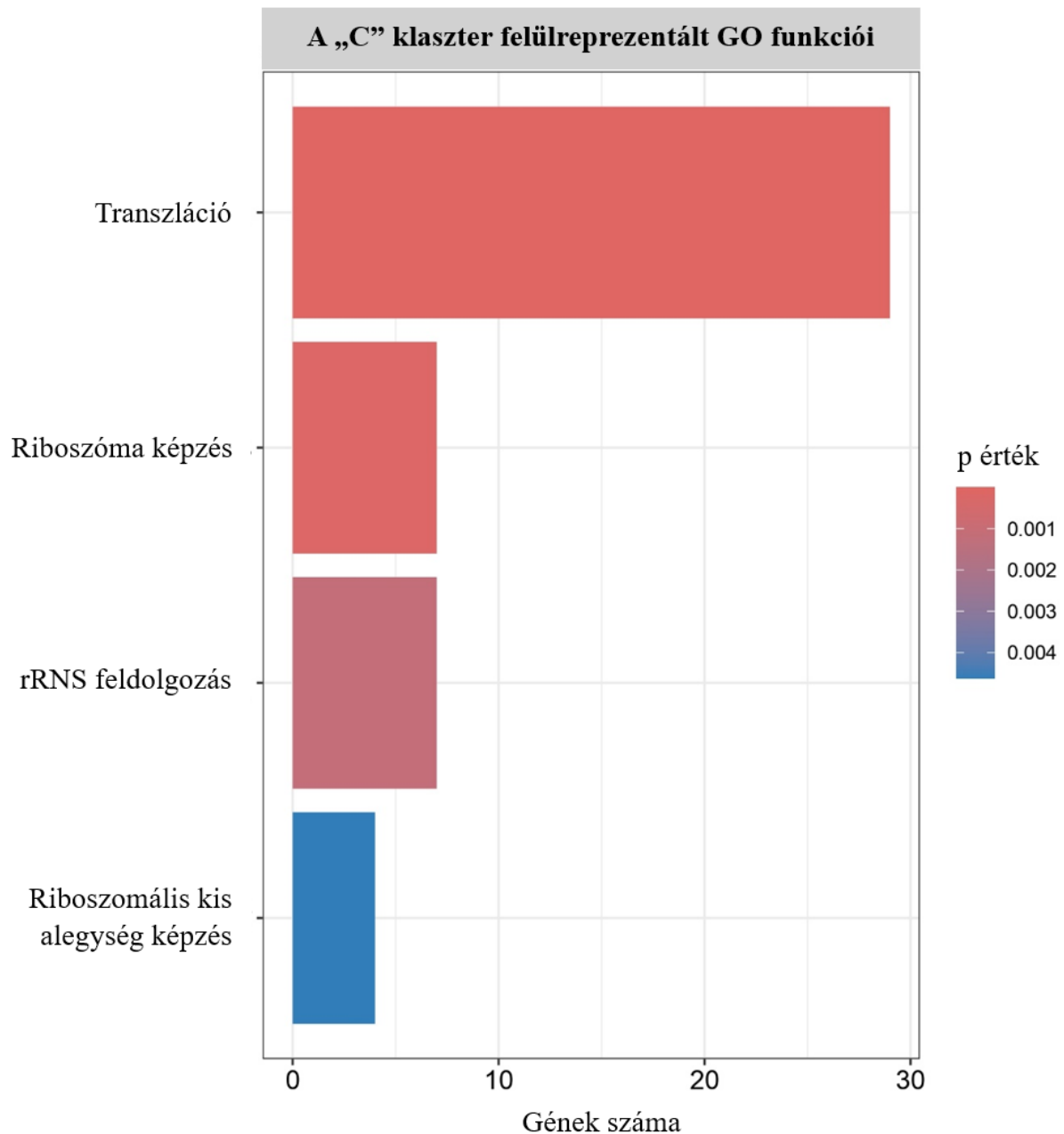
3. ábra: Az ábrán a “C” klaszterbe sorolt gének expressziós mintázatát láthatjuk. Az x tengelyen a minta gyűjtési dátuma látható. Kiemelendő, hogy az első és második időpontok között közel 9 hónap telt el. Az y tengelyen a gének előfordulásának Z-értéke található, mely minden gén saját expressziójához viszonyított relatív expressziós eltérését mutatja. A halvány vonalak az adott gének expresszióját, a vastag vonalak a gének expresszióinak átlagát ábrázolják. A piros vonalak a nőstények a kék vonalak a hímek géneexpressziós szintjét jelzik. A klaszterbe összesen 170 gén került.



4. ábra: Az ábrán az A klaszterbe sorolt gének felülreprezentált GO funkcióiba tartozó gének számát és a GO funkciók szignifikancia skáláját láthatjuk. Az x tengelyen a gének száma látható, míg az y tengelyen a szignifikánsan felülreprezentált GO funkciók vannak felsorolva. Az oszlopok színe a GO funkció felülreprezentáltságának szignifikancia szintjét mutatja. A színskálán a kékes árnyalatok a nagyobb, a vörösebbek a kisebb p-értékeket jelölik. A GO funkciók p-értékük szerint növekvő sorrendben követik egymást.



5. ábra: Az ábrán a “B” klaszterbe sorolt gének felülreprezentált GO funkcióiba tartozó gének számát és a GO funkciók szignifikancia skáláját láthatjuk. Az x tengelyen a gének száma látható, míg az y tengelyen a szignifikánsan felülreprezentált GO funkciók vannak felsorolva. Az oszlopok színe a GO funkció felülreprezentáltságának szignifikancia szintjét mutatja. A színskálán a kékes árnyalatok a nagyobb, a vörösebbek a kisebb p-értékeket jelölik. A GO funkciók p-értékük szerint növekvő sorrendben követik egymást.



6. ábra: Az ábrán a “C” klaszterbe sorolt gének felülreprezentált GO funkcióiba tartozó gének számát és a GO funkciók szignifikancia skáláját láthatjuk. Az x tengelyen a gének száma látható, míg az y tengelyen a szignifikánsan felülreprezentált GO funkciók vannak felsorolva. Az oszlopok színe a GO funkció felülreprezentáltságának szignifikancia szintjét mutatja. A színskálán a kékes árnyalatok a nagyobb, a vörösebbek a kisebb p-értékeket jelölik. A GO funkciók p-értékük szerint növekvő sorrendben követik egymást.

V. Diskusszió

Vizsgálatunk eredményei alátámasztották feltevésünket, miszerint a génexpresszióra a szezon hatással van. Ezt jól mutatja, hogy a vizsgált gének több mint fele mindkét ivarban szignifikánsan differenciálisan expresszáldott. A szezon hatását a génexpresszióra korábban többször kimutatták már növényekben, emberekben és ízeltlábúakban is (Chu és mtsai. 2024; Goldinger és mtsai. 2015; Salminen és mtsai. 2015), ellenben azt is leírták, hogy az ízeltlábúak szezonális viselkedésének génexpressziós tanulmányozása sok esetben csak laboratóriumi körülmények között és olyan modellszervezeteken zajlik, melyek többsége kevésbé mutat a természetben tipikus szezonális viselkedést (Denlinger és mtsai. 2017). Kutatásunk az említett hiány betöltéséhez járul hozzá, a nagyfejű csajkó egy természetes populációján végzett vizsgálattal, amely faj ismeretes hosszú dormanciájáról, rövid, intenzív aktív időszakáról és az ivarok utódgondozás során betöltött eltérő feladatairól (Frantsevich és mtsai. 1977; Kosztolányi és mtsai. 2015; Nagy és mtsai. 2021).

A DGE analízis eredményei nem csak a szezon erős hatását fedték fel, hanem egy ivarok és a szezon közötti interakciót is sejtetnek. Erre az "A" és "C" klasztereknél az első (2019.03.22.), harmadik (2019.04.19.) és negyedik (2019.05.02.) gyűjtési időpontokban az ivarok génexpressziós szintjei között megfigyelhető eltérések utalnak (1. és 3. ábra). Az ivar specifikus génexpresszió ízeltlábúaknál nem ismeretlen jelenség (Jin és mtsai. 2001). A kapcsolat kétirányú lehet, ugyanis a génexpresszió hatással van az ivarra és az ivari dimorfizmusra, de mindeközben az ivari szerepek is befolyásolhatják más gének expressziós szintjét (Hopkins és Kopp 2021; Grath és Parsch 2016). Eredményeink ezen túlmenően arra utalnak, hogy a különböző ivarok eltérő szezonális expressziós mintázatot is leírhatnak, ilyen módon az ivar hatása nem konstans mutatkozik egy gén expressziójában. Ehhez hasonló eredményeket találtak már madár és emlős szervezetekben is, bár ezek a vizsgálatok leginkább kisebb géncsoportokra koncentráltak (K. Wright és mtsai. 2022; Munley és mtsai. 2023). Ezzel szemben mi teljes transzkriptom analízist végeztünk, ami egy robusztus és általános képet ad a génexpressziós mintázatok, a szezon és az ivar kapcsolatáról. Ízeltlábúakban korábban már végeztek hasonló teljes transzkriptom vizsgálatot, ahol eltérő génexpressziót tapasztaltak egy imitált szezon (laboratóriumi hőmérséklet változtatás) során az ivarok függvényében (Parker és mtsai. 2021). Azonban a vizsgálat limitációjaként említették a szezon imitálásának hiányosságait és a kezelési idő (imitált szezon) rövid hosszát. Ezért is fontos kiemelni, hogy vizsgálatunk természetes populáció mintázásán alapult, az egyedek teljes ismert aktív

periódusát lefedve. Eredményeink tehát felvetik a szezon és ivar interakciójának szerepét az erős szezonalitással és ivaronként eltérő utódgondozással rendelkező ízeltlábúaknál, amit érdemes lehet más ízeltlábú szervezeteken is vizsgálni a továbbiakban.

Az “A” klaszterbe tartozó felülreprezentált GO funkciók egyike a peptid metabolikus folyamatok (4. ábra). Ez az egyed bármely peptid közreműködésű biokémiai folyamatával kapcsolatos géneket foglalja magában (v2.5.17, Carbon és mtsai. 2009). Ehhez szorosan kapcsolható a vezikula-mediált transzport GO funkció, ami szintén fontos indikátora lehet az egyed metabolizmusának (v2.5.17, Carbon és mtsai. 2009). A klaszterre jellemző expressziós mintázat alapján - hím eltolódás a szezon elején - felvethető, hogy a hímek metabolizmusa valamivel hamarabb beindul a szezon kezdetén, ami egy rövidebb dormanciát feltételez. Ez a jelleg adaptív lehet (Michener 1983; Constant és mtsai. 2023), ha a nőstényekért folytatott küzdelmet és a többször párosodás lehetőségét vesszük figyelembe, ugyanis a korábban ébredő hímeknek nagyobb lehetősége lehet nőstényt találni és a szezon előrehaladtával váltani is azt (Frantsevich és mtsai. 1977; Kosztolányi és mtsai. 2015; Kiss és mtsai. 2023). Ezzel parallel eredmények más fajoknál is már ismeretesek. Egy marmotiniken végzett, közel egy évtizedes vizsgálat során megfigyelték, hogy a hímek 8-16 nappal korábban ébrednek a dormans állapotból, mint a nőstények. A tanulmányban felvetették, hogy a hímek számára esetleges szaporodási előnyt jelenthet a jelleg (Michener 1983). A jelenséget egyfajta protandriaként értelmezhetjük, vagy azzal szoros összefüggésbe hozhatjuk, ahogy ezt egy emlősökön végzett komparatív vizsgálatban is tették (Constant és mtsai. 2023). Azt, hogy a szezon második felében már a nőstények rendelkeznek az említett GO funkciók génjeinek magasabb expressziójával az magyarázhatja, hogy a szezonnak ebben a szakában zajló peterakás, illetve utódgondozás (levelek gyűjtése) szükségessé teheti az említett funkciók fokozását (Frantsevich és mtsai. 1977; Kosztolányi és mtsai. 2015).

Egy másik felülreprezentált GO funkció az “A” klaszterben a szagok szenzoros érzékelése és a válaszreakció stimulusra (4. ábra). A szaglás kifejezetten fontos az ízeltlábú szervezetek tájékozódásában, segíti őket a párkeresésben, a táplálék találásban (vagy megválogatásában) és a peterakás helyének megválasztásában is (Haverkamp, Hansson, és Knaden 2018). Ez szintén illeszkedik arra a feltevésre, hogy a hímek korábban kezdenek meg aktív periódusukat, ami a táplálkozással indul, és a nőstények felkutatásával folytatódik. Később a hímek expressziós szintjének visszaesését az aktív periódus alatt magyarázhatja, hogy a fokozott expressziót kiváltó hajtó tényezők (gyors táplálék keresés, korai nőstény találás és szaporodás) megszűnnek és más, a szaglást kevésbé igénylő tevékenységet kezdenek végezni

(Frantsevich és mtsai. 1977; Kosztolányi és mtsai. 2015; Kiss és mtsai. 2023). A nőstények emelkedő expressziója szintén jól magyarázható a peterakás és a levélgyűjtés viselkedésével (Frantsevich és mtsai. 1977; Kosztolányi és mtsai. 2015). Ez alátámasztja azt a megfigyelést, hogy az utódgondozó időszakban megnő a nőstények által gyűjtött növények között a magas nitrogéntartalmú pillangósvirágúak aránya (Nagy és mtsai. 2021), így a nőstények a gyűjtött levelek feltehetően szaganyagok alapján választják ki. Korábban megfigyelték, hogy a hímek gyakran váltanak fészket és helyükre új hím kerül, akár harc nélkül is (Kiss és mtsai. 2023). Lehetséges tehát, hogy a nőstények költőjárataiban több hímnek is vannak utódai, ami azt a kérdést is felveti, hogy a nőstény eltérően gondolja-e ezeket az utódokat és ebben segítheti-e a szaglása.

Az "A" klaszter expressziós mintázatánál a kontroll időpont kimagasló eltérést mutat (1. ábra). Erre magyarázatként szolgálhat, hogy az egyedek a gyűjtéskor még nem kerültek teljesen dormans állapotba és annak előkészítésében játszanak szerepet az olyan funkciók, mint a szaglás, a vezikula-mediált transzport vagy a peptid metabolikus folyamatok. Egy másik lehetőség, hogy ezek a gének a dormancia ideje alatt is ilyen magas szinten expresszálódnak más, eddig ismeretlen funkciójuk miatt. Jelenleg a dormancia szabályozásában az oxidatív stressz kivédésében résztvevő gének és chaperon fehérjék szerepét hangsúlyozzák, ezen felül a gének átírását követő utólagos mRNS módosulásoknak is erős hatását gyanítják a dormancia szabályozásában (MacRae 2010; Torson és mtsai. 2023). Vizsgálatunk fejlesztése, pontosítása és a dormancia időszakának több időpontban történő mintázása fényt deríthet a felmerülő kérdésekre. Érdekes lehet továbbá eltérő szövetek vizsgálata is, ugyanis a különböző szövetekben eltérhet a dormancia szabályozása (Torson és mtsai. 2023).

A "B" klaszternél tapasztalható mintázat és a klaszterben felülreprezentált GO funkciók összhangban vannak a nagyfejű csajkó szezonálisáról eddig alkotott képünkkel. A klasztert jellemző GO funkciók elsősorban a sejtlégzésért felelősek (v2.5.17, Carbon és mtsai. 2009). A dormancia alatt az energiatermelő folyamatokat a szervezet a metabolikus rátával együtt lecsökkenti, ami egybeesik ezen gének kontroll időpontban tapasztalt alacsony expressziós szintjével (Hahn és Denlinger 2007). Az első időpontban megjelenő expressziós csúcsot legjobban az időszak magas energiaigényével magyarázhatjuk. Az ébredést követő metabolikus visszaállás és az esetlegesen leépített szervek visszanovesztése, meglehetősen energiaigényes folyamatok és viszonylag rövid időn belül lejátszódnak (Hahn és Denlinger 2007; Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). Az ezt követő fokozatos csökkenés a klaszter génjeinek expressziójában egészen az ötödik időpontig értelmezhető a metabolikus ráta

normalizálódásaként is, a harmadik és negyedik időpont expressziós szintje ugyanis a kontroll időpontjának két és fél-, másfélszerese. Ezek alapján valószínűsíthetjük, hogy a sejtlegzés génjei egy down-regulált dormanciát követően erős up-regulációba mennek át, majd a későbbiekben a szezon során visszaigazodnak egy alapállapothoz, mely az egyed általános energiaigényeit kielégíti.

A “C” klaszternél felülreprezentált GO funkciók (6. ábra) mindegyike a fehérjeszintézissel kapcsolatos (v2.5.17, Carbon és mtsai. 2009). Az ébredés utáni emelkedett expresszió segítheti az egyedek fehérje termelését. A jelenség okozója lehet, hogy az egyed le kényszerül cserélni a dormancia időszaka alatt elhasználódott fehérjeit és az eddig szüneteltetett metabolikus folyamatokat újra be kell indítsa. Az ezt követő visszaesés jelezheti, hogy az egyedek felépítették szükséges fehérje háztartásukat, amit a dormancia idejére az energiatakarékosság miatt leépítenek, összetételét megváltoztatták (MacRae 2010). A hímek és nőtények közötti elérés adódhat a fentebb említett hímeknél feltételezhető korábbi ébredésből, de feltételezhető az is, hogy az ivarok eltérő dormancia szabályozása áll az expressziós különbség hátterében (Constant és mtsai. 2023). A nőtények harmadik és negyedik időpontban tapasztalt magasabb és a hímek alacsonyabb génexpressziójára kézenfekvő magyarázat lehet a peterakás magas fehérje investíciója, ami egyszerre magyarázza a nőtények expressziós szintjének emelkedését és a hímek stagnálását (Donoughe 2022). Az ötödik időpontban történő párhuzamos expressziós szint emelkedés mindkét ivarban a dormancia előkészítése céljából történhet, ez az időpont ugyanis az aktív periódus végére esik. A fehérjeszintézishez szükséges elemek (például riboszóma) képzése több szempontból is fontos lehet a dormanciához. Egyfelől a dormanciához szükséges tartalék tápanyag egy része fehérje, ami kiemelt szerepet kap a dormancia későbbi szakaszaiban, illetve hipoxiás körülmények között (Wilsterman, Ballinger, és Williams 2021). Másfelől szerepe lehet a dormancia előkészítésében a fehérje expresszió kiépítésének, a chaperon fehérjék termelésének biztosítása. A chaperon fehérjék több kutatásban is megjelentek, mint a dormanciát szabályozó és a dormans állapot során a sejtet védő fehérjék (MacRae 2010; Quan és mtsai. 2018; Torson és mtsai. 2023). Lehetséges tehát, hogy a chaperon fehérjék dormancia előtti tömeges megtermeléséhez szükséges a szintetizáló rendszert kódoló gének emelkedett expressziója.

Eredményeink alapján a szezonális és az ivar együtt is befolyásolhatja a génexpressziós mintázatokat a nagyfejű csajkókban. Vizsgálatunk előnye, hogy természetes populáció egyedein, valós szezon hatása alatt vizsgáltuk a populáció génexpressziós mintázatait, az aktív periódus teljes hosszán. Teljes transzkriptom alapú elemzésünk kontextusában vizsgálta a

különböző géneket, ennek köszönhetően rávilágíthattunk, a sejtlegzés potenciális befolyásoltságára, a fehérje termelés igénybevételének ivaronként eltérő mintázatára és a szaglás érzékenységének lehetséges szezonális alakulására. Továbbá vizsgálatunk felvet a hímeknél egy adaptív viselkedéses jelleget, a korai ébredés meglétét, mely viselkedésökológiai, evolúcióbiológiai és populációdinamikai relevanciákkal bír.

Kutatásunk egyik limitációja a dormans időszak mintázottságának hiánya. A jövőbeni kutatásoknál érdemes a dormancia ideje alatt is több mintát venni, és megvizsgálni a dormancia során fellépő génexpressziós változásokat. Egy másik limitáció lehet, hogy a vizsgált egyedek eltérő mikrokörnyezete is befolyásolhatja génexpressziós mintázatukat. Ezekre a változatosságokra egy terepi vizsgálat során nehéz kontrollálni. Ezt a hiányosságot legkönnyebben az egy időpontban vett mintaszám emelésével lehetne eliminálni. Ezen kívül érdemes lehetne vizsgálni a szaglás fontosságát a nőstények viselkedésében, különösen az utódgondozás időszakában. Továbbá új vizsgálatoknak adhat teret a hímek feltételezett korábban ébredő viselkedéses jellege.

Eredményeink összességében segítettek feltárni a szezonális és az ivar közös hatását nagyfejű csajkók génexpressziójára. A géndúsulási vizsgálatok segítettek az eltérő mintázatok értelmezésében, új, potenciális viselkedéses jellegek prediktálásában, és betekintést engedtek egy komplex szabályozási rendszerbe, mely egy ízeltlábú faj dormanciája és aktív periódusa között zajlik.

VI. Összefoglalás

A környezet szezonális változásához az állatok eltérő stratégiák segítségével alkalmazkodnak. Egyik gyakori stratégia a dormancia, mely során az egyedek metabolizmusuk, életfolyamataik drasztikus redukálásával és viselkedésük megváltoztatásával vészelik át a kedvezőtlen időszakot. Egy másik stratégia az utódgondozás megléte, mikor a szülők saját erőforrásaikat az utódok túlélésének növelésébe fektetik. A szezon előrehaladtával az alkalmazott stratégiák váltják egymást, ami kiváló lehetőséget teremt ezek komplex vizsgálatára. Az egyedek génexpressziója jó indikátora lehet azoknak a háttérfolyamatoknak, melyek szerepet játszanak az egyedek viselkedésének kialakításában, és ezáltal az említett stratégiák szabályozásában is. Kutatásunk célja az volt, hogy nagyfejű csajkók természetes populációján vizsgáljuk a szezon hatását a génexpresszióra. Ennek érdekében teljes transzkriptom alapú differenciális génexpresszió analízist végeztünk. A génekhez funkcionális annotációt társítottunk. A differenciálisan expresszált géneket expressziós mintázatuk alapján klaszterekbe soroltuk, ezt követően a klaszterekben gendúsulási vizsgálatot végeztünk, hogy felmérjük az adott klaszterben felülreprezentált génontológiai funkciókat. Az elemzések során figyelembe vettük az egyedek ivarát is. A mindkét ivarban differenciálisan expresszáldott gének száma 4390 volt. Ezeket 41 klaszterbe rendeztük és kiválasztottunk három biológiailag releváns mintázatot és magas gén számot mutató klasztert, melyeket jelen tanulmányunkban részletesebben bemutattunk. Eredményeink bizonyították a szezon hatását nagyfejű csajkók természetes populációjának génexpressziójára és rámutatnak az ivar és szezon lehetséges interakciójára. Felmerült továbbá mindkét ivar esetében egy-egy viselkedéses jelleg meglétének lehetősége, melyek felderítésére további vizsgálatok szükségesek. Vizsgálatunk eredményei összhangban voltak a dormancia szabályozásával kapcsolatos szakirodalomban fellelhető eredményekkel és megerősítették azok érvényességét természetes populációkban is. A jövőben érdemesnek tartjuk folytatni az ehhez hasonló vizsgálatokat természetes populációkban, és javasoljuk a vizsgálat fejlesztését a dormancia időszaka alatt több mintavételi időpont kijelölésével.

VII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban dr. Nagy Nikoletta Andrea témavezetőmnek, aki szakmai tanácsaival, rendszeres konzultációval és szükséges ismeretanyagokkal segítette a diplomamunkám elkészülését. Ezeken felül figyelmével, türelmével és segítőkészségével is hozzájárult a munkafolyamat gördülékennyé tételéhez. Köszönet illeti továbbá a minták begyűjtése, az RNS kivonása, valamint a szekvencia adatok feldolgozása során végzett áldozatos munkájáért. A minták begyűjtéséért további köszönet illeti dr. Lévai-Kiss Johannát. Az RNS kivonásában nyújtott segítségéért szintén köszönet illeti Mester Valériát. Valamint köszönet Nagy Szabolcsnak a szekvencia adatok feldolgozásában nyújtott segítségéért. Köszönet illeti továbbá feleségemet Kozma Dorina Beátát, aki laikus szemléletével és támogatásával segítette a diplomamunkám megírását és érthetőbbé tételét.

VIII. Irodalomjegyzék

- Andrews, S. 2010. „Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data”.
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. 2010.
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Ashburner, Michael, Catherine A. Ball, Judith A. Blake, David Botstein, Heather Butler, J. Michael Cherry, Allan P. Davis, és mtsai. 2000. „Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology”. *Nature Genetics* 25 (1): 25–29.
<https://doi.org/10.1038/75556>.
- Bar-Joseph, Ziv, Anthony Gitter, és Itamar Simon. 2012. „Studying and Modelling Dynamic Biological Processes Using Time-Series Gene Expression Data”. *Nature Reviews Genetics* 13 (8): 552–64. <https://doi.org/10.1038/nrg3244>.
- Batley, Nick H. 2000. „Aspects of seasonality”. *Journal of Experimental Botany* 51 (352): 1769–80. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.352.1769>.
- Benjamini, Yoav, és Yosef Hochberg. 1995. „Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing”. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57 (1): 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
- Bolger, Anthony M., Marc Lohse, és Bjoern Usadel. 2014. „Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data”. *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Brazma, Alvis, és Jaak Vilo. 2000. „Gene expression data analysis”. *FEBS Letters, Functional Genomics*, 480 (1): 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01772-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01772-5).
- Carbon, Seth, Amelia Ireland, Christopher J. Mungall, ShengQiang Shu, Brad Marshall, Suzanna Lewis, the AmiGO Hub, és the Web Presence Working Group. 2009. „AmiGO: online access to ontology and annotation data”. *Bioinformatics* 25 (2): 288–89. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn615>.
- Chu, Xian, Minyan Wang, Zhengqi Fan, Jiyuan Li, és Hengfu Yin. 2024. „Molecular Mechanisms of Seasonal Gene Expression in Trees”. *International Journal of Molecular Sciences* 25 (3): 1666. <https://doi.org/10.3390/ijms25031666>.

- Constant, Théo, F. Stephen Dobson, Caroline Hahold, és Sylvain Giroud. 2023. „Trade-Offs in Dormancy Phenology in Endotherms and Ectotherms”. *eLife* 12 (november). <https://doi.org/10.7554/eLife.89644.1>.
- Denlinger, David L., Daniel A. Hahn, Christine Merlin, Christina M. Holzapfel, és William E. Bradshaw. 2017. „Keeping time without a spine: what can the insect clock teach us about seasonal adaptation?” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1734): 20160257. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0257>.
- Donoughe, Seth. 2022. „Insect egg morphology: evolution, development, and ecology”. *Current Opinion in Insect Science* 50 (április):100868. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.12.008>.
- Dufour, Paul, Sébastien Descamps, Stéphane Chantepie, Julien Renaud, Maya Guéguen, Katja Schiffrers, Wilfried Thuiller, és Sébastien Lavergne. 2020. „Reconstructing the Geographic and Climatic Origins of Long-Distance Bird Migrations”. *Journal of Biogeography* 47 (1): 155–66. <https://doi.org/10.1111/jbi.13700>.
- Fischer, David S, Fabian J Theis, és Nir Yosef. 2018. „Impulse model-based differential expression analysis of time course sequencing data”. *Nucleic Acids Research* 46 (20): e119. <https://doi.org/10.1093/nar/gky675>.
- Frantsevich, L., V. Govardovski, F. Gribakin, G. Nikolajev, V. Pichka, A. Polanovsky, V. Shevchenko, és V. Zolotov. 1977. „Astroorientation in *Lethrus* (Coleoptera, Scarabaeidae)”. *Journal of Comparative Physiology* 121 (2): 253–71. <https://doi.org/10.1007/BF00609615>.
- Füst, György, Zoltán Prohászka, és László Cervenak. 2003. „A hőszokkfehérjék immunológiai tulajdonságai és szerepük az érlelmeszedés keletkezésében”. 2003. <http://www.matud.iif.hu/03apr/fust.html>.
- Golding, Anita, Konstantin Shakhbazov, Anjali K. Henders, Allan F. McRae, Grant W. Montgomery, és Joseph E. Powell. 2015. „Seasonal Effects on Gene Expression”. *PLOS ONE* 10 (5): e0126995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126995>.
- Grath, Sonja, és John Parsch. 2016. „Sex-Biased Gene Expression”. *Annual Review of Genetics* 50 (Volume 50, 2016): 29–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035429>.
- Grolemund, Garrett, és Hadley Wickham. 2011. „Dates and Times Made Easy with Lubridate”. *Journal of Statistical Software* 40 (április):1–25. <https://doi.org/10.18637/jss.v040.i03>.

- Haas, Brian John. (2015) 2023. „TransDecoder”. Perl. TransDecoder.
<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>.
- Hahn, Daniel A., és David L. Denlinger. 2007. „Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization”. *Journal of Insect Physiology*, VIII European Congress of Entomology - Physiology and Endocrinology, 53 (8): 760–73.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.03.018>.
- Hand, Steven C. 1991. „Metabolic Dormancy in Aquatic Invertebrates”. In *Advances in Comparative and Environmental Physiology: Volume 8*, szerkesztette M. A. Castellini, B. Fiévet, S. C. Hand, R. Motais, B. Pelster, és R. E. Weber, 1–50. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75900-0_1.
- Hand, Steven C., David L. Denlinger, Jason E. Podrabsky, és Richard Roy. 2016. „Mechanisms of animal diapause: recent developments from nematodes, crustaceans, insects, and fish”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 310 (11): R1193–1211.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00250.2015>.
- Haverkamp, Alexander, Bill S. Hansson, és Markus Knaden. 2018. „Combinatorial Codes and Labeled Lines: How Insects Use Olfactory Cues to Find and Judge Food, Mates, and Oviposition Sites in Complex Environments”. *Frontiers in Physiology* 9 (február).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00049>.
- Hopkins, Ben R, és Artyom Kopp. 2021. „Evolution of sexual development and sexual dimorphism in insects”. *Current Opinion in Genetics & Development*, Developmental Mechanisms, patterning and evolution, 69 (augusztus):129–39.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.02.011>.
- Huber, Wolfgang, Vincent J. Carey, Robert Gentleman, Simon Anders, Marc Carlson, Benilton S. Carvalho, Hector Corrada Bravo, és mtsai. 2015. „Orchestrating High-Throughput Genomic Analysis with Bioconductor”. *Nature Methods* 12 (2): 115–21.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>.
- Jin, Wei, Rebecca M. Riley, Russell D. Wolfinger, Kevin P. White, Gisele Passador-Gurgel, és Greg Gibson. 2001. „The Contributions of Sex, Genotype and Age to Transcriptional Variance in *Drosophila Melanogaster*”. *Nature Genetics* 29 (4): 389–95.
<https://doi.org/10.1038/ng766>.
- Kim, Daehwan, Joseph M. Paggi, Chanhee Park, Christopher Bennett, és Steven L. Salzberg. 2019. „Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 and HISAT-

- Genotype". *Nature Biotechnology* 37 (8): 907–15. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>.
- Kiss, J., M. E. Rosa, R. Rácz, A. Kosztolányi, és Z. Barta. 2023. „Behavioural Repertoire and the Effect of Male Removal in a Geotrupid Beetle with Parental Care". *Journal of Zoology* 320 (3): 202–13. <https://doi.org/10.1111/jzo.13069>.
- Kosztolányi, András, Nikolett Nagy, Tibor Kovács, és Zoltán Barta. 2015. „Predominant Female Care in the Beetle *Lethrus Apterus* with Supposedly Biparental Care". *Entomological Science* 18 (2): 292–94. <https://doi.org/10.1111/ens.12123>.
- Král, David, Oliver Hillert, Dana Drožová, és Petr Šípek. 2013. „*Lethrus (Lethrus) schneideri* sp. n. (Coleoptera, Geotrupidae) from Greece". *ZooKeys*, sz. 339 (október), 93–106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.339.6132>.
- Lehmann, Philipp, Saija Piironen, Anne Lyytinen, és Leena Lindström. 2015. „Responses in Metabolic Rate to Changes in Temperature in Diapausing Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* from Three European Populations". *Physiological Entomology* 40 (2): 123–30. <https://doi.org/10.1111/phen.12095>.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, és Simon Anders. 2014. „Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2". *Genome Biology* 15 (12): 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- MacRae, Thomas H. 2010. „Gene Expression, Metabolic Regulation and Stress Tolerance during Diapause". *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (14): 2405–24. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0311-0>.
- McDermaid, Adam, Brandon Monier, Jing Zhao, Bingqiang Liu, és Qin Ma. 2019. „Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration". *Briefings in Bioinformatics* 20 (6): 2044–54. <https://doi.org/10.1093/bib/bby067>.
- McNamara, John M, és Alasdair I Houston. 2007. „Optimal annual routines: behaviour in the context of physiology and ecology". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363 (1490): 301–19. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2141>.
- Michener, Gail R. 1983. „Spring Emergence Schedules and Vernal Behavior of Richardson's Ground Squirrels: Why Do Males Emerge from Hibernation before Females?" *Behavioral Ecology and Sociobiology* 14 (1): 29–38. <https://doi.org/10.1007/BF00366653>.
- Michna, Agata, Herbert Braselmann, Martin Selmansberger, Anne Dietz, Julia Hess, Maria Gomolka, Sabine Hornhardt, Nils Blüthgen, Horst Zitzelsberger, és Kristian Unger.

2016. „Natural Cubic Spline Regression Modeling Followed by Dynamic Network Reconstruction for the Identification of Radiation-Sensitivity Gene Association Networks from Time-Course Transcriptome Data”. *PLOS ONE* 11 (8): e0160791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160791>.
- Miyazaki, Yosuke. 2023. „Circannual Rhythms”. In *Insect Chronobiology*, szerkesztette Hideharu Numata és Kenji Tomioka, 229–49. Singapore: Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-99-0726-7_11.
- Munley, Kathleen M., David M. Sinkiewicz, Sydney M. Szwed, és Gregory E. Demas. 2023. „Sex and seasonal differences in neural steroid sensitivity predict territorial aggression in Siberian hamsters”. *Hormones and Behavior* 154 (augusztus):105390. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2023.105390>.
- Nagy, Nikolett A., Zoltán Németh, Edit Juhász, Szilárd Póliska, Rita Rácz, Johanna Kiss, András Kosztolányi, és Zoltán Barta. 2021. „Inotocin, a Potential Modulator of Reproductive Behaviours in a Biparental Beetle, *Lethrus Apterus*”. *Journal of Insect Physiology* 132 (július):104253. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104253>.
- Nakanishi, Tomoaki, Takemichi Kaneda, és Kiyoshi Nakamuta. 2017. „Effects of Temperature on the Development and Circannual Control of Pupation in the Carpenter Moth, *Cossus Insularis* (Lepidoptera: Cossidae), Reared on an Artificial Diet”. *Applied Entomology and Zoology* 52 (1): 29–35. <https://doi.org/10.1007/s13355-016-0450-3>.
- Nueda, María José, Sonia Tarazona, és Ana Conesa. 2014. „Next maSigPro: updating maSigPro bioconductor package for RNA-seq time series”. *Bioinformatics* 30 (18): 2598–2602. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu333>.
- Öberg, Meit, Tomas Pärt, Debora Arlt, Ane T. Laugen, és Matthew Low. 2014. „Decomposing the Seasonal Fitness Decline”. *Oecologia* 174 (1): 139–50. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2763-z>.
- Pantano, Lorena. 2023. „DEGreport: Report of DEG analysis”. <http://lpantano.github.io/DEGreport/>.
- Parker, Darren J., Christopher B. Cunningham, Craig A. Walling, Clare E. Stamper, Megan L. Head, Eileen M. Roy-Zokan, Elizabeth C. McKinney, Michael G. Ritchie, és Allen J. Moore. 2015. „Transcriptomes of Parents Identify Parenting Strategies and Sexual Conflict in a Subsocial Beetle”. *Nature Communications* 6 (1): 8449. <https://doi.org/10.1038/ncomms9449>.

- Parker, Darren J., Tapio Envall, Michael G. Ritchie, és Maaria Kankare. 2021. „Sex-Specific Responses to Cold in a Very Cold-Tolerant, Northern *Drosophila* Species”. *Heredity* 126 (4): 695–705. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-00398-2>.
- Pertea, Geo, és Mihaela Pertea. 2020. „GFF Utilities: GffRead and GffCompare”. *F1000Research* 9 (szeptember):ISCB Comm J-304. <https://doi.org/10.12688/f1000research.23297.2>.
- Pertea, Mihaela, Geo M. Pertea, Corina M. Antonescu, Tsung-Cheng Chang, Joshua T. Mendell, és Steven L. Salzberg. 2015. „StringTie Enables Improved Reconstruction of a Transcriptome from RNA-Seq Reads”. *Nature Biotechnology* 33 (3): 290–95. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>.
- Quan, Guoxing, Jun Duan, William Fick, George Kyei-Poku, és Jean-Noël Candau. 2018. „Expression profiles of 14 small heat shock protein (sHSP) transcripts during larval diapause and under thermal stress in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (L.)”. *Cell Stress and Chaperones* 23 (6): 1247–56. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0931-0>.
- R Core Team. 2023. „R: A Language and Environment for Statistical Computing”. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Rapaport, Franck, Raya Khanin, Yupu Liang, Mono Pirun, Azra Krek, Paul Zumbo, Christopher E. Mason, Nicholas D. Succi, és Doron Betel. 2013. „Comprehensive Evaluation of Differential Gene Expression Analysis Methods for RNA-Seq Data”. *Genome Biology* 14 (9): 3158. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-9-r95>.
- Reppert, Steven M., és Jacobus C. De Roode. 2018. „Demystifying Monarch Butterfly Migration”. *Current Biology* 28 (17): R1009–22. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.067>.
- Robich, Rebecca M., Joseph P. Rinehart, Linda J. Kitchen, és David L. Denlinger. 2007. „Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization”. *Journal of Insect Physiology, Physiology of Vector Arthropods*, 53 (3): 235–45. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.08.008>.
- Rosa, Márta E., Zoltán Barta, és András Kosztolányi. 2018. „Willingness to Initiate a Fight but Not Contest Behaviour Depends on Intruder Size in *Lethrus Apterus* (Geotrupidae)”. *Behavioural Processes* 149 (április):65–71. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.02.004>.

- Salminen, Tiina S., Laura Vesala, Asta Laiho, Mikko Merisalo, Anneli Hoikkala, és Maaria Kankare. 2015. „Seasonal Gene Expression Kinetics between Diapause Phases in *Drosophila Virilis* Group Species and Overwintering Differences between Diapausing and Non-Diapausing Females”. *Scientific Reports* 5 (1): 11197. <https://doi.org/10.1038/srep11197>.
- Schwartz, Christine, és Matthew T. Andrews. 2013. „Chapter Nine - Circannual Transitions in Gene Expression: Lessons from Seasonal Adaptations”. In *Current Topics in Developmental Biology*, szerkesztette Ann E. Rougvie és Michael B. O'Connor, 105:247–73. Developmental Timing. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00009-9>.
- Somveille, Marius, Ana S. L. Rodrigues, és Andrea Manica. 2015. „Why Do Birds Migrate? A Macroecological Perspective”. *Global Ecology and Biogeography* 24 (6): 664–74. <https://doi.org/10.1111/geb.12298>.
- Spies, Daniel, és Constance Ciaudo. 2015. „Dynamics in Transcriptomics: Advancements in RNA-seq Time Course and Downstream Analysis”. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13 (január):469–77. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.08.004>.
- Spies, Daniel, Peter F Renz, Tobias A Beyer, és Constance Ciaudo. 2019. „Comparative analysis of differential gene expression tools for RNA sequencing time course data”. *Briefings in Bioinformatics* 20 (1): 288–98. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx115>.
- Stearns, Stephen C. 2000. „Life History Evolution: Successes, Limitations, and Prospects”. *Naturwissenschaften* 87 (11): 476–86. <https://doi.org/10.1007/s001140050763>.
- Torson, Alex S., Susan Bowman, Daniel Doucet, Amanda D. Roe, és Brent J. Sinclair. 2023. „Molecular signatures of diapause in the Asian longhorned beetle: Gene expression”. *Current Research in Insect Science* 3 (január):100054. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2023.100054>.
- Törönen, Petri, és Liisa Holm. 2022. „PANNZER—A Practical Tool for Protein Function Prediction”. *Protein Science* 31 (1): 118–28. <https://doi.org/10.1002/pro.4193>.
- Van Doren, Benjamin M., Greg J. Conway, Robbie J. Phillips, Glynne C. Evans, Graham C. M. Roberts, Miriam Liedvogel, és Ben C. Sheldon. 2021. „Human Activity Shapes the Wintering Ecology of a Migratory Bird”. *Global Change Biology* 27 (12): 2715–27. <https://doi.org/10.1111/gcb.15597>.
- Varpe, Øystein. 2017. „Life History Adaptations to Seasonality”. *Integrative and Comparative Biology* 57 (5): 943–60. <https://doi.org/10.1093/icb/ix123>.

- Vasantha, I. 2016. „Physiology of Seasonal Breeding: A Review”. *Journal of Veterinary Science & Technology* 07 (03). <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000331>.
- Verhulst, Simon, és Jan-Åke Nilsson. 2007. „The timing of birds’ breeding seasons: a review of experiments that manipulated timing of breeding”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363 (1490): 399–410. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2146>.
- Warnes, Gregory R., Ben Bolker, Lodewijk Bonebakker, Robert Gentleman, Wolfgang Huber, Andy Liaw, Thomas Lumley, és mtsai. 2024. „gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data”. <https://CRAN.R-project.org/package=gplots>.
- West, Alexander C, és Shona H Wood. 2018. „Seasonal physiology: making the future a thing of the past”. *Current Opinion in Physiology, Circadian Rhythms*, 5 (október):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.04.006>.
- Wickham, Hadley, Mara Averick, Jennifer Bryan, Winston Chang, Lucy D’Agostino McGowan, Romain François, Garrett Grolemond, és mtsai. 2019. „Welcome to the Tidyverse”. *Journal of Open Source Software* 4 (43): 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.
- Wilsterman, Kathryn, Mallory A. Ballinger, és Caroline M. Williams. 2021. „A Unifying, Eco-Physiological Framework for Animal Dormancy”. *Functional Ecology* 35 (1): 11–31. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13718>.
- Winger, Benjamin M., Giorgia G. Auteri, Teresa M. Pegan, és Brian C. Weeks. 2019. „A Long Winter for the Red Queen: Rethinking the Evolution of Seasonal Migration”. *Biological Reviews* 94 (3): 737–52. <https://doi.org/10.1111/brv.12476>.
- Wolda, H. 1988. „INSECT SEASONALITY: WHY?” *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 19 (Volume 19, 1988): 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.000245>.
- Wright, Kristina, Ka Ming Nip, Ji Eun Kim, Kimberly M. Cheng, és Inanc Birol. 2022. „Seasonal and Sex-Dependent Gene Expression in Emu (*Dromaius Novaehollandiae*) Fat Tissues”. *Scientific Reports* 12 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13681-5>.
- Wright, Peter J., és Edward A. Trippel. 2009. „Fishery-Induced Demographic Changes in the Timing of Spawning: Consequences for Reproductive Success*”. *Fish and Fisheries* 10 (3): 283–304. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00322.x>.

- Yu, Guangchuang, Li-Gen Wang, Yanyan Han, és Qing-Yu He. 2012. „clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters”. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 16 (5): 284–87. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.
- Zhang, Zong Hong, Dhanisha J. Jhaveri, Vikki M. Marshall, Denis C. Bauer, Janette Edson, Ramesh K. Narayanan, Gregory J. Robinson, és mtsai. 2014. „A Comparative Study of Techniques for Differential Expression Analysis on RNA-Seq Data”. *PLOS ONE* 9 (8): e103207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103207>.