

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Neurogenetika, mint a neurobiológiai kutatások új iránya: peptiderg neuronhálózatok vizsgálata transzgenikusan módosított ecetmuslicában

Karsai Gergely

Biológia MSc I.

Pécsi Tudományegyetem

Témavezetők:

Dr. Pollák Edit, Phd

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETŐ.....	4
ÁLTALÁNOS LEÍRÁS.....	4
SZAPORODÁS	4
NEMI DIMORFIZMUS	4
A MUSLICA GENETIKAI MANIPULÁLHATÓSÁGA	5
A FLIP-OUT TECHNIKA	5
GFP	6
SZINAPSZIS	7
FASCICLIN 2	7
NEUROPEPTIDEK.....	7
CCAP PEPTID	10
CCAP IMMUNHISZTOKÉMIA	11
PROBLÉMAFELVETÉS.....	13
CÉLKITŰZÉS.....	14
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
A KÍSÉRLETI ÁLLATOK TARTÁSA	15
TÖRZSEK	15
A KÍSÉRLETI ÁLLATOK ELŐKEZELÉSE (FLIP-OUT PROTOKOLL)	15
A KÍSÉRLETI ÁLLATOK BONCOLÁSA	16
A SZÖVETMINTA FIXÁLÁSA	16
FLUORESZCENS IMMUNHISZTOKÉMIA.....	16
KONFOKÁLIS MIKROSZKÓPOS FOTÓDOKUMENTÁCIÓ, KÉPFELDOLGOZÁS	17
EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....	18
A RÁK SZÍVMŰKÖDÉST SERKENTŐ PEPTID (CCAP) TARTALMÚ NEURONOK MORFOLÓGIÁJA	18
<i>Fluoreszcens mikroszkópia.....</i>	<i>18</i>
<i>Konfokális mikroszkópia</i>	<i>18</i>
<i>CCAP kimutatása cd8.GFP-vel.....</i>	<i>18</i>
<i>A CCAP-termelő sejtpopuláció anatómiai leírásának további finomítása a flip-out technika segítségével.</i>	<i>22</i>
<i>Pre- és posztzinaptikus markerek eloszlása a CCAP-neuronok rosthálózataiban.....</i>	<i>27</i>
ÖSSZEFOGLALÁS.....	30
IRODALOMJEGYZÉK.....	31
"NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ"	33

Rövidítések jegyzéke

A1-9 = abdominális szegmensek

BSA = szarvasmarha szérum albumin

CCAP = rák szívműködést serkentő peptid (Crustacean cardioactive peptide)

CCAP-EN = CCAP efferens neuronok

CCAP-IN = CCAP interneuronok

cDNS = az RNS-ről reverz transzkripcióval készülő DNS

CI = centro-intermediális rostok

DL = dorzolaterális rostok

DM = dorzomediális rostok

DNS = deoxiribonukleinsav

Fas2 = Fascilin 2 fehérje

GAL4 = élesztő transzkripció faktor génje

GFP = zölden fluoreszkáló fehérje (green fluorescent protein)

IR = immunreaktív

KIR = központi idegrendszer

L1/L2/L3 = lárva fejlettségi stádiumok

PBS = NaCl-tartalmú foszfát puffer

PBT = NaCl-tartalmú foszfát puffer Triton-X 100 detergenssel

PFA = paraformaldehid oldat

SEG = garatalatti dúc

TX = Triton-X 100

T1-3 = Thorakális szegmensek

UAS = Upstream Activation Sequence

Va = ventrális helyzetű neuroszekréciós abdominális sejtek

VL = ventrolaterális rostok

VM = ventromediális rostok

Bevezető

Általános leírás

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) a rovarok (Insecta) osztályán belül a kétszárnyúak (*Diptera*) rendjébe tartozik. Eredetileg trópusi és szubtrópusi faj, de mára már az emberrel együtt az egész világban elterjedt. A hideget házakban vagy hibernálva vészeli át.

Már nagyon korán a laboratóriumi kísérleti állatok körébe került. Először William Ernest Castle használta modellállatként 1901-ben a beltenyésztés hatásainak vizsgálatára. A *Drosophila* laboratóriumi alkalmazásában az igazi áttörés Thomas Hunt Morgan nevéhez kötődik, aki a kromoszóma leírásával kapcsolatos, *Drosophilában* folytatott kutatásaiért 1933-ban orvosi Nobel-díjat kapott.

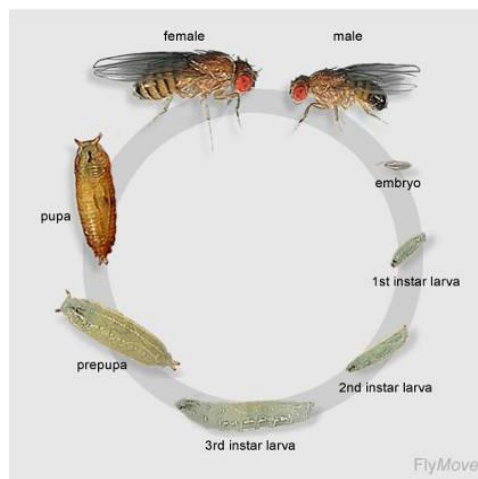
Az ecetmuslicának több olyan előnyös tulajdonsága is van, ami közrejátszott abban, hogy ilyen széles körben elterjedt modellorganizmussá vált. Laboratóriumi körülmények közt rendkívül költséghatékonyan tartható. Még a legegyszerűbb táptalajokon is. Nem igényel sok helyet, és törődést: az állatokat elegendő 1-2 hetente friss táptalajra átoltani.

Szaporodás

A faj életciklusának hossza és szaporodásának menete szintén nagyon előnyös a kutatók számára. A nőtények naponta 100 petét is rakhatnak [Reeve (2001)]. A fejlődés ütemét a környezet hőmérséklete szabja meg. A teljes átalakulás 25 °C-on 10 nap alatt megy végbe [Golic és Hawley (2005), Ashburner és Wright (1978)]. A megtermékenyítést követően a petékből kb. 24 óra múlva első stádiumos lárvák (L1) kelnek ki, melyek 2-3 nap leforgásával második stádiumos lárvákká (L2) vedlenek. Ezt még 2 nap és egy vedlés követi. Ekkor jelennek meg a harmadik stádiumos lárvák (L3), melyek még további két napig a táptalajban élnek és ott szabadon mozognak. A bebábozódás előtt a lárvák a táptalajból a tárolóedény falára másznak ki, ahol bebábozódnak. Az ezt követő 9.-10. napon kelnek ki a kifejlett egyedek. Ezek az elkövetkező 6-8 órában még nem képesek szaporodni, mert a hímek kitines nemi szerve még nem keményedett meg, és ez által nem alkalmas a megtermékenyítésre (1. ábra) [Ralph (1997)].

Nemi dimorfizmus

A hímek és nőtények könnyen megkülönböztethetőek egymástól, ami nagyban megkönnyíti a keresztezések végrehajtását. A két nemet legkönnyebben a nemi szervük alapján különíthetjük el: a hímeknek sötétebb színű, barnás nemi szervük van, míg a nőtényeken csak egy fejletlen tojócső látható. A hímek általában kisebbek és karcsúbb potrohkal rendelkeznek, mint a nőtények, továbbá a potroh utolsó két háti lemeze (tergitje) teljesen fekete, míg a nőtényekké kevésbé pigmentált (2. ábra).



1. ábra. A *Drosophila melanogaster* életciklusa. A teljes átalakulás három lárvállapon keresztül történik.



2. ábra. Az ecetmuslica nemi dimorfizmusából adódó fenotípusos különbségek. Méretbeli különbség (A), a potroh pigmentáltsága és a nemi szervek különbsége (B) és a szexfésű megléte/hiánya (C).

Frissen kikelt egyedeken, ahol a kitinpáncél még nem keményedett meg, ezek a jegyek talán nem olyan szembetűnőek. Ilyenkor a nemek megkülönböztetésére az úgynevezett „szexfésű” használható, mely a hímek első pár lábán található, és már vedlés után erősen elüt az állat színétől, egyértelműen fekete (2. C ábra).

A muslica genetikai manipulálhatósága

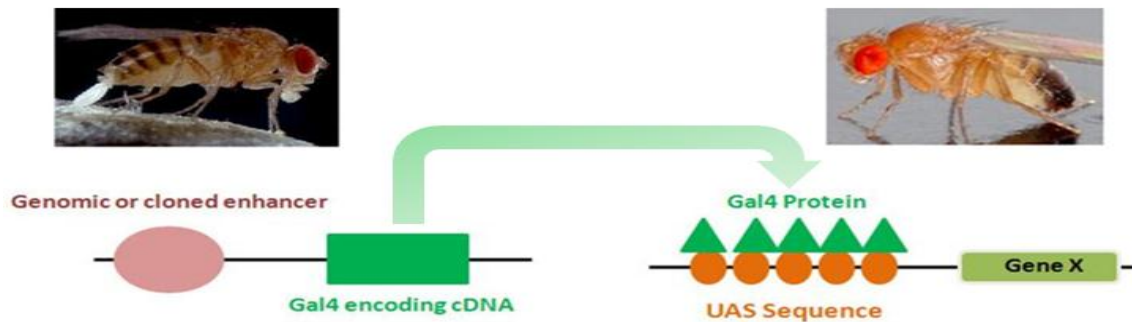
A *Drosophila* teljes genomját 2000-ben publikálták. A munka során összesen 139.731.881 bázispárt szekvenáltak meg és kb. 13.600 különböző gént azonosítottak [Adams és mtai.(2000)]. Ennek eredményeként a muslica géneit célzottan tudjuk manipulálni és ma már számos mesterséges génkonstrukció szabadon elérhető (Bloomington Flycenter).

Elterjedt genetikai manipulációs eszköz a GAL4/UAS-rendszer, amivel az általunk kiválasztott és klónozott géneket szövet- vagy sejtspecifikusan fejeztethetjük ki [Phelps (1998)]. A GAL4 egy élesztő-specifikus gén, ami egy gyenge promóter hatása alatt áll, és a transzkripció faktor szerepű GAL4 fehérjét kódolja. A GAL4 fehérje specifikusan köt az UAS (Upstream Activation Sequence) szekvenciához, ami által egy „downstream” helyzetű célgén (riporter gén) aktiválódik. Ez lehet egy általunk vizsgált gén vagy egy általunk kifejeztetni kívánt fehérje mesterségesen beillesztett génje is (pl. CCAP peptid, szinaptikus markerfehérjék, GFP). Transzpozonok segítségével a GAL4-konstrukció behelyezhető egy enhancer régió és egy másik, sejt-/szövetspecifikus gén közé, ez esetben az adott gén és a GAL4 gén is aktiválódik. Ezt az eljárást nevezik „enhancer trapping” módszernek. A GAL4/UAS-rendszer ez esetben két muslica törzs keresztezésével jön létre. Az egyik törzsben a GAL4 konstrukció (ez a „meghajtó”) található a szövetspecifikusan kifejeződő gén és az enhancer között, a másik törzs tartalmazza a „meghajtott”) UAS-konstrukciót, amelyhez a kifejeztetendő riporter gént kapcsoljuk. Az utódok minden sejtjében megtalálható lesz mind a GAL4, mind az UAS-konstrukció, de az UAS után kapcsolt gén csak azokban a sejtekben lesz aktív, ahol a GAL4 gén is aktív. Ennek a rendszernek a specificitása mellett még az is előnye, hogy rendkívül sok GAL4 vonal ismeretes (3. ábra) [Duffy (2002)].

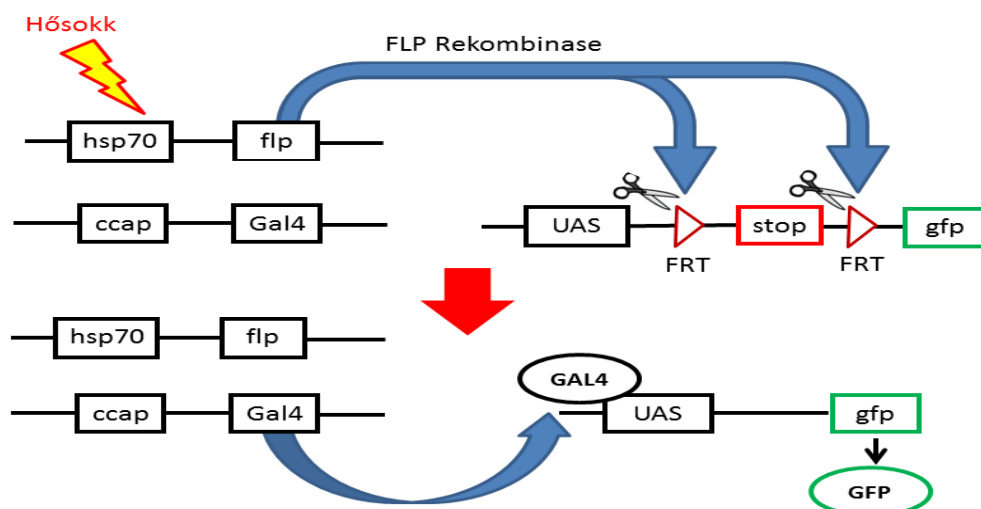
A flip-out technika

Az enhancer trapping módszerhez hasonlóan marker fehérjéket fejeztetünk ki, azonban az enhancer trapping módszerrel ellentétben, amikor is minden sejt expresszálja a beépített markert, a flip-out technikával mi magunk kontrollálhatjuk, mely sejtek fejezzék ki a markert. Ezt a hőszokk aktivált flipáz-rekombináza segítségével érhetjük el úgy, hogy a marker fehérjét kódoló gén elé egy stop kazettát építünk be, így az normál körülmények között nem expresszál. Ha az állatokat hőhatásnak tesszük ki, amelynek során a hőszokk fehérje promótere aktiválódik, akkor az utána beépített flipáz enzimet kódoló gén is átíródik, amely a stop kazetta körül elhelyezett flipáz

felismerő régiók mentén hasít. Ennek köszönhetően a stop kazetta eltávolítható, így a marker kifejeződik. A flipáz enzim csak a mitózisban, illetve közvetlenül a mitózis utáni fázisban lévő sejtekben képes eltávolítani a stop kazettát. Így a hőkezelés időzítésével tudjuk kontrollálni, hogy mely sejtek szálaljanak meg és melyek ne (4. ábra) [Wong és mtsai. 2002]. Mivel a fejlődő állatban számos intenzíven osztódó sejtet találunk, így az egyes sejtpopulációkon belül egy időben egyszerre több sejt is érzékeny fázisban lehet. Azonban megfelelő, azaz könnyen vizualizálható morfológiai marker ko-expresszáltatásával megkönnyíthető a vizsgálatra alkalmas minták hőkezelés utáni kisselektálása. Ideális esetben a flip-out módszerrel képesek vagyunk egy adott sejtpopuláción belül a sejteket egyenként „megszólaltatni”.



3. ábra. A hím által hordozott szövetspecifikus enhancer kontroll alatt lévő GAL4 gén által kódolt GAL4 fehérje specifikusan kapcsolódva az UAS szekvenciához aktiválja az utána kapcsolt gént is [Duffy (2002)].



4. ábra. Flip-out technika. Az UAS szekvencia és a riporter gén között beépített stop kazetta megakadályozza a riporter gén átíródását. A hőkezelés hatására aktiválható flipáz rekombináz (flp) a számára specifikus hasítási helyeken (FRT) vág, így a stop kazetta eltávolítható és a riporter fehérje expresszálódhat [módosítva Wong és mtsai 2002].

GFP

A zölden fluoreszkáló fehérje (GFP) egy természetes eredetű, 238 aminosavból álló fehérje (26,9 kDa), mely kék fényrel történő megvilágítás hatására zöld fényt bocsájt ki. Több tengeri élőlény szintetizálja, elsőként az *Aequorea victoria* csendes-óceáni medúzából izolálták [Shimomura és mtsai (1962), Shimomura (2005)]. 1992-ben Douglas Prasher izolálta, klónozte és szekvenálta meg a GFP cDNS-ét [Prasher (1992)]. Két évvel később, 1994-ben, Prashernek sikerült először a GFP-t más fehérjék kifejeződésének követésére alkalmaznia. Módszere pár évvel később már standard eljárásnak számított a sejtbiológiában. Igazi jelentősége abban rejlik, hogy az enhancer trapping módszerrel kifejeztetett fehérjék megjelenését a számunkra érdekes sejtekben direkt fluoreszcens megvilágítást követően láthatóvá tehetjük akkor, ha a GFP fehérjét együtt fejeztetjük ki a vizsgált fehérjével [Chalfie és mtsai. (1994)].

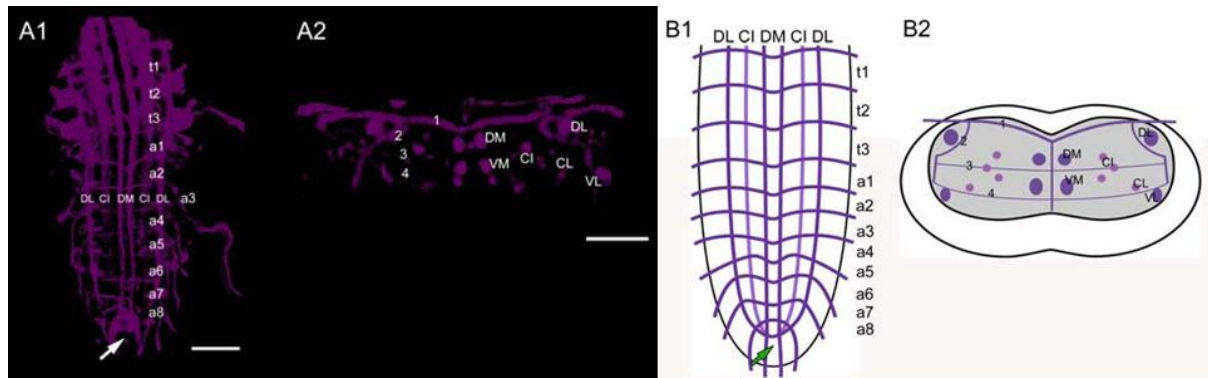
Szinapszis

Az idegrendszer morfológiai alapegységét képező neuronok között létrejövő fizikai kapcsolatokat nevezzük szinapszisnak. Ennek klasszikus típusában kémiai hírvivő molekulák által történik az információ továbbítása. A szinapszis két fő részből áll: a kimeneti –preszinaptikus -felszínből, ahol az információt hordozó molekulák felszabadulnak, és a bemeneti – posztzinaptikus - felszínből, ahol a felszabadult kémiai hírvivők a számukra specifikus receptorokon kötődnek és kiváltják a megfelelő választ (**6. ábra**).

Az ecetmuslica genetikai adottságai miatt az elmúlt években fontos szerepet töltött be a neuronális hálózatok kutatásában, így például számos genetikailag beépíthető és a be- és kimeneti felszínek membránjain kifejezethető szinaptikus markert, illetve általános membránmarker genetikai konstrukcióját fejlesztették ki (pl. synaptobrevin, synaptotagmin, CD8). Ezek a fúziós fehérjék két komponensből állnak: egyrészt a vizsgálandó sejt-kompartmenthez köthető fehérjéből, másrészt a hozzá kötött markerből, ami az esetek nagy részében valamilyen fluoreszcens fehérje [Nicolai és mtsai. (2010)].

Fasciclin 2

A muslica központi idegrendszerében a különböző neuronhálózatokban az egyes elemek egymáshoz viszonyított helyzetének összehasonlításához szükségessé vált egy olyan rendszer felállítása a neuropilben, amihez viszonyítva a későbbiekben vizsgált és azonosított struktúrák leírhatóak. Egy ilyen, anatómiailag behatárolható rostok helyzetén alapuló hálózat már született a *Drosophila* KIR kutatás során [Murphey és mtsai. (1989), Merritt és Murphey (1992)]. Ez a rendszer azonban kifejlett állatban készült, így használhatósága limitált. Ennek a problémának a megoldására a Matthias Landgraf által 2003-ban publikált fasciclin-rendszer szolgál. A fasciclin 2 az immunglobulinok családjába tartozik, egy, az axonnövekedés irányításában szerepet játszó sejtadhéziós molekula. A Landgraf kutatócsoportja által kidolgozott módszer a fasciclin 2-IR elemek térbeli elhelyezkedésén alapszik. A fasciclin 2-IR struktúrák eloszlása egyenletes és változatlan a vizsgált egyedek közt, ezért alkalmas a KIR neuropiljének a felosztására. Landgraf rendszerét a Fas2-IR struktúrák feltárásán túl a korábban alkalmazott egyéb általános morfológiai bélyegek figyelembe vétele alapján alkotta meg. A hosszanti lefutású rostokat az elhelyezkedésük alapján betűkkel jelölte, dorzoventrális viszonylatban a D=dorzális; C=centrális; V=ventrális jelöléseket, mediolaterális viszonylatban pedig az M=mediális; I=intermediális; L=laterális jelöléseket alkalmazta. Az öt transzverzális rostköteget (commissurákat) 1-től 5-ig számozta, a számozást dorzális oldalról kezdte (**5. ábra**) [Landgraf és mtsai. (2003)].



5. ábra. *Drosophila* L3 lárva hasdúcáról készült (**A1,2**) Fas2-IR struktúrák és (**B1,2**) a felvételek alapján készült sematikus ábra [Santos (2007)].

Neuropeptidek

A neuropeptidek olyan kis molekulájú jelző anyagok, amelyeknek igen sokrétű a gerinctelen szervezetben kifejtett hatása. A neuropeptidek szerepüket tekintve lehetnek neurotranszmitterek, neuromodulátorok és neurohormonok is, neuropeptideket termelhetnek neuroszekréciós sejtek és interneuronok is. Hatásukat egyszerre több támadásponton is képesek kifejteni. A vizsgálatok a mai napig elsősorban a neurohormonként működő peptideket célozzák, mert ezek tesztelése könnyen kivitelezhető [Holman és mtsai. (1990), Gäde és mtsai. (1997)]. Nagy számuk, változatos kémiai természetük, és nem utolsósorban gyakorlati jelentőségük miatt

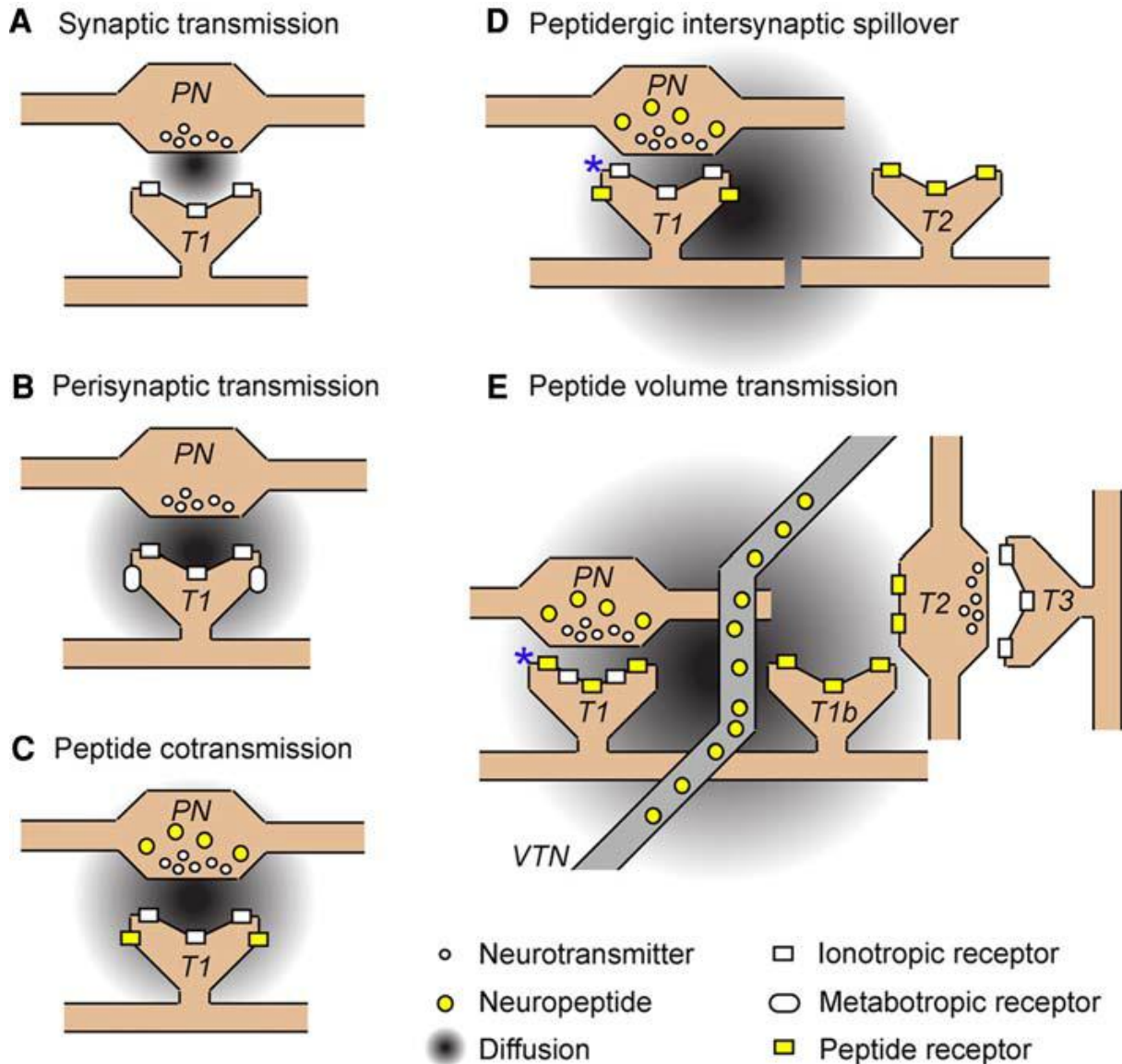
a neuropeptidek besorolásának ma leginkább elterjedt csoportosítása a funkcionális alapon történő felosztás. Így a gerinctelen neuropeptidek közt négy különböző csoportot különíthetünk el: a növekedésre és fejlődésre, a szaporodásra, az anyagcserére és nagyrészt az izommozgások befolyásolásán át a viselkedésre ható neuropeptideket [Fónagy (2005)] (1. táblázat).

Funkció	Neuropeptid	Elsődleges hatás	Szerkezet
Növekedés és fejlődés	Bom-PTTH (monomer)	Az ekdizon-bioszintézist serkenti az előtöri mirigyben	GNIQVENQAIPDPCTCKYKEIEDLGENSEVPRFIETRN-CNKTQOPTCRPPYICK ESLSYITILKRRETKSQESLEIPN-ELKYRWVAESHVPVSVACLCTRDYQLYNNN
	A-lánc: Bombyxin-II	A glikogén- és trehalózsint csökken	GIVDECCLRPCSVVDVLLSYC
	A-lánc: humán inzulin	A vércukorszint csökken	GIVEQCCTSIICSLYQLENYCN
	Mas-AT	A JH-szintézis serkentése	GFKNVEMMTARGFamid
	Mas-AST	A JH-szintézis gátlása	pQVRFRQCYFNPISCF
	Dip-AST-1=Pea-AST-1	A JH-szintézis gátlása	LYDFGLamid
	Dip-AST-2=Pea-AST-2	A JH-szintézis gátlása	AYSYSVEYKRLPVYNFLamid
	Mas-EH	A vedlés részfolyamatait, a potroh motoros neuronjait serkenti	NPAIATGYDPMIEICIENCAQCKKMLGAWFEG-PLCAESCIFKFKGLIPECEDFASIAFPLNKL
	Bom-MRCH-I(=PBAN-I)	A melaninképződést serkenti	LSEDMPATPADQEMYQPDPEEMESRTRYFSPRLamid
	Bom-DH	Embrionális diapauzát indukál	TDMKDESDRGAHSERGALCFGPRLamid
Szaporodás	Lom-OMP (kétféle izoform)	Az ováriumfejlődést serkenti	YYEAPPDGRHLLQAPAPAPAPAP(A/S)PASWPH-QORRQALDEFAAAAAAADAQFQDEEDGGRRV
	Aea-OEH	Az ovárium ekdizontermelését serkenti	OPTNVLEIRCKLYSGPAVONTGECVHGAELNPGCKLSCLKGVG-DKCGESTAGIIMSGKASGLMCCGGQCVGCKNGICDHRLCPPRL
	Lyd-TE	A herék ekdizontermelését serkenti	ISDFDEYEPLNDADNNEVLDF
	Aea-TMOF	A tripszinaktivitást gátolja	YDPAPPPPPP
	Neb-kolloosztatin	A pete szikbeépülését gátolja	SIVPLGLPVPVIGVGR
	Hez-PBAN	A feromonszintézist serkenti	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRKYFSPRLamid
Metabolizmus és homeosztázis	Lom-AKH-I	A lipidmobilizációt serkenti	pQLNFTPNWGTamid
	Mas-AKH	A lipidmobilizációt serkenti	pQLFTSSWGamid
	Pea-CAH-I	Szívfrekvencia-fokozó	pQVNFSPNWamid
	Hez-HrTH	Trehalózsintet fokozó	pQLTFSSGWGNamid
	Mas-DP-I	A folyadékiválasztást serkenti	RMPSLSIDLPMSVLRQKLSLEKERVHALRAAANRNFLNDIamid
	Patkány-CRF	Az ACTH-termelést serkenti	EEPPISLDLTFHLLREVLAMARAEQLAQQAHSNRKLMellamid
	Lom-AVP-DP	A folyadékiválasztást serkenti	CLITNCPRGamid CLITNCPRGamid CYFQNCPRGamid
	Gerinces-AVP	A vér-agy gát permeabilitását serkenti	
	Lom-neuroparsin	Antidiuretikus hatású a végbélben	NPISRSCEGANCVDLTRCEYGDVTDFFGRKVCAGKPGDKC-GGPYELHGKCGVGMDCRCGLCSGCSLHNLQCFEFGGLPSSC
Izommozgások	(Pea)-Proktolin	Általános izomserkentő	RYLPT
	Mas-CAP	A szív működését serkenti	pQLYAFPAamid
	Lom-TK-I	A visceralis izmok serkenti	GPSGFYGVRamid
	Emlős Substance P	Bélsimaizom-serkentő stb.	RPKPQOFFGLMamid
	Lem-M-I	A visceralis izmok serkenti	DPAFNSWGamid
	Lem-PK	A visceralis izmok serkenti	pQTSFTPLRamid
	Lem-SK-I	A visceralis izmok serkenti	EQFEDY(SO ₃ H)GHMRFamid
	Gerinces-CCK	A bélmozgás és a pankréáz enzim szekréciós serkentője	DY(SO ₃ H)MGWMDFamid
	Lom-MIP	Mioinhibitor hatású	AWQDLNAGWamid
	Lom-FaRP	Mioinhibitor hatású	GOERNFLRFamid
	Neb-MS (FaRP)	Mioszuppresszív hatású	TDVDHVFLRFamid
	Puhatestű-FMRF	Motoros neuronok gátlása	FMRFamid

1. táblázat: A legfontosabb és legismertebb rovar-neuropeptidek bemutatása a tanulmányban vázolt csoportosítás alapján. (Dőlt betűkkel néhány, a felette található rovarhormonnal rokonságot mutató, ismert, de nem rovar eredetű neuropeptid.) A vastagított karakterek az azonos aminosavakat vagy rokon vegyületeket, illetve hasonló végződéseket emelik ki. Aminosav kódok: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr.

A neuronális információ-továbbítást különböző típusú vegyületek mediálják; ezek közül a klasszikus neurotranszmitterekről tudunk a legtöbbet, típusaik, biokémiájuk és hatásmechanizmusai egyaránt jól ismertek. A neuropeptidek viselkedése még kevésbé feltárt, de így is számos eltérés ismeretes. A neuropeptidek többnyire nagyméretű, ún. dense core vezikulákba csomagolódnak, és gyakran nem pre-, hanem periszinaptikusan halmozódnak, felszabadulásukhoz pedig a membrán nagyobb mértékű depolarizálódására van szükség, mint a klasszikus neurotranszmitterek esetén. Azoktól eltérően azonban gyakran jellemző rájuk az extraszinaptikus, kis kvantumokban történő felszabadulás is. A peptidek hatótávolsága nem korlátozódik olyan mértékben a

felszabadulás helyére, mint a klasszikus neurotranszmittereké: akár a környezetükben lévő más szinapszisokra is hatással lehetnek. Ez különösen igaz olyan esetekben, amikor felszabadulásuk nem szinaptikusan történik. Ebben az esetben egy sajátos parakrin felszabadulási folyamatról beszélünk („volume transmission”), mely során a peptid molekulák a diffúziós paraméterektől függően akár több tíz mikrométer távolságban lévő receptorhoz is kötődhetnek. Ennek a folyamatnak a szabályozásában a peptidkihipólás, a specifikus peptidázok, valamint a gliasejtek vesznek részt. Mindezeknek a tulajdonságaiknak köszönhetően a neuropeptidek valószínűsíthetően kulcsszerepet töltenek be az idegrendszer működésének a finomhangolásában (6. ábra) [Nässel, D.R. (2009)].



6. ábra. Nem-peptiderg és peptiderg szinaptikus transzmisszió típusainak sematikus összehasonlítása a KIR neuronhálózataiban. Az ábrák a neurotranszmitterek és neuropeptidek hatótávolságát szemléltetik a különböző szinaptikus elrendezésekben. (A) Egy egyszerű szinapszisban a preszinaptikus neuron (PN) egy klasszikus transzmitter molekuláit szabadítja fel a szinaptikus résbe, ahol azok specifikus ionotrop receptorokhoz kötődnek a vele szomszédos célneuron (T1) posztzinaptikus felszínén. A felesleges transzmitter a szinaptikus résből membrántranszporterekkel keresztül távozik, vagy extracelluláris enzimek segítségével inaktíválódik. (B) A neurotranszmitter kidiffundálva a szinaptikus résből a posztzinaptikus neuron(T1) felszínén lévő periszinaptikus helyzetű metabotrop receptorokhoz is kötődhet. Előfordul, hogy periszinaptikusan metabotrop receptorokat találunk a preszinaptikus neuronon (PN) is. (C) A preszinaptikus profilban a neurotranszmitterrel együtt dense core vezikulákba csomagolt neuropeptid is felhalmozódhat. A peptidfelszabadulás valószínűsíthetően periszinaptikusan történik és a szintén periszinaptikus G-proteinhez kötött receptorokhoz (GPCR) kötődik. A peptidfelszabaduláshoz feltehetően a preszinaptikus felszín nagyobb mértékű depolarizációjára van szükség,

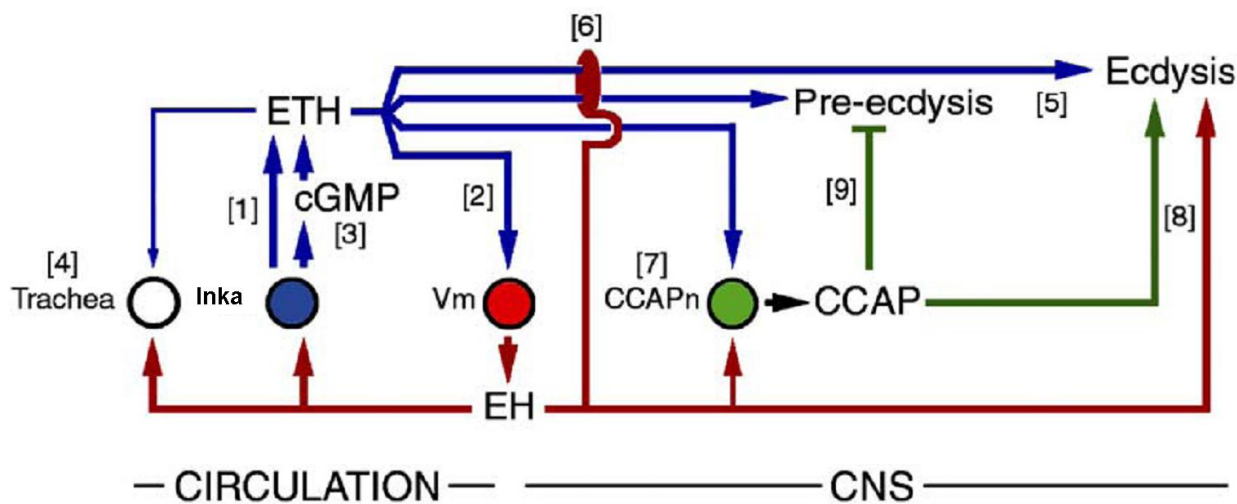
mint neurotranszmitterek esetén. **(D)** A szinaptikus peptidfelszabadulás „túlcsordulhat” a szinaptikus résen, és akár több közeli célneuronig (T1, T2) is diffundálhat. Az aktív peptid különböző célneuronokhoz való eljutását valószínűleg a különböző helyekhez kötött proteolitikus peptidázok (kék csillag) korlátozzák. Így az is előfordulhat, hogy T1 kevesebb ideig lesz az aktív peptid hatása alatt, mint T2. **(E)** A „volume transmission” (parakrin felszabadulás) lehetőséget ad arra, hogy a neuroaktív anyagok a neuropilben nagy távolságokra diffundáljanak. Itt egy nem szinaptikus neuropeptid felszabadulást (VTN) láthatunk. Egy peptid hatását a célsejten található rokon receptorok távolsága határozza meg, a peptid a távolság hatására kihígulhat vagy membránhoz kötött peptidázok által inaktiválódhat. Ebben az esetben a diffundáló peptid különböző célpontokra is hatással lehet (T1-T2): peptid ko-transzmisszió T1-nél, peptid hatás egyazon neuron más részén (T1b), preszinaptikusan a T2-n. [Nässel, D.R. (2009)]

A muslica kisszámú neuronjai és genetikai manipulálhatósága miatt a neurobiológia kedvelt alanya. Bár idegrendszere öt nagyságrenddel kisebb, mint a gerinceseké, ennek ellenére sok tekintetben hasonló változatosságot mutat. Ami a *Drosophilát* a neuropeptid kutatásban tette érdekessé a neurobiológusok számára, az az a tény, hogy azon peptiderg neuronok száma, melyek egy adott neuropeptid gént expresszálnak, viszonylag alacsony (kettő és pár tucat közt van). Ez leegyszerűsíti az egyes neuronpopulációk tanulmányozhatóságát. Eddig *Drosophilában* 31 neuropeptid gént azonosítottak [Taghert és Veenstra (2003)], ezek feltehetően közel 60 peptidet kódolnak, ebből 41-et már kémiai is beazonosítottak [Taghert és Veenstra (2003), Predel és mtsai. (2004), Baggerman és mtsai. (2005), Wegener és mtsai. (2006)].

Kutatásunk során a *Drosophilában* is előforduló rák szív működést serkentő peptiddel foglalkoztunk behatóbban.

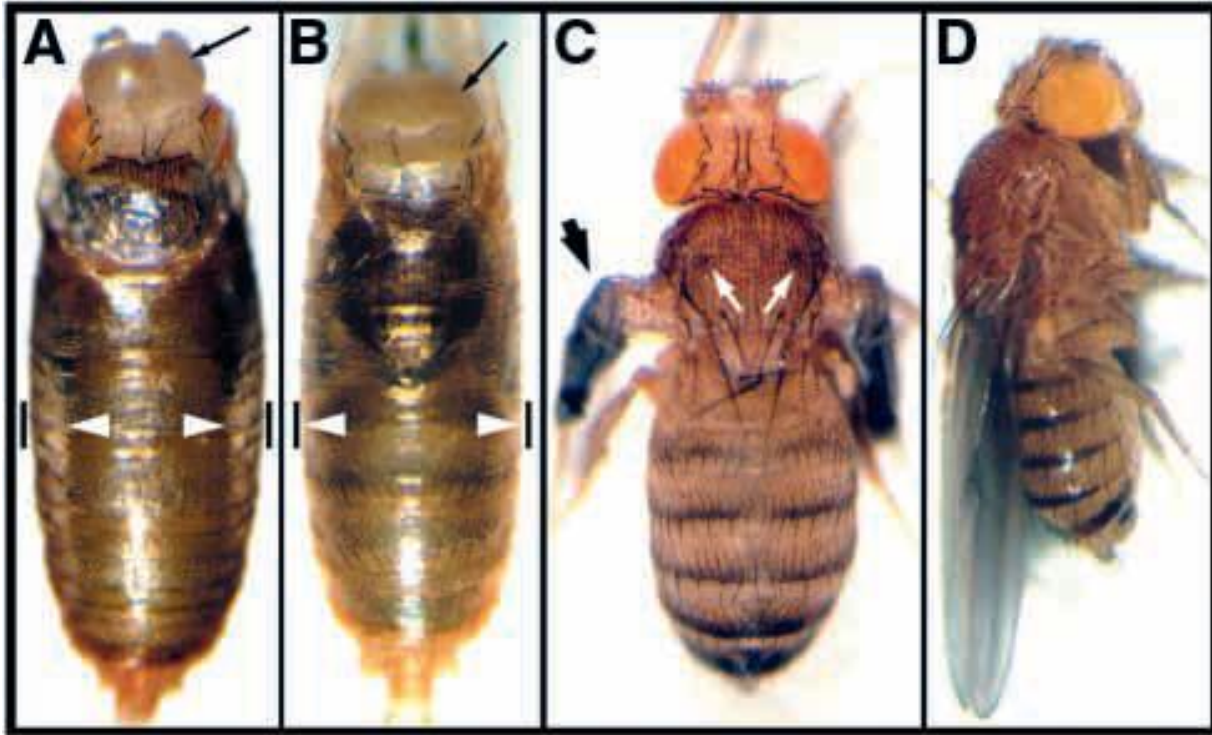
CCAP peptid

A rák szív működést serkentő peptid (Crustacean cardioactive peptide, a továbbiakban CCAP) egy nagyon konzervált szerkezetű, amidált, ciklikus nonapeptid. Megtalálható rákokban és rovarokban egyaránt. A periférián neurohormonként szívgyorsító hatással bír, míg az idegrendszerben neurotranszmitterként és neuromodulátorként hat. Elsőként a parti tarisznyarak szívburkából izolálták, ahol szívritmust szabályozó szerepet tölt be [Groome és Lehman (1995)]. Feltételezték, hogy a peptid fő funkciója a szívritmus szabályozás, ez az oka a peptid elnevezésének is. *Drosophilában* a CCAP szintén szívritmus szabályozó hatással bír, de emellett fontos szerepet játszik a vedlés véghezvitelében és a circadián időzítésben. A CCAP aktiválja a vedléshez szükséges izomműködést, így az állat kibújhat a régi kitinvázából [Predel és Wegener (2006), Nässel (2002)] (**7. ábra**).



7. ábra. A CCAP összetett vedlési szabályozási rendszer része. A diagram demonstrálja ezeket a több peptidhez köthető folyamatokat a vedlési szabályozásban. A vedlés ETH (ecdysis triggering hormone) felszabadulással kezdődik a perifériás Inka sejtekből (1). Majd az ETH beindítja az EH (eclosion hormone) felszabadulást a centrális Vm neuronokból (2). A pozitív visszacsatolás következtében az Inka sejtek további ETH-t szekretálnak, amit a növekvő cGMP szint indukál (3). Az ETH feltehetően további sejteket aktivál a KIR-ben, amelyek beindítják a pre-ecdysist és a vedlési folyamatot (4), ezek mind EH igényű folyamatok (5). Az ETH és az EH együttesen indukálják a CCAP/MIP (Mytilus inhibitory peptide) felszabadulást a CCAP-neuronokból (6). A CCAP/MIP gátolja a pre-ecdysist (7) és aktiválja a vedlési motoros folyamatokat (8) [Ewer 2005].

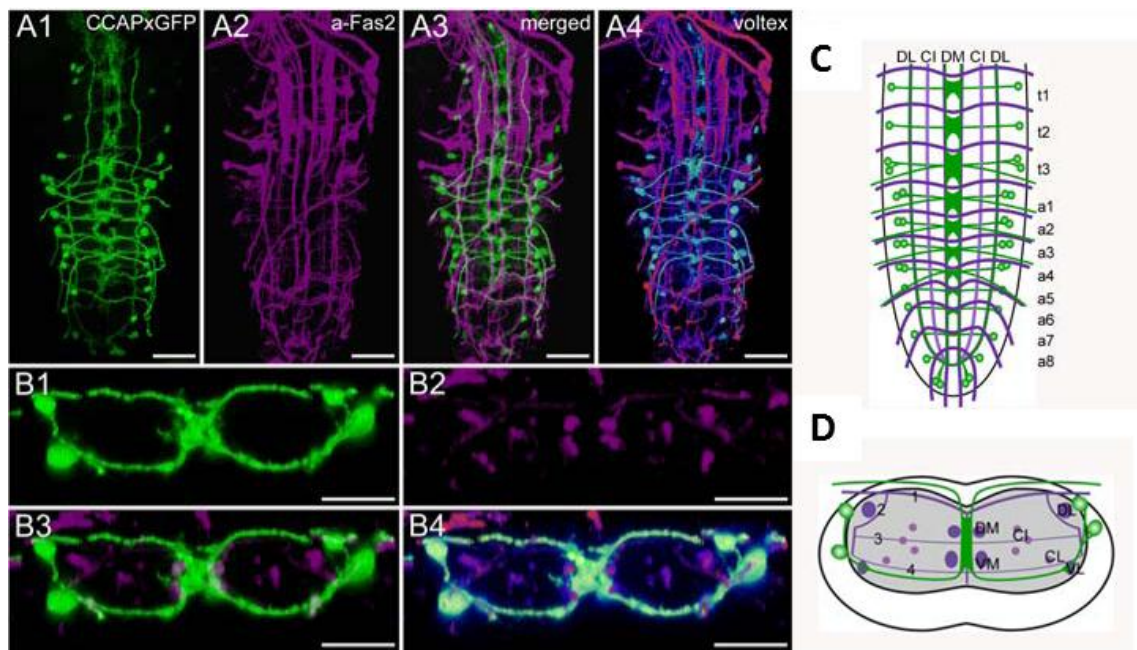
A CCAP knock out (KO) mutánsok jellegzetes vedlési hibákat mutattak, de ezek fajtája és súlyossága a különböző fejlődési stádiumokban eltérő volt. A mutánsok többsége elpusztult a bábból való vedlés hibájának következtében, míg a lárvá stádiumok közti vedlés és a felnőtt állapotban bekövetkező vedlés kevésbé volt érintett. A vedlés során bekövetkező legsúlyosabb hiba a potroh felfúvódásában mutatkozott, ami feltehetően a szív működés zavarával hozható összefüggésbe. Annak ellenére, hogy a CCAP KO mutánsok vedlése mutatott egyfajta circadián ritmust, a kikelések napi eloszlása eltérő volt a normálistól. Ez is azt bizonyítja, hogy a CCAP kulcsfontosságú a vedlés kivitelezésében és időzítésében egyaránt (**8. ábra**) [Park (2003)].



8. ábra A CCAP hiánya zavart okoz a vedlésben és a vedlést követő eseményekben. Vedlés előtti kifejlet kontroll (**A**) és KO mutáns állat (**B**). Míg mindkét állat sikeresen felfújta a homlokhólyagját (ptilinumát, **fekete nyíl**) addig a KO mutánsban a potroh téjéka képtelen volt felfúvódni, majd húzóerőt gyakorolni a báb kitinvázának belső falára. A **fehér nyilak** a potroh határát jelzik, a **fekete vonalak** a kitinváz határát jelölik. A kifejlett KO mutánsok (**C**) nem képesek kifeszíteni a szárnyukat (**fekete nyíl**) és a kutikula szklerotizációja is zavart szenved. A **fehér nyilak** azokat a gödröcskéket jelölik, ahol a tor dorzális izmai tapadnak. Azonos korú (2-4 napos) kifejlett kontroll állat (**D**) [Park (2003)].

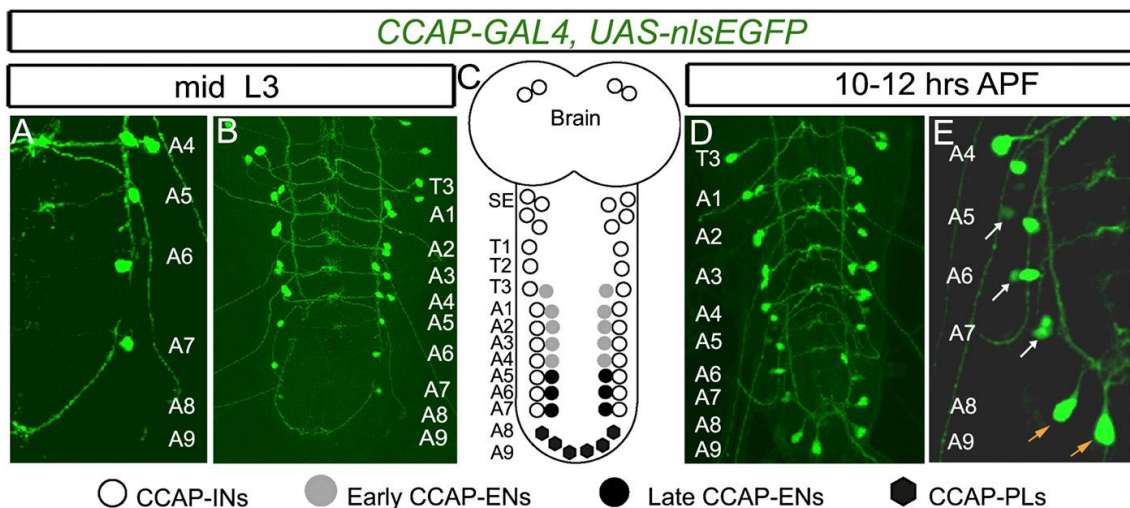
CCAP immunhisztokémia

A CCAP peptidek eloszlását a *Drosophila* lárvá hasdúcláncában először Santos és munkatársai írták le 2007-ben [Santos és mtsai. (2007)]. Kísérleteiket konfokális mikroszkóppal dokumentálták, de a peptid indirekt fluoreszcens jelölésének érzékenysége a primer antitest minősége miatt nem volt megfelelő. Ezért vizsgálataikat a már korábban említett enhancer trapping módszerrel előállított Ccap-GAL4xUAS-cd8-gfp konstrukcióval folytatták. Ezen a törzsen nem CCAP-IR, hanem a CCAP-szintetizáló sejtekben ko-expresszáldó, jobban vizualizálható GFP-IR eloszlása volt vizsgálható, így egy jobb leírást adhattak a CCAP-s struktúrák eloszlásáról (**9. ábra**).



9. ábra. A CCAP-s neuronok eloszlása a *Drosophila* L3 lárva hasdúcláncában, a Ccap-GAL4xUAS-cd8 törzs segítségével. Dorzális nézetből a hasdúclánc GFP-IR elemei (zöld) és a Fas2-IR struktúrák (magenta) (A), keresztmetszeti kép a harmadik abdominális neuromer területéről (B). A felvételek alapján készült idealizált sematikus rajzok, dorzális nézet (C) és keresztmetszet (D). Aránymérték: 50 μ m az A és 25 μ m a B ábrákon. [Santos 2007]

A hasdúcláncban található neuronok morfológiailag további két fő csoportra bonthatóak. A CCAP-tartalmú interneuronokra (CCAP-IN) és a CCAP-tartalmú efferens neuronokra (CCAP-EN). Előbbiekből szegmensenként egy pár található (T1-A7). A T3-A4 CCAP-EN rostjai szegmensenként laterálisan kilépnek a hasdúcláncból. A továbbiakban azonosítottak 12 kései CCAP-s neuront az A5-A9 szegmensekben, melyek a báb állapotot követő vedlés előtt bukkannak fel. Ezek közül az A5-A9 szegmensekben egy pár, míg az A8-A9 szegmensekben további 6 neuron jelenik meg (10. ábra.).



10. ábra A CCAP-s neuronok időbeli megjelenése és eloszlása *ecetmuslica* KIR-ben. CCAP-GAL4;UAS-nlsEGFP (zöld) T3-A9-ben L3 stádiumos lárvában (A és B) és báb stádiumban (D és E). A CCAP-s neuronok sematikus összefoglaló térképe (C). A T1-A7 CCAP-s neuronok transzverzális rostjai a középvonal mentén egy létraszerű struktúrát képeznek, amit a szegmens határok meghatározására használtunk. (A és B) L3 stádiumban T3-A4-ben két pár neuron, míg A5-A7-ben szegmensenként csak egy pár CCAP-s sejt található. (D és E) báb

stádiumban A5-A7-ben további egy pár neuron bukkan fel (**fehér nyíl**). További hat CCAP-s neuron tűnik fel A8-ban és A9-ben (**narancssárga nyíl**). CCAP-PLs: poszterior laterális CCAP-EN sejtek. [Veverysa és Allan (2012)].

Problémafelvetés

Manapság az egyre nagyobb mértékben fejlődő mikroszkópos technikák segítségével könnyen betekintheünk mintáinkba és dokumentálhatjuk az egyes szervek vagy szervrendszerek morfológiáját. Ez a tény nagyfokú diverzitásuk megmutatása mellett nagyban megkönnyíti az idegi struktúrák egy időben történő részletes, egyúttal áttekintő dokumentálását, ami elengedhetetlen az összetett idegi szabályozás megértéséhez.

Ebben a megközelítésben nem meglepő, hogy a *Drosophila melanogaster* többek között központi idegrendszerének mérete és genetikai manipulálhatósága miatt a neurobiológiai kutatások egyre kedveltebb alanyává vált. Korábbi irodalmi adatok alapján sokat tudunk a peptiderg rendszerek morfológiájáról és neurokémijáról *Drosophilában* [Nässel (2002), Santos és mtsai. (2007)]. A funkcionális vizsgálatok azonban elsősorban a neuroszekréciós folyamatok hatására, celluláris szinten pedig a peptiderg szabályozó mechanizmusokra, a peptidek szinaptikus és extraszinaptikus hatásaira, továbbá klasszikus transzmitterekkel való ko-expressziójukra korlátozódnak [Höckfelt és mtsai. (1986), Merighi (2002)]. Arról azonban, hogy az idegrendszer hogyan gyakorol behatást az egyes peptid-felszabadító neuron csoportok szekréciós aktivitására, kevés és csak nagyon felületes információnk van.

A *Drosophila* egyik, viszonylag jól ismert peptiderg sejtpopulációjáról, a CCAP-szintetizáló neuronokról igazolták, hogy részét képezik annak a bonyolult, más bioaktív anyagokat is felhasználó neuronális körnek, amely az állat vedlését szabályozza [Park (2003), Ewer (2005)]. *In vitro* és *in situ* transzmitter-érzékenységi és irányított kiütéses vizsgálatokkal azt is bizonyították, hogy a CCAP-szintetizáló sejtek funkcionálisan és morfológiailag is több csoportra oszthatók. A metamorfózis során a CCAP-t szintetizáló sejtek számában bekövetkező jelentős változások magyarázhatják a CCAP jelentőségének változását a *Drosophila* különböző életszakaszokban bekövetkező vedlései során. A CCAP sejtpopuláció bizonyos fejlettségi stádiumban megjelenő neuronjainak specifikus kiiktatása során bekövetkező változások a vedlés kivitelezésében és napszaki időzítésében arra hívják fel a figyelmet, hogy a CCAP-s neuronok nem csak külső (más neuron, PDF – pigment diszpergáló hormon) szabályozás alatt állnak, hanem egy fajta belső szinkronizáció is feltételezhető [Park (2003), Veverysa és Allan (2012)]. Direkt morfológiai bizonyíték a CCAP-neuronok szinaptikus szabályozására, ezen belül arra, hogy milyen bemeneteket fogadnak, illetve kialakítanak-e szinaptikus kapcsolatot más peptiderg rostokkal is, jelenleg nem áll rendelkezésre [Vömel és Wegener (2008)].

Az irodalomban fellelhető, szinaptikus marker fehérjék eloszlásának vizsgálatán alapuló adatok alapján a CCAP-tartalmú neuronok nyúlványrendszere, hasonlóan más, a *Drosophilában* vizsgált peptiderg neuronokéhoz, kompartmentalizáltnak tűnik. A CCAP-neuronok - a hasdúc-láncban longitudinális irányban, ventrolaterális helyzetben futó - ún. VL rostjain jól jelölődnek a kimeneti régiókat jelölő szinaptikus fehérjék. A sejteknek a mediális neuropil bonyolult rosthálózatába ágyazódó finomabb nyúlványain a bemenetekre utaló szinaptikus marker fehérje festődés mellett azonban peptid jelölés is kimutatható, ami a bemeneti és kimeneti régiók szigorú térbeli elkülönülését cáfolja. A peptidjelölés azonban nincs összhangban a preszinaptikus felszín-markerként alkalmazott vezikula membrán jelölés során tapasztaltakkal [Santos és mtsai. (2007)]. Ráadásul az eddig a tárgyban leközölt szinaptikus marker fehérje jelölések meglehetősen gyenge és sok esetben nem reprodukálható reakciókat eredményeztek. Így végső soron a CCAP-neuronok szinaptikus kontrolljában szerepet játszó ki- és bemeneti régiók és azok morfológiai jellemzői feltáratlanok maradtak.

Célkitűzés

Eddigi adatok alapján már ismerjük a CCAP-neuronok bizonyos struktúráinak a Fas2 rendszerhez viszonyított elhelyezkedését a hasdúcláncban. Ezek két csoportja a lokális interneuronok és az efferens neuronok, melyek rostjai a szegmentális idegeken keresztül kilépnek a központi idegrendszerből és az izmokon végződnek. A szinaptikus felszínmarkerek eddig feltárt eloszlása alapján megkülönböztettek dominánsan bemeneti (DM/VM rostkötegek) és kimeneti (VL rostköteg) régiókat, melyek pozícióját a Fas2 rendszerhez viszonyítva írták le.

Bár a megfigyelések a teljes CCAP-s neuron populáción (egyes esetekben szubpopulációkon) végzett megfigyelések alapján történtek, az eddigi adatgyűjtések túlnyomóan a központi idegrendszer abdominális részére korlátozódtak. A szinaptikus felszín-marker eloszlás során szempontjából vizsgált rostkötegekben azonban általában többféle, különböző típusú és lokalizációjú CCAP-sejt nyúlványai futnak. Így azonban nem nyílik arra lehetőség, hogy egyértelműen megállapítsák, pontosan mely sejtek rostjai hagyják el a központi idegrendszert és melyekéi nem, illetve ezen sejtek morfológiáját és szinaptikus felszíneinek eloszlását sem ismerjük pontosan. Ahhoz tehát, hogy a CCAP-neuronok szinaptikus szabályozásával és annak kompartmentalizációjával kapcsolatos, a fentiekben felmerült kérdésekre választ adhassunk, a következő vizsgálatok elvégzését láttuk szükségesnek:

1. Az ecetmuslica CCAP-tartalmú neuronpopulációjának pontos anatómiai leírását a teljes központi idegrendszerre vonatkoztatva.
2. A CCAP-neuronok sejtszintű morfológiájának meghatározását a CCAP-IN és CCAP-EN szubpopulációkban.
3. A ki- és bemeneti felszínek eloszlásának pontosítását és sejtszintű értelmezését.

Anyagok és módszerek

A kísérleti állatok tartása

Kísérleti állatunk a *Drosophila melanogaster* M. (Animalia, Arthropoda, Insecta, Diptera, Brachycera, Drosophilidae, Drosophilinae) [Meigen (1830)]. A felhasznált törzseket külön-külön 200 ml-es átlátszó műanyag edényekben tenyésztettük, melyek tetejét szivaccsal zártuk le. A hengerek aljába kb. 20-30 ml standard kukoricaliszt agar táptalajt rétegeztünk [Lakovaara (1969)]. A törzseket 1-2 heti rendszerességgel oltottuk át új táptalajra. A törzseket standard körülmények közt tartottuk (25 °C-on, 12 órás fény-sötét ciklusban és állandó páratartalom mellett).

Törzsek

A felhasznált törzsek: vad típusú Oregon, UAS- és GAL4-konstrukciók (**2. táblázat**). A GAL4/UAS törzseket a kívánt génkonstrukciók elérése érdekében kereszteznünk kellett. A szűz nőtényeket minden esetben a Ccap-Gal4 törzsekből gyűjtöttük. Szűz egyedeket akkor nyerhetünk, ha a hengerből eltávolítjuk az összes kifejlett állatot, és az ezután kikelő egyedek közül maximum 6 óránként kiválogatjuk a nőtényeket (szűz nőtények). A szűz nőtényeket egy új hengerbe tesszük, és három nap elteltével újra megnézzük. Sikeresnek mondható a gyűjtés abban az esetben, ha ekkor nem látunk a táptalajban lárvákat. A szűz nőtényekhez ezután a tervezett UAS konstrukcióhoz szükséges hím muslicákat gyűjtünk. A kívánatos konstrukció a két törzs keresztezéséből származó első utódnemzedékben jelenik meg.

Törzs	Származás (referencia)
yw;CCAP-GAL4	John Ewer [Park és mtsai. (2003)]
yw hsp70flp;Sp/CyO;UAS>CD2y+>mCD8::GFP/TM6b	[Wong és mtsai. (2002)]
yw hsp70flp;UAS>CD2y+>mCD8::GFP/CyO;TM2/TM6b	[Wong és mtsai. (2002)]
UAS-cd8.GFP	Bloomington Stock Center, [Lee és Lou (1999)]
UAS-Syt::eGFP	Bloomington - Kendall Broadie, Zhang és mtsai. (2002)]
UAS-Dscam[17.1]::GFP	[Wang és mtsai. (2004)]
UAS-nSyb::eGFP	Bloomington - Kendall Broadie, Zhang és mtsai. (2002)]
UAS-DenMark::mcherry	[Nicolai és mtsai. (2011)]
yw; UAS-DenMark::mcherry; UAS-Syt::eGFP	Karsai Gergely 2012

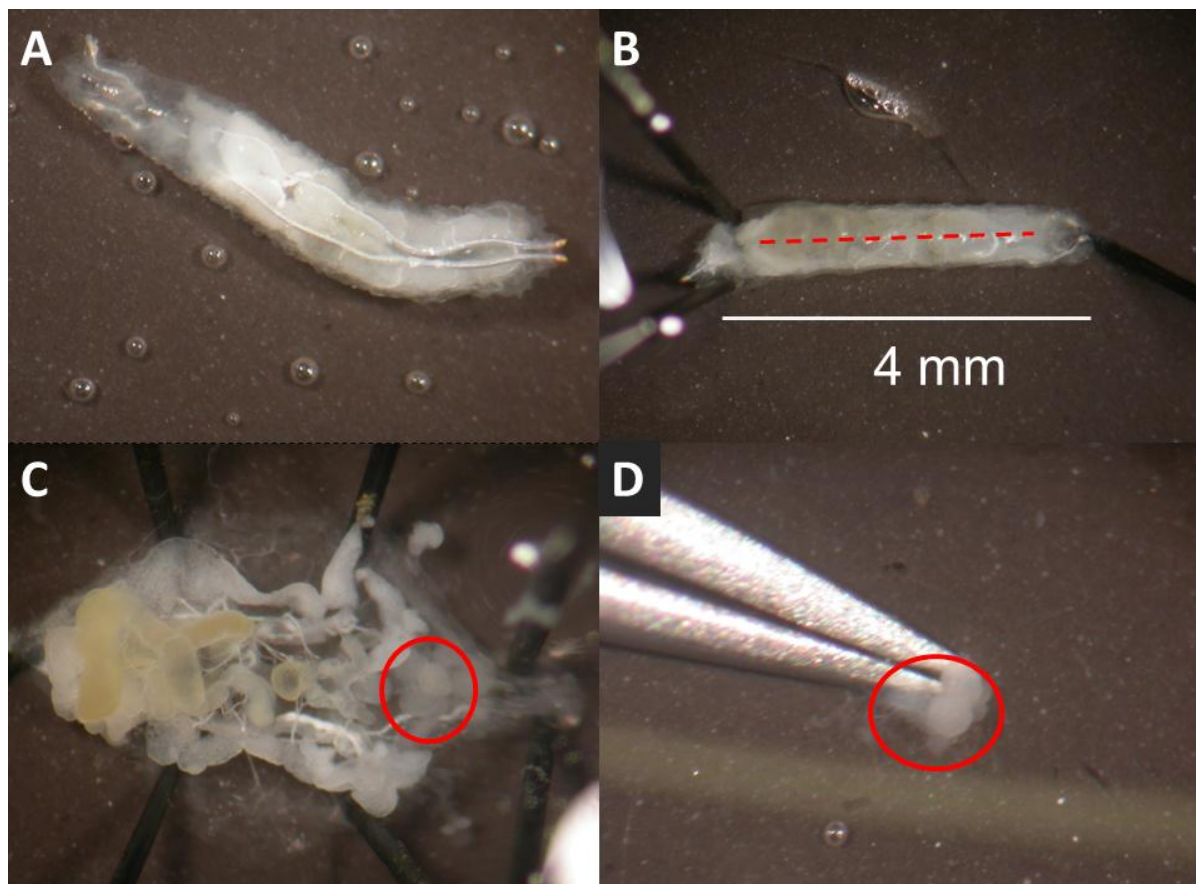
2. táblázat. A felhasznált ecetmuslica törzsek.

A kísérleti állatok előkezelése (flip-out protokoll)

Egy-sejt morfológia nyerése érdekében szűz driver yw;CCAP-GAL4 törzset (Park et al., 2003), amely a CCAP-t szintetizáló sejtekben GAL4 fehérjét is szintetizál, kereszteztünk a riporter yw hsp70flp;Sp/CyO;UAS>CD2y+>mCD8::GFP/TM6b törzsszel (Wong et al., 2002). (Ez utóbbiból a kísérletek előtt a nagyobb siker érdekében a balancereket kikeresztettük.) A riporter törzs tartalmazza a riportergént (mCD8::GFP) és az UAS promoter szekvencia közötti STOP kazettát(CD2y), továbbá egy hőhatásra aktiválható flipáz rekombinááz enzimet (hsp70flp), mely a STOP kazetta körül elhelyezett specifikus hasító helyek mentén képes hasítani. Az állatokat a fentiekben leírt körülmények közt tartottuk, az állatok reggel és este új táptalajra kerültek. A táptalajban kikelő lárvákat a petelerakástól számított 60.(+/-12) órában egy 20 perces 37°C-os hőkezelésnek tettük ki. Ezt követően a lárvákat standard körülmények közt tartottuk, míg L3 stádiumos korukban további feldolgozásra nem kerültek.

A kísérleti állatok boncolása

A transzformált L3 lárvákat boncolás előtt érzéstelenítés és immobilizálás céljából hűtőben 4 °C-on tartottuk 30 percig. A kezelés után a lárvák mozdulatlanok, és az életfunkcióik minimálisra csökkennek. Ezt követően a lárvákat szilikonnal bélelt Petri-csészében egy csepp 4 °C-os *Drosophila* Ringer oldatba helyezzük, és mikrosebészeti ollóval a lárva anterior végétől hosszanti irányban egy metszést ejtünk, ügyelve arra, hogy csak a kutikulát vágjuk át. A vágás után az állatot finom csipeszek segítségével feltárjuk. A központi idegrendszer a nyelőcső végénél és a gyomor kezdeténél helyezkedik el, a nyelőcső a központi idegrendszer (KIR) két hemiganglionja közt halad. Ezért a nyelőcsövet mikrocspeszszel elválasztjuk a KIR-től, a kísérő szöveteket csipesszel óvatosan eltávolítjuk. A KIR-ből több igen erős ideg is kilép, ezért ezeket szintén át kell vágnunk, különben a KIR egyes darabjai húzás hatására sérülhetnek (**11. ábra**).



11. ábra. A Ringer oldatba került *Drosophila* L3 lárva (A) boncolásának demonstrációja. A lárva mérete megközelítőleg 4mm (B). A hosszanti vágás (piros szaggatott vonal, B) után elénk tárulnak a lárva belső szervei (C), ezek közt a KIR (piros kör) is. A KIR mérete a mikrosebészeti csipeszhez viszonyítva (D).

A szövetminta fixálása

A feltárást és az izolálást követően a kipreparált idegrendszert automata pipetta segítségével fixáló szerbe (4% 0,1 M foszfát pufferrel készült paraformaldehid) pipetázzuk, és 4 °C-on egy éjszakán át vagy 3 óráig szobahőmérsékleten fixáljuk.

Fluoreszcens immunhisztokémia

A fixálást követően a totálpreparátumokat 0,1%-os Triton X-100-zal (0,1M PBS-ben oldva, /PBT/, pH=7,4) 4 °C-on néhány óráig mossuk és permeabilizáljuk, az oldatot 2 óránként cseréljük. Ezt immunhisztokémiai előkezelésként a nem specifikus kötőhelyek lefedését szolgáló blokkolás követi, amikor is a mintákat 1%-os antitesthígító oldatban (1% borjú szérum, 0,1% Triton X-100, 0,1 % nártium-azid 0,1M PBS-ben oldva) két óráig inkubáljuk szobahőmérsékleten. Ezt követően primer antitesttel (3. táblázat) történő inkubálás következik 8 óráig 4 °C-on rázató gépen, utána a mintákat többször cserélt PBS-ben, folyamatos mozgatás mellett 4 °C-on 6-8 óráig mossuk. A mintákat a másodlagos ellenanyagot (1:200, 0,5% szarvasmarha szérumalbumin /BSA/ tartalmú

PBT-ben oldva) tartalmazó oldatban inkubáljuk 4 °C-on, rázató gépen, 8 órán át. A felesleges másodlagos antitesteket ezt követően folyamatos mozgítás mellett 4 °C-on kimossuk.

Vizsgálataink során kétféle fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos ellenanyagot (kecske anti-nyúl Cy3 konjugált IgG, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; kecske anti-nyúl Cy5 konjugált IgG, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) használtunk. Vizsgálataink alkalmával nem tapasztaltunk eltérést a különböző másodlagos ellenanyaggal jelölt preparátumok között. A mosást követően a mintákat ProLong® Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), antifade reagensben fedtük le.

A fedés során kihasználtuk a fedőanyag azon tulajdonságát, hogy szobahőmérsékleten polimerizál, és ezáltal gélesedik. A preparátumokat ezért vizsgálat előtt a fedőanyagba helyeztük és pozícionáltuk, majd ezután 24 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően a polimerizált mintákat további folyékony állagú fedőanyag segítségével egy inkubáló kamrában lefedtük. Ezzel az eljárással kiküszöböltük a fedés során korábban keletkezett volumetriás torzulásokat.

Antitest	Eredet (termelő állat)	Hígítás	Referencia
Anti-syntaxin	nyúl	1:1000	Abcam Cat. No. Ab32340
Anti-CCAP	nyúl	1:600	Heinrich Dirksen [Dirksen és Keller (1988)]
Anti-GFP	egér	1:1000	Invitrogen Cat. No. A-11120

3. táblázat A vizsgálataink során alkalmazott primer antiszérumok eredete és hígítása.

Konfokális mikroszkópos fotódokumentáció, képfeldolgozás

A mintákról Leica TCP SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Németország) típusú és Olympus Fluoview FV1000 típusú (Olympus America PA, USA) konfokális mikroszkóppal és a hozzá tartozó software-el optikai metszetsorozatot készítettünk. Az immunhisztokémiai jelöléseink során felhasznált kétféle fluorofestékekkel jelölt struktúrákat Argon-ion és Hélium-Neon lézerrel a megfelelő gerjesztési hullámhosszon (GFP: 488 nm, Cy3: 514 nm, Cy5 633nm) gerjesztettük, az emittált fényből a számunkra megfelelő hullámhosszt a megfelelő szűrők vagy a Leica TCS SP5 esetében az Acousto-Optical Beam Splitter segítségével szűrtük ki. Így a detektorba már csak a számunkra érdekes hullámhossz kerül. A totálpreparátumok kiválasztott részeiről készült dorzo-ventrális orientációjú virtuális tömbszelvény optikai metszeteit különböző nagyításokban vettük fel, mindig az adott objektívhez tartozó X, Y és Z tengelyek mentén elérhető optikai felbontás szerint. A tömbszelvények 8 bites, több csatornás, 512x512, 512x1024 vagy 1024x1024 pixel felbontású képekből álltak, amelyeket 0,5-1 µm-es léptékű, dorzo-ventrális (Z tengely) irányú letapogatással vettünk fel. Az optimális jel/zaj arány elérése érdekében, ha szükségesnek bizonyult, a virtuális tömbszelvényt alkotó kép akár 4 egymást követő letapogatás átlagolásából készült. A tömbszelvényeket a továbbiakban az Amira 5.3.1 software (Indeed-Visual Concepts, Berlin, Germany) segítségével dolgoztuk fel, a 3D-s rekonstrukciókat az Amirához írt *SkeletonTree* [Schmitt és mtsai. (2004); Evers és mtsai. (2005)] segédprogrammal készítettük.

Eredmények és megbeszélésük

A rák szív működést serkentő peptid (CCAP) tartalmú neuronok morfológiája

Fluoreszcens mikroszkópia

A CCAP sejtek eloszlását *Drosophilában* már korábban is leírták [Santos (2007)]. Mi ezeket a kísérleteket ismételtük meg és terjesztettük ki a központi idegrendszer teljes területére a számunkra elérhető antitestekkel. Elsősorban egyszeres indirekt fluoreszcens immunhisztokémiát végeztünk, mert ez a technika egyszerű, gyors és könnyen reprodukálható. A számunkra elérhető antitest (anti-CCAP, M. Eckert szívességéből) azonban nem adott megfelelő minőségű reakciót. A sejttestek igen, de az őket összekötő rosthálózat alig, vagy egyáltalán nem volt kivehető. A minta térbeli kiterjedése miatt a sima fluoreszcens mikroszkópnál ráadásul mélységélességből fakadó problémák léptek föl, ezért az egyébként is gyengén festődő preparátumok dokumentációja nehézségekbe ütközött.

Konfokális mikroszkópia

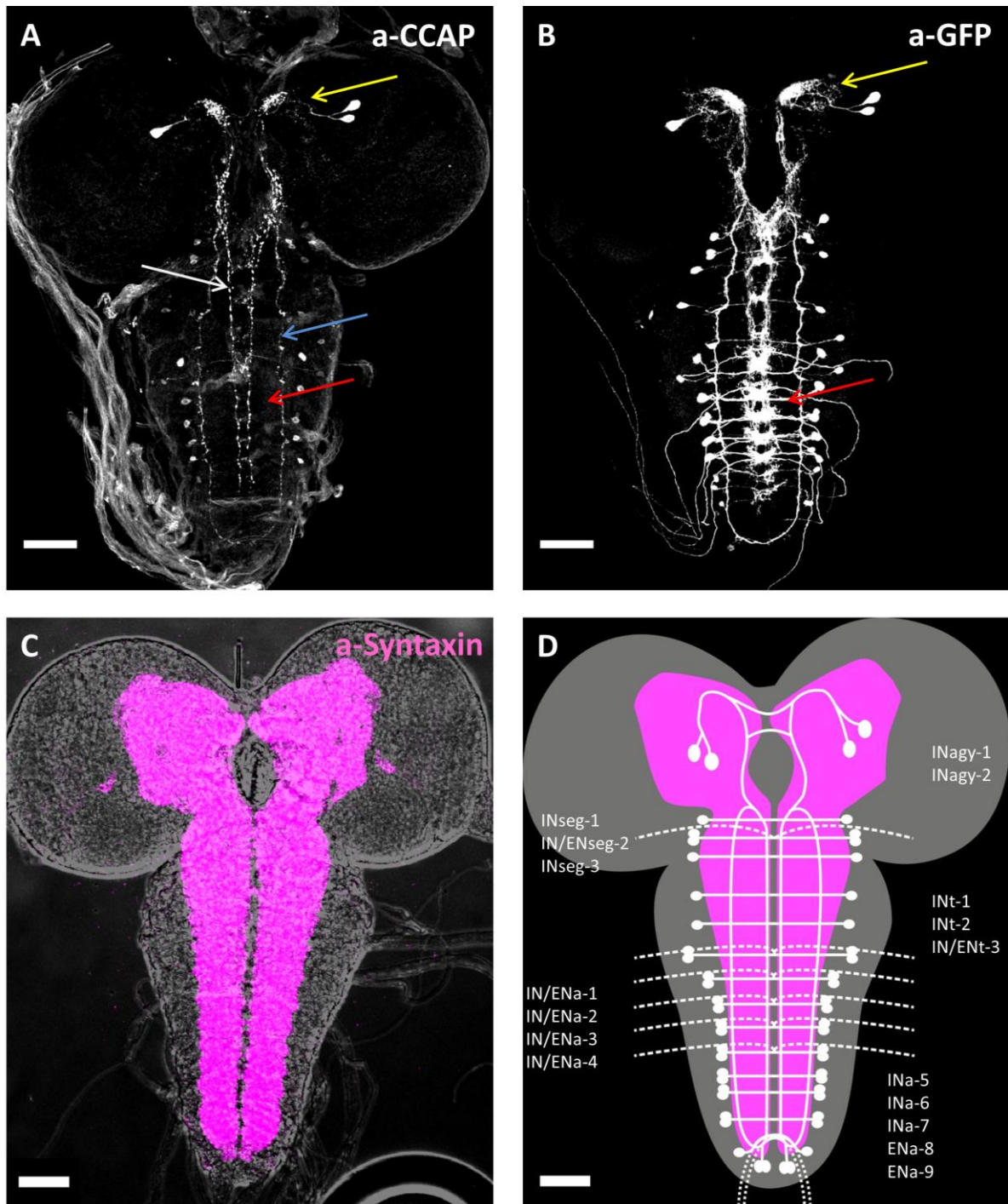
A probléma megoldását a konfokális lézer szkennings mikroszkóptól vártuk. Ennek a technikának az alkalmazása esetén ugyanis a csatlakoztatott számítógép segítségével elvégzett úgynevezett optikai szelektálás megoldhatja a mélységélességi problémát [Claxton és mtsai. (2006)], míg a matematikai filterek alkalmazásával kiküszöbölhetővé válhatna a magas „jel –zaj” arány. Eredményeink azonban nem feleltek meg az elvárásainknak, mert a CCAP-IR sejtek mellett csak a fő rostkötegek váltak láthatóvá, a kisebb, transzverzális lefutású rostok nem (**12A ábra**).

CCAP kimutatása cd8.GFP-vel

A jelerősséggel kapcsolatban felmerült probléma ma már rutinszerűen megoldható genetikai manipulációval. Jelen esetben az „enhancer trapping” módszert alkalmaztuk, melyet ma már széles körben használnak a neuromorfológiai vizsgálatokban, és *Drosophilában* nagyon megbízhatóan működik. A szándékunk az volt, hogy először is egy olyan fúziós proteint transzformáljunk be a CCAP-t termelő neuronokba, amely már a boncolás során könnyen észlelhető, így specifikus reakció nélkül már a kísérletek elején tudjuk, hogy a transzformáció sikeres volt. Másodszor, el akartuk érni, hogy a teljes rosthálózat jól látható legyen. Választásunk a cd8.GFP fúziós proteinre esett, ami már a teszteléskeppen fluoreszcens sztereo mikroszkóp alatt történő boncolásnál jól láthatóan jelezte számunkra, az összes transzformált sejtet, továbbá konzekvensen jelölte a CCAP-tartalmú sejtek teljes nyúlványrendszerét. Mivel célunk első megközelítésben nem az intercelluláris peptideloszlás jellemzése volt, hanem a teljes-sejt morfológia leírása, az anti-CCAP jelölést, amely a CCAP-sejtek nyúlványainak egyes részein erős pontszerű jelölődést mutat, másutt gyenge, a háttértől nehezen elkülöníthető festődést ad, a továbbiakban a cd8.GFP jelöléssel helyettesítettük (**12B ábra**).

A cd8.GFP expresszió és a CCAP-peptid megjelenésének vizsgálatán túl a neuropil és a kortikális régiók elkülönítésével is megpróbálkoztunk. A kortikális régió elkülönítésére egy fluoreszcens magfestéket (DAPI) alkalmaztunk, mely a sejtmagban és részben a mitokondriumban található DNS állományt jelöli, míg a neuropil láthatóvá tételéhez egy szinaptikus membránfehérjét (a syntaxint) jelöltünk indirekt immunhisztokémiával (**12C ábra**).

A Fas2 rendszerhez viszonyított cd8.GFP expresszió alapján a saját eredményeinket egybevetettük a korábbi irodalmi adatokkal, és pontosítottuk a *D. melanogaster* L3 stádiumos lárvák központi idegrendszerében a CCAP peptidet szintetizáló sejtek rendszerét. Ezek alapján ecetmuslica L3 stádiumában 38-56 CCAP-t expresszáló sejtet azonosítottunk: 2 pár neuront az agyban, 4 párat a garatalatti dúcban, 4 párat a hasdúc-lánc thorakális részén és 12-18 párat a hasdúc-lánc abdominális részén. A hasdúc-lánc abdominális részén észlelhető számbeli eltérések annak tudhatók be, hogy a lárvák L3 fejlődési állapotában fokozatosan tűnnek fel a bábivédüléshez szükséges CCAP-t szintetizáló sejtek. A következőekben a teljesség jegyében minden, az L3 és a bábivédleést megelőző állapotokban fellelhető sejt típus morfológiáját részletesen tárgyaljuk (**12D ábra**).



12. ábra CCAP- neuronok morfológiája Ccap-GAL4xUAScd8. gfp törzsön, dorzális nézetből. **(A)** Az anti-CCAP jelöléssel sikeresen jelöltük a CCAP-neuronok sejttestjét és a főbb rostkötegeket (VL **kék nyíl**, VM/DM **fehér nyíl**), de a transzverzális (**piros nyíl**) rostok és a finom elágazások (**sárga nyíl**) nem jelölődnek. **(B)** Az anti-GFP jelölés eredményeként az anti-CCAP által konzekvensen jelölt fő rostkötegek mellett a transzverzális (**piros nyíl**) rostok és finom elágazások (**sárga nyíl**) is jól jelölődtek. **(C)** Fáziskontraszt mikroszkópos (szürke) felvételt láthatunk anti-syntaxin neuropil jelöléssel (rózsaszín). **(D)** Sematikus összefoglaló ábra az A, B és C képek alapján. Az ábrán láthatóak az idegrendszer főbb területein/ neuromereiben megjelenő CCAP-tartalmú sejttestek, a nagyobb CCAP-tartalmú rostkötegek és az idegrendszert a kilépő idegeken elhagyó CCAP-rostok (szaggatott vonal). Az áttekinthetőség érdekében a finom elágazásokat nem jelöltük. Aránymérték: 50 μ m az összes ábrán.

Az agydúc neuronjai

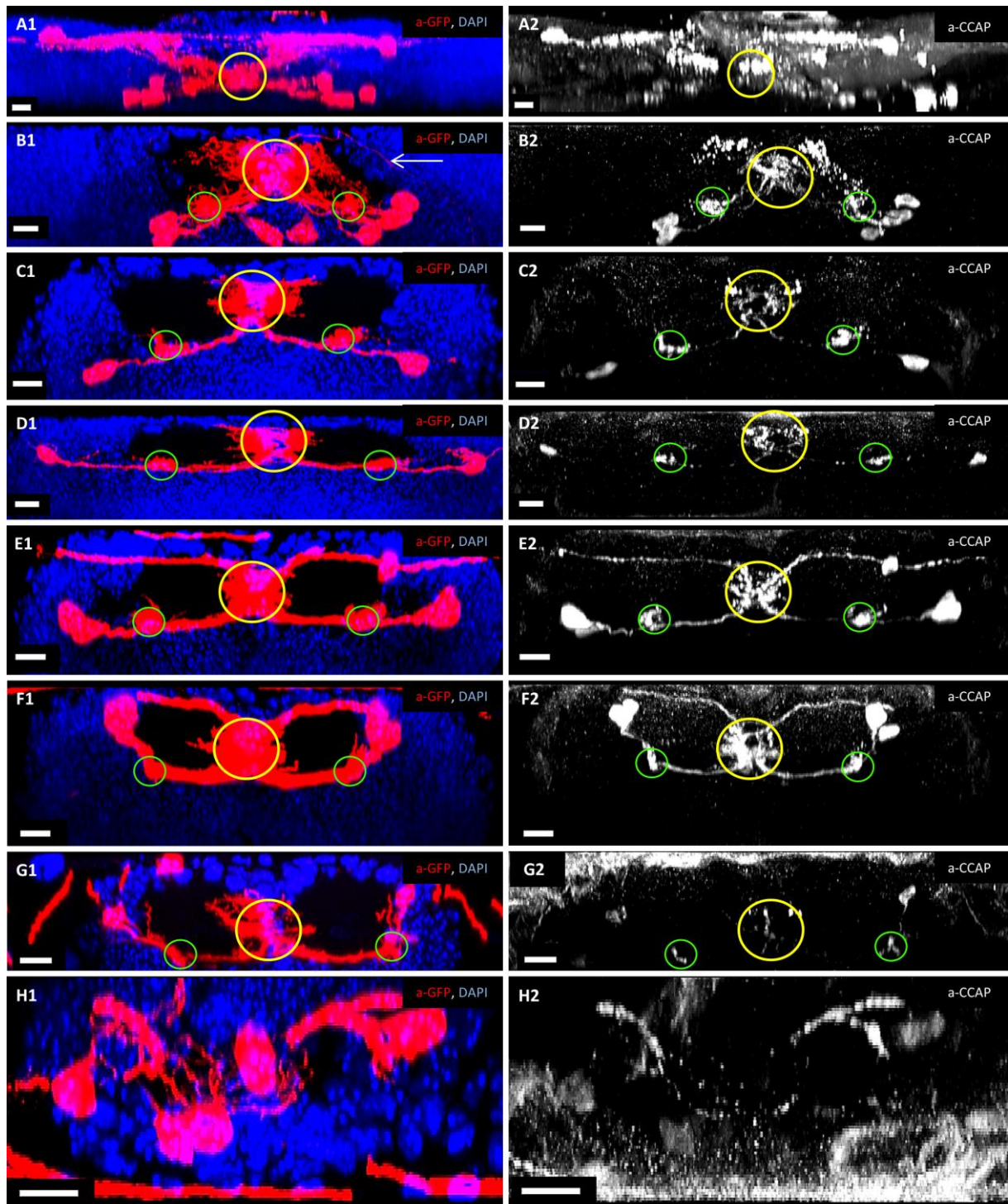
Az agydúcban 2 pár CCAP-neuront figyelhetünk meg, melyek rostjai intenzív arborizációt képeznek a dorzomediális protocerebrum területén, majd ezt követően a foramen mentén a rostok összeszedődnek és feltehetően két irányban folytatódnak. Egy részük a dorzomediális rostköteget alkotja, mely hosszan leszállva a hasdúccláncban látszólag vakon végződik az A5-A9 neuomerben, míg a másik részük a VL rostköteghez csatlakozik, mely szintén a terminális plexus területén végződik.

A garatalatti dúc neuronjai

A garatalatti dúc első neuomerjében egy pár neuron (INseg-1) helyezkedik el, melynek sejttestjei DL elhelyezkedésűek. Ezekből egy főneurit ered, amely először ventrális irányba fordul, majd mediális irányba folytatódik, ezt követően dús rostelágazódást képez a DM rostkötegek területén. A második neuomerben 2 pár neuron található, ebből feltehetően egy pár (INseg-2) az előzőekben leírt morfológiát mutatja, míg a másik axonjai (ENseg-2) a DM rostköteg területén kilépnek a központi idegrendszerből. A harmadik neuomerben szintén egy pár neuront (INseg-3) találunk, melyek az INseg-1-hez hasonló lefutással jellemezhetők.

A hasdúcclánc neuronjai

A thorakális szakaszon a T1-T2 neuomerekben egy-egy pár neuron (INt1-2) található, melyek az INseg-1 sejtekhez hasonló morfológiát mutatnak. A T3 neuomer területén két pár neuron található: az interneuron párra (INt-3) a DEG-ben leírt interneuron-morfológia jellemző, míg az efferens neuron pár az ENseg-2 sejtekhez hasonló morfológiájú. A következő négy neuomerben (A1-A4) két pár neuront találunk: egy efferens (ENa-1-4) és egy interneuron (INa1-4) párt - az előzőekben leírt morfológiával. A következő három neuomerben (A5-A7) neuomerenként egy pár korai és egy pár késői (L3 és a bábi vedlés közötti szakaszban felbukkanó) neuront találunk, melyek szintén az eddig ismertetett interneuron morfológiát mutatják. Az A8-A9 neuomerben burjánzó nyúlványok képezik a terminális plexust. Itt a neuomerek összeolvadása miatt a szegmentális szerveződés kevésbé nyomon követhető. Az A8-as neuomerben egy pár, az előzőekben leírt morfológiájú interneuront találunk. Az A9 neuomerben 2 pár sejt lelhető fel, melyek sejttestjei azonban az előzőektől eltérően nem DL helyzetűek, hanem az idegrendszer poszterior végén helyezkednek el. Feltehetően egy pár interneuronról van szó, melyek nyúlványai eleinte anterior irányban haladnak, majd a VL rostkötegekben folytatódnak, és egy pár efferens neuronról, melyek nyúlványai eleinte szintén anterior irányba futnak, majd feltehetően mediális irányba fordulnak, a DM rostkötegek felé, és az ezt követő átkereszteződés után poszterior irányban hagyják el a központi idegrendszert.



13. ábra. Ccap-GAL4xUAS-cd8.gfp konstrukciót hordozó L3 lárva idegrendszeréből készült transzverzális metszetsorozat. GFP-IR struktúrák (piros), CCAP-IR struktúrák (fehér), sejtmagok (kék) helyzete a KIR-ben. A teljes KIR területén követhetjük a CCAP-IR struktúrák elhelyezkedésének dorzo-ventrális viszonyait a kortikális régióhoz képest (bal oldali színes hasáb), illetve a peptidtartalom változását az adott struktúrákban (jobb oldali fekete-fehér hasáb). (A) Az agydúc és a garatalatti dúc területéről készült felvétel. (B) A garatalattidúc területe, és az ENseg-2 neuron kilépő rostjai (fehér nyíl). (C) A thorakális régió INT-1-es neuronja. (D) Az INT-2-es neuron. (E) Az INT-3 és ENT-3 neuronok struktúráinak helyzete. (F) Az INA-1 és ENa-1 neuronok. (G) Az INA-5 neuronok területe. (H) Az ENa-8 és ENa-9 neuronok területéről készült felvétel. Látható a neuronok sejtestjeinek elhelyezkedése és a neuritjeik lefutása a VL (zöld kör) és DM (sárga kör) rostokhoz viszonyítva. Aránymérték: 10 μ m az összes ábrán.

A CCAP-termelő sejtpopuláció anatómiai leírásának további finomítása a flip-out technika segítségével

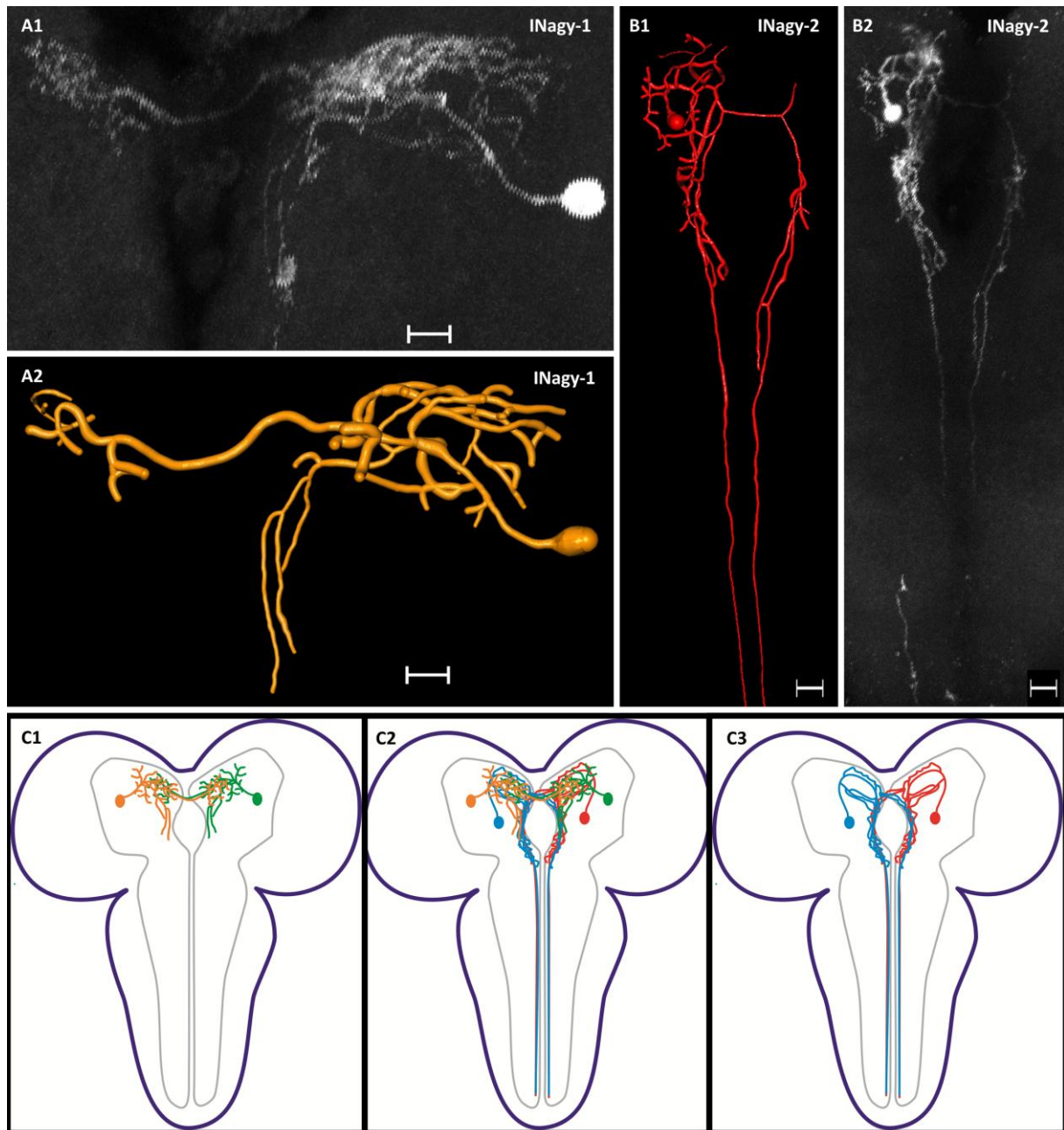
Miután a CCAP-tartalmú struktúrák rendszerét a konfokális mikroszkóp segítségével, az eddigi irodalmi adatokat kiegészítve az L3 stádiumos lárvá teljes központi idegrendszerében részletesen feltérképeztük, továbbra is feltáratlan maradt, pontosan mely sejtek alkotják a főbb rostkötegeket és esetlegesen mely sejtek képezhetnek egymással fizikai kapcsolatokat. A célkitűzésünk második pontjának megvalósítása érdekében a következőkben rátérhettünk a populációt képező neuronok sejtszintű morfológiájának leírására.

A megközelítőleg 1500 preparált idegrendszerben összesen 300 alkalommal tapasztaltunk hőkezelés által újra aktivált cd8.GFP expressziót a CCAP-s sejtekben. Ezek közül 225 esetben szintetizált(ak) a sejt(ek) megfelelő mennyiségű cd8.GFP-t ahhoz, hogy a minták sejtszintű morfológiai vizsgálatokra alkalmasak legyenek. Mivel a mitotikus fázisban lévő, azaz a befolyásolható sejtek száma minden időpillanatban esetleges, a cd8.GFP ritkán jelent meg csak egy sejtben. Az esetek többségében több, általában egymással átfedő nyúlványrendszerű sejt is kifejezte a markert. Bár a befektetett munka a sikeresség százalékos arányához képest aránytalanul tűnhet, azokban az esetekben, amikor az egysejtes expresszió megvalósult, jó arányban kiváló minőségű preparátumok születtek. Így sikerült minden sejttypusról egysejtes expresszióra alapozott igen részletes morfológiai adatokat nyernünk és dokumentálnunk, igazolva ezzel a módszer alkalmasságát is. Ez nem jelenti azt, hogy minden neuromer összes sejtjéről közvetlen adatokat nyertünk, de a CCAP-s neurontípusok nagyfokú homológiájára alapozva sikerült a teljes rendszer részletes sejtszintű morfológiai rekonstrukcióját

CCAP-neuronok az agydúcban

A protocerebrumban hemiganglionként egy interneuron (INagy-1) található, melynek nyúlványai bilaterálisan kettéágaznak a két hemiganglionban, először ipsilaterálisan a dorzomediális protocerebrum területén, majd kontralaterálisan szintén a dorzomediális protocerebrum területén. Az esetek többségében egy neurit ered az ipsilaterális elágazásokból, mely poszterior irányban leszáll és a foramen mentén vakon végződik.

A másik pár interneuron (INagy-2) is bilaterális lefutású, azonban az INagy-1-től eltérően a protocerebrum területén elágazásainak rendszere nem mutat szimmetriát. Az INagy-2 elsődleges neuritje a protocerebrum nagy részét lefedi, részben átfed az INagy-1 elágazásaival, a foramen mentén gyenge arborizációt hoz létre, majd elhagyva az agydúcot a DM rostok mentén leszállva elágazások nélkül halad a hasdúcclánc hossz tengelye mentén. A dorzomediális protocerebrum területén egy másodlagos neurit áttör a középvonalon a foramen dorzális részén, és kontralaterálisan nyúlványt képez. Ez a nyúlvány egy nem túl intenzív arborizáció létrehozása után egy leszálló ágat képez a foramen mentén, és az agydúcot elhagyva szintén a DM rostok mentén fut lefelé, majd az abdominális neuromerek területén vakon végződik. Így ez az egyetlen CCAP-s neuronpár, amelyik leszálló nyúlványrendszerével összekapcsolja az agydúcot és a hasdúccláncot és a KIR-t teljes hosszában átéri (14. ábra).



14. ábra. Az agydúc neuronjainak 3D rekonstrukciója (A2, B1) és maximum projekciója (A1, B2) flip-out állatokból, dorzális nézetből. (A) Az INagy-1 neuron. (B) Az INagy-2 neuron. (C) A maximum projekciók és 3D rekonstrukciók alapján készült egyszerűsített, idealizált sematikus ábrák. A neuronok helyzete a KIR határához (kék) és a neuropil határához (szürke) viszonyítva. (C1) A két INagy-1 sejt. (C2) Az INagy-1 és az INagy-2 sejtpárok összesített ábrán. Jól láthatóak a nyúlványrendszerek átfedő zónái. (C3) Az INagy-2 sejtek. Aránymérték: 10 μ m az egyes ábrákon.

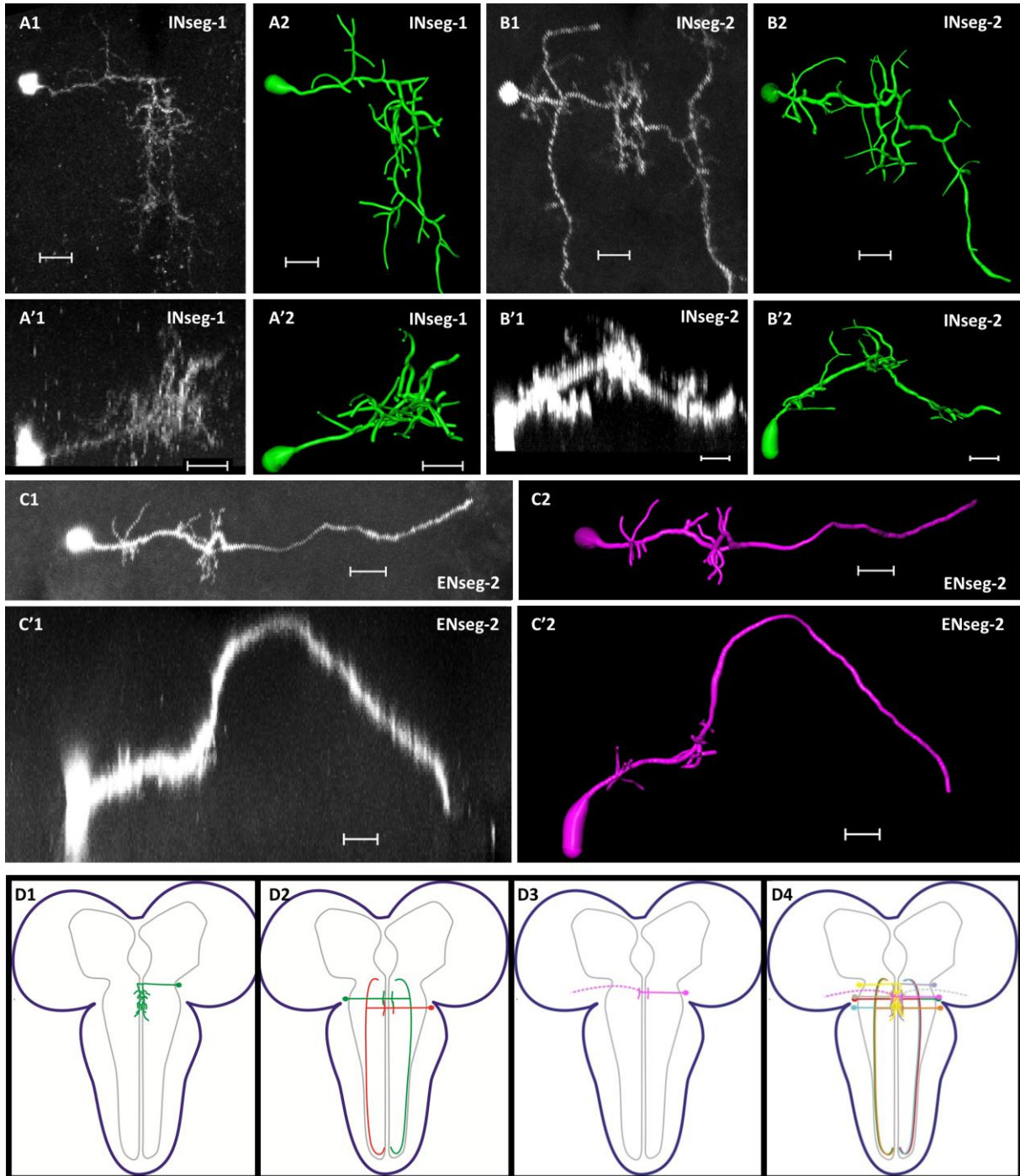
A garatalatti dúc CCAP-neuronjai

A hasdúclánc garatalatti dúcának minden egyes neuomerjében találunk egy pár CCAP-s interneuront (INSog-1-3) és a második neuomerben egy további efferens neuronpárt (ENSog-2) is.

Minden interneuron sejttestje ventrolaterális helyzetű. Ezek egy-egy primer neuritet bocsájtanak ki, amelyek a VL rostokat keresztezve és ezek mentén elágazódásokat képezve mediális irányba futnak, tovább egészen a VM rostokig, ahol anterior és poszterior irányú, majd dorzális irányba fordulva a DM rostok területén is anterior és poszterior orientációjú elágazásokat adnak. Végül a VM rostok területén egy másodlagos neurit lép ki és fut az

ellenoldali VL rostokig, ahol T alakban elágazik és beleolvad a VL rostkötegbe. A VL rostköteg anterior irányban egészen a SOG/cerebrális ganglion határig terjed, majd mediális irányba fordul és kisebb elágazásokat adva végződik. Poszterior irányban a VL köteg rostjai a hasdúc-lánc 8. neuomerjéig kezdve mediális irányba fordulnak és a centrális neuropilben végződnek.

A garatalatti dúc második neuomerjében található efferens CCAP-s neuronpár sejttestje közvetlenül az INseg-2-é mellett található, és nyúlványa vele megegyező lefutást mutat a VM rostkötegekig, ahol az interneuronális rostokhoz hasonlóan anterior/poszterior irányban nyúlványokat ad. Ezt követően dorzális irányba fordul és a DM rostkötegek területén kontralaterálisan elhagyja a központi idegrendszert (15. ábra).



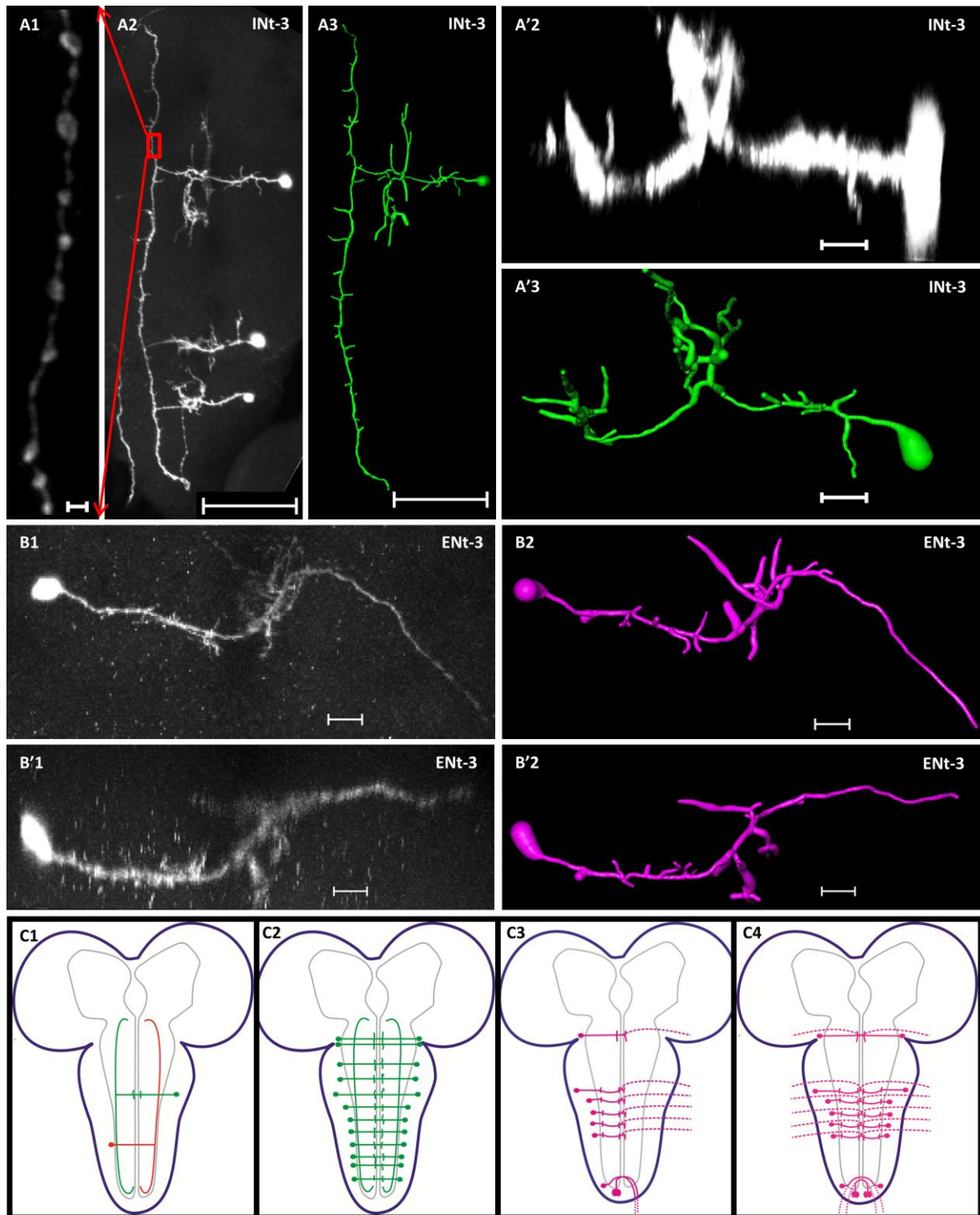
15. ábra. A garatalatti dúc maximum projekciója (A1, A'1, B1, B'1, C1, C'1) és neuronjainak 3D rekonstrukciója (A2, A'2, B2, B'2, C2, C'2) flip-out állapotokból. Dorzális (A1,2, B1,2, C1,2) és keresztmetszeti kép poszterior (A'1,A'2, B'1,B'2, C'1,C'2) nézetből. (A) Az INseg-1 neuron. (B) Az INseg-2 neuron. (C) Az

ENseg-2 neuron. **(D)** A maximum projekciók és 3D rekonstrukciók alapján készült egyszerűsített, idealizált sematikus ábrák. A neuronok helyzete a KIR határához (kék) és a neuropil határához (szürke) viszonyítva. **(D1)** Az INseg-1 sejt. **(D2)** Az INseg-2 (zöld) és az INseg-3 (piros) sejtek. **(D3)** ENseg-2 sejt. **(D4)** Az INseg-1, INseg-2, ENseg-2 és az INseg-3 sejt párok összesített ábrán. Jól láthatóak a nyúlványrendszerek átfedő zónái. Aránymérték: 10 µm az egyes ábrákon.

CCAP-s neuronok a hasdúclánc thorakális (T1-3) és abdominális részén (A1-9)

A thorakális T1-T3 neuromerek három pár CCAP-s interneuronja (INt-1-3) az INSog sejtekhez hasonló. A T3 neuomer egy pár efferens CCAP-s sejtje morfológiailag szintén megegyezik az ENSog sejtekkel, perifériás nyúlványai a központi idegrendszert elhagyva izmokat idegeznek be. Az INt és ENt sejtestek egymáshoz nagyon közel a VL rostok magasságában helyezkednek el, az INt általában egy sejtestnyivel dorzálisabban és laterálisabban helyezkedik el az ENt-nél.

Az A1-4 neuomerek szintén egy pár interneuront (INa-1-4) és egy pár efferens (ENa-1-4) CCAP-s neuront tartalmaznak, hasonlóan a T3 neuomerhez. A sejtestjeik azonban dorzálisabban helyezkednek el, mint a T3-ban, de továbbra is elmondható, hogy az INa-k dorzálisabban/laterálisabban helyezkednek el az ENa-knál. Az A5-7 neuomerekben két-két pár, az elülső neuomerek sejtjeihez hasonló morfológiájú interneuron található. Ezek közül az egyik pár az L3 stádiumban vagy utána, míg a másik ezt megelőzően is szintetizál CCAP-t. Az A8 neuomerben egy pár efferens sejtet (ENa-8), az A9 neuomerben két pár efferens neuront (ENa-9a-b) találunk. Az ENa-8 dorzolaterális helyzetű sejtestjéből egy elsődleges neurit ered, mely a VL rostokat érintve halad a VM rostokig, eközben gyenge arborizációt formál az elsődleges neurittól poszterior irányba. A VM rostoknál kontralaterálisan dorzális irányba fordul és posterior irányban egy kilépő idegen elhagyja a KIR-t. Az ENa-9 neuron sejtestje a hasdúclánc poszterior végén dorzálisan helyezkedik el, az elsődleges neurit ventrálisan anterior irányba fut, míg el nem éri az ENa-8 neuritjét. Itt az ENa-8-hoz hasonlóan mediálisan átlép a középvonalon, majd poszterior irányba fordul és egy kilépő idegen keresztül együtt hagyják el a központi idegrendszert **(16. ábra)**.



16. ábra. A hasdúclánc maximum projekciója (A1,2,'2, B1,'1) és neuronjainak 3D rekonstrukciója (A3,'3, B2,B'2) flip-out állatokból, dorzális (A1,2,3, B1,2) és keresztmetszeti kép poszterior (A'2, '3, B'1, B'2) nézetből. (A) Az INt-3 neuron. (B) Az ENt-3 neuron. (C) A maximum projekciók és 3D rekonstrukciók alapján készült egyszerűsített, idealizált sematikus ábrák. A neuronok helyzete a KIR határához (kék) és a neuropil határához (szürke) viszonyítva. (C1) A hasdúclánc területén előforduló IN sejtek típusai. (C2) A hasdúclánc területén előforduló összes IN sejt összefoglaló ábrája. (C3) A hasdúclánc területén előforduló EN sejtek. Az ábra az EN típusok áttekinthetősége érdekében csak az egyik hemiganglion sejtjeit tünteti fel. (C4) A hasdúclánc területén előforduló összes EN sejt összefoglaló ábrája. Aránymérték: 1 μ m (A1), 50 μ m (A2,A3) és 10 μ m a további ábrákon.

Pre- és posztzinaptikus markerek eloszlása a CCAP-neuronok rosthálózataiban

Korábbi irodalmi adatok alapján [Santos (2007)] a muslica L3 stádiumos lárva hasdúccláncában a DM rostokat mint a CCAP-neuronpopuláció feltételezhető bemeneti régióját, míg a VL rostokat mint feltételezhető kimeneti régiókat írták le, azonban ezek az eredmények nem terjedtek ki az egész idegrendszerre, továbbá nem voltak sem kellően részletesek, sem elég egyértelműek.

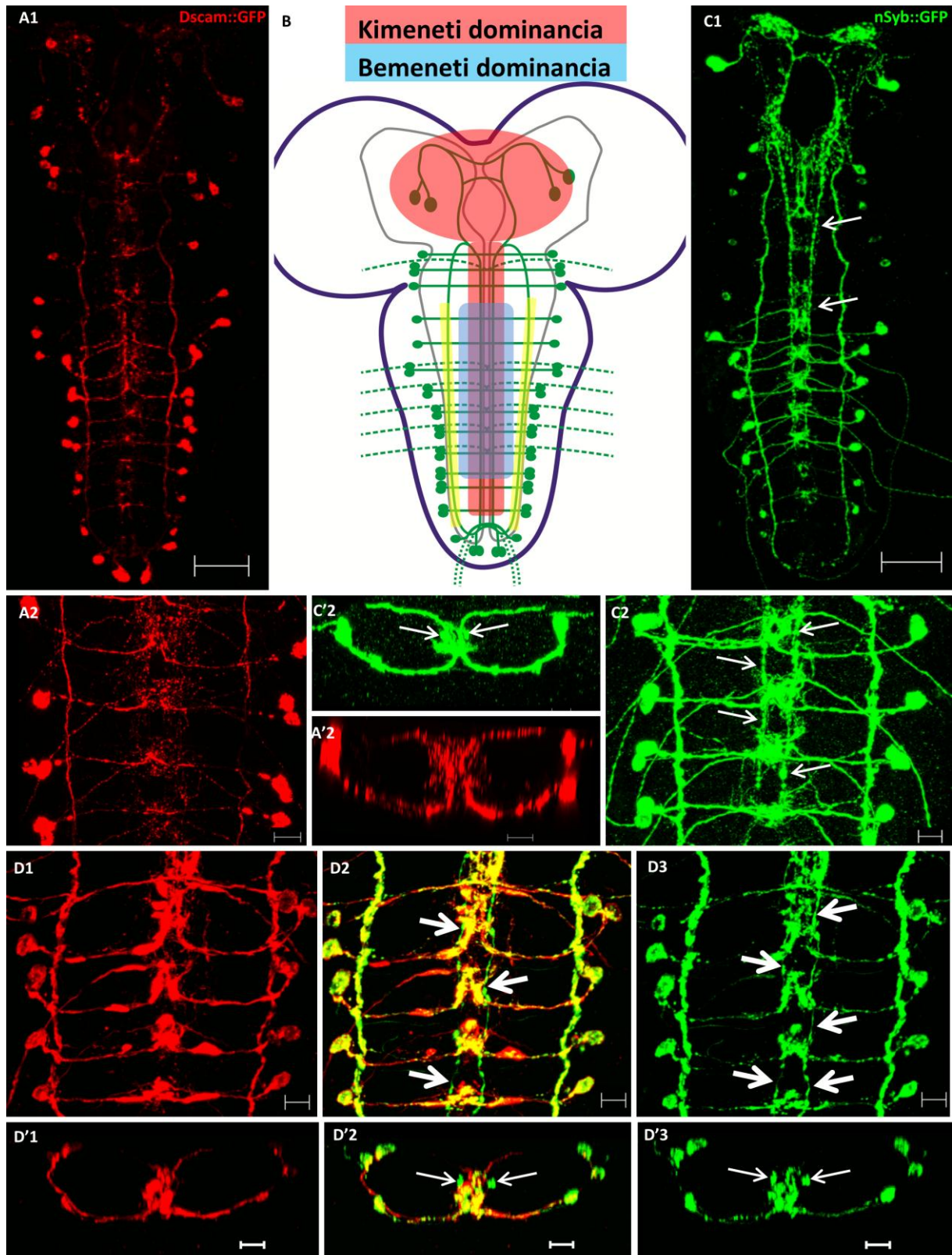
Időközben a neurogenetika fejlődésének köszönhetően újabb, megbízhatóbb szinaptikus felszínmarkerek váltak elérhetővé. Vizsgálatainkban a posztzinaptikus felszíneken Dscam.GFP, a preszinaptikus felszíneken Syt.eGFP fúziós proteinekét fejeztettünk ki. A Dscam[17,1] izoforma egy sejtadhéziós fehérje, mely a *Drosophila* gombatestében a dendritikus régiókhoz asszociált, és így mint egy lehetséges preszinaptikus felszínmarkert alkalmazzák [Wang és mtsai. (2004)]. A synaptotagmin egy szinaptikus vezikula transzmembrán fehérje, mely szerepet játszik a vezikula preszinaptikus felszínhez való dokkolásában, az axonokban a preszinaptikus vezikulá-raktárakba dúsul fel, ezért mint lehetséges preszinaptikus felszínmarker használatos [Zhang és mtsai. (2002)]. Bár a korábbi eredményeket sikerült ugyan pontosítanunk, célkitűzésünk harmadik pontját nem sikerült tökéletesen körbejárni. Kiderült ugyanis, hogy a cd8.gfp-vel ellentétben ezeknek a markereknek a jelenlegi alkalmazhatósága az enhancer trapping módszerre korlátozódik, azaz jelenleg még nem áll rendelkezésünkre a flip-out technikához megfelelően működő változat. Az egy-sejt morfológiai adatok alapján azonban az is látható volt, hogy bizonyos sejtek/sejtnyúlványok jól elkülönülnek az összefüggő rosthálózattól. Ezekben a struktúrákon sejtszinten is kiértékelhetővé válnak a szinaptikus felszínmarker eloszlások. Ennek előkísérleteiként most már a teljes CCAP-rosthálózatban vizsgáltuk és az eddig ismerethez képest részleteiben jelentősen finomítottuk a szinaptikus felszíneket jelölő markereloszlást.

Eredményeink azt mutatják, hogy a korábbiakban kimeneti régióként említett VL rostok mind be-, mind kimeneti felszínjelölést egyaránt hordoznak. A DM rostok területén a bemeneti felszínmarker az abdominális IN és EN neuronok nyúlványaihoz köthető diffúz eloszlást mutat, míg a kimeneti felszínmarker főként az abdominális EN sejtek nyúlványainak VM/DM kötegek mentén kialakuló megvastagodásaihoz, és a flip-out adatok alapján az INagy-2 leszálló nyúlványához köthető.

Az előzőekben a markerek eloszlását külön egyedekben vizsgáltuk, így nem volt viszonyítási alapunk a szinaptikus felszínnek egymáshoz képest megvalósuló térbeli eloszlásáról. Az esetleges kompartmentalizáció igazolásához/cáfolatához azonban ez elengedhetetlenül szükséges.

Más folyamatban lévő kísérletsorozatunk alatt újabb markerek váltak elérhetővé. A már meglévő, preszinaptikusan kifejeződő synaptotagminhoz hasonló synaptobrevint [Zhang és mtsai. (2002)] hordozó törzsön (uas-syb.gfp) és a DenMark [Nicolai és mtsai. (2011)] elnevezésű, posztzinaptikus felszíneket jelölő dendritmarkert expresszáló (UAS-DenMark.mcherry) törzsön végrehajtott kromoszómamozgatásnak köszönhetően egy új riportertörzset keresztezünk ki (UAS-DenMark::mcherry; UAS-Syt::eGFP). Ezt egy GAL4-drivert tartalmazó törzsszel való keresztezés követte, így a meghajtó sejtben/szövetben a valószínűsíthető be és kimeneti felszín a markerekhez kötött piros (mcherry) illetve zölden fluoreszkáló (GFP) fehérjék segítségével jelölhetővé váltak. Így egyazon állatban vizsgálhatjuk a felszínmarkerek eloszlását úgy, hogy közben eltekinthetünk az indirekt immunhisztokémia során esetleg keletkező fals pozitív jelölésektől.

Az új marker-kombináció, alátámasztotta korábbi megfigyeléseinket, miszerint: **i.** a preszinaptikus felszínmarkerek jelölik az abdominális EN/IN sejtek nyúlványait; a transzverzális rostok területén varikózus jelölést mutatnak, míg a mediális és a VL rostok területén erős megvastagodást jelölnek. **ii.** a posztzinaptikus felszínmarkerek esetén kis eltéréseket találtunk. A Dscam foltszerűen jelölte a transzverzális és a VL rostokat, míg a mediális rostok területén gyenge diffúz jelölődést kaptunk. A DenMark a varikózisoknál nagyobb megvastagodásokat mutat a transzverzális rostok területén, a mediális rostok területén egybefüggő megvastagodást jelez, végül a VL rostokat foltszerűen jelöli. **iii.** az INagy-2 nyúlványai az agydúc területén elsősorban posztzinaptikus jelölődést mutatnak, míg a DM rostok területén kizárólag preszinaptikus jelölődést észleltünk (17. ábra).



17. ábra. Szinaptikus felszínmarkerek eloszlása a lárva KIR-ben, maximum projekciók dorzális nézetből (A,C,D), keresztmetszeti képek poszterior nézetből (A',C',D'). (A) A posztszinaptikus felszínmarker (Dscam[17,1]) eloszlását láthatjuk a KIR CCAP-neuronjaiban. A hasdúclánc A1-A4 neuomerjei kinagyítva (A2) és az A2 neuomer keresztmetszeti képe (A'2). (B) A maximum projekciók alapján készült egyszerűsített, idealizált sematikus ábra. A neuronok helyzete a KIR határához (kék) és a neuropil határához (szürke)

viszonyítva. A vizsgált szinaptikus felszínmarkerek eloszlása alapján megkülönböztethetünk dominánsan kimeneti régiókat (áttetsző piros), dominánsan bemeneti régiókat (áttetsző kék) és kodomináns területeket (áttetsző sárga). (C) A preszinaptikus felszínmarker (nSyb) eloszlása a KIR CCAP-neuronjaiban. A hasdúclánc A1-A4 neuomerjei kinagyítva (C2) és az A2 neuomer keresztmetszeti képe (C'2). A DM rostok területén az INagy-2 nyúlványa (fehér nyíl). (D) Preszinaptikus (syt) és posztzinaptikus (DenMark) felszínmarkerek eloszlása egyazon állat hasdúcláncában az A1-A4 neuomerek CCAP-neuronjaiban. (D1) DenMark eloszlása dorzális nézetből és az A2 neuomer keresztmetszeti képe(D'1). (D2) DenMark (piros) és syt (zöld) fehérjék eloszlásának egymásra vetítése dorzális nézetből és az A2 neuomer keresztmetszeti képe poszterior irányból (D'2). (D3) A syt fehérje eloszlása dorzális nézetből és az A2 neuomer keresztmetszeti képe (D'3), az INagy-2 nyúlványa a DM rostok területén (fehér nyíl). Aránymérték: 50 μ m (A1,C1) és 10 μ m a további ábrákon.

Összefoglalás

A neuropeptidek számos élettani és viselkedési folyamat modulátoraiként ma már nem csak széleskörűen kifejtett szabályozó szerepük miatt állnak a figyelem középpontjában, hanem ma már azt is vizsgálják, milyen hatást gyakorol maga a központi idegrendszer a neuropeptiderg sejtekre. Ehhez egyes azonosított peptiderg neuronok kimeneteinek és bemeneteinek feltárása szükséges. Ezeknek a vizsgálatoknak genetikai és neuroanatómiai szempontból is jól ismert modellszervezete az ecetmuslica (*D. melanogaster*).

Vizsgálatainkat a *Drosophila* rák szív működést serkentő petid (CCAP) tartalmú struktúráin végeztük. Korábbi irodalmi adatok alapján ismert a peptid eloszlása a muslica harmadik stádiumos lárvájának (L3) hasdúcláncában. Az eddigi leírások minősége miatt megalapozottnak láttuk a CCAP-termelő rendszer pontosabb leírását, és vizsgálatainkat kiterjesztettük a teljes központi idegrendszerre.

Az elérhető antiszérumok gyenge minősége miatt az irodalomban leírt módon a CCAP-tartalmú sejtek jelölését egy sejtidegen anyag bejuttatásával és követésével oldottuk meg. A genetikából ismeretes enhancer trapping módszer segítségével a CCAP-termelő sejtekkel cd8 sejtadhéziós fehérjéhez kötve zölden fluoreszkáló fehérjét (GFP) fejeztünk ki, ami jól jelölte a CCAP-termelő struktúrák teljes felszínét.

Korábbi irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CCAP-neuronok a hasdúclánc területén megjelenésük és morfológiájuk alapján is több csoportra oszthatók, azonban a fénymikroszkópia felbontási határa és az átfedő struktúrák nagy száma miatt nem volt lehetőség arra, hogy az egyes sejtek morfológiáját feltárjuk. Ahhoz viszont, hogy a rendszer ki és bemeneti régióit azonosíthassuk, ismernünk kell a rendszert alkotó struktúrák pontos lefutását. Egy nemrég elérhetővé vált genetikai eszköz, a flip-out technika segítségével kidolgoztuk, hogyan lehet cd8.GFP fúziós fehérjét csak egy sejtben kifejeztetni. Ezáltal feloldható a teljes CCAP-rendszer és a sejtek morfológiáját és egymáshoz való viszonyát konfokális mikroszkópos 3D modellek segítségével szemléltethetjük.

Jelenleg a ki- és bemeneti felszínek azonosítására alkalmas szinaptikus markereket nem tudjuk csak egy sejtben kifejeztetni. A 3D modellek segítenek a teljes rendszer részegységeit egy-egy sejthez kötni, ezáltal a sejt-kommunikáció lehetséges irányát megszabó szinaptikus felszínek eloszlása sejtszinten vizsgálhatóvá válik. Ezek alapján nem kizárható, hogy az INagy-2 neuron a hasdúcláncban szinkronizáló szerepet játszik.

Irodalomjegyzék

1. Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, 287: 2185-95.
2. Ashburner, M., Wright, T.R. (1978) The laboratory culture of *Drosophila*. The genetics and biology of *Drosophila*. Academic Press, Fribourg
3. Baggerman, G., Boonen, K., Verleyen, P., De Loof, A., Schoofs, L. (2005) Peptidomic analysis of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system by two-dimensional capillary liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 40: 250–260.
4. Claxton, N.S., Fellers, T.J. and Davidson, M.W. (2006) Microscopy, Confocal. Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation.
5. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 263: 802-805.
6. Choi, M.Y., Rafaeli, A., Jurenka, R.A. (2001) Pyrokinin/PBAN-like peptides in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Research, 306: 459-465
7. Dirksen, H., Keller, R. (1988) Immunocytochemical localization of CCAP, a novel crustacean cardioactive peptide, in the nervous system of the shore crab, *Carcinus maenas* L. Cell Tissue Research, 254: 347-360.
8. Duffy, J.B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. Genesis, 32: 1-15.
9. Eckert, M., Herbert, Z., Pollák E., Molnár, L., Predel, R. (2002) Identical cellular distribution of all abundant neuropeptides in the major abdominal neurohemal system of an insect (*Periplaneta americana*). Journal of Comparative Neurology, 452: 264-275.
10. Ewer, J. (2005) Behavioral actions of neuropeptides in invertebrates: insights from *Drosophila*. Hormones and Behavior, 48: 418-429.
11. Evers, J. F., Schmitt, S., Sibila, M., and Duch, C. (2005). Progress in functional neuroanatomy: precise automatic geometric reconstruction of neuronal morphology from confocal image stacks. J. Neurophysiol. 93, 2331–2342.
12. Fónagy, A. (2005) Betekintés a rovar-neuroendokrinológiába I. A neuropeptidok szintézise, hatásai, csopontosításuk. Biokémia, 29: 60-67
13. Gäde, G., Hoffmann, K.-H., Spring, J. H. (1997) Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. Physiol. Rev. 77(4): 963–1032.
14. Golic, K. G., Hawley, R.S. (2005) *Drosophila*: A Laboratory Handbook. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
15. Groome, J. R., Lehman HK. (1995) Characterisation of crustacean cardioactive peptide-like immunoreactivity in the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* J. Comp. Neurol. 357 (1) 36-51.
16. Holman, G. M., Nachman, R. J., Wright, M. S. (1990) Insect neuropeptides. Annu. Rev. Entomol. 35: 201–217.
17. Hökfelt, T., Fuxe, K., Pernow, B. (1986) Coexistence of neuronal messengers: A new principle in chemical transmission. Progress In Brain Research, Vol. 68 Elsevier Amsterdam-New York-Oxford
18. <http://flybrain.neurobio.arizona.edu/Flybrain/html/contrib/2000/rein/larvalbrain.html>
19. Kean, L., Cazenave, W., Costes, L., Broderick, K.E., Graham, S., et al. (2002) Two nitridergic peptides are encoded by the gene capability in *Drosophila melanogaster*. American Journal Physiology, 282: 1297-1307.
20. Lakovaara, S. (1969) Malt as a culture medium for *Drosophila* species. D. I. S. 44: 128.
21. Landgraf, M., Sa'nchez-Soriano, N., Technau, G.M., Urban, J., Prokop, A. (2003) Charting the *Drosophila* neuropile: a strategy for the standardised characterisation of the genetically amenable neurites. Developmental Biology, 260: 207-22.
22. Lee, T., Luo, L. (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron, 22: 451-461.
23. Meigen, J. W. (1830) Auereuropäische zweiflügelige Insekten: als Fortsetzung des Meigenschen Werkes. Schulische Buchhandlung, Damm
24. Meinertzhagen I.A., Hanson, T.E. (1993) The development of the optic lobe. In The development of *Drosophila melanogaster*. Volume II. Eds. Michael Bate and Alfonso Martinez Arias. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
25. Merighi, A. (2002) Coexistence and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. Progress In Neurobiology 66:161-190.
26. Merritt, D.J., Murphey, R.K. (1992) Projections of leg proprioceptors within the CNS of the fly *Phormia* in relation to the generalized insect ganglion. Journal of Comparative Neurology, 322: 16-34.
27. Murphey, R. K., Possidente, D., Pollack, G., Merritt, D.J. (1989) Modality-specific axonal projections in the CNS of the flies *Phormia* and *Drosophila*. Journal of Comparative Neurology, 290: 185-200.

28. Nässel, D.R. (2002) Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology*, 68: 1–84.
29. Nässel, D.R. (2009) Neuropeptide signaling near and far: how localized and timed is the action of neuropeptides in brain circuits? *Invertebrate Neuroscience*, 9(2):57-75.
30. Nicolai, L.J., Ramaekers, A., Raemaekers, T., Drozdzecki, A., Mauss, A.S., Yan, J., Landgraf, M., Annaert, W., Hassan, B.A. (2010) Genetically encoded dendritic marker sheds light on neuronal connectivity in *Drosophila*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 107(47):20553-8.
31. Park, J.H., Schroeder, A.J., Helfrich-Förster, C., Jackson, F.R., Ewer, J. (2003) Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of *Drosophila* causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior. *Development*, 130: 2645-2656.
32. Phelps, B. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *methods*, 14: 367-379.
33. Pollák, E., Eckert, M., Molnar, L., Predel, R. (2005) Differential sorting and packaging of capa-gene related products in an insect. *Journal of Comparative Neurology*, 481: 84–95.
34. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast F.G., Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-233.
35. Predel, R., Wegener, C. (2006) Biology of the CAPA peptides in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(21):2477-90.
36. Predel, R., Wegener, C., Russell, W.K., Tichy, S.E., Russell, D.H., Nachman, R.J. (2004) Peptidomics of CNS-associated neurohemal systems of adult *Drosophila melanogaster*: a mass spectrometric survey of peptides from individual flies. *Journal of Comparative Neurology*, 474: 379–392.
37. Ralph J. Greenpan (1997) *Fly Pushing The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
38. Reeve, E. C. (2001) *Drosophila melanogaster*: The Fruit Fly. *Encyclopedia of genetics*. Fitzroy Dearborn Publisher, New York
39. Santos, J. G., Vömel, M., Struck, R., Homberg, U., Nässel, D. R., Wegener, C. (2007) Neuroarchitecture of Peptidergic Systems in the Larval Ventral Ganglion of *Drosophila melanogaster*. *PloS One*, 2: e695.
40. Schmitt, S., Evers, J. F., Duch, C., Scholz, M., and Obermayer, K. (2004). New methods for the computer-assisted 3-D reconstruction of neurons from confocal image stacks. *Neuroimage* 23, 1283–1298.
41. Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*, 217: 1-15.
42. Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59: 223-239.
43. Taghert, P. H., Veenstra, J. A. (2003) *Drosophila* neuropeptide signaling. *Advances in Genetics*, 49: 1-65
44. Truman, J. W. (1990) Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *Developmental Neurobiology*, 21: 1072-1084.
45. Veverlytsa, L., Allan, D.W. (2012) Temporally tuned neuronal differentiation supports the functional remodeling of a neuronal network in *Drosophila*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 109 (13):E748-56.
46. Vömel, M., Wegener, C. (2008) Neuroarchitecture of Aminergic Systems in the Larval Ventral Ganglion of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 3 (3): e1848.
47. Wang, J., Ma, X., Yang, J.S., Zheng, X., Zugates, C.T., Lee, C.H., Lee, T. (2004) Transmembrane/juxtamembrane domain-dependent Dscam distribution and function during mushroom body neuronal morphogenesis. *Neuron*, 43 (5):663-72.
48. Wegener, C., Reinl, T., Jansch L., Predel, R. (2006) Direct mass spectrometric peptide profiling and fragmentation of larval peptide hormone release sites in *Drosophila melanogaster* reveals tagma-specific peptide expression and differential processing. *Journal of Neurochemistry*, 96: 1362-1374.
49. Wong, A.M., Wang, J.W., Axel, R. (2002). Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell* 109: 229-41.
50. Zhang, Y.Q., Rodesch, C.K., Broadie, K. (2002) Living synaptic vesicle marker: synaptotagmin-GFP. *Genesis*, 34 (1-2):142-5.

"Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez".

Alulírott Karsai Gergely a dolgozatban leírt munkafolyamatokat mind önnállóan végeztem el.

.....

aláírás

Pécs, 2012 december 09.