

## A-Typ Allatostatine und Sulfakinine als Sättigungseffektoren in der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus*

Martina Meyering-Vos & Joseph Woodring

Lehrstuhl für Tierökologie I, Universität Bayreuth

**Abstract:** A-type allatostatins and sulfakinins as satiety effectors in the Mediterranean field cricket *Gryllus bimaculatus*

The regulation of the feeding behavior and digestion is in all animals a complex procedure. Recent investigations showed that neuropeptides play a central role not only in vertebrates but also in invertebrates with regard to these processes. Sulfakinins and allatostatins are two groups of neuropeptides, which were identified from insects of diverse orders. Myoactivity in the digestive tract of insects, seems to be a general function of these neuropeptides within insects. Since the first consequence after ingestion of food is the expansion of the foregut, followed by contraction and relaxation of the muscles of the digestive tract, these processes can affect the food intake. In addition, with some insect species it was proven that these neuropeptides stimulate the release of the digesting enzyme  $\alpha$ -amylase. A purposeful reduction of the allatostatin- and sulfakinin gene expression in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae), using the RNA interference method (RNAi), led to changes of food intake and food transport through the gut. The observations refer to an inhibitory bioactivity for both peptides. The digesting enzyme activities of  $\alpha$ -amylase and proteases were affected only by a suppression of the allatostatin gene.

**Key words:** endocrinological control, neuropeptide, gene silencing, sulfakinin, allatostatin, digestion, *Gryllus bimaculatus*

Dr. M. Meyering-Vos, Prof. Dr. J. Woodring, Lehrstuhl für Tierökologie I, Universität Bayreuth, Universitätsstr. 30, D-95440 Bayreuth, E-mail: Martina.Meyering-Vos@uni-bayreuth.de

Allatostatine (AS) und Sulfakinine (SK) sind Neuropeptidhormone, die aus mehreren Insektenarten isoliert und analysiert wurden. Die AS können durch strukturelle Merkmale in drei Typen eingeteilt werden, wobei die Peptide des A Typs durch das C-terminale Sequenzmotif FGL(I,V)amid charakterisiert sind. Die AS hemmen bei einigen Insektenarten die Juvenilhormonbiosynthese und -freisetzung aus den Corpora allata. Eine generelle Funktion dieser Neuropeptide scheint ihre myoaktive Wirkung auf viscerale Muskulatur zu sein. Daneben stimulieren sie die Verdauungsenzymaktivität und haben inhibitorische Wirkung auf die Futteraufnahme und die Vitellogeninbiosynthese (Review: HOFFMANN & al. 1999). Eine Strukturaufklärung der cDNA der A-Typ AS (MEYERING-VOS & al. 2001) ergab insgesamt 14 potentielle Peptide auf einem Prohormonvorläufer, der in verschiedensten Geweben exprimiert wird, was ein weiterer Hinweis auf die multifunktionale Rolle der Peptide ist. Eine andere Gruppe von Neuropeptiden stellen die Sulfakinine dar, die in ihrer C-terminalen Heptapeptidsequenz DY(SO<sub>3</sub>H)GHMRFamid übereinstimmen, wobei die Sulfatierung des Tyrosins bisher nur für einige Peptide nachgewiesen werden konnte. Die SK cDNA aus der Grille *G. bimaculatus* kodiert einen Prohormonvorläufer, der ausschließlich im Grillengehirn exprimiert wird, und aus dem zwei potentielle SK Peptide freigesetzt werden können (MEYERING-VOS & MÜLLER 2007). Auch diese Neuropeptide sind myoaktiv, d.h. in Schaben und Heuschrecken wurde eine Stimulation der Darmkontraktion nachgewiesen (NACHMAN & al. 1986, SCHOofs & al. 1990). Außerdem wurde in Heuschrecken, Schaben und Fliegen eine Hemmung der Futteraufnahme unter dem Einfluss von SK festgestellt (Wei & al. 2000, MAESTRO & al. 2001, DOWNER & al. 2006). Die Sulfakinine weisen eine große strukturelle aber auch physiologische Ähnlichkeit mit der Gastrin/Cholecystokinin Peptidfamilie der Vertebraten auf, die hormonelle Regulatoren verschiedener Verdauungsprozesse und des Essverhaltens darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wird der Fragestellung nachgegangen, ob die Genexpression von AS und SK in *G. bimaculatus* nach abdominalen Injektionen entsprechender doppelsträngiger (ds) RNA (RNA Interferenz Methode) erfolgreich unterdrückt werden kann und welche Auswirkungen diese Suppression auf die Futteraufnahme und Verdauung der Grillen hat. Detaillierte Kenntnisse über die Funktionen der Genprodukte (Neuropeptide) könnten bei der Entwicklung neuartiger Insektizide für die Schädlingsbekämpfung helfen.

### Materialien und Methoden:

Die für die Versuche verwendete Grille, *Gryllus bimaculatus* (Ensifera, Gryllidae) wurde in einer Laborzucht in Gruppen unter standardisierten Laborbedingungen gehalten (vgl. MEYERING-VOS & HOFFMANN 2003). Adulte weibliche Tiere wurden am Tag der Imaginalhäutung getrennt. Kurz nach der Häutung wurde in die Grillen Ringer Kontrolllösung oder 6 µg (AS), bzw. 1-2 µg (SK, Allatotropin) doppelsträngiger (ds) RNA abdominal injiziert. Die dafür verwendete dsRNA wurde mit einer PCR Methode hergestellt (vgl. MEYERING-VOS & al. 2006).

Für die Expressionsstudien wurden die Gehirne aus 40-50 Tieren herauspräpariert und die RNA mit dem RNeasy Miniprep Kit (Qiagen) extrahiert, wobei Spuren von genomischer DNA mit einem DNase Verdau auf der Säule entsprechend den Anleitungen des Herstellers entfernt wurden (vgl. MEYERING-VOS & HOFFMANN 2003). Die RNA wurde für die anschließende RT-PCR verwendet, die in Gegenwart von sequenzspezifischen Primern durchgeführt wurde. Die entstandenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch getrennt, geblottet und densitometrisch quantifiziert, wie in MEYERING-VOS & al. (2006) beschrieben. Parallel dazu wurde zur Normalisierung der Werte die Expression des internen Standards  $\beta$ -Aktins bestimmt. Für die Fütterungsexperimente wurden unverpaarte injizierte Grillenweibchen mit Wasser, aber ohne Futter für 22 h in Plastikboxen, die Plastikverstecke enthielten, gehalten. Anschließend wurde getrocknetes Karottenpulver für 30-80 min gefüttert. Danach wurde der Darm herauspräpariert und in einen Vorder-/Mitteldarmbereich (Kropf, Proventrikulus, Caecum, Ventrikulus) sowie einen Hinterdarmabschnitt (Colon, Ileum) getrennt. Die Karotinoide wurden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert, photometrisch quantifiziert, und mit einer Eichgerade wurde die von den Tieren aufgenommene Karottenmenge ermittelt (vgl. MAESTRO & al. 2001).

Die  $\alpha$ -Amylase und Protease Aktivität wurde in Mitteldarmgeweben und -sekreten von 2 Tage alten injizierten verpaarten Grillenweibchen bestimmt, wie in WOODRING & al. (2006) angegeben. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der Students *t*-Test angewendet.

### Ergebnisse und Diskussion:

Nach der Injektion von dsRNA in das Abdomen von *G. bimaculatus* Weibchen konnte die Expression der SK- und AS-Gene in verschiedenen Geweben deutlich reduziert werden (Abb.1), was auf eine systemische Wirkung der dsRNA hinweist. Die angewendete semiquantitative RT-PCR mit internem Standard ist nicht zur exakten Quantifizierung der Effizienz der RNA-Interferenz Methode geeignet, jedoch können relative Expressionen im Vergleich zu Ringer injizierten Kontrolltieren ermittelt werden. Die SK Expression war 1 Tag nach der Injektion im Gehirn um  $67,2 \pm 13,8\%$  ( $n=3, p<0,05$ ) unterdrückt, während die AS Expression nach 3 Tagen um  $58 \pm 8,5\%$  ( $n=2$ ) reduziert war. Eine vollständige Suppression konnte nicht erreicht werden, was z.B. auch in Honigbienen bei der Analyse der Genexpression des Octopamin-rezeptors nach Anwendung der RNAi festgestellt worden war (FAROOQUI & al. 2004) und wahrscheinlich damit zu erklären ist, dass die RNA Interferenz posttranskriptional wirkt. Die Spezifität der RNAi wurde nicht nur durch die Konstanz der Expression des  $\beta$ -Aktinstandards bestätigt, sondern auch durch Injektionen von dsRNA, die aus dem Allatotropin Gen des Eulenfalters *Spodoptera frugiperda* (ABDEL-LATIEF & al. 2003) abgeleitet worden war. Grillenweibchen, die mit dieser unspezifischen dsRNA injiziert worden waren, nahmen eine vergleichbare Menge an Futter auf wie die Ringerkontrolltiere (Abb.2 A,B).

Die Suppression der AS und SK Genexpression hatte einen Effekt auf die Futteraufnahme und den -transport durch den Darm. AS dsRNA injizierte Tiere, die einen Tag gehungert hatten, nahmen in den ersten 30 min nach Futtergabe (-38%,  $n=8, p<0,005$ ) weniger Futter auf als die Ringerkontrolltiere (Abb. 2A). In den nächsten 30 min kehrte sich der Effekt jedoch um und nach einer Gesamtfütterungsdauer von 60 min hatten die injizierten Tiere 79 % ( $n=6, p<0,05$ ) mehr gefressen. Erst nach 60 min waren im Hinterdarm Karotinoide extrahierbar und auch dort konnte ein um 75% ( $n=10, p<0,005$ ) erhöhter Darminhalt (Abb. 2B) festgestellt werden, möglicherweise hervorgerufen durch eine Verlangsamung der Nahrungspassage z.B. durch eine

Verringerung der Aktivität der visceralen Darmmuskulatur. SK dsRNA injizierte Tiere zeigten erst nach 80 min Fraßzeit eine erhöhte Futteraufnahme. Nach dieser Zeit war der Karottenfraß um 86 % (n=11, p<0.005) erhöht (Abb. 2A) und auch aus dem Hinterdarm konnten 61% (n=10, p<0,005) mehr Karotinoide extrahiert werden als bei den Kontrolltieren (Abb. 2B). Unter der Annahme, dass die dsRNA Injektionen einen RNA Interferenzmechanismus auslösen, der letztendlich zu einer Verminderung der Peptidtitern in den Geweben führt, kann abgeleitet werden, dass die Peptide eine gegensätzliche Bioaktivität zeigen als die hier im Versuch bestimmte. Während die AS in den ersten 30 min der Futteraufnahme somit möglicherweise einen stimulierenden Effekt haben, scheinen beide Peptide nach einer längeren Fütterungszeit eine inhibierende Funktion auszuüben, wie sie auch schon für SK in Fliegen, Schaben und Heuschrecken und für AS bisher nur in Schaben (AGUILAR & al. 2003) *in vitro* nachgewiesen wurde.

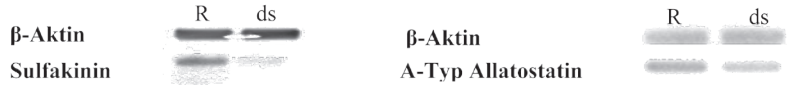


Abb. 1: Genexpression der Sulfakinin (SK), Allatostatin (AS)- und  $\beta$ -Aktinsequenz im Gehirn adulter Grillenweibchen, representative Southern Blots der spezifischen RT-PCR Fragmente. Die Tiere wurden kurz nach der Imaginalhäutung abdominal mit Ringer Lösung (R) oder dsRNA (ds) injiziert und das Gewebe nach 1 Tag (SK) oder 3 Tagen (AS) analysiert.

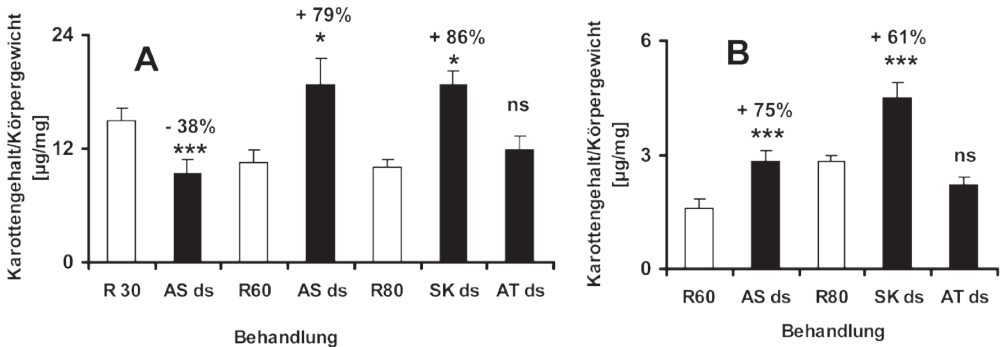


Abb. 2: Effekt der RNA Interferenz auf die Futteraufnahme (A) und die Nahrungspassage durch den Darm (B) der Grillen. Die Tiere wurden kurz nach der Imaginalhäutung mit Ringerlösung (R, weiße Balken) oder doppelsträngiger Allatostatin (AS), Sulfakinin (SK) bzw. unspezifischer Allatotropin (AT) dsRNA aus *S. frugiperda* (ds, schwarze Balken) injiziert und der Vorderdarm (A) bzw. Hinterdarm (B) 1 Tag später extrahiert und der Karotinoidgehalt bestimmt. Fütterungsdauer 30, 60 oder 80 min. Prozentuale Veränderungen über den Balken angeben. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Sternchen bezeichnen signifikante Unterschiede zur Ringerkontrollen, \* p<0.05, \*\*\*p<0.005 (Students t-Test), n=6-10.

Die Injektion der AS dsRNA wirkte sich auch auf die Aktivität des kohlenhydratverdauenden Enzyms  $\alpha$ -Amylase und auf die Proteaseaktivität im Mitteldarm aus (ohne Abb.). Die Suppression der AS Genexpression führte im Vergleich zu Ringer Kontrollen zu einer signifikanten Verminderung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität auf  $72 \pm 1,6\%$  (Ringerkontrolle  $100\% = 1181-3098 \mu\text{g Maltose/h/Mitteldarm}$ ; n=5, p<0,005) im Mitteldarmgewebe 2 Tage alter adulter Grillenweibchen und bei 3 Tage alten Tieren zu einer Steigerung der Proteaseaktivität auf  $313 \pm 14,9\%$  (Ringerkontrolle  $100\% = 8,9-92,6 \text{ mOD}_{595}/\text{h/Mitteldarm}$ ; n=5, p<0,01), während kein Einfluss auf die Sekretion dieser Enzyme in das Mitteldarmmlumen messbar war. SK dsRNA Behandlungen hatten weder eine Wirkung auf die Verdauungsenzymaktivitäten im Mitteldarmgewebe noch auf diejenigen der Sekrete. In Schaben hatten *in vitro* Inkubationen des Darmes in Gegenwart der AS Peptide eine stimulierende Aktivität der Allatostatine auf die Verdauungsenzymaktivität ergeben (FUSE & al. 1999, AGUILAR & al. 2003), die aus den vorliegenden Ergebnissen möglicherweise auch für *G. bimaculatus* abgeleitet werden kann.

In weiteren Untersuchungen sollen die *in vivo* Ergebnisse zur Aufklärung der Funktion von SK und AS bei den verschiedenen Prozessen der Futteraufnahme und Verdauung durch *in vitro* Inkubationsexperimente in Gegenwart der Peptide ergänzt werden.

### Dank

Wir möchten Frau Marion Preiss, Dorothea Wiesner und Carola Göbel für die technische Unterstützung der Arbeiten, sowie Herrn Prof. K. H. Hoffmann für konstruktive Kritik am Manuskript danken. Das Projekt wurde durch die DFG (ME 2034/1-3) gefördert.

### Literatur

- ABDEL-LATIEF, M., MEYERING-VOS, M. & HOFFMANN, K.H. (2003): Molecular characterisation of cDNAs from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* encoding *Manduca sexta* allatotropin and allatostatin preprohormone peptides – *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 467-476.
- AGUILAR, R., MAESTRO, J.L., VILAPLANA, L., PASCUAL, N., PIULACHS, M-D. & BELLÉS, X. (2003): Allatostatin gene expression in brain and midgut, and activity of synthetic allatostatins on feeding-related processes in the cockroach *Blattella germanica* – *Regul. Peptides* **115**: 171-177.
- DOWNER, K.E., HASELTON, A.T., NACHMAN, R.J. & STOFFALONA, JR. J.G. (2006): Insect satiety: sulfakinin localization and the effect of drosulfakinin on protein and carbohydrate ingestion in the blow fly, *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) – *J. Insect Physiol.* **53**: 106-112.
- FAROOQUI, T., VAESSIN, H. & SMITH, B.H. (2004): Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference – *J. Insect Physiol.* **50**: 701-713.
- FUSÉ, M., ZHANG, J.R., PARTRIGE, E., NACHMAN, R.J., ORCHARD, I., BENDENA, W.G. & TOBE, S.S. (1999): Effects of an allatostatin and a myosuppressin on midgut carbohydrate enzyme activity in the cockroach *Diploptera punctata* – *Peptides* **20**: 1285-1293.
- HOFFMANN, K.H., MEYERING-VOS, M. & LORENZ, M.W. (1999): Allatostatins and allatotropins: Is the regulation of the corpora allata activity their primary function? – *Eur. J. Entomol.* **96**: 255-266.
- MAESTRO, J.L., AGUILAR, R., PASCUAL, N., VALERO, M.L., PIULACHS M.D., ANDREU, D., NAVARRO, I. & BELLES, X. (2001): Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach – *Europ. J. Biochem.* **268**: 5824-5830.
- MEYERING-VOS, M., WU, X., HUANG, J., JINDRA, M., HOFFMANN, K.H. & SEHNAL, F. (2001): The allatostatin gene of the cricket *Gryllus bimaculatus* (Ensifera, Gryllidae) – *Molec. Cell. Endocrinol.* **184**, 103-114.
- MEYERING-VOS, M. & HOFFMANN, K. H. (2003): Expression of allatostatins in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae) – *Comp. Biochem. Physiol. B*, **136**: 207-215.
- MEYERING-VOS, M., MERZ, S., SERTKOL, M. & HOFFMANN, K.H. (2006): Functional analysis of the allatostatin A gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the armyworm *Spodoptera frugiperda* – *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**: 492-504.
- MEYERING-VOS, M. & MÜLLER, A. (2007): Structure of the sulfakinin cDNA from *Gryllus bimaculatus* and localization of the gene expression – *Insect Mol. Biol.* (in press).
- NACHMAN, R.J., HOLMAN, G.M., COOK, B. J., HADDON, W.F. & LING N. (1986): Leucosulfakinin II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin – *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **140**: 357-364.
- SCHOOF, L., HOLMAN, G.M., HAYES, T.K., NACHMAN, R.J. & DE LOOF, A. (1990): Isolation and identification of a sulfakinin-like peptide with sequence homology to vertebrate gastrin and chole-cystokinin from the brain of *Locusta migratoria*. – in: MC CAFFEREY, A.R. & WILSON, I.D.: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*. Plenum Press, New York: 231 pp.
- WEI, Z., BAGGERMAN, G., NACHMAN, R.J., GOLDSWORTHY, G., VERHAERT, P., DE LOOF, A. & SCHOOF, L. (2000): Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria* – *J. Insect Physiol.* **46**: 1259-1265.
- WOODRING, J., HOFFMANN, K.H. & LORENZ, M.W. (2006): Activity, release and flow of digestive enzymes in the cricket, *Gryllus bimaculatus* – *Physiol. Entomol.*: DOI: 10.1111/j.1365-3032.2006.00541.x.