A sejtes stressz-választ szabályozó genetikai útvonalak integrációja *Caenorhabditis elegans*ban

Doktori értekezés

Barna János

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológia Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna, akadémikus

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program
Programvezető: Dr. Orosz László, akadémikus

Témavezető: Dr. Vellai-Takács Krisztina, egyetemi adjunktus
Konzulens: Dr. Vellai Tibor, egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Genetikai Tanszék

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ..... .5. oldal
2. BEVEZETÉS ..... . 8. oldal
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ..... . 9. oldal
3.1. A hősokk válasz és hősokk transzkripciós faktorok ..... 9. oldal
3.1.1. A hősokk válasz ..... . 9. oldal
3.1.2. A hősokk válasz során indukálódó fehérjék ..... . 10. oldal
3.1.3. A molekuláris *chaperone*-ok ..... . 11. oldal
3.1.4. A HSF1 hősokk transzkripciós faktor ..... 12. oldal
3.1.5. A hősokk transzkripciós faktor fehérjecsalád ..... 14. oldal
3.1.6. A hősokk transzkripciós faktorok szerepe az egyedfejlődésben és a differenciációban ..... 16. oldal
3.1.7. A HSF-1 *C. elegans* hősokk transzkripciós faktor ..... 17. oldal
3.2. Az autofágia ..... 19. oldal
3.2.1. Az autofágia főbb típusai ..... 19. oldal
3.2.2. Az autofágia mechanizmusa ..... 20. oldal
3.2.2.1. Az autofágia indukciója ..... 20. oldal
3.2.2.2. A vezikula nukleáció ..... 22. oldal
3.2.2.3. Fagofór növekedés és záródás ..... 23. oldal
3.2.2.4. Az autofagoszóma érése és fúziója a lizoszómával ..... 25. oldal
3.2.3. Az autofágia szabályozása ..... 25. oldal
3.2.4. Az autofágia funkciói ..... 27. oldal
3.3. A *C. elegans*, mint genetikai modellszervezet ..... 29. oldal
3.4. A *C. elegans* dauer lárva képződés szabályozása ..... 31. oldal
3.4.1. A dauer lárvaállapot ..... 31. oldal
3.4.2. A dauer egyedfejlődés szabályozása ..... 33. oldal
3.4.2.1. A dauer állapotot szabályozó főbb jelátviteli útvonalak ..... 34. oldal
3.4.2.2. A guanilát cikláz útvonal ..... 35. oldal
3.4.2.3. A TGF-β útvonal ..... 36. oldal
3.4.2.4. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal ..... 40. oldal
3.4.2.5. A szteroid hormon útvonal ..... 43. oldal

3.4.2.6. A dauer egyedfejlődést szabályozó genetikai útvonalak „kölcsönhatásai” ..... 47. oldal

3.4.3. Magas hőmérséklet indukált dauer fejlődés ..... 48. oldal

4. CÉLKITŰZÉSEK ..... 50. oldal
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK ..... 52. oldal
5.1. Törzsek fenntartása ..... 52. oldal
5.2. Felhasznált törzsek ..... 53. oldal
5.2.1. Felhasznált *E. coli* törzsek ..... 53. oldal
5.2.2. Felhasznált *C. elegans* törzsek ..... 53. oldal
5.2.3. Az általam létrehozott *C. elegans* törzsek ..... 54. oldal
5.3. Dauer arány meghatározás ..... 55. oldal
5.4. Élethossz mérések ..... 55. oldal
5.5. RNS interferencia ..... 55. oldal
5.6. Molekuláris biológiai módszerek ..... 56. oldal
5.6.1. Kompetens sejt készítése ..... 56. oldal
5.6.2. *E. coli* transzformálás ..... 56. oldal
5.6.3. Plazmid DNS izolálása *E. coli* baktériumból ..... 57. oldal
5.6.4. Genomi DNS izolálása *C. elegans*ból ..... 57. oldal
5.6.5. RNS izolálás *C. elegans*ból ..... 57. oldal
5.6.6. PCR termék izolálása agaróz gélből ..... 58. oldal
5.7. Riporter konstrukciók ..... 59. oldal
5.7.1. A *pdaf-7::gfp* konstrukció ..... 59. oldal
5.7.2. A p_{mut}*daf-7::gfp* konstrukció ..... 59. oldal
5.7.3. *phsf-2::hsf-2::gfp* konstrukció ..... 59. oldal
5.7.4. *hsf-1* RNSi konstrukció ..... 60. oldal
5.8. Transzgenikus állatok előállítása ..... 60. oldal
5.9. Fluoreszcens mikroszkópia ..... 60. oldal
5.10. Kvantitatív RT-PCR ..... 61. oldal
5.11. Bioinformatikai módszerek ..... 62. oldal
6. EREDMÉNYEK ..... 63. oldal
6.1. A HSF-1 transzkripciós faktor szabályozza a *daf-7* gén expresszióját ..... 63. oldal
6.1.1. A *daf-7* 5’ szabályozó régiójában konzervált HSF-1 kötőhely található ..... 63. oldal

6.1.2. A HSF-1 gátolja a *daf-7* expresszióját ..... 64. oldal
6.1.3. A HSF-1 aktivitását a DAF-11/GC és a DAF-21/Hsp90 negatívan szabályozza ..... 64. oldal
6.1.4. A dauer egyedfejlődés *daf-11/daf-21* mutáns állatokban HSF-1-et igényel ... 67. oldal
6.1.5. A HSF-1 egy konzervált kötőhelyen keresztül szabályozza a *daf-7* expresszióját ..... 67. oldal
6.2. Az inzulin/IGF-1 jelátvitel a HSF-1 gátlásán keresztül aktiválja a *daf-7* expresszióját ..... 70. oldal
6.3. A HSF-1 a *daf-7*-től *downstream* is hat az élethossz és az egyedfejlődés szabályozásában ..... 73. oldal
6.3.1. A HSF-1 *daf-7*-től *downstream* befolyásolja az élettartamot ..... 73. oldal
6.3.2. A HSF-1 a *daf-7*-től *downstream* is befolyásolja a dauer egyedfejlődést ..... 74. oldal
6.3.3. A *hsf-1* túltermelése szuppresszálja a dauer egyedfejlődést *daf-11/daf-21* defektív mutáns állatokban ..... 74. oldal
6.4. A HSF-1 aktiválja a TGF-β útvonal szabályozás alatt álló *daf-9/citokróm p450* gén kifejeződését ..... 75. oldal
6.4.1. A *daf-9 cisz*-szabályozó régiójában potenciális HSF-1 kötőhely található ..... 76. oldal
6.4.2. A HSF-1 aktiválja a *daf-9* gén expresszióját ..... 76. oldal
6.5. A HSF-1 fehérje transzkripciós célpontjainak genom-szintű *in silico* meghatározása ..... 78. oldal
6.6. A HSF-2 a reproduktív egyedfejlődést segíti elő ..... 79. oldal
6.6.1. *A hsf-2* egy HSF-1 paralógot kódol ..... 79. oldal
6.6.2. A *hsf-2* gén genetikai vizsgálata ..... 81. oldal
6.7. A TGF-β jelátvitel aktiválja az autofágiát *C. elegans*ban ..... 84. oldal
7. KÖVETKEZTETÉSEK ..... 86. oldal
7.1. A HSF-1 transzkripciós faktor nem klasszikus hősokk fehérjéket kódoló géneket szabályoz ..... 86. oldal
7.2. A HSF-1 transzkripciós faktor gátolja a *daf-7* gén expresszióját ..... 87. oldal
7.3. A HSF-1 integrálja a dauer egyedfejlődést elősegítő tényezők hatását ..... 88. oldal
7.4. A HSF-1 szerepe a dauer egyedfejlődés finomszabályozásában ..... 89. oldal
7.5. A HSF-1 kettős szabályozó szerepének jelentősége a dauer egyedfejlődésben ..... 94. oldal
7.6. A HSF-2 a reproduktív egyedfejlődést segíti elő ..... 94. oldal
7.7. A TGF-β jelátvitel aktiválja az autofágiát *C. elegans*ban ..... 96. oldal

8. ÖSSZEFOGLALÁS ..... 98. oldal
9. SUMMARY ..... 98. oldal
10. IRODALOMJEGYZÉK ..... 100. oldal
11. MELLÉKLET ..... 112. oldal
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ..... 116. oldal

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Akt	protein kináz B
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
AMP	adenozin-monofoszfát
ATG	autofágia gén (*autophagy related gene*)
ATP	adenozin-trifoszfát
BMP	csont morfogenetikus fehérje (*bone morphogenetic protein*)
bp	bázispár
CADPS	kálcium függő szekréció aktivátor fehérje (*calcium-dependent activator protein for secretion*)
cDNS	komplementer DNS (*complementary DNA*)
CGC	*Caenorhabditis* Genetikai Központ (*Caenorhabditis* Genetics Centre)
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CRISP	ciszteinben gazdag szekréciós fehérje (*cysteine-rich secretory protein*)
C_T	küszöb ciklus (*cycle threshold*)
DA	dafakronikus sav (*dafachronic acid*)
daf	abnormális dauer (lárva) fejlődés (*dauer formation abnormal*)
Daf-c	konstitutív dauer fejlődés (*dauer formation constitutive*)
Daf-d	dauer lárva fejlődés defektív (*dauer formation defevtive*)
DBD	DNS-kötő domén (*DNA-binding domain*)
dod	*daf-16*-tól *downstream* (*downstream of daf-16*)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dsRNS	dupla-szálú RNS (*double stranded RNA*)
EBF1	korai B-sejt transzkripciós faktor 1 (*early B-cell factor 1*)
EMSA	gélretardációs esszé (*electroforetic mobility shift assay*)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (*fibroblast growth factor*)
FoxO	Forkhead O-boksz típusú transzkripciós faktor (*forkhead box O transcription factor*)
FUdR	5-fluoro-2'-deoxyuridin
GC	guanilát cikláz
GFP	zölden fluoreszkáló fehérje (*green fluorescent protein*)

GTP	guanozin-trifoszfát
Hid	magas hőmérséklet indukált dauer (*high temperature induced dauer*)
HR	hidrofób aminosav ismétlődés (*hydrophobic heptad repeat*)
hsf	hősokk transzkripciós faktor (*heat shock factor*)
Hsp	hősokk fehérje (*heat shock protein*)
IGF	inzulinszerű növekedési faktor (*insulin-like growth factor*)
Il	interleukin
ins	inzulinszerű gén
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktozid
IR/InsR	inzulin receptor (*insulin receptor*)
kbp	kilobázispár
LB	Luria-Broth táptalaj
LC3	mikrotubulus asszociált fehérje 1 könnyű lánc (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*)
Lif	leukémia gátló faktor (*leukemia inhibitory factor*)
MAD	*Drosophila melanogaster mothers against decapentaplegic*
Map	mitogén aktivált fehérje (*mitogen-activated protein*)
mRNS	hírvivő RNS (*messenger RNA*)
mTORC	emlős TOR komplex (*mammalian TOR complex*)
NGM	*Nematoda* táptalaj (*Nematode* Growth Medium)
NHR	magi hormon receptor (*nuclear hormone receptor*)
O/E	túltermelő (*overexpressing*)
ORF	nyitott leolvasási keret (*open reading frame*)
PAS	preautofagoszómális struktúra (*preapreautophagosomal structure*)
PCR	polimeráz lácreakció (*polymesase chain reaction*)
PDK	PtdIns(3,4,5)P3 függő protein kináz
PE	foszfatidil-etanolamin
PtdIns(3)P	foszfatidilinozitol-3-foszfát
PtdIns3K	foszfatidilinozitol 3-kináz
PtdIns(4,5)P2	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PtdIns(3,4,5)P3	foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát
PTEN	foszfoinozitid-3-foszfatáz
qRT-PCR	kvantitatív RT PCR
RNS	ribonukleinsav

RNSi	RNS interferencia
ROS	reaktív oxigén származékok (*reactive oxygen species*)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (*sodium-dodecyl-sulfate*)
siRNS	rövid interferáló RNS (*small interfering RNS*)
TGF-β	transzformáló növekedési faktor- β (*transforming growth factor-β*)
TOR	rapamycin által gátolt kináz (*target of rapamycin kinase*)
TORC	TOR kináz komplex
TSC1/TSC2	Sclerosis tuberosa 1/2 komplex (*tuberous sclerosis 1/2 complex*)
unc	paralizált (*uncoordinated*)
ULK	*unc-51* szerű kináz (*unc-51 like kinase*)
UVRAG	UV sugárzás rezisztencia kapcsolt gén (*ultraviolet irradiation resistance-associated gene*)

2. BEVEZETÉS

A környezeti stressz a sejtekben különböző védekező mechanizmusokat indukál, amelyek egyik fontos kimenete a fehérje szerkezet homeosztázisának fenntartása. Ilyen mechanizmusok a citoplazma komponensek (akár a sejtszervecskék) lebontását végző autofágia és a sejtes hősokk-válasz. Az utóbbi során dajkafehérjék indukálódnak, amelyek elősegítik a károsodott fehérjék normális térszerkezetének helyreállítását vagy a károsodott fehérjék lebontását, megelőzve ezáltal a fehérje aggregátumok kialakulását. Munkám célja a sejtes stressz-választ szabályozó konzervált jelátviteli tengelyek közötti potenciális új kapcsolatok feltárása volt a genetikai modell rendszer fonalféreg *Caenorhabditis elegans*ban.

Ebben az élőlényben a környezeti stressz (pl. táplálékhiány, magas hőmérséklet vagy nagy egyedsűrűség) egy speciális egyedfejlődési diapauzát, ún. dauer lárva fejlődést indukál. A dauer lárva kialakulását az inzulin/IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), a TGF-β (*transforming growth factor-beta*), és a guanilát cikláz (GC) neuroendokrin jelátviteli rendszerek szabályozzák. Doktori munkám során kimutattam, hogy a hősokk-válaszban központi szerepet játszó HSF-1 (*heat shock factor-1*) transzkripciós faktor közvetlenül represszálja a DAF-7/TFG-β ligandumot kódoló gén expresszióját. A HSF-1 aktivitását a szisztematikus tápanyag-érzékelő DAF-2/IGF-1 receptor és a dauer feromonra érzékeny DAF-11/GC receptor gátolja. A HSF-1 tehát összefűzi a stressz-útvonalakat az egyedfejlődés (reprodukciós növekedés vs. dauer lárva fejlődés) és az öregedési folyamat szabályozásában. Eredményeim rávilágítanak arra, hogyan befolyásolja az éhezés, a magas hőmérséklet és a zsúfoltság az egyedfejlődést, az élettartamot, valamint a viselkedést egy állati rendszerben.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Hősokk transzkripciós faktorok

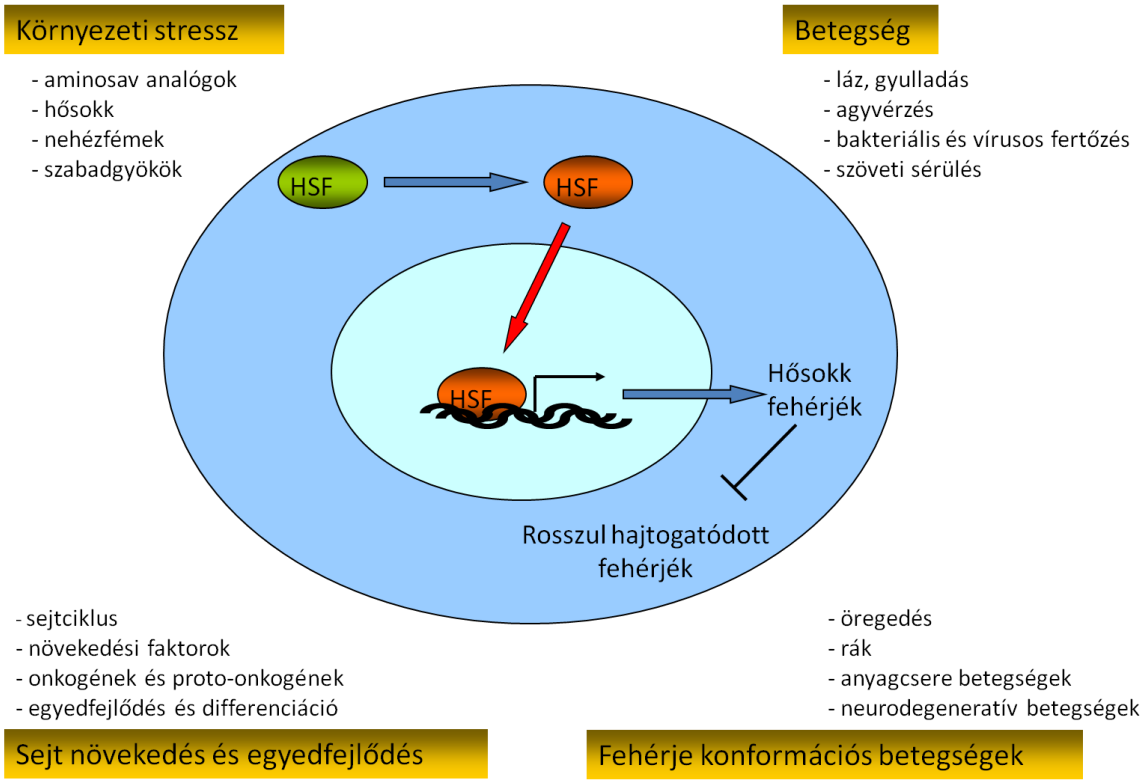
3.1.1. A hősokk-válasz

A fehérjék szigorúan meghatározott háromdimenziós szerkezettel rendelkeznek. Adott aminosavsorrenddel rendelkező fehérjék térszerkezetét a közeg összetétele és pH-ja mellett leginkább a hőmérséklet befolyásolja. Egy élőlény fehérjéi az evolúció során úgy optimalizálódtak, hogy a megfelelő működés ellátásához szükséges térszerkezetüket általában szűk hőmérséklet tartományon belül legyenek képesek kialakítani. Ha a hőmérséklet ezen a tartományon kívül van, akkor erre az élőlény egy evolúciósan konzervált ún. hősokk-válasszal reagál. A hősokk-válasz tehát az élő szervezetek védekezési reakciója a megemelkedett hőmérséklet következtében bekövetkező fehérje károsodások ellen. A válasz során meghatározott gének transzkripciója aktiválódik.

A hősokk válasz felfedezése Ferruccio Ritosa nevéhez köthető, aki 1962-ben megfigyelte, hogy a *Drosophila* nyálmirigy polién kromoszómáin furcsa puff-szerű képződmények alakulnak ki, ha a lárvákat magas hőmérsékleten nevelték [1]. Később igazolást nyert, hogy a hő stresszt követően kialakuló puffok az úgynevezett hősokk fehérjéket (Hsp = *heat shock proteins*) kódoló gének transzkripcionálisan aktív genomi szakaszai [2, 3].

A magas hőmérséklet fehérjéket károsító hatása már régóta ismert. Magas hőmérsékleten a fehérjék elveszítik konformációjukat, aggregálódhatnak, és ezáltal működésképtelenné válhatnak. Ezért nem meglepő, hogy a hősokk-válasz szinte minden élő szervezetben megfigyelhető [4].

A hősokk-válasz elnevezés félrevezethető lehet, hiszen mára kiderült, hogy más stressz faktorok (pl. az oxidatív stressz és nehézfém stressz), illetve számos betegség hatására is hasonló védekezési folyamat indul be az élőlényekben. Az ezredfordulóra pedig nyilvánvalóvá vált, hogy a hősokk fehérjéknek és a hősokk-válasznak az egyedfejlődésben és a differenciációban is alapvető szerepük van (1. ábra). [5, 6].



1. ábra: A hősokk-válasz általános mechanizmusa. A hősokk-választ számos környezeti stressz és különböző betegségek egyaránt kiválthatják. A sejtnövekedés és differenciáció során is hasonló folyamatok játszódnak le. A hősokk-válasz során a HSF-1 transzkripciós faktor aktiválódik, homotrimer formában DNS-hez köt, és hősokk fehérjék expresszióját aktiválja.

3.1.2. A hősokk-válasz során indukálódó fehérjék

A tágabb értelemben vett hősokk fehérjék azon proteinek, amelyek aktivitása jelentősen megnövekedik hő stressz hatására. Különböző organizmusokban végzett genomi léptékű vizsgálatok alapján mintegy 50-200 olyan gént azonosítottak, amelyek transzkripciója hősokk hatására indukálódik [7-11]. Funkciójuk alapján a tágabb értelemben vett hősokk fehérjék 7 csoportba sorolhatóak. Az első csoportba tartoznak a klasszikus hősokk fehérjék, vagy más néven „molekuláris *chaperone*-ok”. A második kategóriába a proteolítikus apparátus elemei tartoznak, amelyek a károsodott fehérjék lebontását végzik el. A harmadik kategóriába a stressz hatására bekövetkező nukleinsav károsodások javításában szerepet játszó RNS és DNS modifikációs enzimeket sorolják. Evolúciósan kevésbé konzervált csoportot alkotnak az anyagcserét befolyásoló enzimek (negyedik csoport), amelyek jelentősége a stressz hatására felborult energiaháztartás stabilizálása lehet. Az ötödik csoportba azok a szabályozó fehérjék alkotják (pl.: transzkripciós faktorok és kinázok), amelyek további stressz-válasz útvonalakat

indítanak be. A hatodik csoportba a sejtváz fenntartásához szükséges fehérjék, végül a hetedik csoportba a membránstabilitást és transzportot befolyásoló proteinek tartoznak [12].

3.1.3. A molekuláris *chaperone*-ok

Egy fehérje térszerkezetét alapvetően annak aminosav sorrendje határozza meg [13, 14]. A fehérjék helyes hajtogatódásában (*folding*) azonban jelentős szerepet játszanak a dajkafehérjék, vagy molekuláris *chaperone*-ok [13]. A molekuláris *chaperone*-ok konstitutívan expresszálódnak az egyedfejlődés során. Hősokk, vagy más stressz esetén azonban a rosszul hajtogatódott fehérjék aránya megnövekedik. A hibás szerkezetű fehérjékben hidrofób aminosav oldalláncok kerülhetnek a felszínre, és ennek következtében nagyobb valószínűséggel képződnek fehérje aggregátumok. A sejt molekuláris *chaperone*-ok mennyiségének növelésével segíti elő a fehérjék normális szerkezetének fenntartását, a károsodott fehérjék lebontását, illetve a fehérje aggregátumok képződésének megelőzését. Ezzel jelentős mértékben megnövekszik a sejt túlélési esélye [15, 16].

Molekulasúlyuk alapján hat hősokk fehérje családot különböztetünk meg: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 és a kisméretű hősokk fehérjék családját. Közös jellemzőjük, hogy a fehérjék hidrofób felületéhez kötődve látják el feladatukat [15].

A hősokk fehérjék legismertebb családja a Hsp70 fehérje család. Fiziológiás körülmények között az újonnan képződött fehérjék feltekerésében játszanak szerepet. Stressz esetén hibás fehérjékhez kötődve megakadályozzák a fehérje aggregátumok kialakulását, továbbá képesek a már aggregált fehérjék újrahajtogatására is [17].

A Hsp60 családba tartozó dajkafehérjék is az újonnan képződött fehérjék hajtogatását végzik, azzal a különbséggel, hogy működésük során a Hsp60 monomerek hengerszerű komplexet alkotnak, és ebbe a komplexbe zárják szubsztrátjaikat. A szubsztrát fehérjék ezáltal a többi fehérjétől elszigetelődve egy speciális környezetben vehetik fel normális térszerkezetüket [16].

A Hsp40 családba a Hsp70 fehérjék kofaktorai tartoznak [18]. A Hsp100 családba tartozó fehérjék egymással kapcsolódva komplexet képeznek, és a Hsp70/Hsp40 fehérjékkel szoros együttműködésben az aggregálódott fehérjék szerkezetét lazítják fel, annak érdekében, hogy a Hsp70-Hsp40 *chaperone*-ok hozzáférjenek a károsodott fehérjékhez [19].

A kisméretű hősokk fehérjék heterogén csoportjába a 12-40 kDa közötti mérettartományba eső, akár óriási komplexeket is képező fehérjék tartoznak. A kisméretű hősokk fehérjék önmagukban nem tudják helyreállítani a károsodott fehérjék szerkezetét, azonban hozzájuk

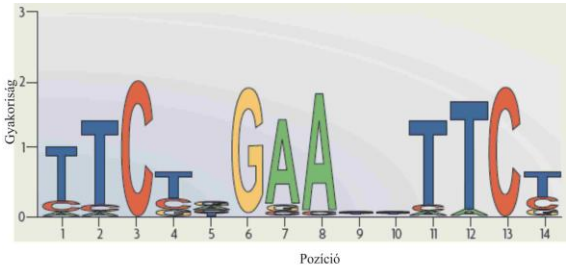
kötődve kivonják őket a forgalomból, hogy azután átadják őket a Hsp70 családba tartozó *chaperone*-oknak [20].

A Hsp90 családba sorolt fehérjék a legnagyobb mértékben expresszálódó fehérjék közé tartoznak. Mennyiségük a citoplazma fehérjéinek akár 1-2%-át is kiteheti fiziológiás körülmények között [21]. A Hsp90 a kisméretű hősokk fehérjékhez hasonlóan a károsodott fehérjéket köti meg, és adja át a Hsp60, illetve a Hsp70 *chaperone*-oknak [12, 15]. Mivel a Hsp90 több fehérjekötő hellyel rendelkezik, ezért a legkülönbözőbb fehérjékkel képes komplexet alkotni. Jelátviteli útvonalak működésében is szerepet játszik, elősegítve például a szteroid hormon receptorok, valamint számos más jelátvitelben szerepet játszó protein kináz aktiválódását ([21-23].

A hibás szerkezetű fehérjék és a fehérje aggregátumok szerepét számos degeneratív betegségben mutatták ki. A Huntington és Parkinson kórok, valamint számos más neurodegeneratív betegség jellemző tünetei ezek [24, 25]. Mivel a hősokk fehérjék gátolják a fehérje aggregátumok képződését, felmerült a Hsp aktivitás növelésének terápiás lehetősége. Számos transzgénikus állat modellen végzett kísérlet azt mutatja, hogy a hősokk fehérjék indukciója vagy túlexpresszálása csökkentheti a neurodegeneráció mértékét [25]. A hősokk fehérjék szintjének növekedése ugyanakkor a rákos sejtek stressz-tűrő képességét is megnövelheti. A Hsp a sejtnövekedést és az apoptózist (programozott sejthalál) szabályozó jelátviteli útvonalak működését is befolyásolhatják. Nem meglepő tehát, hogy megnövekedett Hsp expressziót számos rosszindulatú tumorban mutattak ki [26-29]

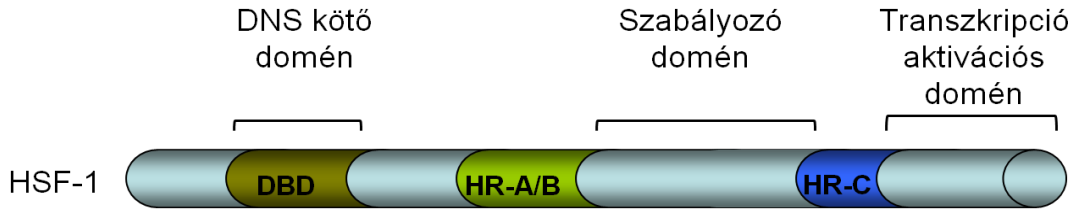
3.1.4. A HSF1 hősokk transzkripciós faktor

A hősokk transzkripciós faktor HSF1 minden eukarióta élőlényben megtalálható. Esszenciális szerepe van a sejtszintű stressz hatásának mérséklésében azáltal, hogy hősokk fehérjék (Hsp) expresszióját aktiválják, amelyek végül biztosítják más fehérjék normális térszerkezetét (fehérje homeosztázis) [30]. A HSF1 emellett az egyedfejlődésben és az élethossz szabályozásban is alapvető szerepet játszanak [31]. A hősokk faktorok egy *upstream* 5’ szabályozó elemen keresztül, az ún. hősokk elemen keresztül fejtik ki hatásukat (2. ábra). A hősokk elem egy-egy nukleotid tripletét a trimer HSF1 hősokk faktor egy-egy DNS kötő doménje ismeri fel [32]. A hősokk elem konzervált, minden hősokk fehérje 5’ szabályozó régiójában megtalálható, emellett minden olyan gén környezetében is előfordul, amelyet a HSF1 hősokk transzkripciós faktor szabályoz [33].



2. ábra: A hősokk génektől *upstream* elhelyezkedő hősokk elem konzervált szekvencia logója. A képen egy pozíció-specifikus pontozómátrix vizuális eredménye látható. A konszenzus szekvencia ennek megfelelően: TTCNNGAANNTTC (az N tetszőleges nukleotidot jelöl). Az ábrán az egyes bázisok különböző színnel vannak jelölve. A betűk mérete az adott bázis konzerváltságával arányos az adott pozícióban.

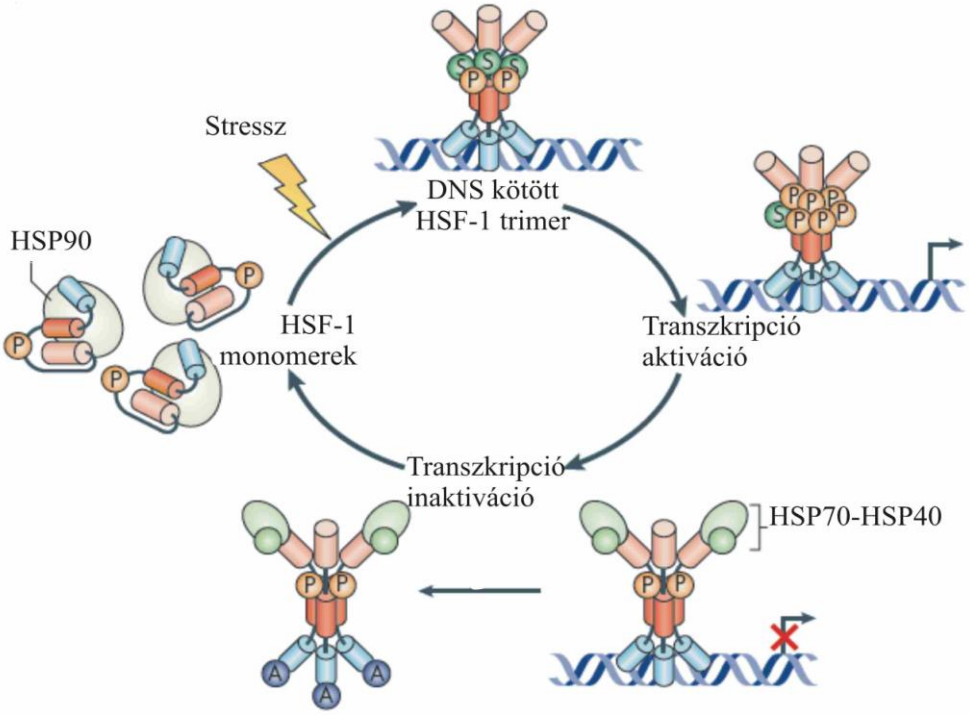
A gerincesekben többféle hősokk faktor található, amelyek különböző biológiai funkcióval rendelkeznek. A legtöbb információval a HSF1 transzkripciós faktorról rendelkezünk, amelynek ortológja megtalálható *C. elegans*-ban is (HSF-1). Emlősökben szerepe van a hősokk válaszban, az immunválaszban, az oogenezisben és spermatogenezisben, valamint az öregedésben. Szerepét kimutatták a rákban is [34]. A HSF1 a transzkripciós faktorokra jellemző moduláris doménszerkezettel rendelkezik. *A winged-helix-turn-helix* DNS-kötő domén segítségével specifikus 5' szabályozó DNS szekvenciákhoz (hősokk elem) kötődik, transzkripció aktivációs doménje révén pedig általános transzkripciós faktorokat toboroz a szabályozott célgének promóteréhez (3. ábra). Ezen kívül a HSF1-ben jelen van egy HR-A/B domén (*hydrophobic heptad repeat* = ismétlődő hidrofób aminosavakból álló domén), amely a HSF1 trimerizációjáért felelős. A HR-C domén is ismétlődő hidrofób aminosavakból épül fel, mely stressz-mentes körülmények között akadályozza a HSF1 trimerek kialakulását [31].



3. ábra: Az emberi HSF1 transzkripciós faktor domén szerkezete. A HSF1 w*inged-helix-turn-helix* DNS-kötő doménje segítségével köt a DNS-hez. A HR-A/B domén a trimerizálódásért felelős. A HR-C domén visszahajolva a HR-A/B doménnel kölcsönhat és gátolja a trimer képződést [32]. A szabályozó doménben számos aminosav oldallánc poszttranszlációs módosulása nyújt lehetőséget a HSF1 aktivitásának szabályozására. DBD: *DNA binding domain* = DNS-kötő domén; HR-A/B: *hydrophobic heptad repeat* = ismétlődő hidrofób aminosavakból álló, trimerizációért felelős domén, HR-C: *hydrophobic heptad repeat* = ismétlődő hidrofób aminosavakból álló domén.

Stressz-mentes körülmények között a HSF1 fehérje monomerként van jelen a sejtben. Ebben az állapotban a fehérje HR-A/B doménjéhez a HR-C domén kapcsolódik, meggátolva

ezzel a fehérje trimerizálódását. Ezt a kapcsolatot stabilizálja a Hsp90 hősokk fehérje. Stressz esetén azonban a Hsp90 leválik a HSF1-ről, ezzel lehetővé válik az aktív HSF1 homotrimerek kialakulása [34]. Ezt követően a fehérje foszforilálódik, és konzervált hősokk elemekhez kötődik, lehetővé téve ezáltal a stressz-válaszhoz szükséges gének transzkripcióját. A HSF1 önmaga aktivitását gátló fehérjét (Hsp90) is transzkripcionálisan aktiválja. A Hsp90 azonban nemcsak a HSF1-hez képes kötődni, hanem a hibás térszerkezetű fehérjékhez is. Mivel stressz esetén sok az ilyen hibás szerkezetű fehérje, a Hsp90 túlnyomó mennyiségben ezekhez a hibás konformációjú fehérjékhez fog kötődni, így a HSF1 hatékonyan tudja aktiválni más *chaperone* fehérjék expresszióját. A stressz-válasz lecsengését követően egyes hősokk fehérjék, például a Hsp70 és Hsp40, hozzákötődnek a HSF1 komplexhez, meggátolva ezzel a további transzkripciós aktivációt, és elősegítik a DNS-ről történő leválást (4. ábra) [34].



4. ábra: A HSF1 transzkripciós aktivációjának szabályozása. Inaktív állapotban a HSF1 monomer formában van jelen, és az aktív homotrimer forma kialakulását hősokk fehérjék (pl. Hsp90) gátolják. A HSF1 stressz hatására trimerizálódik és hiperfoszforilálódik (P). Ebben az aktív formában transzkripciós faktorként működik: a stressz-válaszhoz szükséges gének átírását indítja be. Transzkripciót aktiváló kapacitását hősokk fehérjék gátolják.

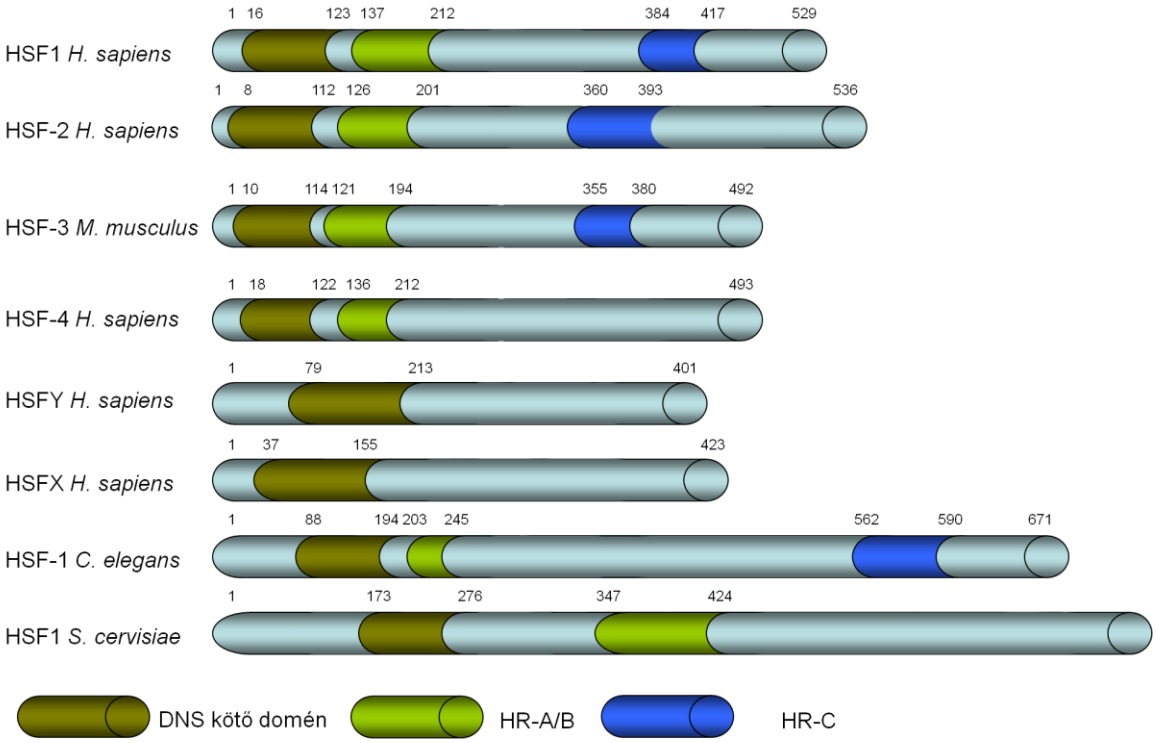
3.1.5. A hősokk transzkripciós faktor fehérjecsalád

Az élesztőben, fonálférgekben, rovarokban és más gerinctelenekben csak egyetlen hősokk transzkripciós faktort azonosítottak. Az emlősökben ugyanakkor a HSF fehérjecsaládnak négy tagja van: a HSF1-HSF4 fehérjék. (5. ábra) [4, 31, 35]. A HSF fehérjecsalád ősének a HSF1-et tartják, amely a gerinctelenek hősokk faktorának emlős ortológja. Ezt támasztja alá az a

megfigyelés, miszerint *Hsf1(-)* mutáns fibroblaszt sejtvonalban és egérben nem váltható ki hősokk-válasz, vagyis a többi *Hsf* gén nem komplementálja a *Hsf1*-et [36, 37]. A HSF2 és HSF4 fehérjéknek szerepük van továbbá az egyedfejlődésben és differenciációban [38-41]. Míg a HSF1 a legtöbb szövetben expresszálódik, addig a HSF2 jellegzetes térbeli és időbeli expressziót mutat [42-44]. Ez arra utal, hogy a HSF2 az egyedfejlődés folyamán specifikus szerepet játszik. *Hsf2* génkiütött egerekben végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a HSF2-nek nincs szerepe a hősokk fehérjék expressziójának szabályozásában [45-47]. *Hsf2(-)* mutáns egerek központi idegrendszere és ivarsejtképzése abnormálisnak bizonyult. Nőstény *Hsf2(-)* mutáns egerek abnormális petesejteket képeznek, megnő a születés előtt elpusztult embriók aránya, és termékenységük csökkent [38, 45, 47]. *Hsf-2* deficiens egerek központi idegrendszerének fejlődésében is rendellenességek figyelhetőek meg. Chang és munkatársai kimutatták, hogy a HSF2 az agykéreg fejlődése során az idegsejtek vándorlását a p35 fehérje közvetlen transzkripcionális szabályozása révén befolyásolja [38].

A HSF4 kulcsfontosságú a szemlencse és a szaglóhám kialakulásában [48]. *Hsf4(-)* mutáns egerekben a születés után pár nappal szürkehályog alakul ki [39-41]. Kimutatták azt is, hogy a HSF4 hősokk hatására nem klasszikus hősokk gének transzkripcióját indukálja [49].

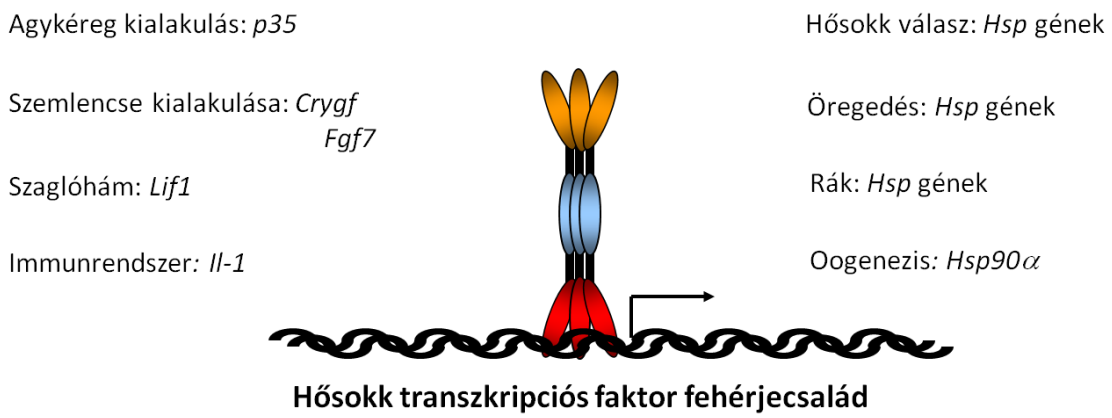
Fujimoto és munkatársai megfigyelései szerint a HSF3 egerekben hősokk hatására - a HSF1-hez hasonlóan - a sejtmagba transzlokálódik és ott nem klasszikus hősokk géneket aktivál [35]. Ugyanakkor az emberi *Hsf3* egy pszeudogén, nem képződik róla mRNS átirat. Az emlősök hősokk transzkripciós faktor családjának sokszínűségét az is növeli, hogy génjeikről alternatív mRNS szerkesztés (*splicing*) segítségével számos izoforma keletkezhet [31, 35].



5. ábra: A HSF fehérjecsalád tagjainak domén szerkezete. A trimerizálódásért az ismétlődő hidrofób aminosavakból álló HR-A/B domén a felelős. A trimerizálódást gátolja a fehérje C-terminálisának közelében elhelyezkedő HR-C domén, amely visszahajolva a HR-A/B doménnel hat kölcsön [32]. HR-C hiányában a HSF1 konstitutívan trimer formát vesz fel [50, 51]. Ezért a HR-C doménnel nem rendelkező élesztő HSF1 és emlős HSF4 konstitutívan trimert alkot [52, 53]. HR-A/B: *hydrophobic heptad repeat* = ismétlődő hidrofób aminosavakból álló, trimerizációért felelős domén, HR-C: *hydrophobic heptad repeat* = ismétlődő hidrofób aminosavakból álló domén.

3.1.6. A hősokk transzkripciós faktorok szerepe az egyedfejlődésben és a differenciációban

Élesztőben a hősokk faktor alapvető fontosságú, hiányában a sejtek még stressz-mentes körülmények között sem képesek növekedni [54, 55]. A hősokk-válaszban betöltött szerepükön túl a hősokk transzkripciós faktorok számos egyedfejlődési folyamatot befolyásolnak (6. ábra) [37, 39, 40, 45-47, 56-58].

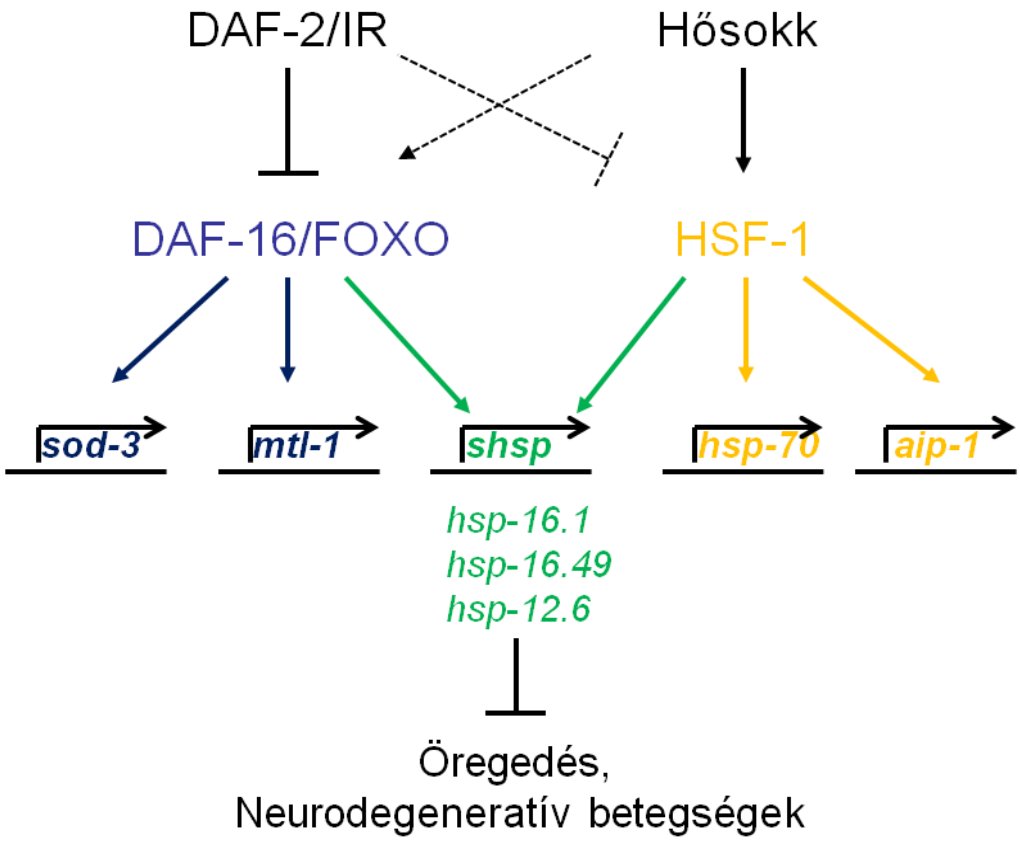


6. ábra: A hősokk faktorok számos biológiai folyamatban játszhatnak szerepet.
Az ábrán néhány hősokk transzkripciós faktor célgén látható és mögöttük zárójelben az őket szabályozó transzkripciós faktor(ok) . *Crygf:* krisztallin γF; *Fgf7*: fibroblaszt növekedési faktor 7 *(fibroblast growth factor 7)*; Il-1: interleukin-1; Lif1: leukémia gátló faktor (*leukemia inhibitory factor*)

3.1.7. A HSF-1 *C. elegans* hősokk transzkripciós faktor

A *C. elegans* genomban eddig egyetlen hősokk transzkripciós faktort kódoló gént azonosítottak, a *hsf-1*-et [59]. Walker és munkatársai kimutatták, hogy a *hsf-1* gén csendesítésének hatására a férgek L1 lárva állapotban megrekednek, egyedfejlődésük lelassul, testhosszuk rövidebb és fertilitásuk csökken. Az említett fenokópiák penetranciája a hőmérséklet emelésével arányosan nő. Megállapították továbbá, hogy a *hsf-1* szükséges számos hősokk fehérje (HSP-16, HSP-90) hőmérséklet-függő expressziójához. *hsf-1(RNSi)* férgek továbbá szignifikánsan rövidebb ideig élnek, mint a vad típusú állat [59]. A hősokk fehérjék expressziójának HSF-1 függő indukcióját, valamint a HSF-1 élethosszra gyakorolt hatását Hajdu-Cronin és munkatársai a *hsf-1(sy441)* mutáns törzsben is megfigyelték [60]. A *hsf*-1 gén dózisának növelése az állatok stressz-tűrő képességét és élethosszát egyaránt megnöveli [57]. A *hsf-1* aktivitása továbbá szükséges a *daf-2(-)* inzulin/IGF-1 receptor mutációk élethossz növelő hatásához (az inzulin/IGF-1 neuroendokrin rendszer az öregedési folyamat egyik központi szabályozó útvonala). Az inzulin/IGF-1 útvonal terminális transzkripciós faktora a DAF-16/FoxO fehérje, amely számos célgén aktivitását a HSF-1-gyel együtt szabályozza [57]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HSF-1 az inzulin/IGF-1 jelátvitelben hat az öregedési folyamat szabályozásában. A *hsf-1* csendesítése azonban nincs hatással a DAF-16 magi lokalizációjára (a hosszú élettartamú fonalférgekben a DAF-16 defoszforilálódik és a sejtmagba jut, ahol az élettartam növelésében szerepet játszó célgének expresszióját szabályozza [179]). A *hsp-70* hő-indukciója *daf-16* független folyamat,

ugyanakkor a kisméretű hősokk fehérjéket kódoló gének hősokk hatására bekövetkező expressziós növekedése *daf-16 (RNSi)* és *hsf-1 (RNSi)* hatására egyaránt mérséklődik. A HSF-1 és a DAF-16 tehát egymástól független működésre is képesek, de bizonyos gének expresszióját együtt szabályozzák (7. ábra); Erre utal az is, hogy az inzulin/IGF-1 receptor deficiens *daf-2(-)* mutánsokban a kisméretű hősokk gének (*hsp-16.1, hsp-16.49, hsp-12.6)* expressziója megnő [57].



7. ábra: A DAF-16 és a HSF-1 stressz-indukált transzkripciós faktorok együtt szabályozzák bizonyos gének expresszióját: A DAF-16 (kék) és a HSF-1 (narancssárga) együtt aktiválják kisméretű hősokk fehérjéket (zöld) (*shsp = small heat shock protein*) kódoló géneket. Más géneket egymástól függetlenül szabályozhatnak. A szaggatott vonalak a hősokk válasz és a inzulin/IGF-1 jelátvitel közötti feltételezett kapcsolatot jelölik.

A HSF-1 szerepét a *C. elegans* természetes immunválaszában is kimutatták [61, 62]. HSF-1 hiányában ugyanis csökken, míg HSF-1 túlexpresszálás hatására nő a féreg ellenálló képessége a *P. aeruginosa* baktérium fertőzéssel szemben. A HSF-1 ezen immunerősítő hatása valószínűleg a megnövekedett molekuláris *chaperone* szintnek köszönhető [61]. Mohri-Shiomi és munkatársai kimutatták, hogy bakteriális fertőzés esetén a bélben megnövekedett reaktív oxigén származékok (ROS) szintjének hatására fehérje károsodások lépnek fel, és ennek a károsító hatásnak a kivédéséhez szükséges a HSF-1 [63].

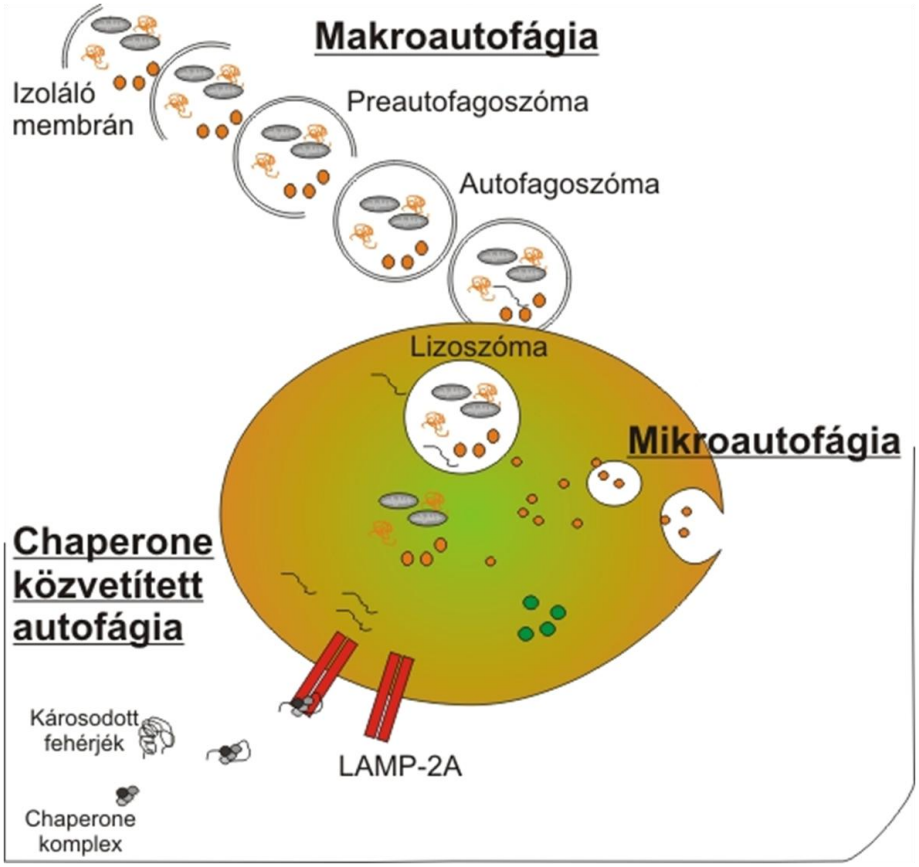
3.2. Az autofágia

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott önemésztő folyamata. Működése alapvetően a sejt homeosztázisának fenntartását szolgálja a változó körülmények közepette. A károsodott, elöregedett fehérjék, protein aggregátumok, valamint sejtszervecskék autofágiával történő tömeges lebontása fontos szerepet játszik a citoplazmatikus összetevők megújításában. Számos környezeti stressz (pl. tápanyag hiány, oxidatív stressz) hatására a sejtekben jelentős mértékben megnövekedik az autofág aktivitás. Az autofágia tehát a káros stressz hatások ellen véd. Az elmúlt évtizedben világossá vált, hogy az autofágia alapvető fejlődésbiológiai folyamatokban is részt vesz. Működésének zavarait a daganatos és a neurodegeneratív betegségekben is megfigyelték.

3.2.1. Az autofágia főbb típusai

Az autofágiának három fő típusát különböztetik meg: a mikroautofágiát, a *chaperone*-közvetített autofágiát és a makroautofágiát [64] (8. ábra). A mikroautofágia során a lizoszóma a citoplazma egyes részleteit közvetlenül, membránbetűrődéssel (invaginációi) kebelezi be. A *chaperone*-közvetített autofágia során speciális pentapeptid (KFERQ) motívumot tartalmazó fehérjék *chaperone*-okhoz kapcsolódhatnak, majd az így kialakult komplex a LAMP-2 lizoszómális membrán transzporteren keresztül jut a lizoszóma lumenébe. A makroautofágia (a továbbiakban ezt a folyamatot nevezem autofágiának) során egy ún. izoláló kettős membrán a citoplazma egy részletét körülhatárolja, majd az így keletkezett autofagoszóma lizoszómával fúzionál, létrehozva az ún. autolizoszómát, amelyben az autofagoszóma belső membránja és tartalma lizoszomális hidrolázok által lebomlik. A keletkezett termékeket a sejt újrahasznosítja a felépítő folyamatokban [64] (8. ábra).

Annak ellenére, hogy az autofágia folyamatát ultrastrukturálisan már mintegy 40 éve leírták [65, 66], az első autofág géneket csak az 1990-es években azonosították élesztőben [67-69]. A legtöbb élesztő autofágia gén (*ATG* = *autophagy related gene*) rendelkezik soksejtű szervezetekben ortológgal [70, 71]. Az autofágia genetikai vizsgálata így számos eukarióta modellszervezetben lehetővé vált.



8. ábra: Az autofágia főbb típusai: A makroautofágia során a citoplazma egy részletét ún. izoláló kettős membrán határolja el a sejt többi részétől. Miután a növekvő kettős membrán vezikulává záról, a kialakult struktúrát autofagoszómának nevezik. Később az autofagoszóma külső membránja lizoszómával olvad össze. Az így kialakult képlet az autolizoszóma, amelyben lizoszómális hidrolázok bontják le az elhatárolt citoplazma komponenseket. A mikroautofágia során a lizoszóma membránja betűrődik (invagináció), és így közvetlenül kerülnek a lebontásra kijelölt citoplazma komponensek a lizoszóma lumenébe. A *chaperone*-közvetített autofágia során egy citoplazmatikus *chaperone* komplex ismeri fel és köti meg speciális KFERQ pentapeptid motívumot hordozó fehérjéket. Az így megjelölt fehérjék a lizoszómális LAMP-2 membrán receptor segítségével jutnak be a lizoszóma belsejébe.

3.2.2. Az autofágia mechanizmusa

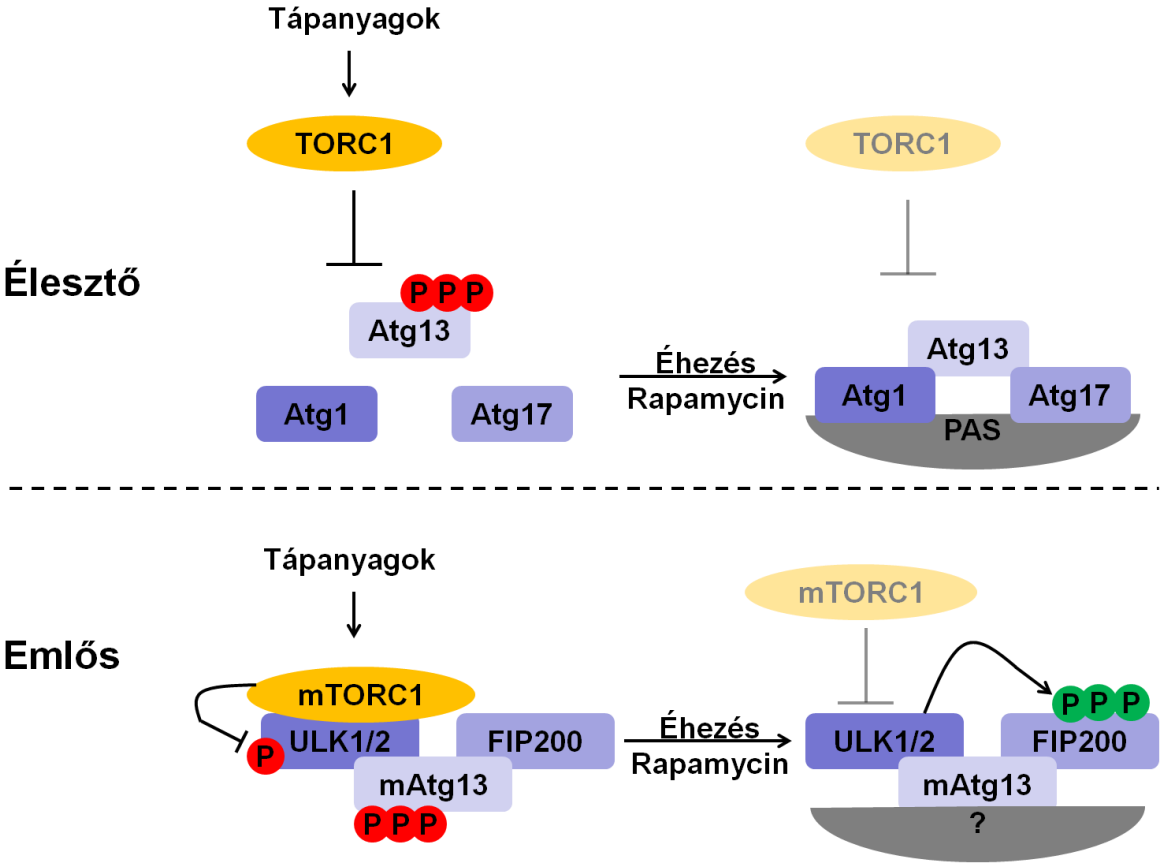
A (makro)autofág folyamat alapvetően négy egymást követő lépésre osztható fel: indukció, vezikula nukleáció, vezikula növekedés és záródás, valamint az autofagoszóma érése és fúziója a lizoszómával.

3.2.2.1. Az autofágia indukciója

Élesztőben az autofágia indukciója során ún. preautofagoszómális struktúra (PAS = *preautophagosomal structure*) alakul ki. A PAS az autofagoszóma képződésének helye. Az izoláló membrán kialakulásához szükséges fehérjék toborzását az Atg1 szerin/treonin kináz komplex iniciálja. Tagjai élesztőben az Atg1 szerin/treonin kináz, az Atg13 és az Atg17

fehérjék. A komplex kialakulását élesztőben a TORC1 komplex (*target of rapamycin complex 1*) az Atg13 foszforilálása révén gátolja. Ha a tápanyag ellátottságot érzékelő TORC1 inaktív (például éhezés esetén), akkor az Atg13 és az Atg1 fehérjék defoszforilálódnak, és ebben a formában a komplex autofágiát indukál [72] (9. ábra).

Emlősökben az Atg1 ortológ ULK-1 és ULK-2, az Atg13 ortológ mAtg13, valamint az Atg17 ortológ FIP200 hasonló funkciójú komplexet alkot. Emlősökben ez a komplex az mAtg13 foszforiláltsági állapotától függetlenül, konstitutívan kialakul, de stressz-mentes körülmények között működését az emlős TORC1 (mTORC1) komplex gátolja [73] (9. ábra).



9. ábra: Az autofágia indukcióját a TORC1 komplex szabályozza: Élesztőben (felül) az indukciós Atg1 komplex működését tápanyag gazdag környezetben a TORC1 komplex gátolja. A TORC1 komplex foszforilálja az Atg13 fehérjét. Az Atg13 hiperfoszforilált állapotban nem köti az Atg1 és Atg17 fehérjéket, így nem áll össze az Atg1 indukciós komplex. Éhezés vagy rapamycin kezelés hatására a TORC1 komplex inaktiválódik. Ennek következtében az alulfoszforilált Atg13 az Atg1 és Atg17 fehérjékkel komplexet alkot és autofágia indukálódik [74]. Emlősökben (alul) az ULK1/2/Atg1 az mAtg13 és FIP200/Atg17 fehérjékkel a körülményektől függetlenül konstitutívan komplexet alkot. Az ULK1/2 komplexhez azonban tápanyag gazdag környezetben az mTORC1 kötődik és az ULK1/2 foszforilálása, valamint az mAtg13 hiperfoszforilálása révén gátolja az indukciós komplex működését. Éhezés vagy rapamycin kezelés esetén a TORC1 inaktiválódik és leválik az ULK1/2 komplexről. Ekkor az ULK1 /2 hiperfoszforilálja a FIP200 fehérjét, ami az autofágia indukciójához vezet [73]. Emlősökben még nem azonosítottak PAS-t (lsd. kérdőjel az ábrán).

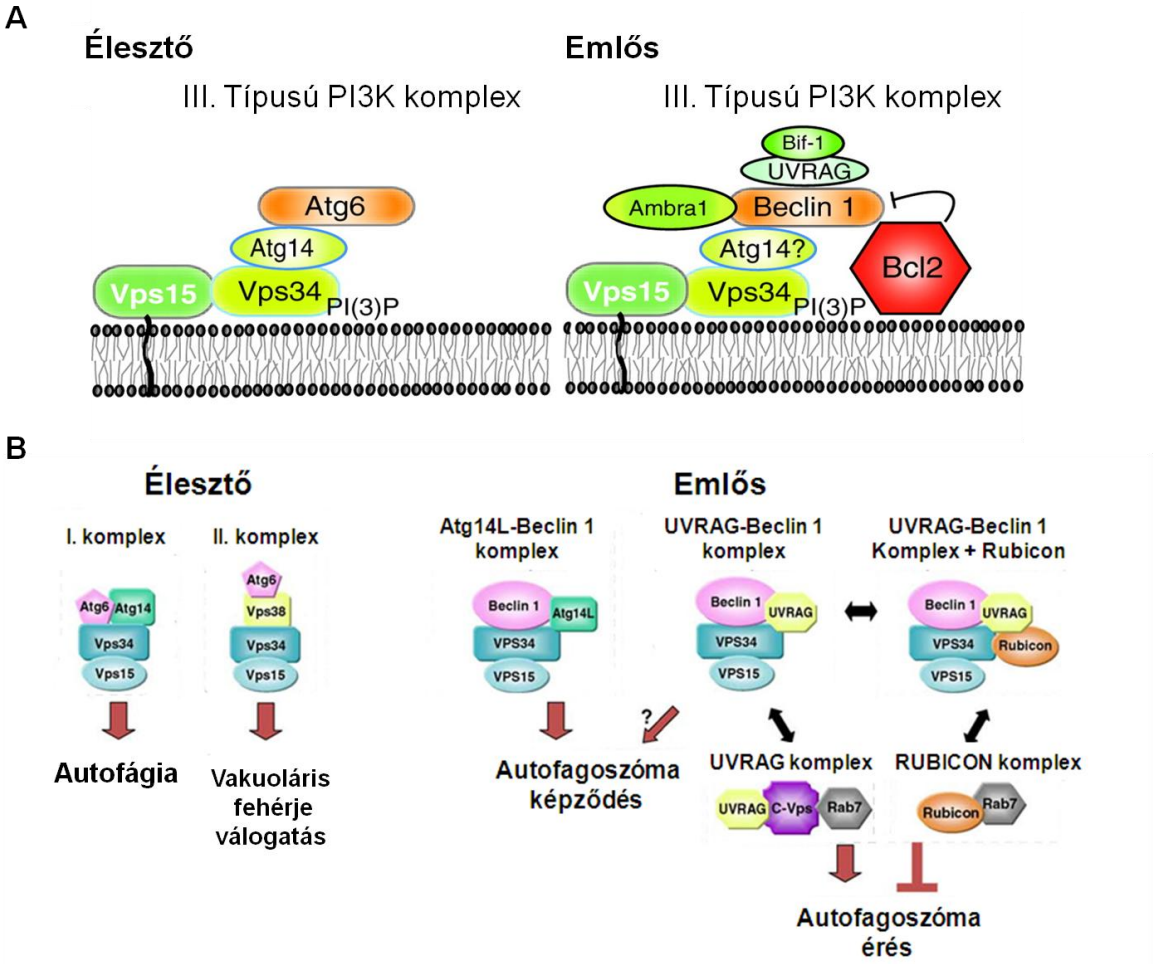
3.2.2.2. A vezikula nukleáció

Az izoláló membrán (más néven a fagofór) a vezikula nukleáció során jön létre a PAS környezetében. A kettős izoláló membrán eredete a mai napig vitatott. A különböző tanulmányok szerint a fagofór származhat a mitokondrium, az endoplazmatikus retikulum, a Golgi készülék, vagy az endoszómák membránjából. Más közlemények az izoláló membrán *de novo* keletkezésének lehetőségét vetik fel [75].

A fagofór kialakulásához egy III. típusú foszfatidilinozitol 3-kináz (PtdIns3K) komplex szükséges. Ennek komponensei élesztőben a III. típusú PtdIns3 kináz Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), az Atg6, Atg14 és Vps15 fehérjék. A Vps34 a membránok foszfatidilinozitol molekuláit foszforilálja. Az így létrejött foszfatidilinozitol-3-foszfát (PtdIns(3)P) az autofagoszóma képződéséhez nélkülözhetetlen komplexek (például az Atg18-Atg2 komplex) kialakulását teszi lehetővé PtdIns(3)P-kötő fehérjék toborzása által [13, 14].

Élesztőben a Vps34 PtdIns3-kináz két komplexben vesz részt (komplex I és II) [21]. A már említett I-es komplexnek az autofágiában van szerepe. A II-es komplex a vakuoláris fehérjék kiválogatásában (*vacuolar protein sorting*) játszik szerepet. Mindkét komplex tagja a Vps15, Vps34 és Vps30/Atg6. Kizárólag az I-es komplexben vesz részt az Atg14. A II-es komplexben pedig a Vps38 található meg [21] (10. ábra).

A PtdIns3K komplexek funkciója emlősökben is kettős: az autofagoszóma képződés mellett [71, 74] a lizoszómális fehérjék válogatásában [76, 77] kapnak szerepet. PtdIns3K komplex tagjai a hVps34, az Atg6 ortológ Beclin 1, és a Vps15 ortológ p150. Az Atg-14 és a Vps38 emlős ortológjai is ismertek: Az Atg14 szerű Atg14L (Atg14 *like)* illetve az UVRAG (*ultraviolet irradiation resistance-associated gene*) [54, 55]. Érdekes módon, míg az élesztőben Vps38 kizárólag a vakuoláris fehérje válogatásban játszik szerepet, addig emlős ortológja az UVRAG az autofágiát számos ponton szabályozza [78]. Az izoláló membrán kialakulását egyes tanulmányok szerint az UVRAG-Beclin1–hVps34–p150 komplex is elősegítheti [78]. Emlősökben a Rubicon (*RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting*) fehérje az UVRAG–Beclin1–hVps34–p150 komplexhez kötődik és hatására a hVps34 aktivitása csökken, vagyis negatívan szabályozza az autofagoszóma érését [79] (10. ábra).



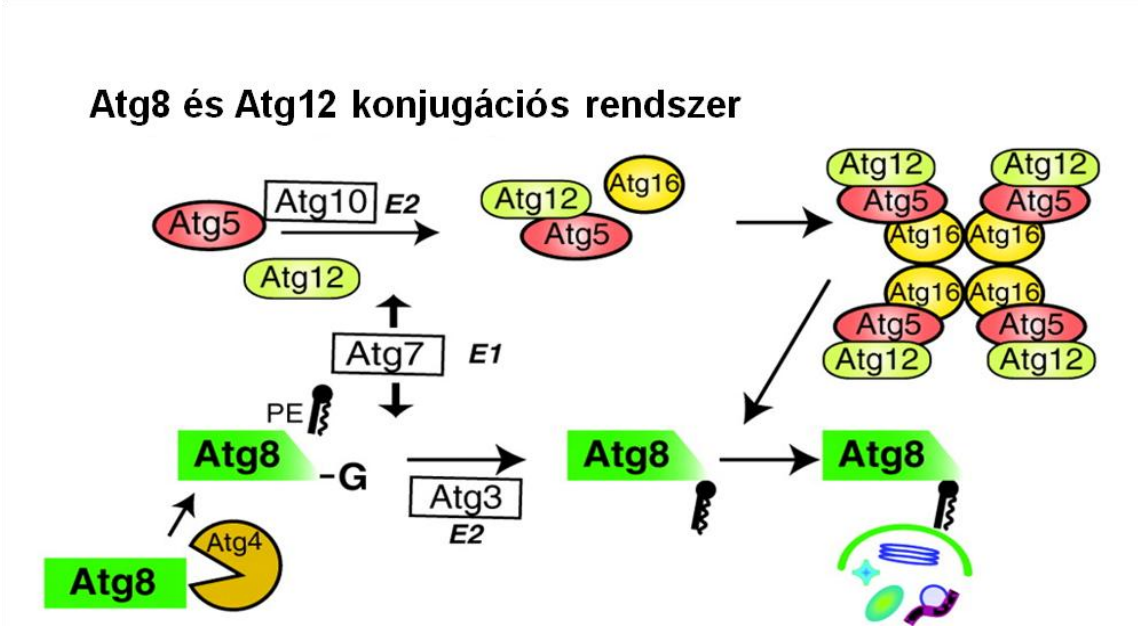
10. ábra: A vezikula nukleáció élesztőben és emlősökben: (A) Az izolációs membrán képződéséhez élesztőben és emlősökben egy III. típusú foszfatidilinozitol 3-kináz (PtdIns3K) komplex szükséges. Ennek komponensei élesztőben a PtdIns3K/Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), az Atg6, Atg14 és Vps15 fehérjék. Emlősökben a Bcl2, UVRAG, Bif-1 és más fehérjék is a komplex részei. (B) Élesztőben a Vps34 két PtdIns 3-kináz komplexnek is tagja (komplex I és II). Az I-es komplexnek az autofágiában, míg a II. komplexnek a vakuoláris fehérjék kiválogatásában (*vacuolar protein sorting*) van szerepe. Az I-es komplex része az Atg14, a II-es komplexben Vps38 található meg. A két komplex közös elemeket is tartalmaz (Vps15, Vps34, és Vps30/Atg6). Emlősökben több Beclin 1-Vps34-Vps15 tartalmú komplex az autofágia különböző lépéseiben játszik szerepet. Az Atg14L-Beclin1 komplex az izoláló membrán nukleációját irányítja. Az UVRAG-Beclin 1 komplex szintén a fagofór képződést segíti elő. Az UVRAG a Beclin 1-től függetlenül a C-Vps és a Rab7 GTPáz fehérjékkel komplexet alkotva az autofagoszómák érését segíti elő. A Rubicon a Rab7 fehérjével asszociálva az autofagoszóma érést gátolja. Ez a gátlás semlegesítődhet ha Rubicon az UVRAG-Beclin 1 komplexhez kötődik [78].

3.2.2.3 Fagofór növekedés és záródás

Az izoláló membrán növekedéséhez két ubikvitin-szerű konjugációs rendszer szükséges: az Atg12, illetve az Atg8/LC3 konjugációs rendszer (11. ábra). A két rendszer egymással kapcsolatban áll. Egyes elemeik mindkét rendszerben megtalálhatóak [80-82]. Az Atg12

rendszert az Atg12, Atg5, Atg7 és Atg10 fehérjék alkotják. A rendszer működésének eredményekképpen az Atg12 és az Atg5 között kovalens kötés jön létre. Az Atg12-Atg5 komplexek kötődnek az Atg16 molekulákhoz, és létrehozzák a több alegységből álló Atg16L komplexet [83]. Ez a komplex a növekedő izoláló membránhoz kötődve ma még tisztázatlan molekuláris mechanizmus segítségével a fagofór növekedését és záródását teszi lehetővé [84, 85]. Az Atg12-Atg5 konjugátum az Atg8/LC3 konjugációs rendszer működésében is részt vesz az Atg8 és a foszfatidil-etanolamin közti kötés kialakításában [85, 86].

A második konjugációs rendszer az Atg8-at a fagofór foszfatidil-etanolamin (PE) komponenseihez kapcsolja (11. ábra). Elsőként a cisztein proteáz Atg4 lehasítja az Atg8 C-terminális argininjét. Ezt követően az Atg7 E1 tioészter kötést létesít az Atg8 C-terminálisán hozzáférhetővé vált glicinnel [87]. Az így aktivált Atg8-at az Atg3 konjugáló enzim kapcsolja a foszfatidil-etanolaminhoz [87]. Az Atg8 így a fagofór mindkét oldalához kötődik, és a fagofór növekedésében játszik szerepet. Az Atg8 mennyisége befolyásolja a képződő autofagoszómák méretét. Az Atg8 hiányában rendellenes, kis méretű autofagoszómák alakulnak ki [88, 89].



11. ábra: A fagofór növekedését az Atg12 és az Atg8 konjugációs rendszerek segítik elő. Az Atg12 (Atg12, Atg5 és Atg16) konjugációs rendszer működésének következtében kialakul a több alegységből álló Atg16L komplex. Az Atg8 (Atg8, Atg3 és Atg7) konjugációs rendszer az Atg8-at a fagofór foszfatidil-etanolamin komponenseihez köti. Az Atg16L és a membránkötött Atg8 ma még tisztázatlan molekuláris mechanizmus segítségével a fagofór növekedését és záródását teszi lehetővé. (E1: E1-szerű ubikvitin aktiváló enzim; E2: E2-szerű ubikvitin konjugáló enzim; G: Az Atg8 C-terminális glicinje; PE: foszfatidil-etanolamin, melyet az Atg8 kovalensen köt.)

A fagofór növekedését emlősökben az Atg8 fehérje ortológja, az LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) segíti. Az izoláló membrán záródását megelőzi a

növekedésében szerepet játszó fehérje komplexek eltávolítása. Emlősökben ebben a folyamatban az Atg8 egyik ortológjának, a GATE16-nak (*Golgi-associatedATPase enhancer of 16 kDa*) van szerepe [90].

3.2.2.4 Az autofagoszóma érése és fúziója a lizoszómával

Az autofagoszómák emlősökben először a korai és/vagy késői endoszómákkal fúzionálnak [91, 92]. Végül az autofagoszóma lizoszómával olvad össze. Ezt megelőzi az Atg8-PE molekulák leválása az autofagoszóma külső membránjáról. A fúzióban kizárólag a kettős határoló membránnal rendelkező autofagoszóma külső membránja vesz részt [92, 93]. Ebben a folyamatban számos fehérje mellett a SNARE fehérjék (*soluble NSF attachment protein receptor*) játszanak szerepet [94]. A fúziót követően emlősökben az autofagoszóma belső membránját és beltartalmát különböző proteázok (lizoszómális cisztein proteázok és katepszin, valamint lipázok, és nukleázok) bontják le [95].

3.2.3. Az autofágia szabályozása

Élesztőben és emlősökben az autofágia vegetatív növekedési feltételek között bazális aktivitást mutat. Éhezés, vagy egyéb stressz hatására azonban jelentősen megnő a sejtek autofág aktivitása. Az autofágia számos fejlődésbiológiai folyamatban is részt vesz. Az autofág aktivitást ezért különböző környezeti tényezők (éhezés vagy egyéb stressz), jelátviteli útvonalak (RAS, insulin/IGF1, TOR) szabályozzák [96].

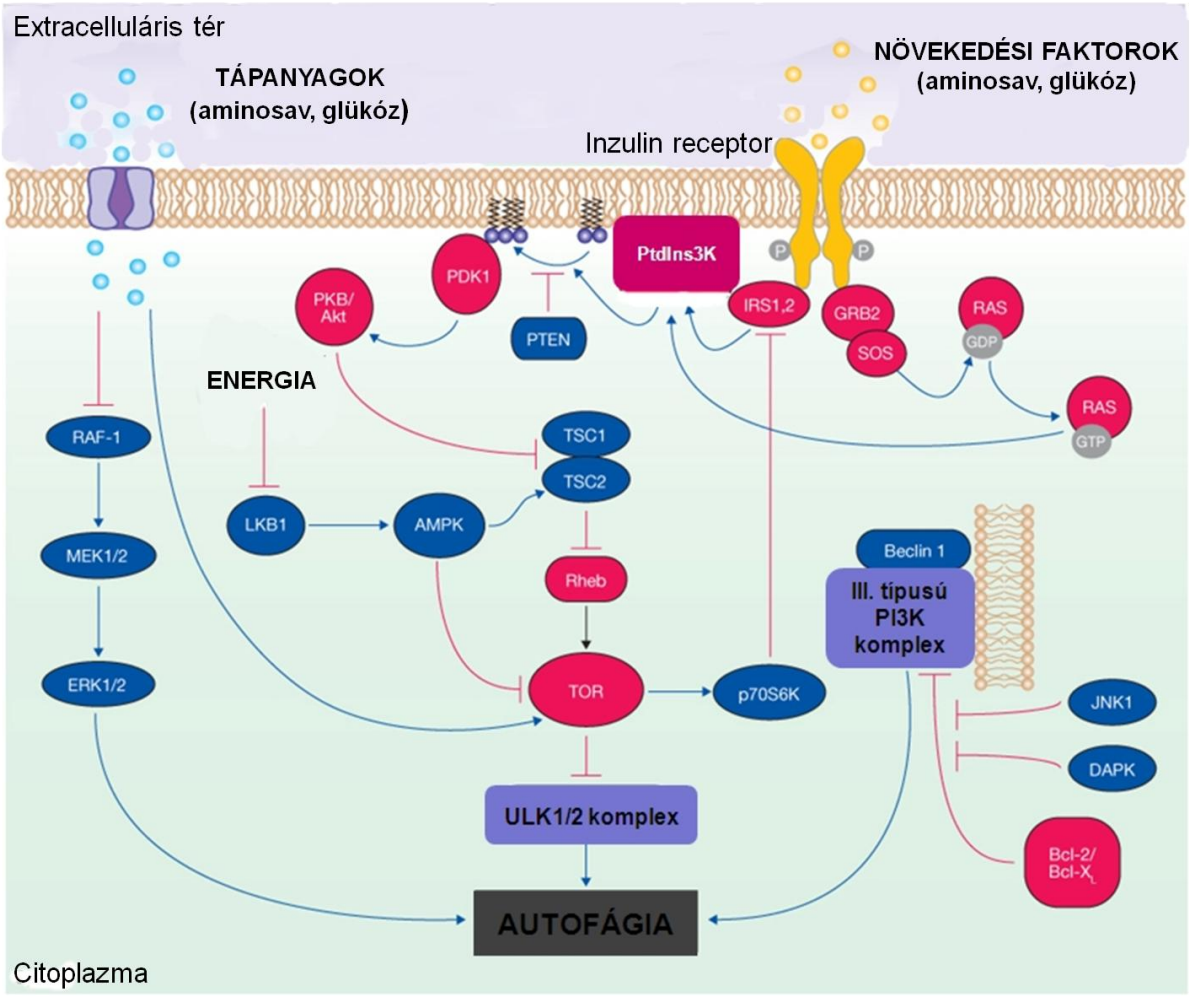
A TOR (*target of rapamycin*) kináz az autofágia egyik legfontosabb *upstream* szabályozója [97]. A TOR kináz normális tápanyag ellátottság esetén foszforilálja az Atg13 fehérjét [98, 99]. A hiperfoszforilált Atg13 kisebb affinitással kötődik az Atg1 fehérjéhez, és ez meggátolja az Atg1 indukciós komplex kialakulását [100]. A TOR kináz gátlása esetén az Atg13 defoszforilált formában köti az Atg1-et, és ez az autofágiát indukáló Atg1 komplex kialakulásához vezet [101] (9. ábra).

Az inzulin/IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) jelátvitel különböző útvonalakon keresztül szabályozza az autofágiát. A FoxO transzkripciós faktorok az inzulin/IGF-1 jelátvitel *downstream* komponensei, aktivitásukat az inzulin/IGF-1 jelátvitel gátolja. Emlősökben a FoxO1 és FoxO3 közvetlenül aktiválja az *LC3b, GabarapL1 és Atg12L* autofágia gének kifejeződését, és ez megnövekedett autofág aktivitást eredményez [102-104].

Az inzulin/IGF-1 jelátvitel az autofágia negatív regulátorát, az mTORC1-et is szabályozza. A PBK/Akt kináz (az inzulin/IGF-1 útvonal citoplazmatikus komponense) a TSC-2 fehérjét foszforilálva meggátolja a TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis 1/2 complex*) komplex kialakulását

[105]. A TSC1/TSC2 komplex gátolja az mTORC1 komplexet, így végeredményben az inzulin/IGF-1 útvonal az mTORC1 komplex aktiválásán keresztül is gátolja az autofágiát (12. ábra).

A sejtek energia állapotát érzékelő AMP-aktivált protein kináz (AMPK) a TORC1 és Atg1 komplexeken keresztül szabályozza az autofágiát. Az AMPK a TSC1/2 komplex aktiválásán keresztül gátolja az mTORC1 komplex működését [106]. Az AMPK az mTORC1 komplex alkotó elemét, a Raptort (*regulatory associated protein of mTOR*) közvetlenül is foszforilálja, és gátolja az mTORC1 komplex működését [107].



12. ábra: Az autofágiát bonyolult jelátviteli hálózat szabályozza. A TORC1 komplex az autofágia szabályozásának központi eleme. Növekedési faktorok hatására az I-es típusú PtdIns3 és a PKB/Akt jelátvitel gátolja a TSC1/TSC2 komplexet. Az inaktív TSC1/TSC2 komplex nem képes gátolni az mTORC1 komplex működését, így autofágia nem indukálódik. Az inzulin receptor által aktivált Ras szintén az I-es típusú PtdIns3 - PKB/Akt - TSC1/TSC2 tengelyen keresztül szabályozza az autofágiát. A sejt energiaháztartásának állapotát érzékelő AMPK közvetve, illetve közvetlenül gátolja az mTORC1 komplex aktivitását, ezáltal autofágiát indukál. Az autofágia bazális szintjének fenntartását egy negatív visszacsatoláson keresztül a TOR közvetlen szubsztrátja a p70S6K kináz biztosíthatja. Megfelelő aminosav ellátottság esetén a Raf-1–MEK1/2–ERK1/2 jelátviteli kaszkád is negatívan szabályozza az autofágiát. A JNK kináz foszforilálja az antiapoptotikus Bcl-2 és Bcl-XL

fehérjéket, amelyek ebben az állapotban kisebb affinitással kötődnek a Beclin1 fehérjéhez. A felszabaduló Beclin1 pedig a III-as típusú PtdIns3K komplexen keresztül segíti elő az autofagoszóma képződést. Ugyanezt a DAPK a Beclin 1 foszforilálása révén teszi lehetővé.

A Ras jelátvitel is szerepet játszik az autofágia szabályozásában. A Raf-1/Map (*mitogen-activated protein*) és az I-es típusú PtdIns3K kinázok a Ras jelátvitel közvetítői. Egér embrionális fibroblasztok sejttenyészetében a Ras I-es típusú PtdIns3K kináz függő módon gátolja az autofágiát [108]. Humán vastagbél rákos sejtek tenyészetében ugyanakkor az aminosavak mennyiségét érzékelő Raf-1 serkenti az autofág folyamatokat. A Ras jelátvitel az autofágiát PtdIns3K–PKB/Akt-mTORC1 útvonalon keresztül gátolja, míg a Raf-1–MEK1/2–ERK1/2 útvonalon keresztül aktiválhatja is [109] (12. ábra).

Az autofágia az Atg fehérjék poszttranszlációs módosítása révén is szabályozható. Erre az Atg1/ULK kináz komplex TORC1 függő foszforilálása mellett számos példa van. A Beclin 1 az autofágia nukleációjában alapvető fontosságú III-as típusú PtdIns3 kináz komplex eleme. A Bcl-2 által kötött Beclin 1 ebben a komplexben nem képes ellátni funkcióját, így a fagofór nukleációja gátolt [110]. Ceramid vagy éhezés hatására a JNK kináz foszforilálja a Beclin1-et gátló fehérjét, a Bcl-2-t [111, 112]. Hiperfoszforilált állapotban a Bcl-2 leválik a Beclin 1-ről, így a Beclin 1 betöltheti feladatát az autofagoszóma képződésben. A DAPK (*death associated protein kinase*) a Beclin-1 BH3 doménjének foszforilálásán keresztül gátolja a Bcl-2 és a Beclin 1 közötti kölcsönhatást és ezáltal az autofágiát aktiválja [113] (12. ábra).

3.2.3. Az autofágia funkciói

Az autofágia az éhezési stressz hatására indukálódó sejtválasz része [114]. Többsejtű élőlényekben azonban az autofágia szerepe ennél sokkal szerteágazóbb. A sejt homeosztázisának fenntartása mellett az egyedfejlődés során bekövetkező, differenciációs folyamatokban is szerepet játszik [71, 76, 77, 115, 116].

Éhezéskor az autofágia a sejt citoplazmatikus fehérje és lipid tartalmának lebontása által segíti a sejt energiaháztartásának fenntartását. Emlősökben szülést követően a méhlepény által biztosított tápanyag ellátás megszűnik. A tápanyagok hiányát az újszülött számos szövetében megnövekedett autofág aktivitás kompenzálja [117]. Az autofágia *C. elegans*ban a nem táplálkozó dauer (kitartó) lárvák kialakulásához és életben maradásához is szükséges [118].

Az autofágia az egyedfejlődésben is fontos szerepet kap. A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése során a lárvális nyálmirigy lebontásához az apoptózis mellett autofágiára is szükség van [119], a középbél eltávolítása pedig kizárólag autofágiával történik [120]. *C.*

*elegans*ban a megtermékenyítést követően a petesejtbe jutott apai mitokondriumok is autofágia segítségével bomlanak le [121, 122].

Az önemésztő folyamat szerepét néhány sejtdifferenciációs folyamatban is kimutatták. Az eritrociták, a limfociták és az adipociták differenciációja során a citoplazma átalakításában autofág folyamatok játszanak szerepet [77]. *C. elegans*ban az RNS és fehérje tartalmú P granulumok a csíravonal sejtsors meghatározói [123]. Szomatikus sejtekben nem figyelhetőek meg. A csírasejt prekurzorokat létrehozó egymást követő egyenlőtlen sejtosztódások során a P granulumok aszimmetrikus, csírasejt specifikus eloszlását egyéb mechanizmusok [124, 125] mellett az autofágia biztosítja [126].

Több élőlényben kimutatták, hogy az autofágiának az élethossz szabályozásában is szerepe van [118, 127, 128]. Az autofágia az öregedést valószínűleg a citoplazma károsodott fehérjéinek és organellumainak megújítása révén gátolhatja.

Az autofágia abnormális működése számos degeneratív betegség kialakulásával hozható összefüggésbe. Ezen patológiák közé tartozik a rák, neurodegeneráció, izomsorvadás és a cukorbetegség is. A citoplazma homeosztázisát fenntartó autofágia zavarai esetén a sejtekben aggregátumok képzésére hajlamos hibás fehérjék és károsodott organellumok halmozódhatnak fel. Számos neurodegeneratív betegségben (pl. Alzheimer, Huntington és Parkinson kórokban) az idegsejtekben fehérje aggregátumok alakulnak ki. Az autofágia megakadályozza a toxikus aggregátumok akkumulálódását, ezáltal védi az idegsejteket [77, 129]. Az aggregátumok képzésére hajlamos fehérjék eltávolítása révén az autofágia az izomatrófia és a fibrózis kialakulását is befolyásolhatja [77, 130].

Az autofágia a cukorbetegség kialakulásában is szerepet játszhat. Megfigyelték, hogy az autofág folyamatok zavarai esetén a hasnyálmirigy inzulin termelő β-sejtjei nem működnek megfelelően [131]. Az autofágia hibája hozzájárulhat az inzulinrezisztencia és a II-es típusú diabétesz kialakulásához is [132].

Az autofágia és a rák kapcsolata összetett [77]. Az autofágia egyrészről megakadályozza a toxikus, karcinogén anyagok felhalmozódását a sejtekben, és így tumor szuppresszor hatású. Ugyanakkor a már kialakult rákos sejtek túlélését is segíti oxigén és táplálék hiányos környezetben. Így az autofág aktivitás növelésének a daganatos betegségek megelőzésében, míg az autofágia gátlásának a már kialakult daganatok elleni küzdelemben lehet szerepe [133].

3.3. A *C. elegans*, mint genetikai modellszervezet

Doktori munkám során a *Caenorhabditis elegans* fonalféreg fajt használtam genetikai modell szervezetként. Alábbiakban ezt a modell rendszert mutatom be. A *C. elegans* a mérsékelt övben elterjedt, talajban előforduló, elsődlegesen baktériumokkal táplálkozó fonalféreg. Laboratóriumi körülmények között viszonylag könnyen tenyészthető. Egyetlen agar tartalmú műanyag Petri-csészén akár több ezer állat is fenntartható. A férgek táplálékául az agar lemezen felnövesztett *E. coli* OP50 baktérium törzs szolgál [134].

A *C. elegans* 1-1,2 mm hosszúságú, rövid generációs idejű (25°C-on mindössze 3 nap), speciális ivari dimorfizmussal rendelkező faj (a populációkat önmegtermékenyítő hímnős egyedek és párosodásra képes hím egyedek alkotják). Az állat embrionális fejlődése 14 óra alatt befejeződik, a petéből kikelve pedig újabb 38 óra szükséges ahhoz, hogy posztembrionális fejlődése négy lárvaállapoton (L1-L4) keresztül végbemenjen (13. ábra). A kifejlett állat átlagosan 2 hétig él, és ezen idő alatt 300-350 embriót rak le. [135].

Az állat testfala fénymikroszkóp alatt átlátszó, így egyedfejlődése egyedi sejtszinten vizsgálható. A *C. elegans* szomatikus sejtjeinek száma genetikailag meghatározott, hímekben 1031, hímnősekben 959. A sejtek egyedfejlődési leszármazása (*cell lineage*) invariáns és melyet fénymikroszkóppal meghatároztak [136].

A haploid genom 5 autoszómába és 1 ivari kromoszómába szerveződik, mintegy 100 Mb-ból áll, és körülbelül 19000 gént kódol. Ezek 30%-a szignifikáns szekvencia hasonlóságot mutat emberi génekkel [135]. A *C. elegans* genom különlegessége, hogy rendkívül kompakt szerveződésű, az egy génre jutó bázisszámot tekintve 20-szor tömörebb az emberi genomnál. Jellemzője az operonos szerkezet, amely az eukarióták között csak a fonalférgekben ismert [137].

A vad típusú állatokban kémiai mutagénekkel (pl.: etil-metán szulfonáttal) vagy transzpozonokkal (mobilis genetikai elemek) hatékonyan indukálhatók mutációk. A *C. elegans* rendszer további előnye az, hogy igen hatékonyan lehet gének funkcióját RNSi-vel csökkenteni [138].

A törzsek fenntartását megkönnyíti, hogy az állatokat -80°C-on vagy folyékony nitrogénben lefagyasztva hosszú ideig lehet tárolni. Ez az eljárás lehetővé teszi pl. a balanszer kromoszómát tartalmazó törzsekben a háttérmutációk felhalmozódásának elkerülését.

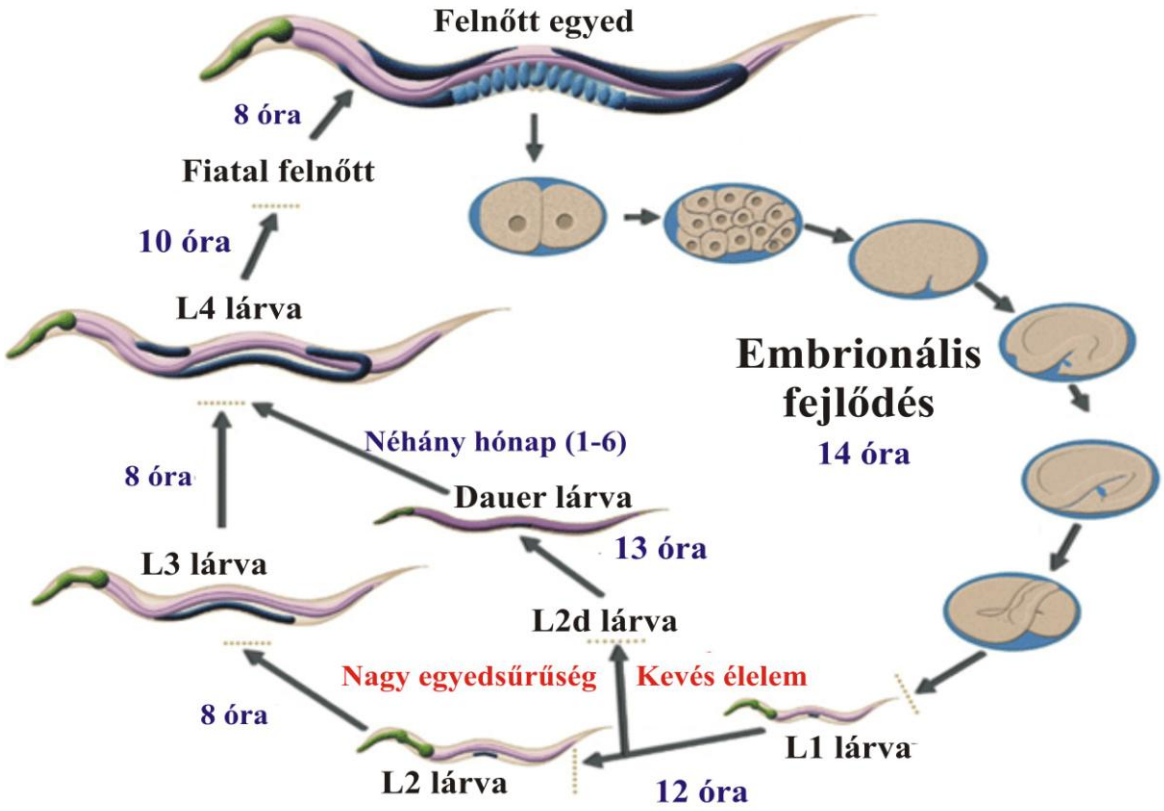
Az évek során felhalmozódott tudást az egyik első integrált adatbázis, a *Wormbase* tartalmazza (*wormbase.org*). A féreg anatómiájával a *Wormatlas* (*www.wormatlas.org*)

segítségével lehet megismerkedni, a nemzetközi törzsgyűjtemény (CGC: *Caenorhabditis Genetics Center*) pedig a *biosci.umn.edu/CGC/CGChomepage.htm* címen keresztül érhető el.

3.4. A *C. elegans* dauer lárva képződés szabályozása

3.4.1. A dauer lárvaállapot

Szinte minden élőlény rendelkezik túlélési stratégiával az extrém környezeti feltételek átvészelésére. Az egyik legelterjedtebb stratégia az úgynevezett diapauza (egy alternatív egyedfejlődési állapot, amelyben az állat megakasztja egyedfejlődését). A diapauza során az életfolyamatok lelassulnak vagy felfüggesztődnek, az állat nem táplálkozik, keveset mozog, és lassan öregszik. Ez a stratégia a rovarok körében a legelterjedtebb, de az emlősök és a kétéltűek hibernációja vagy téli álma, sőt a baktériumok és az egysejtű gombák spóraképzése is hasonló célokat szolgál. A *C. elegans* esetében ilyen túlélő forma az ún. dauer (kitartó) lárva állapot (13. és 14. ábra) [139].



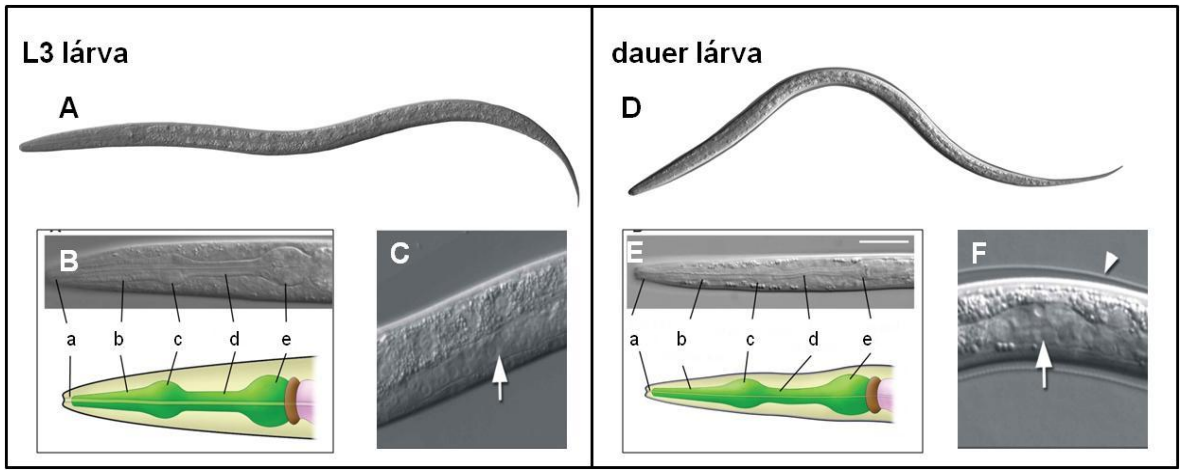
13. ábra: A *C. elegans* egyedfejlődése 22°C-on. Az állat embrionális fejlődése 14 óra alatt megy végbe, majd újabb 38 óra elteltével a lárvákból fiatal felnőtt állatok fejlődnek. Kedvezőtlen körülmények között (kevés élelem, nagy egyedsűrűség, vagy magas hőmérséklet) azonban az állatok dauer állapotba mennek át. A környezeti feltételek javulásával a dauer lárva visszaalakul L3 állapotba (*recovery*), és onnan folytatja a normális reproduktív egyedfejlődést.

A *C. elegans* posztembrionális egyedfejlődése 4 lárva állapoton (L1-L4) keresztül megy végbe (13. ábra). Kedvezőtlen körülmények közé kerülve azonban az állat felfüggeszti

reproduktív egyedfejlődését, és dauer lárvává alakul. A kitartó lárva képzés során az L1 lárva az első vedlés után módosult L2d lárvává alakul, amelyből egy újabb vedlést követően alakul ki a dauer lárva (13. ábra) [140].

A dauer képzést kiváltó környezeti tényezők a nagy egyedsűrűség, amit az állatok által termelt dauer feromon mennyisége jelez, a tápanyag hiány és a magas hőmérséklet [141]. 27°C felett a dauer fejlődés feromontól függetlenül és megfelelő tápanyag ellátottság mellett is indukálódhat [142]. Ha az egyes kedvezőtlen környezeti hatások együttesen jelentkeznek, a dauer lárva kialakulásának valószínűsége megnő.

A dauer lárva sok tekintetben eltér a normális lárva állapotoktól, és ez jellegzetes morfológiai jegyekben is megnyilvánul. Az állat sokkal vékonyabb és átlátszóbb, mint egy normálisan fejlődő L3 lárva. Speciális kutikulával rendelkezik, ami ellenállóvá teszi a külső behatásokkal szemben. A dauer lárva akár 1 órás 1%-os SDS (nátrium-dodecil-szulfát) kezelést is elvisel. Ebben a különleges lárvastádiumban az állatok nem táplálkoznak, a garatot egy kutikula réteg zárja le, a garat pumpálása lelassul vagy akár teljesen meg is szűnhet. A bélcsatorna ürege összezsugorodik és a bélsejtek sötét megjelenésűek a bennük felhalmozódott zsíroktól. A kiválasztó mirigyekből hiányoznak a szekréciós granulumok, az ivarmirigyek fejlődése pedig megreked az L2 lárvákra jellemző állapotban (14. ábra) [139].



14. ábra: A dauer lárva morfológiája. A dauer lárva (D) vékonyabb és áttetszőbb, mint egy L3 stádiumú lárva (A). A dauer lárva garatja összeszűkült (E). A dauer lárva speciális kutikulával rendelkezik (F, nyílfej), és gonádjának fejlődése megreked az L2 stádiumra jellemző állapotban (F, nyíl). Az L3 lárva gonádja (C, nyíl) tovább fejlődik. [a garat anatómiai részei: a: szájnyílás; b: procorpus; c: első garat bulbusz (metacorpus); d: isthmus; e: második garat bulbusz.]

A kitartó lárva anyagcseréje jelentősen módosult. A citromsav ciklus aktivitása lecsökken, és a raktározott zsírok felhasználása jut elsődleges szerephez az energia ellátásban. Az L3 lárvákhoz képest a dauer lárvák transzkripcionálisan inaktívak. Citoplazmájukban megnövekedett mennyiségű Hsp90-et kódoló mRNS található [143]. Emellett megfigyelték,

hogy a szuperoxid dizmutáz [144] és kataláz [145] enzimek aktivitása is megnövekszik bennük. A dauer lárva tehát metabolikusan alkalmazkodik a környezeti stresszhez; ez az átalakulás a túlélést szolgálja [146].

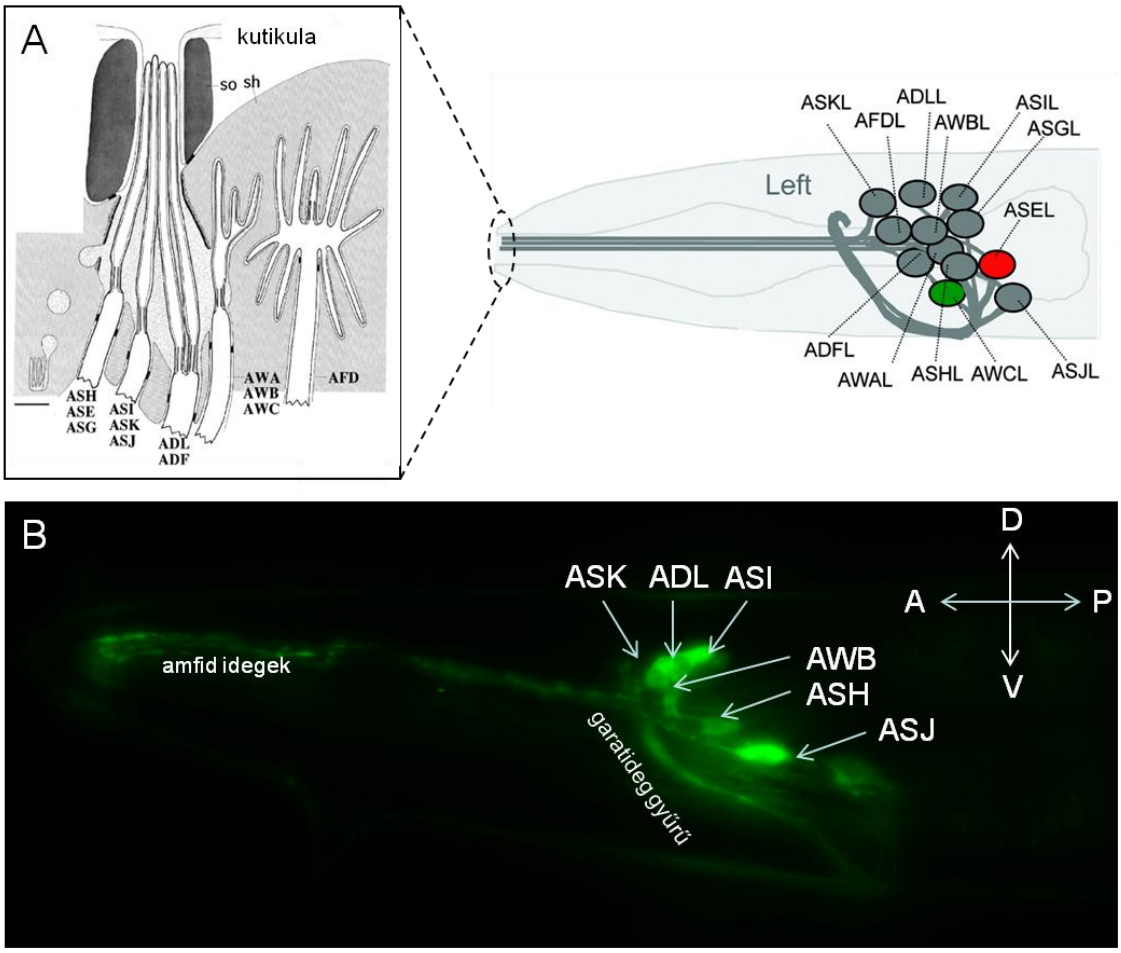
Ha a dauer lárvák jobb környezeti feltételek közé kerülnek (pl. lecsökken a hőmérséklet vagy az állatok élelemhez jutnak), akkor kilépnek a kitartó lárvaállapotból és L4 stádiumú lárvává, majd felnőtt állattá alakulnak. A dauerek idővel fokozatosan érzékenyebbé válnak ezekre a „menekítő" ingerekre. Minél hosszabb ideje van egy állat dauer állapotban, annál könnyebben lép újra a reprodukciós fejlődési útra [140].

3.4.2. A dauer egyedfejlődés szabályozása

A dauer állapotot környezeti tényezők váltják ki. Ezeket a környezeti jeleket az állat szenzoros idegsejtjei érzékelik és integrálják. A dauerképzést kiváltó egyik legfontosabb jel az állatok által termelt dauer feromon [147, 148]. A feromon három aszkarozid-szerű molekula keveréke, amelynek pontos kémiai összetételét meghatározták [149, 150].

A hermafrodita *C. elegans* idegrendszerét 302 neuron alkotja. Ebből mintegy 60 szenzoros neuron érzékeli a külvilágból érkező ingereket. Az érző idegsejtek egy része két nagyobb érzékszervben, az ún. amfidokban csoportosul. Ezekben az érzékszervekben találhatóak azok a speciális érzéksejtek, az amfid sejtek, amelyek elengedhetetlenek a külvilágból érkező jelek érzékeléséhez (15. ábra).

Az idegsejtek lézeres elpusztításával azonosították azokat a neuronokat, amelyek részt vesznek a dauer egyedfejlődés szabályozásban. Az ASI, ADF, ASJ és az ASG idegsejteknek a reproduktív fejlődés fenntartásában van szerepük; eltávolításuk következtében az állatok megfelelő tápanyag ellátottság esetén is dauer lárvaként fejlődnek [151]. Az ASJ és ASK idegsejtek a dauer feromon érzékelésében játszanak szerepet [152]. Ezek a neuronok számos hormont választanak ki, amelyeknek a dauer egyedfejlődés mellett az anyagcsere, az öregedés, a peterakás és a testméret szabályozásában is szerepük van. Ilyen hormonok többek között a TGF-β fehérje családba tartózó DAF-7 az ASI-ban [153], az inzulin-szerű peptid DAF-28 az ASI és ASJ neuronokban [154], és az ADF neuronban termelődő szerotonin [155]. Összességében tehát a külvilágból érkező jeleket az amfid neuronok érzékelik, hatásukra hormonokat termelnek, amelyek számos élettani funkciót és egyedfejlődési lépést (így többek között a dauer egyedfejlődést) befolyásolják.



15. ábra: A *C. elegans* érző idegsejtjei az ún. amfid érzékszervekben csoportosulnak: (A) Az amfid érzékszerv idegvégződései (balra) és maguk az amfid szenzoros neuronok (jobbra). A 12 pár amfid neuron mindegyike két nyúlvánnyal rendelkezik: egy anterior irányban húzódó dendrittel és egy axonnal, amely a garatideg gyűrűbe torkollik. (B) 6 pár amfid neuront és nyúlványaikat a DiO festék specifikusan jelöli.

3.4.2.1. A dauer állapotot szabályozó főbb jelátviteli útvonalak

A fejlődésgenetikusok mutáns analízis segítségével több mint 30 olyan gént azonosítottak, amelyek befolyásolják a dauer képzést. Ezek fenotípusuk alapján két csoportba oszthatóak. Az egyik csoportba azok a gének tartoznak, amelyek funkcióvesztéses mutánsai feltétel nélkül, tehát normális egyedsűrűség, bőséges élelem, és alacsonyabb hőmérséklet esetén is kitartó dauer lárvaként fejlődnek. Ezek az úgynevezett Daf-c (*dauer formation constitutive* = dauer konstitutív) mutánsok. A másik csoportot azok a gének alkotják, amelyek funkció vesztése esetén az állatok éhezés, magas hőmérséklet mellett, illetve dauer feromon jelenlétében sem képesek dauer állapotba fejlődni. Ezek a Daf-d (*dauer formation defective* = dauer defektív) mutánsok [140]. A genetikai vizsgálatok során kiderült, hogy a dauer fejlődést különböző, evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalak szabályozzák. Ezek közé tartoznak a

guanilát-cikláz, a DAF-7/TGF-β, DAF-2/IGF-1 és a szteroid hormon jelátviteli rendszerek [141].

3.4.2.2. A guanilát cikláz útvonal

A guanilát-ciklázok GTP-ből (guanozin-trifoszfát) cGMP-t (ciklikus guanozin-monofoszfát) állítanak elő. A cGMP egy másodlagos hírvivő molekula, amelynek különböző élettani folyamatok szabályozásában van szerepe. A cGMP szabályozza például a sejtek programozott pusztulását (apoptózis) is. *C. elegans*ban a guanilát cikláz útvonal a dauer képzés mellett [156] a vad típusú testméret és élethossz kialakításában vesz részt [157]. Az útvonal tagjai szerepet játszanak a kemotaxisban [158], a testméret szabályozásában [159], valamint szükségesek az idegrendszer „huzalozásának" kialakulása során [160].

1. táblázat: A *C. elegans* cGMP útvonal alkotóelemei és humán ortológjai.

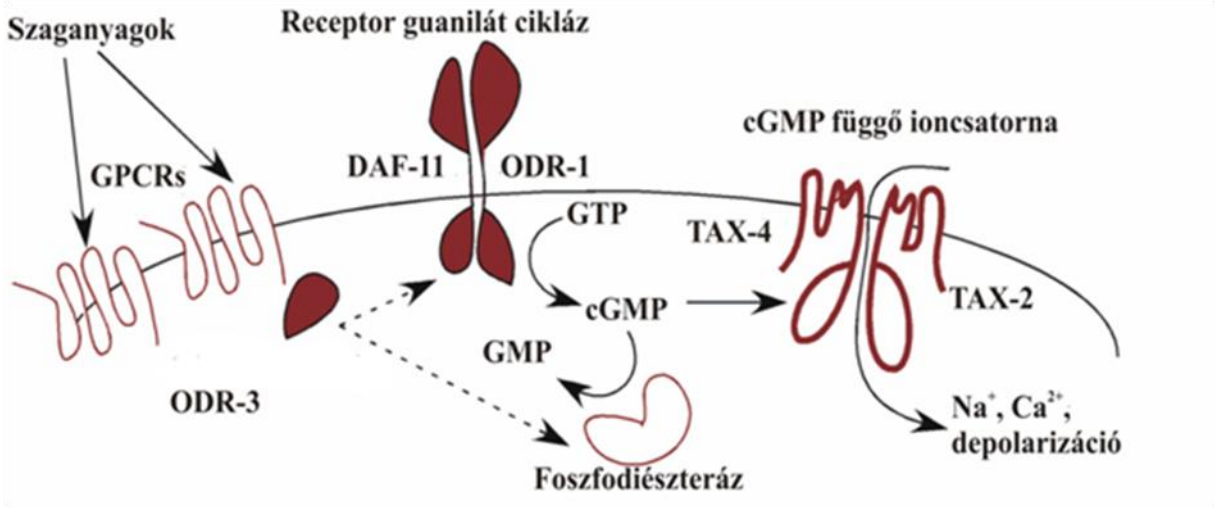
Gén	Funkció	Humán ortológ
daf-11	Transzmembrán guanilát cikláz	NPR1
daf-21	Hsp90	HSP90AB1
tax-2	cGMP-függő ioncsatorna β-alegység	CNGB3
tax-4	cGMP-függő ioncsatorna α-alegység	CNGA1
egl-4	cGMP-függő protein kináz	PRKG1

A *C. elegans* genom 34 guanilát-ciklázt kódol, ezekből 27 transzmembrán fehérje, a fennmaradó 7 pedig citoszolikus oldható guanilát-cikláz [161]. A dauer egyedfejlődés szabályozásában a DAF-11 transzmembrán guanilát-cikláz játszik központi szerepet (1. táblázat). A *daf-11* gén csak néhány amfid neuronban - ASI, ASJ és ASK - fejeződik ki. A *daf-11(-)* mutánsok Daf-c fenotípusúak, valamint a mutánsokban sérült a kémiai anyagok érzékelése és a kemotaxis is. A *daf-11* a DAF-7/TGF-β és inzulin/IFG-1 útvonalakhoz képest *upstream* helyezkedik el. Kimutatták, hogy *daf-11(-)* mutáns állatokban a TGF-β (*transforming growth factor-β*) és IGF-1 (*insulin like growth factor*) ligandumok (DAF-7 és DAF-28) expressziója jelentősen csökkent [154, 156].

A dauer konstitutív *daf-21(p673)* mutánsokban - hasonlóan a *daf-11(-)* mutánsokhoz - abnormális a kémia anyagok érzékelése [141] (1. táblázat). A *daf-21* egy Hsp90 (*heat shock protein* – hősokk fehérje) homológ fehérjét kódol. E génnek eddig két allélját izolálták: a

*p67*3-at, amely egy gyenge funkciónyeréses *daf-21* allél [162] és a deléciós *tm3133* allélt, amely egy genetikai null allél. A *daf-21(tm3133)* mutáns állatok lárva állapotban megrekednek és elpusztulnak [162].

A *tax-2* és a *tax-4* egy cGMP függő ioncsatorna alegységeit kódolják [160] (1. táblázat). Ez az ioncsatorna a hőmérséklet és a kémiai anyagok érzékelését, valamint az idegrendszer kialakulását szabályozza. Ezen gének expressziós mintázata átfed a *daf-11* mintázatával. A *tax-2* és a *tax-4* mutációja következtében kialakuló Daf-c fenotípus penetranciája kisebb, mint a *daf-11(-)* egyszeres mutánsok esetében. A *daf-11* tehát több párhuzamos útvonalon keresztül gátolhatja a dauer fejlődést [141] (16. ábra).



16. ábra: A cGMP útvonal *C. elegans*ban. A szaganyagokat (köztük a dauer feromont) G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCRs) érzékelik, és az ODR-3 közvetítésével adják tovább a jelet a DAF-11 és ODR-1 guanilát cikláznak. A keletkező cGMP egy ioncsatornát nyit meg, aminek hatására a sejt depolarizálódik. A jelet a foszfodiészterázok szüntetik meg.

Az *egl-4* (*egg-laying defective*) egy cGMP-függő protein kinázt kódol (1. táblázat), ami ugyancsak ebben az útvonalban fejti ki a hatását. Mutációja dauer konstitutív fenotípust eredményez [163]. Ezenkívül szerepe van a normális kemotaxis kialakításában, a testméret meghatározásában, és szükséges a normális peterakási képesség kialakításához is. A gén funkcióvesztéses mutációi magas hőmérsékleten megnövekedett arányban képeznek dauer lárvát, valamint más mutációkkal együtt szintetikus Daf-c fenotípust mutatnak [159]. Az *egl-4* tehát befolyásolja a TGF-β útvonal kimenetelét; úgy tűnik, hogy kulcsszerepet játszik a dauer fejlődésben [164].

3.4.2.3. A TGF-β útvonal

A TGF-β útvonal mind a fejlődő embrió, mind a felnőtt állat életfolyamatait szabályozza [165, 166]. Befolyásolja többek között a sejtnövekedést, a sejtek differenciálódását és

programozott halálát. E konzervált jelátviteli útvonal működése során a TGF-β ligandum DAF-7 hozzáköt a II-es típusú TGF-β receptorhoz (DAF-4), ami azután kapcsolódik az I-es típusú receptorhoz (DAF-1), és foszforilálja azt. Az I-es típusú receptor ezután foszforilálja az R-SMAD-okat (*receptor-regulated SMAD*), amelyek képesek kölcsönhatni a Co-SMAD-okkal (*common-mediated SMAD*). Ez a fehérje komplexum a sejtmagba jut, és mint transzkripciós faktor működik a továbbiakban, meghatározott gének átírását elősegítve vagy gátolva.

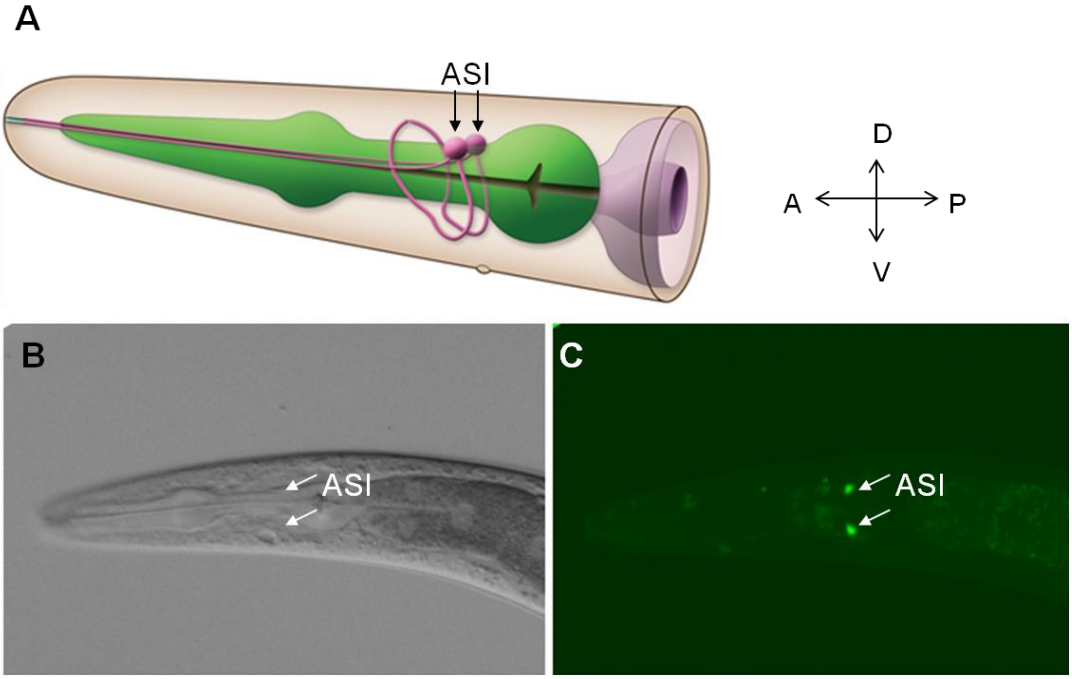
2. táblázat: A TGF-β útvonal alkotóelemei és emlős ortológjai.

Alkotó elemek	Gén	Humán ortológ
Ligandumok	*daf-7*	GDF-11
	dbl-1	BMP5
	unc-129	GDF10
	tig-2	BMP8
	tig-3	BMP2
I-es típusú receptor	*daf-1*	TGF-βRI
	sma-1	BMPRIB
II-es típusú receptor	*daf-4*	ACTRIIB
R-Smad	*daf-8*	SMAD9
	daf-14	SMAD2
	sma-2	SMAD1
	sma-3	SMAD5
Co-Smad	*daf-3*	SMAD4
	sma-4	SMAD4
I-Smad	*tag-68*	SMAD6
Transzkripciós faktorok	*daf-5*	Sno/Ski családhoz hasonló
	daf-12	NR1H3 (LXR-alpha isoform c)
	sma-9	HIVEP1-hez hasonló
	lin-31	FKH-5

*C. elegans*ban ez az útvonal a dauer fejlődést (dauer útvonal), a hímek párzási struktúráját, valamint a testméret meghatározását szabályozza (Sma/Mab útvonal) [167]. A dauer fejlődés szabályozásában a *daf-1, -4, -7, -8* és *-14* Daf-c gének és a *daf-3* és *daf-5* Daf-d gének, míg a testméret meghatározásában a *dbl-1, sma-2, -3, -4, -6 és -9* gének vesznek részt (2. táblázat), (18. ábra). A Sma/Mab útvonal liganduma a DBL-1 [167].

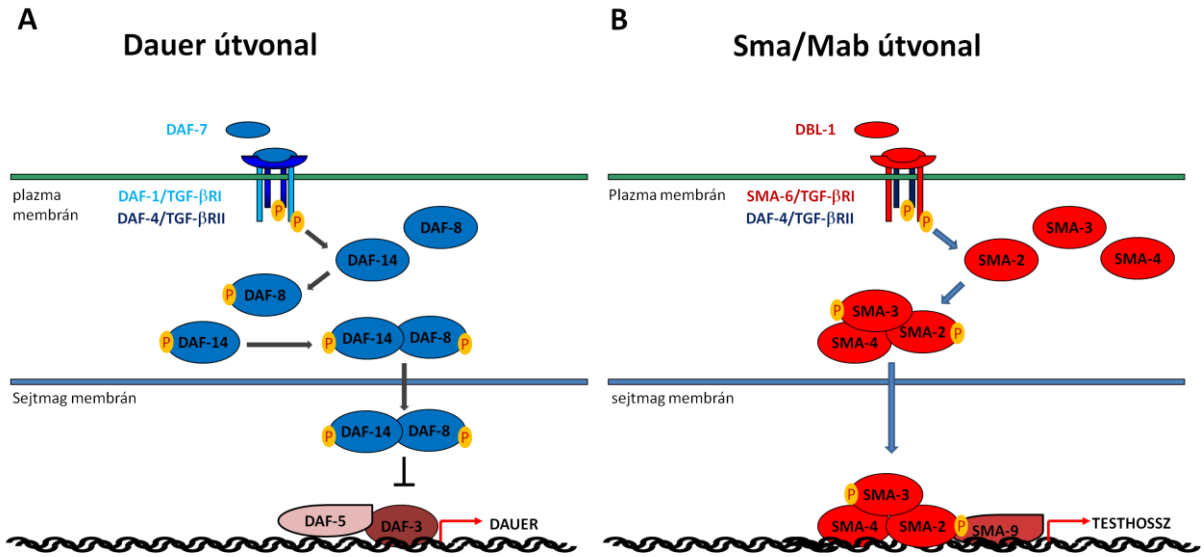
A DAF-7 a dauer fejlődést szabályozó TGF-β útvonal liganduma. A testméretet nem szabályozza. A DAF-7 a reproduktív egyedfejlődést segíti elő. Mutációja Daf-c fenotípust alakít ki. Az útvonal elemei az állat legtöbb sejtjében kifejeződnek, kivéve a DAF-7 fehérjét, ami kizárólag az ASI érzékelő amfid neuronokban fejeződik ki [152, 153] (17. ábra). A DAF-7 tehát sejt-nem autonóm módon szabályozza az egyedfejlődést.

A DAF-7 expressziója nemcsak térben, hanem az időben is jellegzetes mintázatot mutat [152, 153]. A DAF-7 mRNS szintje az L1 fázisban a legnagyobb. Ez a szint csökken az L2 állapotban, és majdnem teljesen hiányzik az L2d lárvákban és a későbbi állapotokban. A DAF-7 fehérje expresszióját nyomon lehet követni a *daf-7* gén promóterének szabályozása alatt álló transzlációs fúziós riportert hordozó *daf-7::gfp* transzgenikus állatokban. Ha az állatok dauer fejlődést indukáló környezetbe kerülnek, akkor már az L1 lárvákban észrevehető a GFP intenzitásának csökkenése, míg dauer állapotban a GFP jel alig észlelhető [140]. Schackwitz és munkatársai megfigyelték azt is, hogy a DAF-7 fehérje mennyisége pusztán a megemelkedett hőmérséklet hatására is lecsökken [152].



17. ábra: A DAF-7::GFP az ASI neuronokban fejeződik ki. (A) A neuronpár a második garatbulbus előtt helyezkedik el az állatban. (B) Nomarski és (C) fluoreszcens felvételek egy *daf-7::gfp* transzgenikus *C. elegans*ról.

Bár számos olyan mutáns ismert [pl. *daf-11(-), daf-21(p673)*], amelyben a DAF-7 fehérje expressziója lecsökken, ennek közvetlen kiváltó okát még nem ismerjük. Elképzelhető, hogy a dauer fejlődést indukáló tényezők (magas hőmérséklet, éhezés, dauer feromon) hatására a gén transzkripcióját gátló faktorok jelennek meg az ASI neuronok sejtmagjában. Nem zárható ki azonban, hogy a DAF-7 fehérje gyors expressziós csökkenését olyan fehérjelebontó mechanizmusok segítik, mint az autofágia vagy az ubikvitin-proteoszóma rendszer.



18. ábra: A TGF-β útvonal *C. elegans*-ban. (A) A dauer fejlődést szabályozó TGF-β útvonal. Kedvező körülmények között a DAF-7 TGF-beta ligandum expresszálódik és hozzáköt a DAF-1 és DAF-4 TGF-β receptorokhoz, amelyek ennek hatására foszforilálják először saját magukat, majd a DAF-8 és DAF-14 citoplazmás SMAD-okat. A foszforilált DAF-8 és DAF-14 dimerizálódik, és így képes lesz bejutni a sejtmagba, ahol a DAF-3 és DAF-5 transzkripciós faktorok működését gátolják. (B) A testméretet szabályozó Sma/Mab TGF-β útvonal. A DBL-1 a testméretet és a hím párzószervének fejlődését szabályozza. A DBL-1 a SMA-6 I-es típusú és a DAF-4 II-es típusú receptort kötve kiváltja a SMA-2 és SMA-3 fehérjék foszforilálódását, így kialakul a SMA-2/SMA-3/SMA-4 komplex, amely a sejtmagba jutva aktiválja a SMA-9 transzkripciós faktort.

A DAF-7 receptorai az I-es típusú DAF-1, és a II-es típusú DAF-4 TGF-beta receptorok. Feladatukat heterotetramer állapotban képesek ellátni, bár a DAF-4 hiányában a DAF-1 korlátozottan önmagában is működőképes. A DAF-4 sejttenyészetben köti az emberi BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) ligandumokat, ami azt jelzi, hogy ez az útvonal a fonálférgektől az emberig konzervált [169]. Míg a DAF-4 *C. elegans*-ban széleskörűen expresszálódik, addig a DAF-1 főleg az idegrendszerben fejeződik ki [170, 171].

A jelátvitel következő tagjai a DAF-8 és a DAF-14 R-SMAD-ok. A receptor aktivációját követően ezek az elemek foszforilálódnak és heterodimerként jutnak be a sejtmagba (18. ábra), ahol gátolják a DAF-3 és DAF-5 transzkripciós faktorok működését [167].

A DAF-3 egy Co-SMAD, a DAF-5 pedig a Sno/Ski onkogének családjába tartozó fehérjékkel mutat homológiát. A két transzkripciós faktor a dauer állapot kialakulásához és fenntartásához szükséges gének transzkripcióját aktiválja. A reproduktív fejlődési útnak kedvező környezeti feltételek mellett működésüket a DAF-8 és DAF-14 R-SMAD-ok gátolják [167].

3.4.2.4. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal

Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal működése során az inzulin illetve az inzulinszerű növekedési faktor (IGF) hatására a tirozin kináz inzulin/IGF-1 receptor aktiválódik és foszforilálja a foszfatidilinozitol-3-kinázt (PtdIns3K). Az aktivált PtdIns3K foszforilálja a foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfátot (PtdIns(4,5)P2) és így foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát (PtdIns(3,4,5)P3) képződik. PtdIns(3,4,5)P3 jelenlétében a PtdIns3K PDK-1 aktiválja az Akt protein kináz B molekulát. Az aktivált Akt kináz *downstream* célpontjai révén számos sejtszintű folyamatot szabályoz. Részt vesz az élethossz, a stressz válasz, az apoptózis, a glükóz anyagcsere (glükóz transzport, glikogén szintézis), a fehérjeszintézis, az autofágia és a sejtciklus szabályozásában [164].

Az inzulin/IGF-1 útvonal a *C. elegans* számos fontos fejlődési és élettani aspektusát befolyásolja. Ilyenek többek között az anyagcsere, a stresszel szembeni ellenálló képesség, az állatok termékenysége, valamint élethossza [172]. Ezt az útvonalat a *daf-2* és *daf-23/age-1* gének, illetve a *daf-16* gén által alkotott jelátviteli tengely határozza meg (3. táblázat). Az inzulin útvonal párhuzamosan működik a TGF-β útvonallal a dauer lárva fejlődés szabályozásában. A *daf-2* és a *daf-23* gének null mutánsai erős Daf-c fenotípust mutatnak: a környezeti feltételektől függetlenül dauerekké alakulnak. A hőérzékeny mutáns állatok vizsgálata során megfigyelték, hogy a Daf-c fenotípus mellett élethosszuk is jelentősen megnövekszik [163].

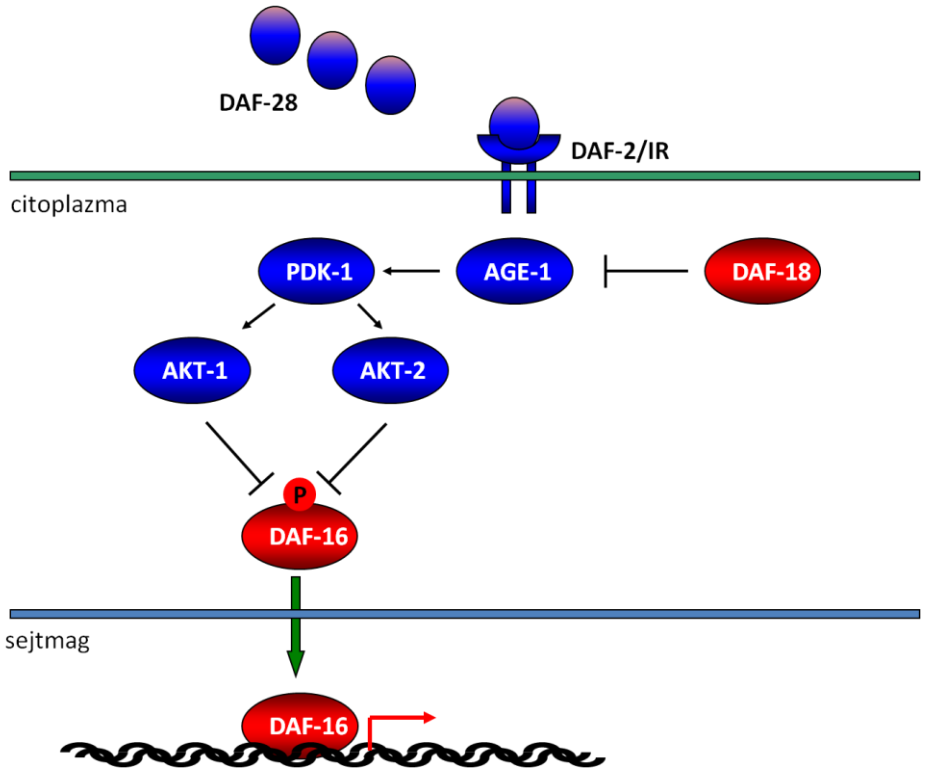
3. táblázat: A *C. elegans* inzulin/IGF-1 útvonal alkotóelemei és humán ortológjai

Gén	Funkció	Humán ortológ
daf-28	DAF-2 agonista	- Inzulinszerű peptid
ins-1	DAF-2 antagonista	- Inzulinszerű peptid
daf-2	receptor tirozin kináz	INSR
pdk-1	PIP3 függő kináz	PDPK1
daf-18	foszfoinozitid-3-foszfatáz	PTEN
akt-1	protein kináz	AKT1
daf-16	Forhead O-boksz típusú transzkripciós faktor	FOXO

A *C. elegans* genom mintegy 40 inzulinszerű molekulát (INS) kódol [173]. Az *ins* gének vizsgálatát jelentősen megnehezíti az, hogy az egyes inzulin-szerű molekulák funkciója átfed. A humán inzulinra leginkább az INS-1 fehérje hasonlít. Deléciós *ins-1(-)* mutánsnak nincs dauer fenotípusa, ellenben ha a túltermeltetjük az INS-1 molekulát, akkor megnövekszik a dauer állatok aránya a vad típusú genetikai háttérben [173]. Ugyanezt tapasztaljuk akkor, ha humán inzulint kódoló cDNS-t juttatunk az állatokba. Ez arra utal, hogy az INS-1, illetve a humán inzulin gátolja a DAF-2/IGF-1 jelátviteli útvonalat. A fentiekhez hasonló hatást írtak le az INS-18 esetében is, míg más *ins* gének (*ins-9, ins-22 vagy ins-31*) túlexpresszálása nem járt ilyen változással. Az INS-1 és INS-18 fehérjék, a többi *C. elegans* inzulin-szerű peptiddel szemben, rendelkeznek C-peptiddel. Ez az a peptid, mely az emberi proinzulinból proteolítikusan hasad le. Számos inzulinszerű gén az amfid neuronokban expresszálódik, ami arra utal, hogy a dauer képződést szabályozó környezeti jelek szabályozhatják az inzulin expressziót és/vagy szekréciót [173].

Inzulinszerű molekulát kódol a *daf-28* gén is. Expressziója éhezés esetén jelentősen lecsökken [163]. A *daf-28* gén promótere által szabályozott DAF-28::GFP fúziós fehérje legerősebben 2 pár érző idegsejtben, az ASI és ASJ neuronokban fejeződik ki. *daf-28(sa191)* mutáns állatok dauer konstitutív fenotípusúak. A *daf-28(sa191)* egy domináns negatív allél.

Mivel a DAF-2 receptornak nemcsak ez az egyetlen liganduma, a *daf-28* null alléljának fenotípusát az átfedő funkciójú gének miatt nem érzékeljük [154, 173]. Az inzulinszerű peptideket kódoló gének tehát redundánsan és antagonisztikusan is működhetnek, többségük pontos biológiai funkciója még ismeretlen.



19. ábra: Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal *C. elegans*-ban. A DAF-28/Ins ligandum kötődése a DAF-2/IGF-1 receptorhoz egy foszforilációs kaszkádot aktivál. A kaszkád végén a DAF-16/FoxO transzkripciós faktor foszforilálódik, ezáltal nem képes bejutni a sejtmagba. A DAF-18/PTEN egy foszfoinozitid-3-foszfatáz (PTEN), amely az AGE-1/PI3K inhibitora. Ha az útvonal inaktív, akkor a kinázok nem foszforilálják a DAF-16/FoxO-ot, amely így transzlokálódik a sejtmagba, és ott a dauer egyedfejlődésért és stressz-válaszért felelős géneket aktiválja. Kék színnel vannak jelölve azon fehérjék, amelyeket kódoló gének funkció vesztéses mutáció dauer konstitutív fenotípust okoznak. A piros színnel jelölt fehérjék hiánya dauer defektív fenotípushoz vezet.

Kedvező környezeti feltételek esetén a DAF-2 inzulin/IGF-1 receptor a DAF-28/Ins ligandum kötésének eredményeképpen aktiválódik (dimerizálódik) és foszforilálja az AGE-1/PtdIns3 kinázt. Az aktivált AGE-1 aztán foszforilálja a foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfátot (PtdIns(4,5)P2), amely így foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfáttá (PtdIns(3,4,5)P3) konvertálódik. PtdIns(3,4,5)P3 jelenlétében a PtdIns(3,4,5)P3-függő protein kináz ortológ PDK-1 aktiválja az AKT-1-et (szerin/treonin protein kináz B) és az AKT-2-t [174-177]. Végül az AKT-1 foszforilálja a DAF-16-ot, amely egy FoxO-szerű (*Forkhead box-O*) transzkripciós faktor. A foszforilált DAF-16 nem képes a sejtmagba transzlokálódni [178-180]. A defoszforilált (aktivált) DAF-16 bejut a sejtmagba, ahol a stressz-válaszhoz, dauer fejlődéshez és élethossz növekedéshez szükséges gének átírását szabályozza [179] (19. ábra).

A DAF-18 egy foszfoinozitid-3-foszfatáz (PTEN) (3. táblázat, 19. ábra), amely defoszforilálja az AGE-1 által képzett foszfatidilinozitol (3,4,5) trifoszfát molekulákat, így az AKT-1 és AKT-2 kinázok működését gátolja, ezzel lehetővé téve a DAF-16 transzkripcionális aktivitását [181]. A PTEN fehérje egy tumorszupresszor, az inzulin/IGF-1 útvonal egyetlen ismert negatív szabályozója.

3.4.2.5. A szteroid hormon útvonal

A szteroid hormonok számos fiziológiai folyamatot szabályoznak. Befolyásolják a szaporodást (ösztrogén receptorok), a glükóz anyagcserét (glükokortikoid receptorok), a sóháztartást (mineralokortikoid receptorok) és a stressz-választ [72]. A szteroid hormonok biológiai hatását sejtmagi hormon receptorok, a szteroid hormon receptorok közvetítik. Ezek a receptorok olyan transzkripciós faktorok, amelyek megfelelő hormon kötésére aktiválódnak. A *C. elegans* genomban 284 nukleáris hormon receptor gént azonosítottak. Közülük eddig mintegy 20 receptort jellemeztek, melyek többsége evolúciósan konzervált. Szerepüket kimutatták a szex-determinációban [182], a vedlésben [183-185], az idegrendszer kialakulásában [186, 187], a lipid anyagcserében [188], valamint a dauer egyedfejlődés és az élethossz szabályozásában [189-191].

A dauer egyedfejlődést szabályozó TGF-β és inzulin/IGF-1 jelátvitelek a szteroid hormon útvonalon futnak össze. Az útvonal első lépéseként koleszterolból kiindulva epesav-szerű szteroid, úgynevezett dafakronikus sav (DA = *dafachronic acid*) szintetizálódik [192].

A dafakronikus sav az XXX feji neuroendokrin sejtekben képződik, szintéziséhez és transzportjához szükséges gének többsége kifejeződik ezekben a sejtekben (4. táblázat). A hormon szintézis legjobban jellemzett eleme a citokróm P450 homológ szteroid hidroxiláz, a DAF-9. A *daf-9* térben és időben jellegzetes expressziót mutat. A hipodermisz és az *XXX* sejtek mellett a felnőtt állatok spermatékájában fejeződik ki. Míg azonban a feji neuroendokrin XXX sejtekben expressziós szintje a reproduktív egyedfejlődés során állandó, addig a hipodermiszben a *daf-9* kizárólag a késői L2, az L3 és a korai L4 lárvákban fejeződik ki [193]. A hipodermális *daf-9* mennyisége a környezeti tényezők függvényében is változik. A dauer egyedfejlődést elősegítő körülmények (éhezés, dauer feromon, magas hőmérséklet) hatására megnő az expressziója. Hasonló DAF-9 szint növekedés tapasztalható a TGF-β és inzulin/IGF-1 jelátvitelekben mutáns állatok reproduktívan növekedő lárváiban.

4. táblázat: A dafakronikus sav szintéziséhez szükséges *C. elegans* gének és humán ortológjaik

Gén	Funkció	Humán ortológ
daf-9	citokróm P450	CYP2U1
daf-36	Rieske-féle oxigenáz	-
ncr-1	transzmembrán glikoprotein	NPC1L1
ncr-2	transzmembrán glikoprotein	NPC1

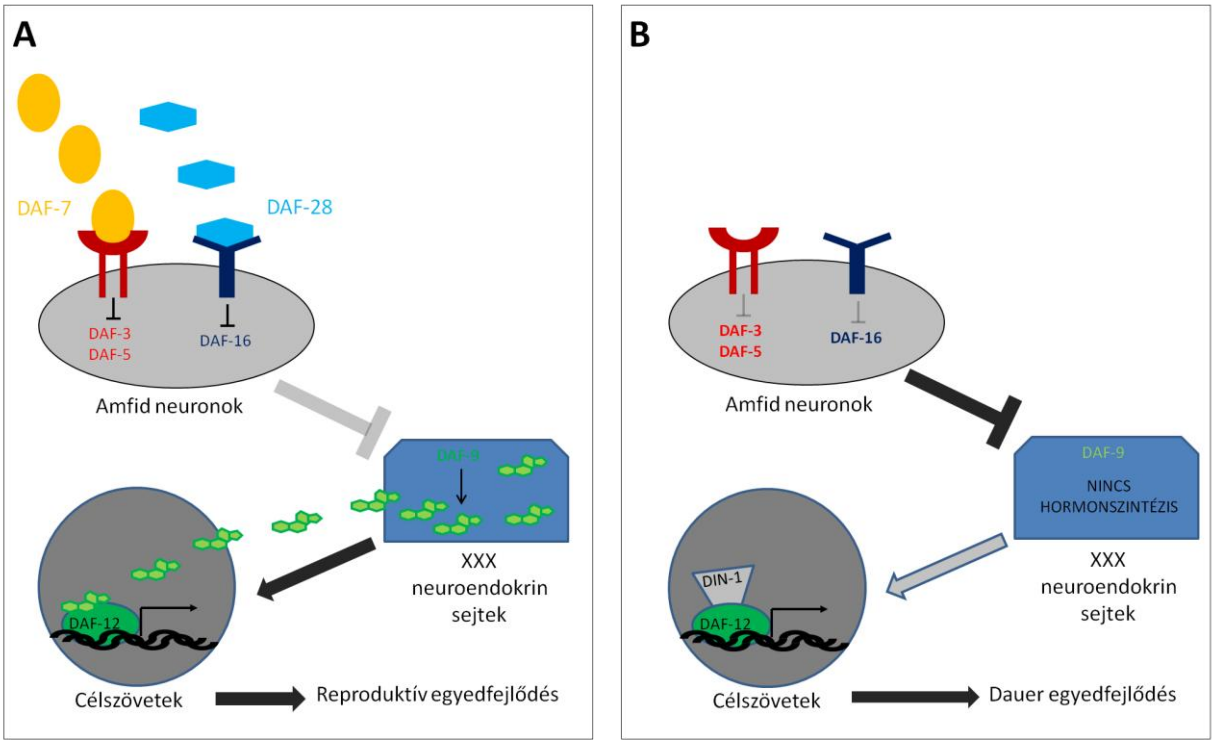
Több megfigyelés is utal arra, hogy az XXX sejtekben a DAF-9 közreműködésével képződő dafakronikus sav elengedhetetlen a reproduktív egyedfejlődéshez. *daf-9(-)* mutánsok és azok az állatok, amelyekben az XXX sejteket az L1 lárvaállapotban lézersugár segítségével elpusztítják, egyaránt dauer lárvává fejlődnek [193, 195]. *daf-9(-)* és XXX sejttel nem rendelkező állatok Daf-c fenotípusa kívülről bejuttatott dafakronikus sav segítségével menekíthető [192]. Végül megfigyelték azt is, hogy a dafakronikus sav szintéziséhez szükséges koleszterol megvonása esetén megnő a dauer lárvák aránya a populációban [193, 196].

A dafakronikus sav képződését befolyásolják még az *ncr-1* (*Niemann-Pick type C protein*) és *ncr-2* gének. Mindkét gén funkcióvesztéses mutánsa kis penetranciájú Daf-c fenotípust mutat. Ezen gének humán ortológjai az intracelluláris koleszterin szállításért felelősek [197] (4. táblázat).

A dafakronikus sav a DAF-12 liganduma. A *daf-12* egy sejtmagi hormon receptort kódol, aminek legközelebbi gerincesek ortológjai a D vitamin és az LXR (*Liver X Receptor*) szteroid receptorok [198, 199] (4. táblázat). A *daf-12* a sejtek túlnyomó többségében kifejeződik. Expressziós szintje az L2 és L3 lárvaállapotokban a legmagasabb [198]. A *daf-12(-)* mutánsok dauer defektívek. A *daf-12(-)* minden ismert dauer konstitutív mutációt szuppresszál: szükséges a *daf-9(-)*, az XXX sejt hiányos állatok, valamint mindhárom, az előzőekben tárgyalt útvonal (TGF-β, guanilát cikláz, inzulin/IGF-1) mutánsainak Daf-c fenotípusának kifejeződéséhez [193, 200]. A *daf-12* mutánsokat fenotípusuk alapján két csoportba sorolhatjuk. Míg a *daf-12(-)* mutánsok Daf-d fenotípusúak, addig azok a mutánsok, amelyekben a mutáció a receptor ligandkötő doménjét kódoló génszakaszt érinti, Daf-c fenotípussal rendelkeznek [141]. A reproduktív fejlődéshez tehát a dafakronikus savat kötő DAF-12 szükséges.

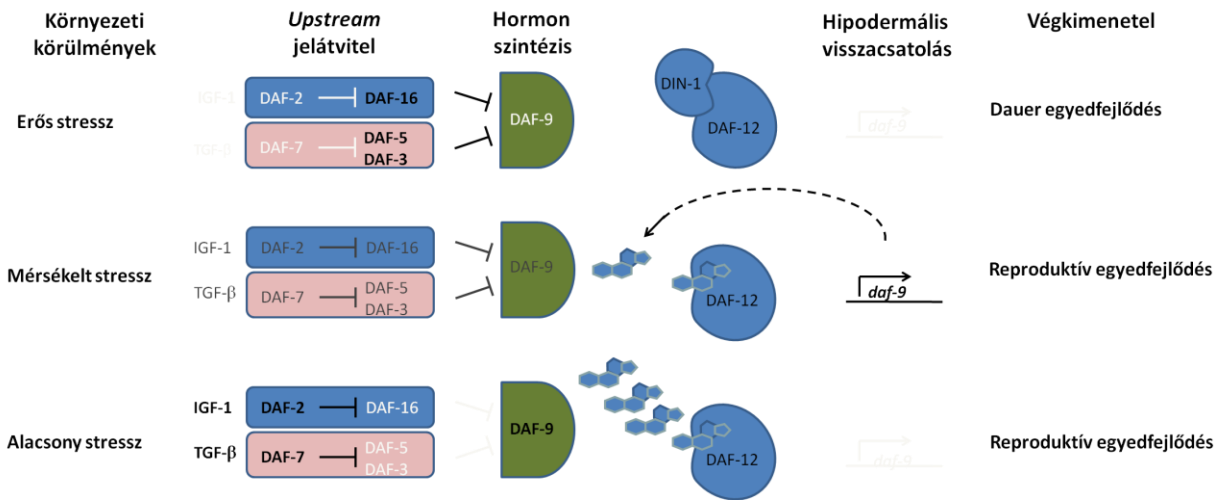
A magi hormon receptorok egy része, például a retinsav és a tiroid receptorok, célgénjeik kifejeződését koaktivátorok és korepresszorok segítségével szabályozzák [201]. Ludewig és munkatársai a DAF-12 egy korepresszoraként a DIN-1 fehérjét azonosították. A DIN-1 az emberi SHARP (*SMRT/HDAC-1-associated repressor protein*) korepresszor ortológja [202] . Két izoformája közül a rövidebb a *C. elegans* dauer egyedfejlődésében játszik szerepet, az inzulin és a TGF-β útvonaltól *downstream*. *daf-12(-)* mutánsokhoz hasonlóan a *din-1(-)* mutánsok is dauer defektívek [202] (20. ábra).

Az *upstream* jelátviteli útvonalból érkező jeleket tehát az XXX neuroendokrin sejtek összegzik, és dafakronikus savat termelnek. A hormon mennyiségétől függően a féreg szöveteiben a DIN-1-DAF-12 komplex vagy a dafakronikus savat kötő DA-DAF-12 alakul ki. A dafakronikus savat kötő DAF-12 a reproduktív egyedfejlődést, míg a DIN-1-DAF-12 a dauer egyedfejlődés segíti elő (20. ábra) [192, 194]. A DAF-12 a dauer fejlődésben játszott szerepén kívül fontos még a zsíranyagcsere szabályozásában, az egyedfejlődés időtartamának meghatározásában, az ivartelep érésében, és a felnőtt élethossz meghatározásában is [141].



20. ábra: A *C. elegans* szteroid hormon útvonal összefoglalása. (A) Kedvező környezetben a TGF-β és inzulin/IGF-1 útvonalak aktívak, így szteroid hormon (dafakronikus sav; zöld sokszögek) termelődik, amely a DAF-12 szteroid hormon receptorhoz kötődve a reproduktív egyedfejlődést segíti elő. (B) Kedvezőtlen környezeti feltételek mellett azonban a *downstream* transzkripciós faktorok (DAF-3 és DAF-16) gátolják a hormonképződést, így a DIN-1-DAF-12 komplex a dauer egyedfejlődést segíti elő.

Érdekes módon a DAF-12 a *daf-9* expressziójára is hatással van [190, 194]. Megfigyelték, hogy kedvezőtlen környezeti feltételek mellett a reproduktív egyedfejlődésű férgekben a DAF-9 mennyisége megnő a hipodermiszben. Ez a változás azonban *daf-12(-)* mutánsokban elmarad. A DAF-12 tehát visszahat az őt aktiváló hormon szintézisét végző DAF-9 szintjére. Ennek a dauer egyedfejlődés finomszabályozásában van jelentősége (21. ábra).



21. ábra: A dauer egyedfejlődés finomszabályozás modellje. Erős környezeti stressz esetén az inzulin/IGF-1 és a TGF-β jelátvitel gátolt. Ekkor a dafakronikus sav szintéziséhez szükséges fehérjéket kódoló gének nem fejeződnek ki, így nem képződik a reproduktív egyedfejlődés fenntartását lehetővé tévő hormon. A hipodermiszben DIN-1-DAF-12 komplex alakul ki, és az állatok dauer lárvát képeznek. Mérsékelt környezeti stressz esetén még képződhet bizonyos mennyiségű dafakronikus sav, így kialakulhat a hormonkötött DAF-12 komplex, amely elősegíti a *daf-9* gén hipodermális kifejeződését és a szteroid hormon képződését. A DAF-9 – dafakronikus sav – DAF-12 – *daf-9* pozitív visszacsatolási kör pedig lehetővé teszi, hogy a szomszédos sejtek, illetve végeredményben a teljes állat a reproduktív egyedfejlődési út mellett köteleződjön el. Stressz mentes környezetben az inzulin/IGF-1 és a TGF-β jelátvitel aktív, így elegendő dafakronikus sav képződik az XXX sejtekben ahhoz, hogy az állat sejtjei a reproduktív egyedfejlődés mellett köteleződjenek el.

Kedvezőtlen, dauer egyedfejlődést indukáló körülmények esetén a TGF-β és az inzulin/IGF-1 jelátvitel gátolja az XXX sejtekben a hormon termelődést. Ennek következtében a különböző szövetekben a DIN-1-DAF-12 komplex gátolja a reproduktív egyedfejlődéshez szükséges gének kifejeződését, így kitartó dauer lárvák képződnek [203, 204] (21. ábra).

Enyhébb stressz esetén azonban az XXX sejtek még képesek valamennyi hormont termelni, így az XXX sejtek közelében lévő hipodermisz sejtekben kialakulhat dafakronikus savat kötő DAF-12, amely a *daf-9* gén kifejeződését aktiválja. A megnövekedett DAF-9 szint pedig elősegíti a dafakronikus sav szintézisét, így megemelkedhet a hormon-kötött DAF-12 szintje, amely az adott sejtekben beindítja a reproduktív egyedfejlődési programot. Ezzel párhuzamosan pedig a DAF-9 – dafakronikus sav – DAF-12 – *daf-9* pozitív visszacsatolási

kör révén a szomszédos sejtek is a reproduktív egyedfejlődési út mellett köteleződnek el (21. ábra). Ezt a modellt az a megfigyelés is alátámasztja, hogy enyhe stressz esetén a *daf-9* expresszió először az XXX sejtek közelében elhelyezkedő hipodermisz sejtekben erősödik fel, majd innét terjed tovább poszterior irányban [203, 204].

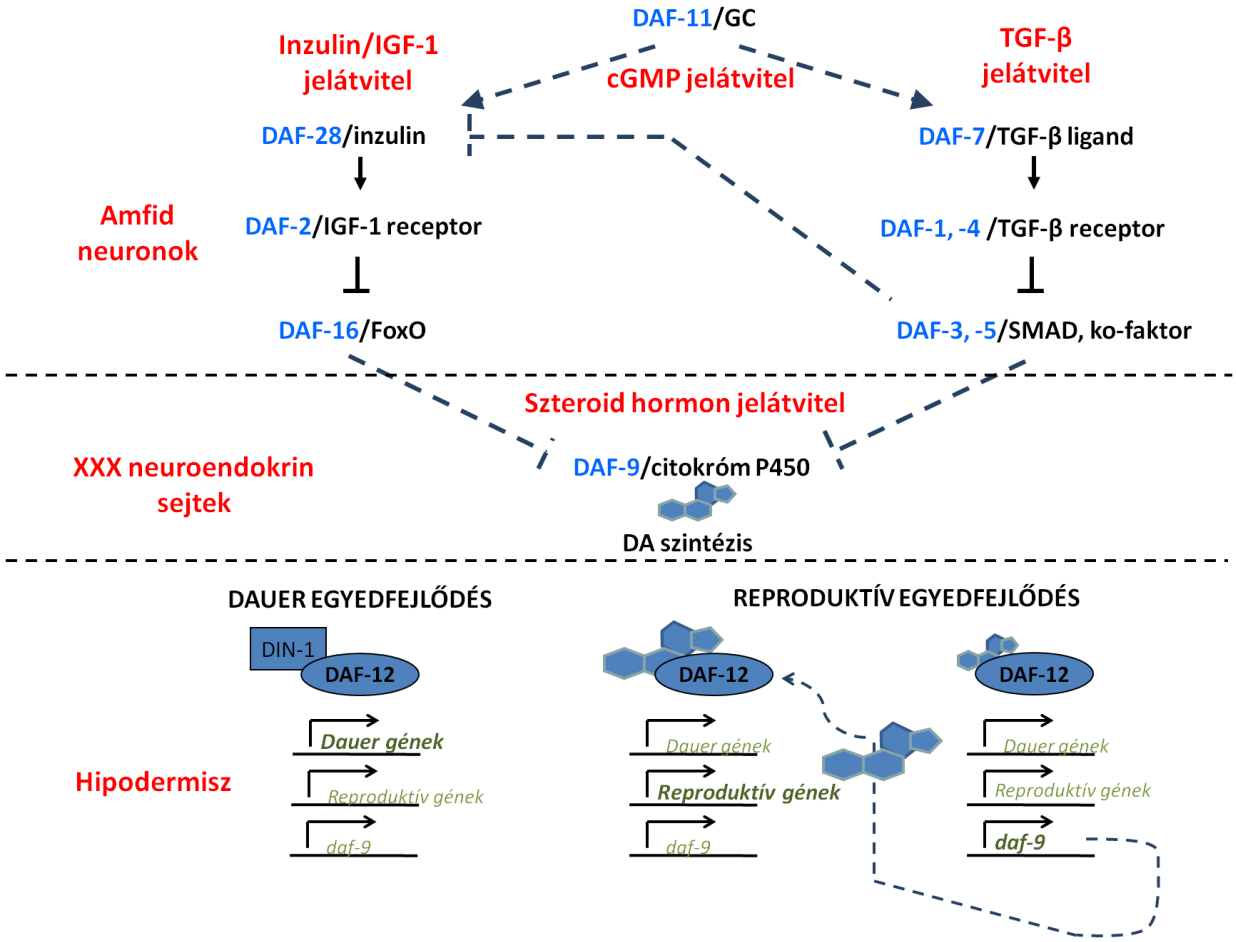
A reproduktív egyedfejlődéshez kedvező körülmények esetén, az XXX sejtekben elegendő dafakronikus sav termelődik. Így az összes célszövetben kialakul a hormon-kötött DAF-12 aktivátor komplex, ezért nincs szükség jelerősítésre a hipodermiszben. Ilyen körülmények között nem is figyelhető meg hipodermális *daf-9* expresszió növekedése [203, 204].

A pontos molekuláris mechanizmus, amely lehetővé teszi, hogy a dafakronikus sav alacsony, illetve magas szintje eltérő hatással legyen a *daf-9* kifejeződésére még nem ismert. Elképzelhető azonban, hogy a hormon mennyiségének függvényében a DAF-12 különböző korepresszorokkal vagy koaktivátorokkal képez komplexet, amelyek különböző módon befolyásolják a *daf-9* gén átírását. Ehhez hasonló mechanizmusokat már leírtak a magi hormon receptor jelátvitelben [205]. Az, hogy a DAF-12 a *daf-9* közvetlen transzkripcionális aktivátora, még nem ismert. Elképzelhető tehát, hogy más DAF-12 szabályozása alatt álló vagy akár attól független stressz-indukált transzkripciós faktorok is hatással vannak a *daf-9* átírására.

3.4.2.6. A dauer egyedfejlődést szabályozó genetikai útvonalak „kölcsönhatásai”

A dauer lárva 1975-ben történt leírása óta [139] a dauer egyedfejlődés kutatása a *C. elegans* genetika igen termékeny területévé vált. A dauer átmenetet szabályozó evolúciósan konzervált TGF-β és inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonalak számos elemét a *C. elegans* dauerképződés kutatása kapcsán fedezték fel.

A jelátviteli útvonalak az élő szervezetben sohasem izoláltan, egymástól függetlenül működnek. Közöttük alá-, fölé-, illetve mellérendelői viszonyok állhatnak fenn. A dauer egyedfejlődést szabályozó jelátviteli útvonalak tengelye már régóta ismert, a köztük lévő kapcsolatokat azonban csak az elmúlt évtized során kezdték feltérképezni. Ezekről a kapcsolatokról nyújt áttekintést a 22. ábra



22. ábra. A *C. elegans* dauer egyedfejlődés összetett szabályozása. A környezetből érkező jeleket (dauer feromont) G-fehérjével kapcsolt transzmembrán receptorok érzékelik az amfid neuronokban. Dauer feromon hiányában a DAF-11 receptor guanilát-cikláz cGMP-t szintetizál. A cGMP jel az amfid szenzoros idegsejtekben kiváltja az inzulin-szerű és TGF-β ligandumok termelődését, amelyek aztán aktiválják az inzulin/IGF-1 és TGF-β útvonalakat. Az aktivált jelátviteli útvonalak megakadályozzák, hogy a DAF-16/FoxO és DAF-3/SMAD és DAF-5/Sno/Ski transzkripciós faktorok a sejtmagba jussanak, és ott gátolják a dafakronikus sav szintéziséhez szükséges enzimeket kódoló gének kifejeződést. Ennek eredményeképpen a neuroendokrin XXX sejtekben hormon szintetizálódik, ami a megfelelő szövetekben DAF-12 szteroid hormon receptorhoz kapcsolódva a reproduktív fejlődéshez szükséges géneket kapcsolja be, a dauer program működését pedig gátolja. Kedvezőtlen környezeti feltételek esetén az amfid neuronokban nem képződik cGMP, ezért nem expresszálódnak inzulin/IGF-1 és TGF-β ligandumok. Ennek következménye, hogy a DAF-16 és DAF-3/DAF-5 transzkripciós faktorok felszabadulnak a gátlás alól, és kikapcsolják a hormonszintézist. Ebben az esetben a dauer fejlődéshez szükséges gének aktiválódnak. A kékkel jelölt szaggatott vonalak a jelátviteli útvonalak közti kapcsolatot jelölik.

3.4.3. Magas hőmérséklet indukált dauer fejlődés

Egy véletlen esemény vezetett annak felismeréséhez, hogy 25°C felett a *C. elegans* képes dauer lárvaként fejlődni. Thomas laboratóriumában egy hibás inkubátorban a hőmérséklet 27°C-ra emelkedett. Meglepődve tapasztalták, hogy ezen a hőmérsékleten számos olyan mutáns törzs mutat Daf-c fenotípust, amely alacsonyabb hőmérsékleten reproduktív

egyedfejlődési utat követ. A további vizsgálatok kiderítették, hogy ezen a hőmérsékleten a vad típusú állatok néhány százaléka szintén dauer lárvát képez. Ezen új Hid fenotípus (*High temperature induction of dauer* = magas hőmérséklet indukált dauer) felfedezése lehetővé tette, hogy számos új, a dauer egyedfejlődésben szerepet játszó gént azonosítsanak [142, 206].

A Hid mutánsok többsége idegrendszeri defektusokat mutat [142, 207]. Nem meglepő tehát, hogy a magas hőmérséklet dauer egyedfejlődést indukáló hatásában az amfid érző neuronok játszanak szerepet. Ha lézersugár segítségével elpusztítják az ASI és ADF kemoszenzoros neuronokat, akkor 20°C-on az állatok közel 100%-a dauer lárvává fejlődik [151]. 27°C-on ezzel szemben csupán az ASI idegsejtek elpusztítása elegendő ahhoz, hogy az állatok túlnyomó többsége dauer lárvát képezzen [142]. Magas hőmérsékleten tehát az ADF neuron dauer lárva képzést gátló hatása nem érvényesül, vagy ezen a hőmérsékleten más neuronok dauer fejlődést indukáló hatása erősebb. Az ASI idegsejtekben kifejeződő DAF-7/TGF-β és DAF-28/inzulin ligandumok a dauer egyedfejlődést gátolják. Schackwitz és munkatársai megfigyelték, hogy a DAF-7 expressziója a hőmérséklet emelésével csökken [142, 152], míg a DAF-28/inzulin expressziója a hőmérséklettől független [154]. Elképzelhető tehát, hogy magas hőmérsékleten a DAF-7 expressziójának csökkenése révén válnak érzékenyebbé a vad típusú és a mutáns állatok a dauer képződést indukáló jelekre.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A stressz fehérjekárosító hatására a sejtekben különböző védelmi mechanizmusok indukálódnak (stressz-válasz). Ilyenek a sejtes komponensek lebontását végző autofágia, valamint a hősokk-válasz, amelynek során a HSF1 (*heat shock transcription factor*) *chaperone* gének kifejeződésének aktiválásán keresztül lehetővé teszi a károsodott fehérjék térszerkezetének helyreállítását vagy lebontását. Doktori munkám célja a *C. elegans* stressz-válaszát szabályozó konzervált jelátviteli tengelyek közötti új kapcsolatok feltárása volt.

HSF-1 célgének azonosítása és a szabályozási kapcsolat jellemzése

Az eddig azonosított HSF1 célgének többsége klasszikus hősokk fehérjét kódol, azonban az utóbbi évek kutatásai nyomán kiderült, hogy a HSF1 a molekuláris *chaperone*-ok mellett, az egyedfejlődésben és sejtdifferenciációban szerepet játszó gének kifejeződését is szabályozhatja. A HSF-1 hősokk transzkripciós faktor jól definiált, konzervált kötőhellyel rendelkezik (TTCNNGAANNTTC). Ezért célunk a HSF-1 által közvetlenül szabályozott gének meghatározása volt.

Egy DNS szekvencia evolúciós konzerváltsága funkcióra utal. Ezért a potenciális célgének halmazából a *Caenorhabditis* fajok ortológ génjeinek szabályozó régiójának szekvencia analízisével kívántuk kiválasztani azokat a géneket, amelyekben a HSF-1 kötőhely konzervált, vagyis nagy valószínűséggel a HSF-1 közvetlen szabályozása alatt állnak.

Az így megszűrt találatok közül elsősorban azokra a nem klasszikus hősokk fehérjét kódoló potenciális HSF-1 célgénekre kívántunk koncentrálni, amelyek a stressz-választ szabályozó genetikai útvonalak elemeit kódolják, vagy az egyedfejlődés szabályozásában betöltött szerepük ismert.

A HSF-1 hősokk faktor a hőmérséklet hatására aktiválódik, ezért a potenciális célgének hőmérséklet és HSF-1 függő expressziójának vátozását kvantitatív RT-PCR felhasználásával kívántuk megvizsgálni.

Az *in silico* azonosított potenciális célgének és a HSF-1 közti szabályozási kapcsolatot a megfelelő riporterek *in vivo* expressziós analízisével terveztük megerősíteni. A HSF-1 és a potenciális célgénjei közti közvetlen transzkripcionális szabályozást olyan riporter konstrukciók előállításával terveztük alátámasztani, amelyek a konszenzus kötőhely vad típusú illetve mutáns verzióját tartalmazzák.

A HSF-1 és potenciális célgénjei közötti szabályozási viszonyokat, valamint a szabályozási kapcsolat biológiai jelentőségét kettős mutáns (episztázis) elemzésékkel terveztük elvégezni.

HSF-1 paralógok azonosítása

Gerincesekben a hősokk válaszban kulcsszerepet játszó hősokk transzkripciós faktorok több fehérjéből álló családot alkotnak. Gerinctelenekben ugyanakkor eddig csak egyetlen hősokk transzkripciós faktort azonosítottak. Célom volt, hogy a *C. elegans* genomban bioinformatikai módszerekkel hősokk transzkripciós faktor-szerű fehérjéket kódoló géneket azonosítsak, és megkezdjem genetikai elemzésüket.

Az autofágia és a TGF-β jelátvitel kapcsolata

A stressz-válaszban szerepet játszó autofágia szabályozását laboratóriumunkban intenzíven vizsgáltuk. Előzetes eredményeink alapján feltételeztük, hogy a TGF-β jelátvitel az autofágia szabályozásán keresztül befolyásolja a sejtnövekedést. E hipotézis alátámasztásának érdekében az autofagoszómákhoz kötődő, azokat kijelölő *gfp::lgg-1* riporter segítségével kívántam megvizsgálni az autofág aktivitást a hipodermális *seam* sejtekben különböző TGF-β útvonal defektív mutánsok *in vivo* expressziós analízisével.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Törzsek fenntartása

Laboratóriumi körülmények között a *C. elegans*t Petri csészékben, agar tartalmú NGM (*Nematoda Growth Medium*) táptalajon (a továbbiakban NGM lemez) tartjuk fenn. Az állatok táplálékául a lemezre cseppentett korlátolt növekedésű OP50 *Escherichia coli* baktérium törzs szolgál. Az állatokat egyedileg platina tű segítségével helyezzük át egyik NGM lemezről a másikra. Nagyobb mennyiségű állat mozgatását kisméretű spatula segítségével végezhetjük el az agar darab kivágásával és áthelyezésével. A *C. elegans* törzsek fenntartása viszonylag egyszerű. Stabil törzsek esetében elég a törzseket 1-2 havonta frissíteni. Folyékony N_2-ben, illetve -80°C-on a törzseket akár évekig is tárolhatjuk. Laboratóriumban a törzseket általában 15-25°C között tartjuk fenn. Mivel a *C. elegans* egyedfejlődése hőmérsékletfüggő, valamint termoszenzitív mutánsokkal is dolgoztunk, a kísérleteknél minden esetben feltüntettük, hogy a vizsgálatot milyen hőmérsékleten végeztük el.

Az NGM Agar lemez összetétele (1l)

NaCl		3 g
agar		17 g
pepton		2,5 g
koleszterol (5mg/ml etanolban)		1 ml
H_2O		975 ml

Autoklávozás, majd a 60°C-ra hűlt médiumhoz a következő komponenseket kell hozzáadni:

$CaCl_2$	1M	1 ml
$MgSO_4$	1M	1 ml
KH_2PO_3	1M (pH=6,0)	25 ml

Speciális NGM lemez élethossz mérésekhez (FUdR-os lemez):

Az NGM táptalajhoz FUdR-t (5-fluoro-2'-deoxyuridine) adunk 300 µg/ml végkoncentrációban. A FUdR gátolja a DNS szintézist, ebből következően a sejtosztódást, így az állatok nem képeznek embriókat.

Speciális NGM lemez RNS interferenciához (RNSi lemez):

Standard NGM oldathoz ampicillin (50 µg/ml) és tetraciklin (15µg/ml) antibiotikumokat, ill. az indukcióhoz szükséges 0,4 mM végkoncentrációban IPTG-t (isopropyl-β-D-thio-galaktozid) adunk. E lemezeken speciális tetraciklin rezisztens HT115 *E. coli* törzseket használunk tápforrásként.

5.2. Felhasznált törzsek

5.2.1 Felhasznált *E. coli* törzsek

OP50: Uracil auxotróf *E. coli* törzs. A laboratóriumi *C. elegans* vonalak táplálékául szolgáló törzs.

HT115(DE3): Az „etetéses" RNS interferenciához használt *E. coli* törzs.

F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD- rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lizogén: lacUV5 promóter -T7 polimeráz) (IPTG-indukálható T7 polimeráz) (RNase III)

5.2.2. Felhasznált *C. elegans* törzsek (fenotípus)

N2 Bristol-féle vad típus

AA205 *lin-15(n765)X dhEx67*[pdaf-9::DAF-9::GFP + lin-15(+)]

CB1370 *daf-2(e1370)III* (abnormal DAuer Formation)

CB1372 *daf-7(e1372)III* (abnormal DAuer Formation)

RB2302 *daf-7(ok3125)III* (abnormal DAuer Formation)

DR62 *daf-7(m62)III* (abnormal DAuer Formation)

DR47 *daf-11(m47)V* (abnormal DAuer Formation)

PR673 *daf-21(p673gf)V* (abnormal DAuer Formation)

PS3551 *hsf-1(sy441)I* (Heat Shock Factor)

VC3071 *hsf-1(ok600)/hIn1[unc-101(sy241)]I* (Heat Shock Factor)

CF1824 *muEx265[HSF-1p::HSF-1 cDNA + myo-3::GFP]:* HSF-1 túltermelő törzs (*hsf-1 O/E)* A törzs a *hsf-1* gént több kópiában tartalmazza.

FX04607 *hsf-2(tm4607)I* (Heat Shock Factor)

CB151 *unc-3(e151)X* (UNCoordinated)

CB169 *unc-31(e169)IV* (UNCoordinated)

DP38 *unc-119(ed3)III* (UNCoordinated)

FK181 *ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

CB1482 *sma-6 (e1482)II*

CB185 *lon-1(e185)III*

BU071 *buIs1[GFP::plgg-1::LGG-1]*

5.2.3. Az általam létrehozott *C. elegans* törzsek

TTV100 *daf-2(e1370)III; ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

TTV101 *hsf-1(sy441)I; daf-7(e1372)III*

TTV116 *bjEx1*[p*daf-7::daf-7::gfp + unc-119(+)*]

TTV117 *bjEx9*[pmut*daf-7::daf-7::gfp +unc-119(+)*]

TTV102 *daf-7(e1372)III; muIs265[hsf-1p::hsf-1cDNA + myo-3::GFP]*

TTV103 *daf-7(ok3125)III; muIs265[hsf-1p::hsf-1cDNA + myo-3::GFP]*

TTV104 *hsf-1(sy441)I; daf-11(m47)V*

TTV105 *daf-7(m62)III; muIs265[hsf-1p::hsf-1cDNA + myo-3::GFP]*

TTV106 *hsf-1(sy441)I; daf-21(p673)V*

TTV108 *daf-11(m47)V; ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

TTV109 *hsf-1(sy441)I; ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

TTV112 *hsf-2(tm4607)I; unc-3(e151)X*

TTV113 *hsf-2(tm4607)I; unc-31(e169)IV*

TTV114 *hsf-1(sy441)I; daf-2(e1370)III; ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

TTV115 *hsf-1(sy441)I; daf-11(m47)V; ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

TTV110 *hsf-1(sy441)I; daf-21(p673)V; ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

TTV117 *hsf-1(sy441)I; daf-2(e1370)III*

TTV118 *daf-2(e1370)III; muIs265[hsf-1p::hsf-1cDNA + myo-3::GFP]*

TTV119 *daf-11(m47)V; lin-15(n765)X dhEx67[pdaf-9::DAF-9::GFP + lin-15(+)]*

TTV120 *hsf-1(sy441)I; daf-11(m47)V; lin-15(n765)X dhEx67[pdaf-9::DAF-9::GFP + lin-15(+)]*

TTV121 *hsf-1(ok600) ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I/+; daf-11(m47)V*

TTV200 *muIs265[hsf-1p::hsf-1cDNA + myo-3::GFP]* HSF-1 túltermelő törzs (*hsf-1 O/E)* A törzs a *hsf-1* gént több kópiában tartalmazza. 4x visszakeresztezve

TTV201 *hsf-2(tm4607)I* 4x visszakeresztezve

TTV122: *lon-1(e185)III; buIs1[GFP::plgg-1::LGG-1]*

TTV123: *sma-6 (e1482)II; buIs1[GFP::plgg-1::LGG-1]*

TTV124 *daf-21(p673)V; hsf-1(sy441)I*

TTV125 *daf-21(p673)V; ksIs2[pdaf-7::gfp + rol-6(su1006)]I*

5.3. Dauer arány meghatározása

A dauerek százalékos arányának megállapításához a felnőtt állatokat 4-6 órán keresztül hagytuk petézni NGM lemezen. Az így szinkronizált utódokat tartalmazó lemezeket a vizsgálati hőmérsékleten (20°C, 23°C, 26,5°C) növesztettük. Amikor a reproduktívan fejlődő állatok elérték az L4 lárva/fiatal felnőtt kort (72, 60 illetve 44 óra múlva), meghatároztuk a lemezen található dauer lárvák százalékos arányát. A dauerek átlagos százalékos arányát törzsenként legalább három lemezen kapott eredmény alapján határoztuk meg. Az adatok grafikonos ábrázolásánál a dauerek átlagos százalékos arányát és a hozzá tartozó standard hibát tüntettük fel. Az adatok szignifikancia tesztjét *Student t* teszt segítségével hajtottuk végre. A szignifikancia szintet a következőképpen jelöltük: * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$.

5.4. Élethossz mérések

A fonálférgek élethosszát 25°C-on határoztuk meg. A törzseket „petéztetéssel" szinkronizáltuk (20-30 felnőtt állatot hagytunk 4-6 órát petézni egy NGM lemezen). Az utódokat 20°C-on 72 órán át növesztettük, majd az L4/fiatal felnőtt állatokat FUdR (5-fluoro-2-deoxyuridine) tartalmú (300 μg/ml) lemezekre helyeztük át, és a lemezeket 25°C-ra téve kezdtük meg az élethossz mérést. A FUdR gátolja a DNS szintézist, ebből következően a sejtosztódást, így az állatok nem képeznek embriókat, ill. az esetlegesen már lerakott embriók nem fejlődnek tovább. Az elpusztult állatokat naponta megszámoltuk és eltávolítottuk. Azokat az állatokat tekintettük halottnak, amelyek platinatűvel történő finom érintés után sem mozdultak meg, és garatjuk pumpáló mozgása is megállt. A mérést addig végeztük, míg nem maradt élő állat a lemezen. A befertőződött lemezeket kizártuk a mérésből, mert a különböző fertőzések jelentősen befolyásolhatják az élethosszt. A Kaplan-Meyer túlélési görbéket és az átlagos felnőtt élethosszt az SPSS statisztikai programmal készítettük el. Az adatok grafikonos ábrázolásánál a túlélési görbéket, illetve az átlagos élethosszt és a hozzá tartozó standard hibát tüntettük fel. Az adatok szignifikancia tesztjét Mantel-Cox teszt segítségével hajtottuk végre. A szignifikancia szintet a következőképpen jeleztük: * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$.

5.5. RNS interferencia (RNSi)

Az RNSi a gén inaktiválás egyik módszere. Lényege, hogy egy kettősszálú (ds) RNS molekula specifikusan gátolja egy endogén génről átíródott mRNS működését. A kísérletek

során az ún. etetéses RNSi módszert alkalmaztuk, kihasználva a *C. elegans* speciális tulajdonságait. A *C. elegans* beléből ugyanis felszívódik a dsRNS, ha olyan baktériummal táplálkozik, amely termeli az adott dsRNS-t, majd az állat egész szervezetében szétterjed a dsRNS és minden sejtjében (szisztematikusan) „csendesíti" az adott gént.

Az etetéses RNSi során az állatokat az L4440 *(„feeding"*) vektorral transzformált *E. coli* HT115 törzsével etetjük. A HT115 baktérium törzs nem rendelkezik az RNáz III enzimmel, ezért nem képes lebontani a dsRNS-eket. A HTT115 genomja ezenkívül egy *lac* operátor/promóter által szabályozott T7 RNS polimeráz gént is tartalmaz. Ez lehetővé teszi, hogy a kettős szálú RNS-ek termelését IPTG (*izopropil-β-D-tiogalaktozid*) segítségével indukáljuk. A T7 RNS polimeráz ugyanis az L4440 vektorban található T7 promóterhez képes kötni, és ezáltal RNS-t szintetizálni. A T7 promóter szintén *lac* operátor által szabályozott. A T7 promóter a *„feeding"* vektorban kétszer található meg a klónozó hely két oldalán ellentétes orientációban. Így a T7 promóterek közé klónozott cDNS-ről 2 db egymással komplementer RNS szál keletkezik az átírás során, amelyek kétszálú dsRNS-t képeznek.

5.6. Molekuláris biológiai módszerek

5.6.1. Kompetens sejt készítése

Az *E. coli* DH5α és HT115 sejteket a *Z competent kit* segítségével tettük kompetenssé a gyártó utasításai szerint (Zymogen) (http://www.zymoresearch.com/ zrc/pdf/T3001i.pdf).

5.6.2. *E. coli* transzformálás

A megfelelő kompetens sejtet jégen hagytuk kiolvadni. A kiolvadt sejthez a transzformálni kívánt plazmidból 2-5 µl-t adtunk. Ezután 30 percig jégen tartottuk, majd 37°C-on 1,5 percig hősokkoltuk a sejteket. Ezt követően 500 µl LB táptalajban 30-60 percig 37°C-on rázatva növesztettük a baktériumokat. Végül az előmelegített szelekciós lemezre szélesztettük a baktériumkultúrát és 37°C-on egész éjszakán át növesztettük.

5.6.3. Plazmid DNS izolálása *E. coli* baktériumból

A felszaporított plazmid izolálását a baktériumsejtekből a *Promega miniprep kit* segítségével végeztük el, a cég által ajánlott leírás szerint (http://www.promega.com/protcards/ 9fb016/fb016.pdf).

5.6.4. Genomi DNS izolálás *C. elegans*ból

Protokoll:

- minimum 20 db tiszta, sok állatot tartalmazó kis NGM lemezt kétszeresen desztillált vízzel, vagy M9 pufferrel (3 g/l KH_2PO_4, 6 g/l Na_2HPO_4, 5 g/l NaCl, 1 mM $MgSO_4$ pH = 7) lemosunk egy falcon csőbe
- centrifugálás 1 percig (maximum 1000 g)
- a felülúszót eltávolítjuk, az állatokat 2 új eppendorf csőbe pipettázzuk
- hozzáadunk 500 µl Worm Lysis Buffert-t (20 mM Tris pH 7.5; 50 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0.5% SDS) és 2-5 µl proteináz K-t (20mg/ml)
- inkubáljuk 2-5 óráig 65°C-on, miközben 20 percenként összekeverjük
- hozzáadunk 500 µl fenolt, és óvatosan összekeverjük
- 10 percig 12000 rpm-el centrifugáljuk (laboratóriumi asztali mikrocentrifuga)
- a felső fázist átpipettázzuk egy új eppendorf csőbe
- hozzáadunk 500 µl kloroformot, és 10 percig 12000 rpm-el centrifugáljuk
- a felső fázist átpipettázzuk egy új eppendorf csőbe
- hozzáadunk 500 µl kloroformot, és 10 percig 12000 rpm-el centrifugáljuk
- a felső fázist átpipettázzuk egy új eppendorf csőbe
- hozzáadunk 500 µl izopropanolt, óvatosan összekeverjük és hagyjuk állni szobahőmérsékleten, vagy 4°C-on egész éjszakán át (ebben a lépésben csapódik ki a DNS az izopropanol hatására)
- centrifugálás nélkül eltávolítjuk a vizes fázist a csapadékról
- 500 µl abszolút etanollal mossuk a csapadékot
- centrifugálás nélkül eltávolítjuk az alkoholt
- 500 µl 70%-os alkohollal mossuk a csapadékot kétszer, centrifugálás nélkül
- kiszárítjuk a mintát (akkor jó, ha a kezdeti átlátszóság helyett fehér színű a csapadék)
- 30-100 µl DNáz mentes vízben (pl. MQ) feloldjuk a mintát, és 4°C-on tároljuk hosszútávon

5.6.5. RNS izolálás *C. elegans*ból

Protokoll:

- minimum 20 db állatot belerakunk 20 µl M9 pufferbe (3 g/l KH_2PO_4, 6 g/l Na_2HPO_4, 5 g/l NaCl, 1 mM $MgSO_4$ pH = 7) egy eppendorf csőbe
- 14000 rpm-el lecentrifugáljuk az állatokat a cső aljára 30 másodpercig

- hozzáadunk 250 µl TRIzol® reagenst (*Invitrogene*)
- vortexeljük 30 másodpercig, majd berakjuk az eppendorf csövet -70°C-ra 20 percig, vagy egész éjszakára
- miután kiolvadt a minta, hozzáadunk 50 µl kloroformot
- rázatás 30 másodpercig
- max. 3 percig hagyjuk állni, majd 4°C-on, 15 percig 12000 rpm-el centrifugáljuk
- a tiszta, legfelső réteget átpipettázzuk egy új eppendorf csőbe
- ehhez mégegyszer hozzáadunk 50 µl kloroformot
- óvatos keverés
- max. 3 percig hagyjuk állni, majd 4°C-on, 15 percig 12000 rpm-el centrifugáljuk
- a tiszta, legfelső réteget átpipettázzuk egy új eppendorf csőbe
- hozzáadunk 125 µl izopropanolt és le-fel fordítva a csövet összekeverjük
- pár percig hagyjuk szobahőmérsékleten állni
- 4°C-on, 10 percig 12000 rpm-el centrifugáljuk
- óvatosan leszívjuk a felülúszót
- a csapadékot 500 µl 70%-os alkohollal mossuk
- 4°C-on, 5 percig 14000 rpm-el centrifugáljuk
- felülúszó eltávolítása, majd a csapadék kiszárítása
- 10 µl RNáz-mentes vízben feloldjuk a csapadékot (a feloldás segítése érdekében felmelegítjük a mintát 60°C-ra 10 percig)
- a mintát -70°C-on tároljuk, hogy megelőzzük az RNS lebomlását

5.6.6. PCR termék izolálása agaróz gélből

A PCR reakció termékét gélből izoláljuk. Az izolálás a gyártó által megadott protokoll szerint történt a *QIAquick Gel Extraction Kit*-tel. *(http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/ qiaquickgelextractionkit.aspx#Tabs=t2)*

5.7. Riporter konstrukciók

5.7.1. A *pdaf-7::gfp* konstrukció

Polimeráz láncreakcióval felszaporítottuk a *daf-7* gén 5' genomi szekvenciáját és első exonjának egy részét. A használt primerek szekvenciája: Fw: 5'-aaatccgagtccgtgaaatg-3' és Rv: 5'-aaacaccgggagtgaagatg-3'. A gélből izolált 3810 bp hosszúságú PCR terméket pGEM®-T Easy (Promega) vektorba ligáltuk. Ezután DH5α kompetens sejtbe transzformáltuk a vektort. Miniprep készítése után restrikciós endonukleázos emésztéssel meghatároztuk a fragment orientációját. A megfelelő orientációban tartalmazó klónból a PCR terméket (*pdaf-7*ori1T) SphI-SalI, illetve SalI enzimek segítségével két lépésben klónoztuk be a pPD95.75 expressziós vektroba (A. Fire-től származik). Ez a vektor tartalmazza a GFP-t kódoló ORF-et. Első lépésben a *pdaf-7*ori1T vektort SphI/SalI enzimekkel emésztettük, majd a kapott 2491 bp hosszú fragmentet ligáltuk a szintén SphI és SalI enzimekkel hasított pPD95.75 vektorba. Az így létrehozott *pdaf-7a::gfp* vektort SalI enzimmel hasítottuk és ligáltuk a *pdaf-7*ori1T vektor 1383 bp hosszúságú SalI fragmentjével. Az így kapott konstrukcióval DH5α kompetens sejteket transzformáltunk. Több telepet kiválasztva és miniprepet készítve belőlük restrikciós emésztéssel azonosítottuk azt a klónt, amelybe a SalI fragment helyes orientációban épült be. Az így létrehozott *pdaf-7::gfp* vektorban szekvenálással ellenőriztük, hogy egyazon leolvasási keretben van-e a *daf-7* első exonja és a GFP-t kódoló DNS szakasz. Szintén szekvenálással bizonyosodtunk meg arról, hogy a feltételezett HSF-1 kötőhely szekvenciája nem szenvedett mutációt a klónozási lépések során.

5.7.2. A p_{mut}*daf-7::gfp* konstrukció

A p_{mut}*daf-7::gfp* konstrukciót a *QuikChange* helyspecifikus mutagenezis kit segítségével állítottuk elő (Stratagene, catalog #200521), a del3556-3561Fw (5'-caattccgcaaaattttctggcttttctctacggtatagatg-3') és a del3556-3561Rv (5'-catctataccgtagagaaaagccagaaaattttgcggaattg-3) primereket felhasználva. Templátként az előzőleg elkészített *pdaf-7::gfp* konstrukció szolgált. A mutagenezis sikerességéről szekvenálással győződtünk meg.

5.7.3. A *phsf-2::hsf-2::gfp* konstrukció

PCR segítségével felszaporítottuk a *hsf-2* gén mintegy 5,6 kb hosszú 5' szabályozó szakaszát és a teljes kódoló régiót. Ehhez a következő primereket használtuk fel: Fw: 5'-

tttggcgcgccgcgtcagagtgtcctatttcg-3’ és Rv: 5’-ataagaatgcggccgcatggagttagtatgatatgatttgtctgagg-3’. A kapott 6,5 kb hosszú DNS fragmentumot AscI és NotI enzimek segítségével klónoztuk a pRH21 (gfp) expressziós vektorba.

5.7.4. A *hsf-1* RNSi konstrukció

A konstrukció elkészítéséhez a *hsf-1* cDNS-ét használtuk fel (yk1245f10, Y. Kohara ajándéka). A cDNS-t pME18S-FL3 vektorban kaptuk meg. A mintegy 2,4 kb hosszúságú cDNS 1333 bp-nyi részét HindIII és KpnI enzimekkel vágtuk ki a vektorból, majd a fragmentet az L4440 „*feeding*” vektor HindIII és KpnI helyére klónoztuk. Az így kapott *hsf-1* RNSi konstrukcióval *E. coli* HT115 baktérium törzset transzformáltuk.

5.8. Transzgenikus állatok előállítása

Transzgenikus állatokat biolisztikus transzformációval állítottuk elő. 50µl 60 mg/ml koncentrációjú aranyszemcsére kötöttünk fel 25-25 µg linearizált *pdaf-7::gfp* vagy *pΔdaf-7::gfp* DNS-t, illetve a kotranszformációs markert (*unc-119(+)*) hordozó pRH21 plazmid DNS-t. A PDS-1000/He rendszer (BioRad) segítségével *unc-119(ed3*) mutáns állatokat transzformáltam. A transzgenikus állatok mozdulatlan, Unc fenotípusú háttéren könnyen azonosíthatóak, mivel az *unc-119* gén vad allélje menekíti a mutánsok Unc fenotípusát. Az így előállított törzseket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam. A zölden fluoreszkáló állatokat is tartalmazó törzseket így különítettem el a nem fluoreszkáló törzsektől, amelyek valószínűleg csak a pRH21 vektorra nézve voltak transzgénikusak. Egy törzsből egyesével kitett hermafroditák utódainak fenotípusos vizsgálatával megállapítottam, hogy az adott törzs extrakromoszómális *„array”* elemen vagy a genomba integrálódva hordozza a transzgént.

5.9. Fluoreszcens mikroszkópia

Az állatokat tárgylemezre cseppentett 5%-os agaróz felületre M9 fiziológiás pufferben (3 g/l KH_2PO_4, 6 g/l Na_2HPO_4, 5 g/l NaCl, 1 mM $MgSO_4$ pH = 7) vittük fel. A képeket Olympus-BX51 kutatómikroszkóppal készítettük el. A fluoreszcens képek esetében a mikroszkóp beállításai (expozíciós idő, az UV intenzitása) megegyeztek, így a képeken a GFP jel intenzitása összehasonlítható volt.

A GFP jel intenzitásának meghatározásához az *Image J* szoftvert használtuk fel. Az azonos expozíciós idővel készült képeken az adott sejteket vagy az egész állatot körülrajzoltuk, és megmértük a kijelölt terület átlagos jelintenzitását (*mean grey value*). A fluoreszcens

intenzitás értékeket végül úgy kaptuk meg, hogy a vizsgált terület jelintenzitásából kivontuk az azonos területű háttér jelintenzitását.

Az átlagos GFP intenzitást legalább három független kísérlet eredménye alapján határoztuk meg. Az adatok szignifikancia tesztjét *Student t* teszt segítségével hajtottuk végre. A szignifikancia szintet a következőképpen jeleztük: * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$.

A különböző mutáns törzsekben mért relatív GFP jel intenzitást úgy határoztuk meg, hogy az adott kísérletnél az adott törzsben mért átlagos GFP intenzitás vettük 100%-nak, és ehhez viszonyítottuk a többi törzsben mért átlagos GFP intenzitást. Az adatok grafikonos ábrázolásánál a relatív GFP jel intenzitást és a hozzá tartozó standard hibát tüntettük fel.

5.10. Kvantitatív RT-PCR

Kvantitatív RT-PCR analízishez az RNS-t 100-200 szinkronizált L1 lárvából izoláltuk a *PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogene)* kit segítségével. A genomi DNS szennyeződést Rnáz mentes Dnáz I (*Fermentas*) felhasználásával távolítottuk el. A tisztított RNS-ből 1-2 µl-t agaróz gélen megfuttattunk, hogy ellenőrizzük az RNS integritását. A DNS mentes RNS-t ezután random hexamerekkel a *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Fermentas*) alkalmazásával írtuk át cDNS-sé. A PCR reakciót 20 µl-es végtérfogatban végeztük el a *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)* kittel a gyártó protokollja szerint. Az amplifikációt *LightCycler® 2.0 (Roche)* készülékkel hajtottuk végre a következő reakció körülmények mellett:

RT-PCR Program:

1.: 95°C 5 perc
2.: 95°C 10 másodperc
3.: 60°C 5 másodperc } 45 ciklus
4.: 72°C 10 másodperc
5.: 95°C 1 másodperc
6.: 65°C 15 másodperc
7.: A hőmérsélet lassú emelése (0,1C/másodperc) 65°C-ról 95°C-ra } olvadáspont analízis
8.: 95°C 1 másodperc
9.: 4°C

A fluoreszcencia intenzitását minden ciklus végén 72°C-on méri a készülék. A PCR reakció után a készülékkel olvadáspont analízist is végrehajtattunk, így bizonyosodtunk meg

arról, hogy csak egy termék képződik a reakció során. A reakcióban felhasznált primerek szekvenciái a következőek voltak:

pmp-3: Fw primer: 5'- gttcccgtgttcatcactcat-3'
Rv primer: 5'- acaccgtcgagaagctgtaga-3'
daf-7: Fw primer: 5'- caacaatgtgataggcaacga-3'
Rv primer: 5'- aactacgcacgcacagacac-3'

Mérési eredményeink értékelésekor relatív génexpressziós értékeket a komparatív C_T módszerrel a $2^{-\Delta\Delta CT}$ képlet segítségével határoztuk meg [208]. Endogén referencia génként az állandó expressziós szintet mutató *pmp-3* gént használtuk [209].

A relatívgén expressziós különbségeket legalább három mérés alapján határoztuk meg. Az adatok szignifikancia tesztjét *Student t* tesztjének segítségével hajtottuk végre. A szignifikancia szintet a következőképpen jeleztük: * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$.

5.11. Bioinformatikai módszerek

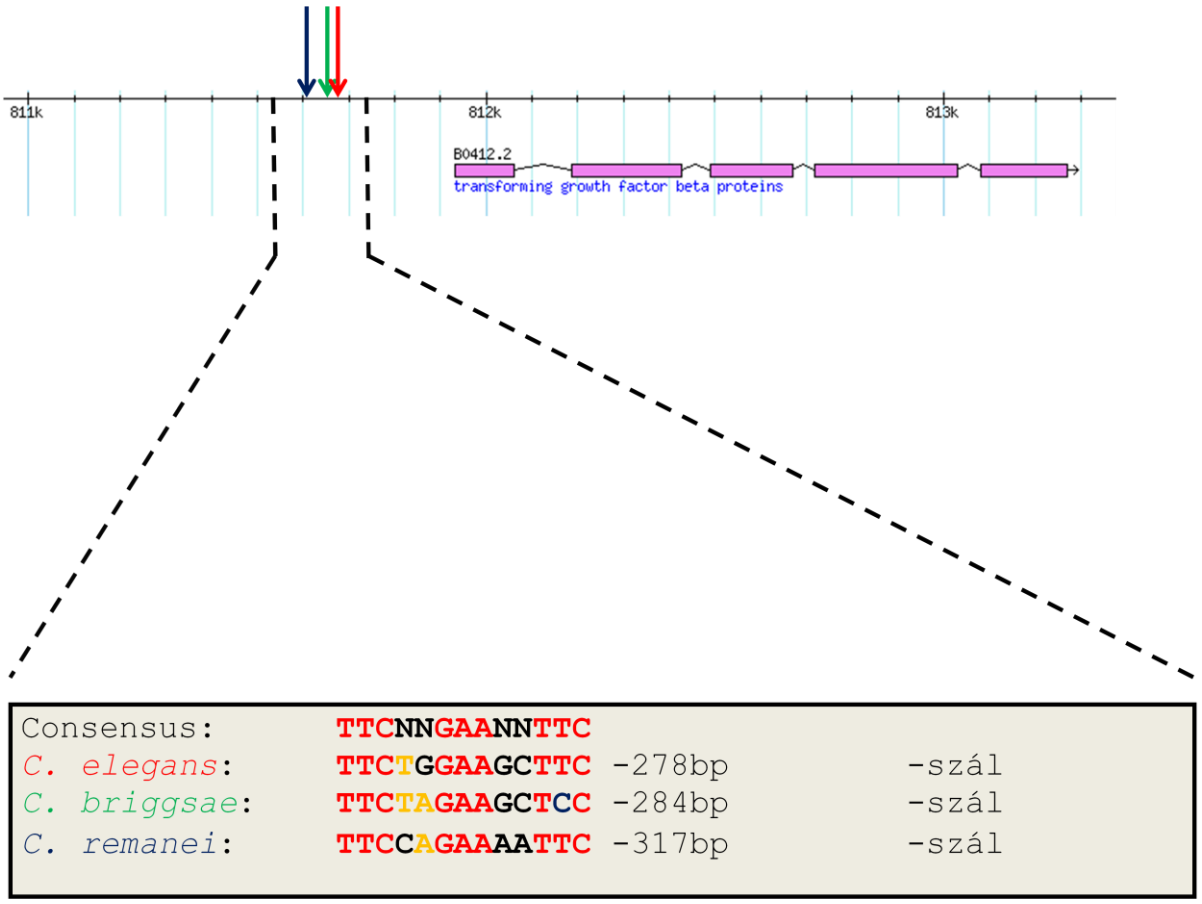
Az *in silico* promóter analízishez a TESS (http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess) és a Wormenhancer (*http://opengenomics.org/downloads.php*) és a cisRED (*http://www.cisred.org*) szoftvereket használtuk. A primereket a Primer3 (*http://frodo.wi.mit.edu/primer3*) program segítségével terveztük meg. A molekuláris biológiai munkákat a DNASTAR (*http://www.dnastar.com*) programcsomag segítette.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A HSF-1 transzkripciós faktor szabályozza a *daf-7* gén expresszióját

6.1.1. A *daf-7* 5' szabályozó régiójában konzervált HSF-1 kötőhely található

A *daf-7* expresszióját szabályozó transzkripciós faktorok azonosítása érdekében elvégeztük a *daf-7* gén szabályozó régiójának bioinformatikai analízisét. Az *in silico* vizsgálat egy konzervált HSF-1 hősokk transzkripciós faktor kötőhelyet azonosított a *C. elegans daf-7* és számos rokon *Caenorhabditis* faj ortológ gén szabályozó régiójában (23. ábra).

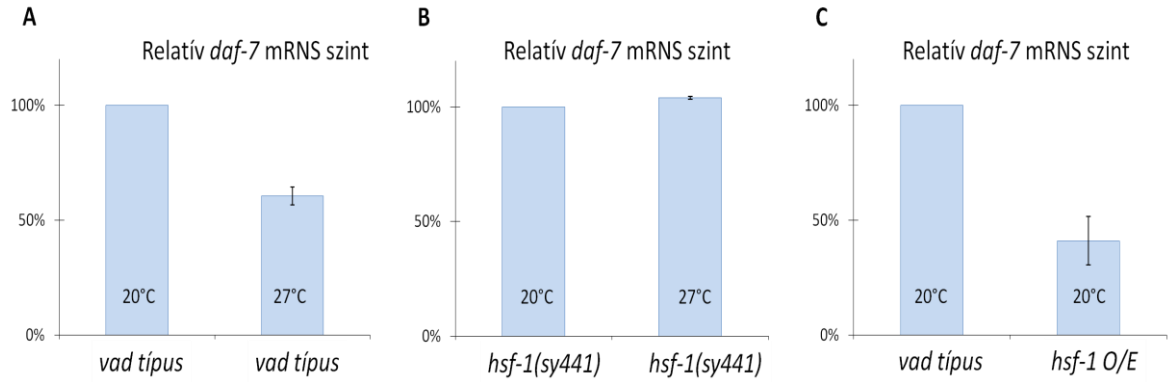


23. ábra: A *daf-7* gén szabályozó régiója egy konzervált HSF-1 kötőhelyet tartalmaz: Az ábra alsó részéről leolvasható, hogy a pirosan jelölt konzervált bázisok szinte minden vizsgált *Caenorhabditis* fajban megegyeznek, kivéve a *C. briggsae*-t, ahol az egyik konszenzus timin helyett egy citozin található. Az ábra felső részén látható a kötőhely elhelyezkedése a *daf-7* 5' szabályozó régiójában. A színes nyilak jelölik a megfelelő fajban található HSF-1 kötőhely helyzetét. A *C. elegans daf-7* gén szerkezetét lila bokszok (exoni szekvenciák) és azokat összekötő vonalak (introni szekvenciák) jelölik. A felső vonalon levő számok a relatív kromoszómális pozíciót jelölik kbp-ban megadva.

C. elegans esetében a kötőhely 278 bázispárral a *daf-7* gén kódoló régiója (az ATG transzlációs iniciációs starthelytől *upstream*) előtt helyezkedik el. Ez arra utal, hogy a HSF-1 potenciálisan képes lehet transzkripcionálisan szabályozni a *daf-7* expresszióját.

6.1.2. A HSF-1 gátolja a *daf-7* expresszióját

Kedvező környezeti körülmények esetén a DAF-7/TGF-β kizárólag két kemoszenzoros neuronban, az ASI idegsejtekben fejeződik ki, és sejt-nemautonóm módon segíti elő a reproduktív egyedfejlődést. Megfigyelték, hogy a *daf-7* expressziója a hőmérséklet emelésével csökken az ASI-kban [142, 152]. Ezért kvantitatív RT-PCR segítségével megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a *daf-7* mRNS mennyisége a hőmérséklet emelkedésével. Azt tapasztaltuk, hogy a *daf-7* mRNS szintje 27°C-on mintegy felére esik a 20°C-on mérthez képest (24 A. ábra). *hsf-1(sy441)* mutáns állatokban ezzel szemben a *daf-7* mRNS szintje nem változik magasabb hőmérsékleten (24 B. ábra). Megállapítottuk továbbá, hogy a *hsf-1* gént több kópiában hordozó törzs (*hsf-1 overexpressziós* transzgenikus törzs; TTV200 *bjIs10*[*hsf-1*p*::hsf-1cDNA* + *myo-3*::GFP], a továbbiakban *hsf-1* O/E) 20°C-on is csökken a *daf-7* mRNS mennyisége a vad típusú állatokban mérthez képest (24 C. ábra). Mindezek arra utalnak, hogy a *daf-7* expressziója HSF-1-függő módon szabályozott.



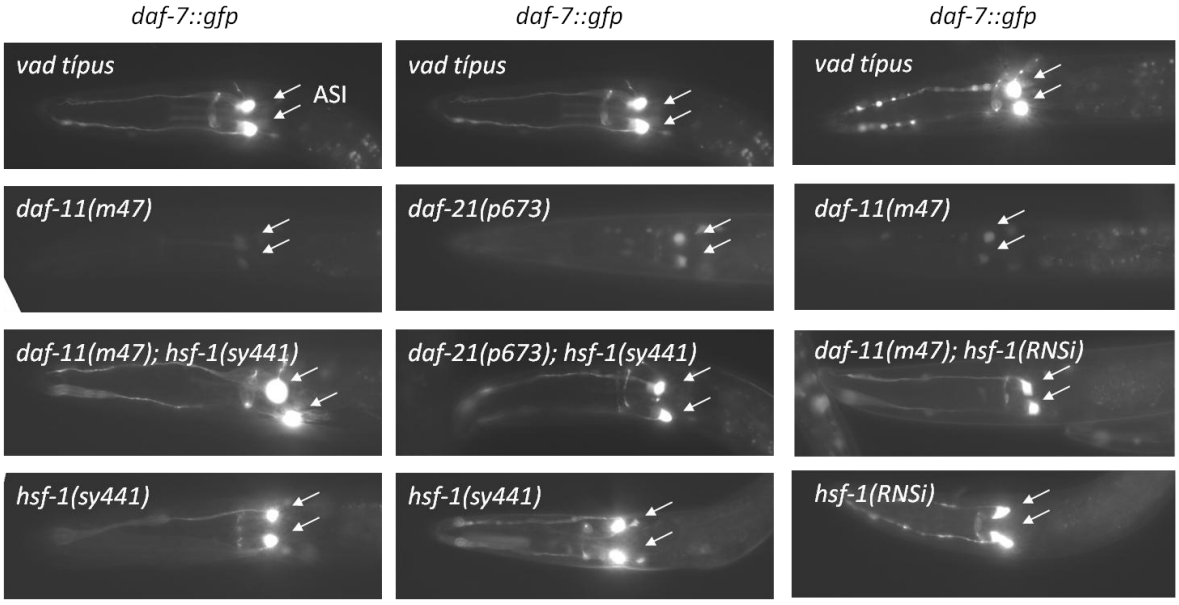
24. ábra: A *daf-7* mRNS szintje *hsf-1*-függő módon változik a hőmérséklet függvényében: A *daf-7* transzkripcionális aktivitása a hőmérséklettől és a HSF-1 aktivitásától függ. Kvantitatív RT-PCR analízis szerint a *daf-7* transzkripciós szintje 27°C-on csökken (A panel; $p<0.001$), és ez HSF-1 aktivitást igényel (B panel). A HSF-1 túltermelésének hatására a *daf-7* mRNS szintje 20°C-on is csökken (C panel; $p<0.001$). A *hsf-1 O/E* HSF-1-et túltermelő törzset jelöl. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik.

6.1.3. A HSF-1 aktivitását a DAF-11/GC és a DAF-21/HSP90 negatívan szabályozza

A *daf-7* expresszióját az ASI neuronokban a guanilát cikláz jelátviteli útvonal tartja fenn. A *daf-11* és *daf-21* gének a DAF-7/TGF-β és az inzulin/IGF-1 útvonaltól *upstream* található

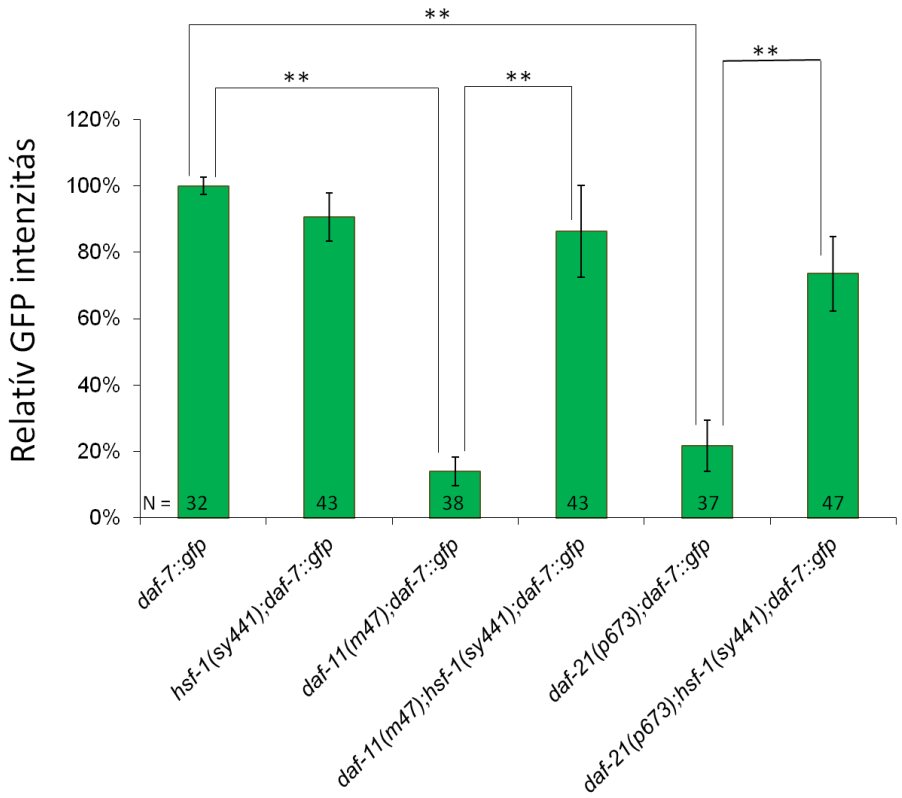
guanilát cikláz útvonal komponensei. A *daf-11* egy transzmembrán guanilát ciklázt, a *daf-21* a Hsp90 *C. elegans* ortológját kódolja. A *daf-11(-)* és *daf-21(p673)* mutáns állatokban a *daf-7/TGF-β* expressziója lecsökken, és az állatok dauer lárvaként fejlődnek [156]. A *p673* egy különleges, gyenge funkcióvesztéses allél. Dauer fenotípusa csak a homozigóta (*daf-21(p673)/daf-21(p673*) állatoknak van [162]. Megfigyelték, hogy ezen allélra homozigóta törzs minden vizsgált fenotípusa megegyezik a *daf-11(-)* fenotípusával, a kísérletek során éppen ezért ezt a törzset úgy kezeltük, mint egy *daf-11(-)* mutációt hordozó törzset (a *daf-11* és *daf-21* tehát azonos episztatikus pozíciót foglalnak el a GC jelátviteli útvonalban).

Mivel a *daf-7* expresszióját a hőmérséklet mellet a DAF-11/GC jelátvitel is befolyásolja, elképzelhető, hogy a GC jelátvitel a HSF-1-en keresztül hat a *daf-7* gén kifejeződésére. Ezért egy integrált *daf-7::gfp* riportert (*ksIs2*) felhasználva elkészítettük a *daf-11(m47); daf-7::gfp*, *hsf-1(sy441); daf-7::gfp* és *daf-11(m47); hsf-1(sy441); daf-7::gfp,* valamint *daf-21(p673gf); daf-7::gfp* és *daf-21(p673gf); hsf-1(sy441); daf-7::gfp* genotípusú törzseket és fluoreszcens mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk bennük a *daf-7::gfp* expresszióját. Eredményeinket a 25. ábra foglalja össze.



25. ábra: A DAF-11 és a DAF-21 a *daf-7* expressziót HSF-1-függő módon aktiválja: A *daf-7* a két ASI neuronban expresszálódik vad típusú L1 lárvákban (fehér nyilak). A *daf-11(m47)* és *daf-21(p673)* mutáns háttéren az expresszió intenzitása jelentősen csökken. A *hsf-1(sy441)* mutáció azonban szuppresszálja a *daf-11(m47)* és *daf-21(p673)* mutációknak a *daf-7* expresszióra kifejtett gátló hatását; ezekben az állatokban a *daf-7* a vad típusban megfigyelhető (erős) szinteken expresszálódik. A *hsf-1(sy441)* mutációnak önmagában nincsen hatása a *daf-7* expresszióra. A *daf-11(m47)* mutáció *daf-7* expresszióra kifejtett represszáló hatását a *hsf-1* RNSi is szuppresszálja. A felvételek azonos expozíciós idővel készültek.

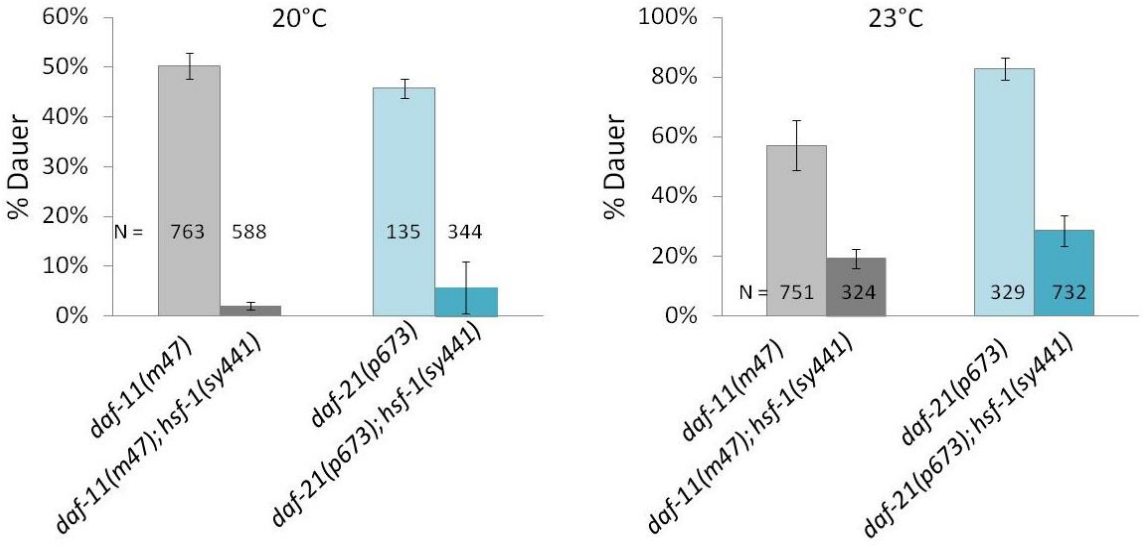
A 25. ábrán látható, hogy a *daf-7* expressziója az ASI neuronokban *daf-11(m47)* és *daf-21(p673)* háttérben jelentősen lecsökken. *daf-11(m47); hsf-1(sy441)* és *daf-21(p673); hsf-1(sy441)* kettős mutáns háttérben azonban az expresszió a vad szintre jellemző értéket mutat. A *hsf-1(sy441)* mutáció tehát szuppresszálja a *daf-11* és *daf-21* deficienciák *daf-7* expressziót represszáló hatását. Más szavakkal a DAF-11 és DAF-21 *daf-7* expressziót stimuláló hatása a HSF-1 gátlásán keresztül valósul meg (a DAF-11/DAF-21 gátolja a HSF-1-et, amely pedig represszálja a *daf-7*-et; a kettős gátlás eredményeként a DAF-11/DAF-21 aktiválja a *daf-7* expressziót). Ez azt sugallja, hogy a *daf-11/daf-21*, a *hsf-1* és a *daf-7* egy genetikai útvonal mentén szabályozza az egyedfejlődést (reproduktív növekedést vs. dauer lárva fejlődést). Hasonló jelenséget figyeltünk meg abban az esetben, amikor a *hsf-1* gént RNSi-val csendesítettük (25. ábra), illetve *hsf-1(ok600)* mutáns háttérben is. A GFP intenzitását egyes esetekben kvantifikáltuk. Az így kapott adatokat az 26. ábrán tüntettem fel. Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a DAF-11 *daf-7* transzkripcióra kifejtett hatását a HSF-1 közvetíti: a HSF-1 gátolja a *daf-7* gén kifejeződését.



26. ábra: A DAF-11 és a DAF-21 a *daf-7* expressziót HSF-1 függő módon aktiválja: A *daf-7::gfp* relatív intenzitásának kvantitatív ábrázolása az ASI neuronokban vad típusú és mutáns L1 lárvákban. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik. N a vizsgált állatok számát jelöli. (**: $p < 0.001$; *Student t*-teszt)

6.1.4. A dauer egyedfejlődés *daf-11/daf-21* mutáns állatokban HSF-1-et igényel

A fenti eredmények tükrében kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen hatással van a HSF-1 a *daf-11(m47)* és *daf-21(p673)* mutánsok Daf-c fenotípusára. Ennek érdekében *daf-11(m47); hsf-1(sy441)* és *daf-21(p673); hsf-1(sy441)* kettős mutáns törzseket hoztunk létre, és meghatároztuk a dauer lárvák százalékos arányát az egyes törzsekben. Az eredményt a 27. ábra összegzi. Látható, hogy a *daf-11(m47)* és *daf-21(p673)* mutáns állatok Daf-c fenotípusát a *hsf-1(sy441)* 20°C-on és 23°C-on egyaránt szuppresszálja (27. ábra). A HSF-1 tehát a DAF-11/DAF-21-től *downstream* hat és negatívan szabályozza a dauer egyedfejlődési programot. Mindezek alapján elképzelhető, hogy a HSF-1 a *daf-7* közvetlen transzkripciós represszora, és a DAF-11/GC a HSF-1 gátlása révén tartja fenn a *daf-7* expressziót a reproduktív egyedfejlődés során.

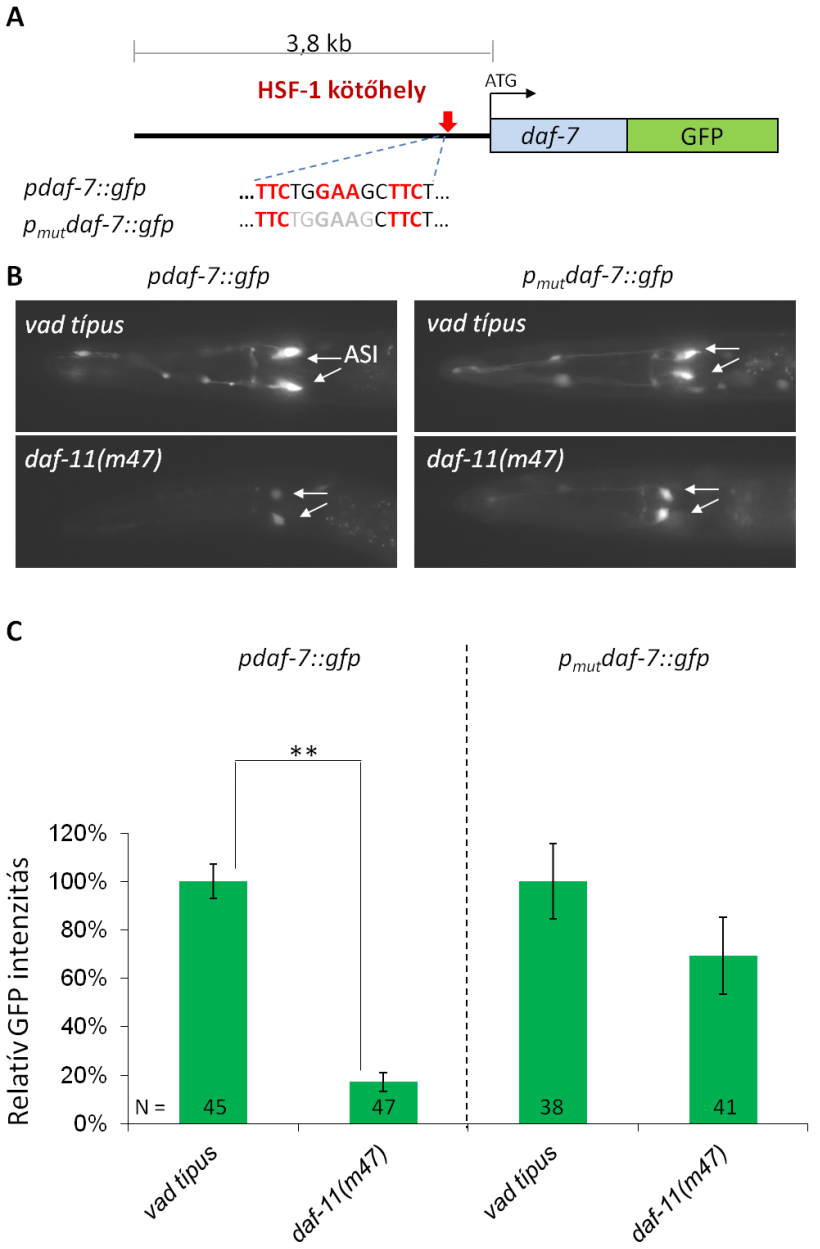


27. ábra: A HSF-1 szükséges a DAF-11 és DAF-21 defektív mutáns állatok dauer konstitutív fenotípusának kifejeződéséhez: *hsf-1(sy441)* mutáns genetikai háttérben a *daf-21(p673)* és *daf-11(m47)* mutánsok Daf-c fenotípusa szuppresszálódik. N a vizsgált állatok számát jelöli. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik. ($p<0.001$; *Student t*-teszt).

6.1.5. A HSF-1 egy konzervált kötőhelyen keresztül szabályozza a *daf-7* expresszióját

Mivel a HSF-1 egy transzkripciós faktor, valamint a *daf-7* 5' szabályozó régiójában potenciális HSF-1 kötőhely található, ezért feltételeztük, hogy a HSF-1 közvetlenül szabályozza a *daf-7* átírását. A potenciális HSF-1 kötőhely vizsgálatához elkészítettünk egy transzkripciós fúziós *pdaf-7::gfp* riporter konstrukciót, amely a *daf-7* gén 5' *upstream* régiójából származó mintegy 3,8 kbp-nyi szekvenciát és a gén első exonjának egy részét, valamint az exonnal egyazon leolvasási keretben a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kódoló gén szekvenciáját tartalmazza. *In vitro* helyspecifikus mutagenezis segítségével létrehoztuk a

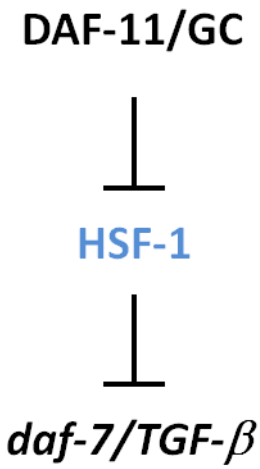
konstrukció mutáns verzióját is (p_{mut}*daf-7::gfp*), amely abban különbözik a vad *pdaf-7::gfp* konstrukciótól, hogy 6 bázispár hiányzik a feltételezett HSF-1 kötőhelyből (28 A. ábra).



28. ábra: A *daf-7* 5' szabályozó régiójában található HSF-1 kötőhely *in vivo* funkcionális. (A) A *daf-7::gfp* riporter vázlata (*pdaf-7::gfp*), amely egy 3,8 kbp hosszú 5' *upstream* szabályozó régiót tartalmaz (felül). A riporter mutáns változatában (*pmutdaf-7::gfp*) a feltételezett HSF-1 kötőhelyből *in vitro* mutagenezis segítségével 6 bázispárt eltávolítottunk (alul; a törölt bázisok szürke betűkkel jelölve). (B) A *daf-11(m47)* mutáció gátolja a vad típusú riporter (p*daf-7::gfp)* expresszióját az ASI neuronokban (bal oldalt, fehér nyilakkal jelölve). A feltételezett HSF-1 kötőhelyben mutáns riporter (*pmutdaf-7::gfp*) expressziója ugyanakkor a vizsgált lárvák többségében (82%, N=264) nem csökken le *daf-11(m47)* mutáns háttéren (jobb oldalt). Ez a feltételezett HSF-1 kötőhely *in vivo* fukcionalitására utal. (C) A GFP jel relatív intenzitása az ASI neuronokban. N a vizsgált állatok számát jelöli. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik (**: p<0.001; *Student t*-teszt).

Mindkét riporter intenzíven expresszálódik az ASI neuronokban, de míg a vad típusú riporter expressziója *daf-11(-)* háttéren csökkent, addig a mutáns p_{mut}*daf-7::gfp* riporter expressziója DAF-11 hiányában nem változott jelentősen (28 B és C. ábra). Mindezek arra utalnak, hogy a *daf-7* 5' szabályozó régiójában található feltételezett HSF-1 kötőhely funkcionális.

Összességében tehát arra következtettünk, hogy a DAF-11, a HSF-1 és a DAF-7 egy útvonalban hatva szabályozzák a fonalféreg egyedfejlődését. Kedvező környezeti körülmények esetén a DAF-11 és a DAF-21 a HSF-1 gátlásán keresztül aktiválják a *daf-7* gén kifejeződését. Kedvezőtlen körülmények esetén azonban a HSF-1 aktív, és gátolja a *daf-7* átírást az ASI neuronokban, így dauer egyedfejlődést indukál. Ez a modell (29. ábra) magyarázatot ad arra, hogy miképpen képesek a fonálférgek alacsony egyedsűrűség és megfelelő táplálék ellátottság mellett is pusztán a magas hőmérséklet (27°C) hatására dauer lárvaként fejlődni [142].

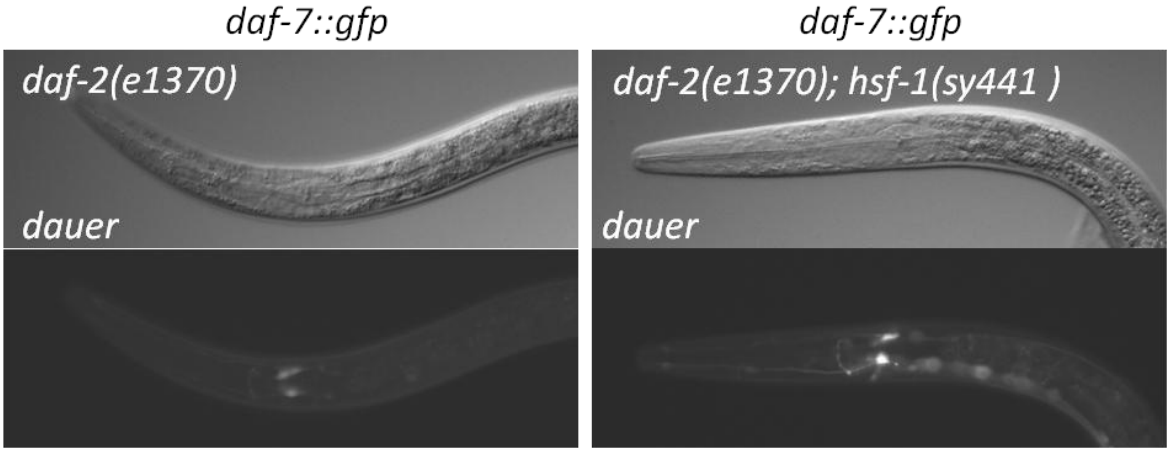


29. ábra: A *daf-7* expresszió szabályozásának modellje. A guanilát cikláz jelátvitel komponensei, a DAF-11 és DAF-21, gátolják a HSF-1 aktivitását (talpas nyíl). A csökkent HSF-1 aktivitás következtében a *daf-7* felszabadul a transzkripciós gátlás alól, így a reproduktív egyedfejlődést segíti elő. A talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek. (GC = guanilát-cikláz)

A DAF-11 és a DAF-21 a *daf-7* gén kifejeződését a HSF-1 transzkripciós faktor aktivitásának gátlásán keresztül aktiválja. A HSF-1 tehát a TGF-β jelátvitel upstream szabályozó komponense, amely magas hőmérsékleten a *daf-7* átíródást gátolva segíti elő a dauer egyedfejlődést.

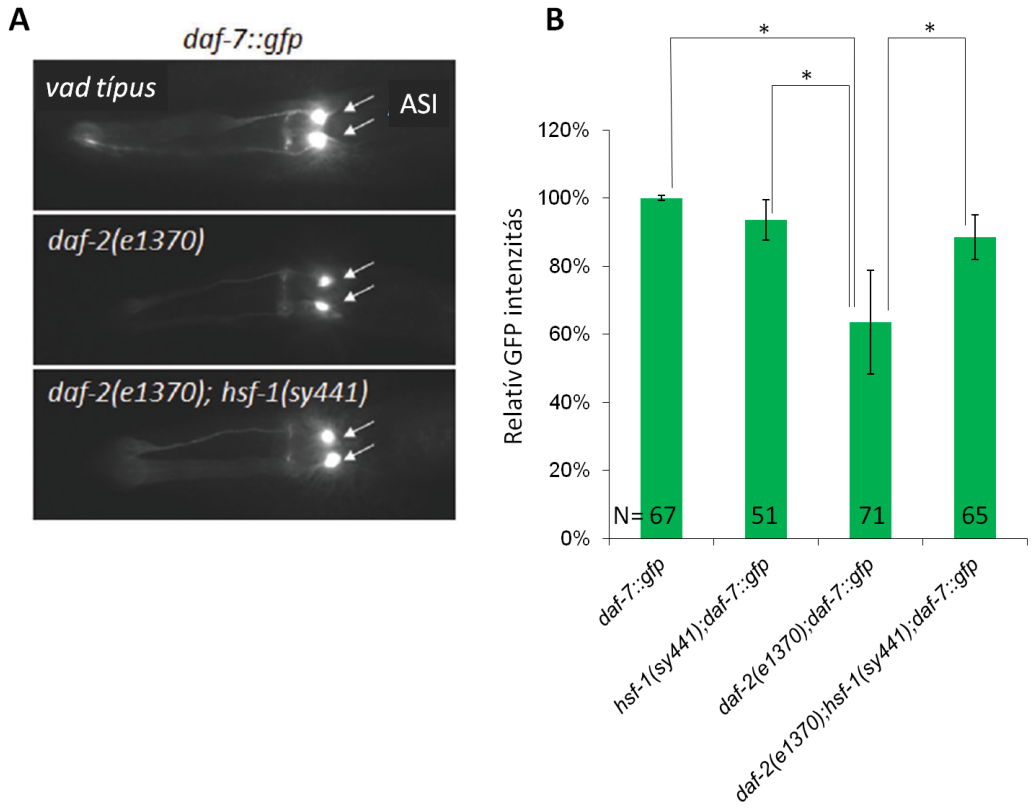
6.2. Az inzulin/IGF-1 jelátvitel a HSF-1 gátlásán keresztül aktiválja a *daf-7* expresszióját

Chiang és munkatársai kimutatták, hogy az inzulin/IGF-1 jelátvitel a HSF-1 két közvetlen negatív szabályozó faktorának (DDL-1 és DDL-2) aktiválásán keresztül gátolja a HSF-1-et [210]. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az inzulin/IGF-1 jelátvitel a HSF-1 gátlásán keresztül befolyásolja a *daf-7* expresszióját is. E hipotézis alátámasztásának érdekében az inzulin receptort kódoló *daf-2* funkcióvesztéses mutáns dauer lárvákban megvizsgáltuk a *daf-7::gfp* riporter expresszióját. Azt tapasztaltuk, hogy *daf-2(e1370); hsf-1(sy441)* kettős mutáns dauer lárvákban a *daf-7* expressziója az ASI neuronokban jelentősen magasabb, mint a *daf-2(e1370)* egyszeres mutáns dauer lárvákban (30. ábra). Ezen kívül a *daf-7* ektopikusan is expresszálódott számos hasi idegdúclánchoz tartozó neuronban a kettős mutáns genetikai háttérben (30. ábra).



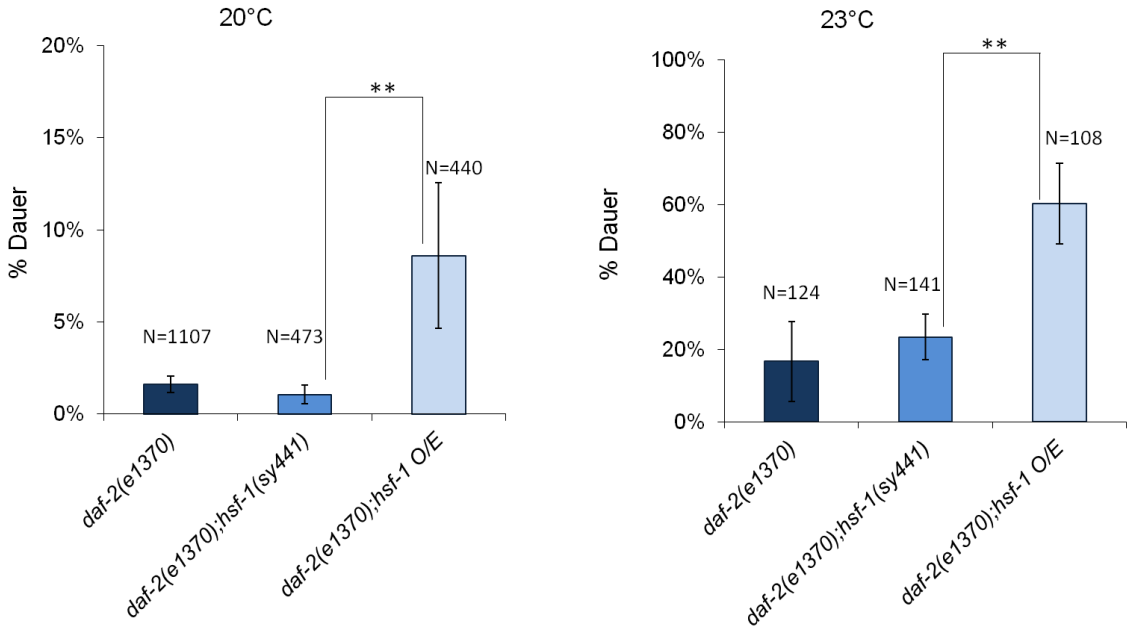
30. ábra: Az IGF-1 receptor defektív *daf-2(e1370)* mutáns dauer lárvákban a *daf-7::gfp* expressziója HSF-1-függő. Felül a Nomarski optikával készült, míg alul a fluoreszcens képek találhatóak. Ez az expressziós különbség a vizsgált állatok 100%-ban megfigyelhető volt (N=112). A fluoreszcens képek azonos expozíciós idővel készültek. A kettős mutáns dauer lárvában ventrálisan GFP-pozitív neuronok láthatóak (ektopikus expresszió).

Ezek után megvizsgáltuk, hogyan változik a *daf-7* expresszió vad típusú és *daf-2(e1370)* mutáns L1 lárvákban. A redukált DAF-2 aktivitás következtében a *daf-7* expressziója csökkent az ASI neuronokban (31. ábra). Ez a csökkenés *hsf-1(sy441)* mutációval szuppresszálható volt (31. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az inzulin/IGF-1 jelátvitel a HSF-1 gátlásán keresztül aktiválja a *daf-7* expresszióját, és ezzel a TGF-β útvonal aktivitását.

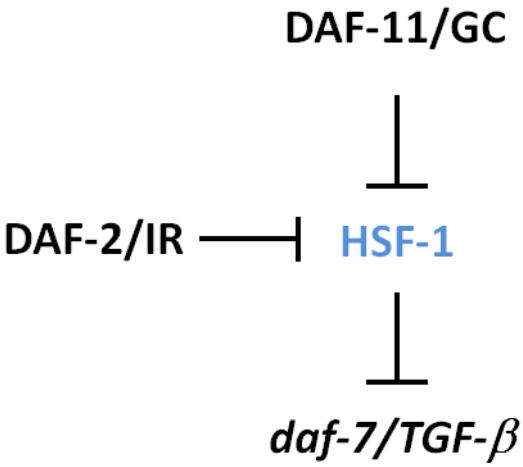


31. ábra: A DAF-2/IGF-1 receptor a HSF-1 gátlásán keresztül stimulálja a *daf-7::gfp* expresszióját L1 lárvákban. (A) *daf-2(e1370)* mutáns L1 lárvában csökken a *daf-7::gfp* expressziója a vad típusú genetikai háttérhez képest. A *hsf-1(sy441)* mutáció szuppresszálja a *daf-7* expresszió csökkenését *daf-2(e1370)* mutáns L1 lárvában. A fluoreszcens képek ugyanolyan expozíciós idővel készültek. (B) A *daf-7::gfp* expresszió relatív intenzitása az ASI neuronokban. N a vizsgált állatok számát jelöli. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik (*: $p<0.05$; *Student t*-teszt).

Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint *daf-2(e1370)* mutáns genetikai háttéren 20°C és 23°C-on a dauer lárvák aránya jelentősen megnövekedik a HSF-1 fehérjét túltermelő *hsf-1*O/E törzsben (32. ábra). Mindezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a táplálék ellátottságot érzékelő inzulin/IGF-1 útvonalat és a DAF-7/TGF-β jelátvitelt a HSF-1 fűzi össze, lehetővé téve a dauer vs. normális egyedfejlődés lépést eldöntő környezeti jelek integrálódását (33. ábra).



32. ábra: A *hsf-1* túltermelése a dauer egyedfejlődést segíti elő *daf-2(e1370)* mutáns állatokban. *daf-2(e1370)* mutánsokban a HSF-1 túltermelés hatására megnő a dauer lárvák aránya 20 és 23°C-on. A *hsf-1 O/E* HSF-1-et túltermelő törzset jelöl. N a vizsgált állatok számát jelöli. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik (**: p<0.001, *Student t*-teszt).

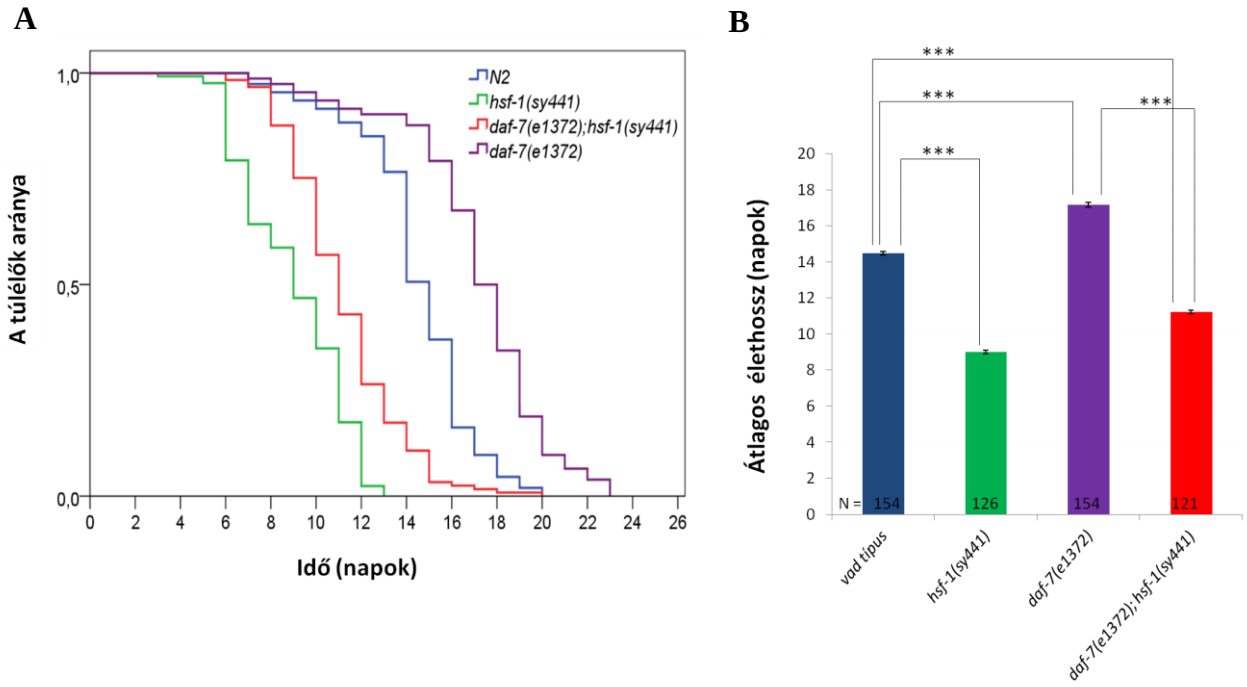


33. ábra: Az inzulin/IGF-1 és TGF-β jelátviteli útvonalakat a HSF-1 fűzi össze *C. elegans*ban. A táplálék ellátottságot érzékelő inzulin/IGF-1 útvonal és a DAF-7/TGF-β jelátvitel közt a HSF-1 teremt kapcsolatot. Így lehetővé válik, hogy a dauer fejlődést elősegítő és gátló környezeti faktorok (éhezés, nagy egyedsűrűség és magas hőmérséklet) integrálódjanak. A talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek (GC = guanilát-cikláz; IR = inzulin receptor).

6.3. A HSF-1 a *daf-7*-től *downstream* is hat az élethossz és az egyedfejlődés szabályozásában

6.3.1. A HSF-1 *daf-7*-től *downstream* befolyásolja az élettartamot

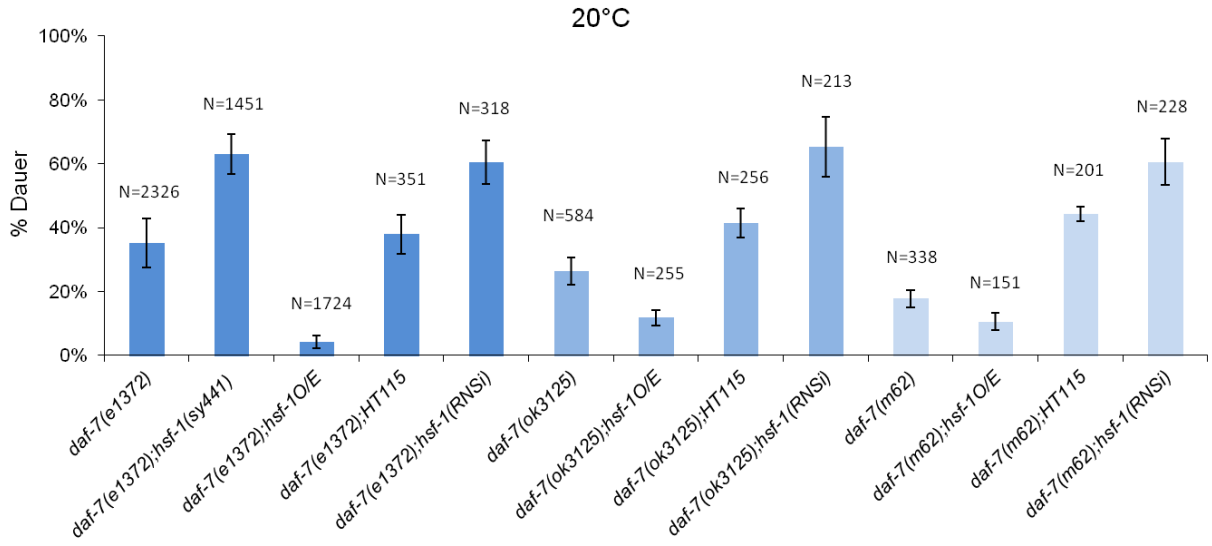
*C. elegans*ban a TGF-β jelátvitel az inzulin/IGF-1 jelátvitelen keresztül szabályozza az állatok élethosszát. *daf-7(-)* mutánsok mintegy kétszer annyi ideig élnek, mint a vad típusú állatok [211]. Mivel az inzulin/IGF-1 receptor mutáns *daf-2(-)* állatok megnövekedett élethossza DAF-16/FoxO és HSF-1 függő [57, 58], ezért feltételeztük, hogy a *daf-7(-)* mutánsok hosszú életidejének érvényesüléséhez is szükséges a HSF-1. Eredményeink alapján a *daf-7(-)* megnövekedett élethosszát a *hsf-1(sy441)* jelentős mértékben (de nem teljesen) szuppresszálja, vagyis a *hsf-1* a *daf-7*-től *downstream* hat az élethossz szabályozásában (34. ábra).



34. ábra: A TGF-β jelátvitelben defektív *daf-7(e1372)* mutáns megnövekedett élethosszának érvényesüléséhez HSF-1 aktivitás szükséges. (A) HSF-1 aktivitás hiányában a *daf-7(e1372)* mutáns állatok megnövekedett élethossza nem tud teljes mértékben kifejeződni. A Kaplan-Meyer túlélési görbéket az SPSS szoftver segítségével készítettük el. *daf-7(-)* egyszeres és a *daf-7(-); hsf-1(sy441)* kettős mutánsok, illetve a vad típusú és a *hsf-1(sy441)* egyszeres mutánsok élethossza közötti eltérés szignifikanciája $p<0.0001$. (B) Az egyes mutáns törzsek átlagos élethossza. N a vizsgált állatok számát jelöli. (***: $p < 0.0001$, *Mantel-Cox* teszt).

6.3.2. A HSF-1 a *daf-7*-től *downstream* is befolyásolja a dauer egyedfejlődést

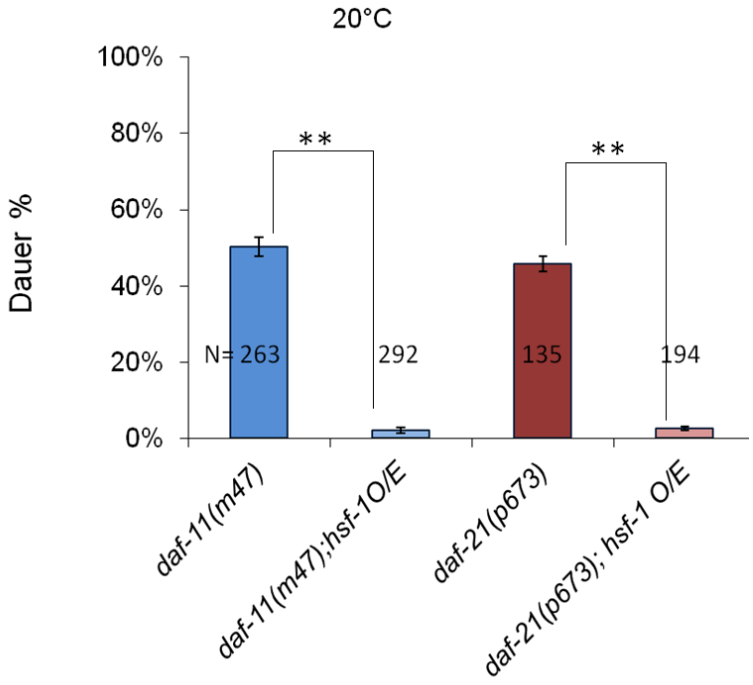
daf-7(-) mutáns állatok Daf-c fenotípusának penetranciája hőmérséklet-függő. Ezért megvizsgáltuk a HSF-1 lehetséges szerepét a *daf-7(-)* mutáns állatok dauer lárva fejlődésében is. Eredményeink szerint *daf-7(-)* mutáns genetikai háttérben a HSF-1 hiányában megnő, míg túlműködése esetén jelentősen csökken a dauer lárvák aránya (35. ábra).



35. ábra: A HSF-1 aktivitás *daf-7(-)* mutáns háttéren is befolyásolja a dauer egyedfejlődést. HSF-1 hiányában megnő, míg HSF-1 túltemelés esetén csökken a dauer lárvák aránya *daf-7(-)* null mutáns genetikai háttérben. A *hsf-1 O/E* HSF-1-et túltermelő törzset jelöl. Minden adott egyszeres és a hozzá tartozó kettős mutánshoz tartozó adat közti különbség szignifikanciája $p<0.001$, kivéve a *daf-7(m62)* mutánshoz tartozó adatot, , ahol ez $p<0.01$ (*Student t*-teszt). Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik. N a vizsgált állatok számát jelöli. RNSi: RNS interferencia. HT115: az „etetéses" RNS interferenciához használt *E. coli* törzs.

6.3.3. A *hsf-1* túltermelése gátolja a dauer egyedfejlődést *daf-11/daf-21* mutáns állatokban

Ezek után megvizsgáltuk, miképpen alakul a dauer lárvák aránya *hsf-1* túltermelés esetén *daf-11(-)* és *daf-21(p673)* mutáns genetikai háttérben. A kísérletet elvégezve azt kaptuk, hogy a *hsf-1* túltermelése a *daf-11(-)* és *daf-21(p673)* mutánsok dauer konstitutív fenotípusát is szignifikánsan szuppresszálja (36. ábra).



36. ábra: A *hsf-1* túltermelése gátolja a dauer egyedfejlődést *daf-11(m47)* és *daf-21(p673*) mutáns állatokban. A HSF-1 túltermelés hatására a *daf-11(m47)* és *daf-21(p673)* mutánsok kevésbé tudnak dauer lárvaként fejlődni. A *hsf-1 O/E* HSF-1-et túltermelő törzset jelöl. N a vizsgált állatok számát jelöli. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik (**: p<0.001, *Student t*-teszt).

Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a HSF-1 a *daf-7*-től *upstream* és *downstream* is hat az egyedfejlődés szabályozásában. Egyrészt a *daf-7* expressziójának gátlása révén elősegíti, másrészt egy vagy több *downstream* komponenssel kölcsönhatva gátolja a dauer egyedfejlődést.

6.4. A HSF-1 aktiválja a TGF-β útvonal szabályozás alatt álló *daf-9/citokróm p450* gén kifejeződését

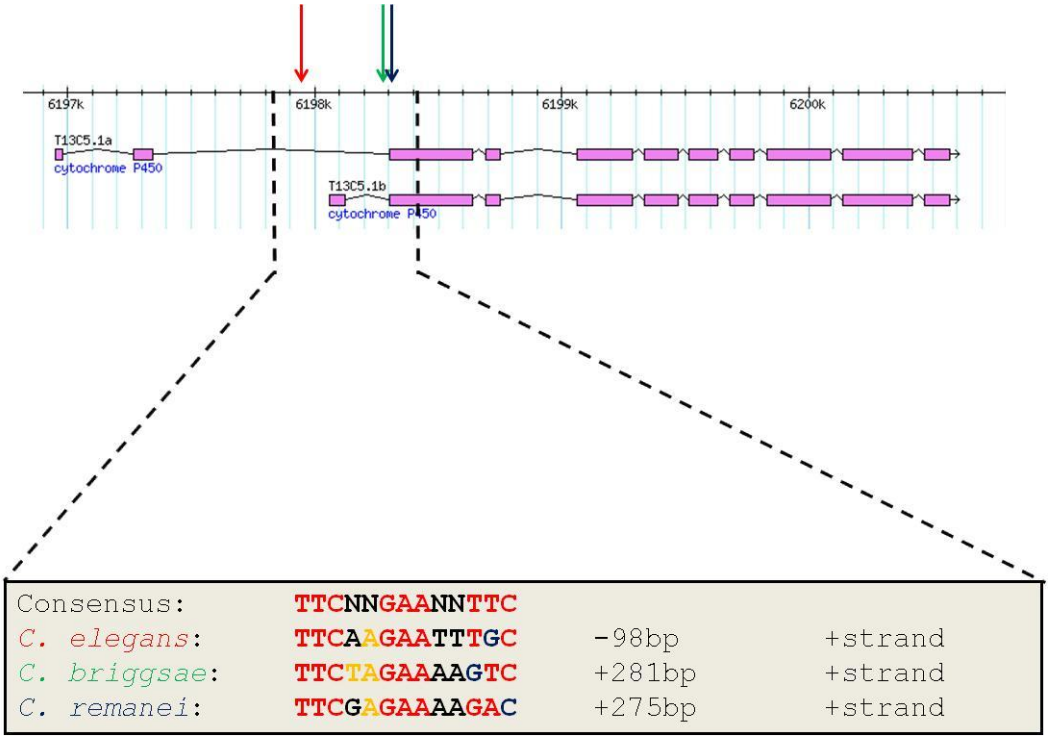
A fenti eredmények alapján elképzelhető, hogy a HSF-1 a dauer egyedfejlődésre és az élethosszra *daf-7*-től *downstream* ható gének expresszióját is befolyásolja. Ilyen potenciális gén a dauer egyedfejlődés finomszabályozásában szerepet játszó *daf-9*, amely gátolja a dauer fejlődést iniciáló DIN-1-DAF-12 nukleáris hormon receptor komplex kialakulását [190].

A *daf-9* egy citokróm P450 családba tartozó fehérjét kódol. A citokróm P450 enzimeknek többek között a szteroid hormonok szintézisében van szerepük [190, 200]. *C. elegans*ban a DAF-9 a dafakronikus sav szintézisét végzi, ami a DAF-12 nukleáris hormon receptor liganduma [190, 200]. A *daf-9* a hipodermisz és az XXX neuroendokrin sejtek mellett a felnőtt állatok spermatékájában fejeződik ki. Dauer fejlődést elősegítő környezetben (pl.

magas hőmérsékleten), valamint a GC, DAF-7/TGF-β és inzulin/IGF-1 jelátvitel defektív mutánsok reproduktívan fejlődő egyedeiben a *daf-9* expressziója megnő a hipodermiszben [190, 194]. A hipodermális DAF-9-nek valószínűleg a dauer egyedfejlődés finomszabályozásában van szerepe, mivel lehetővé teszi, hogy enyhébb stressz esetén a hipodermiszben is termelődjön a reproduktív egyedfejlődéshez szükséges dafakronikus sav [203, 204]. Ezáltal pedig az állatok egy része dauer lárva helyett felnőtt állattá fejlődik.

6.4.1. A *daf-9 cisz*-szabályozó régiójában potenciális HSF-1 kötőhely található

A hőmérséklet-függő expressziót mutató [190] *daf-9* genomi környezetében *Caenorhabditis* fajokban konzervált HSF-1 kötőhelyet azonosítottunk *in silico* módszerekkel (37. ábra).

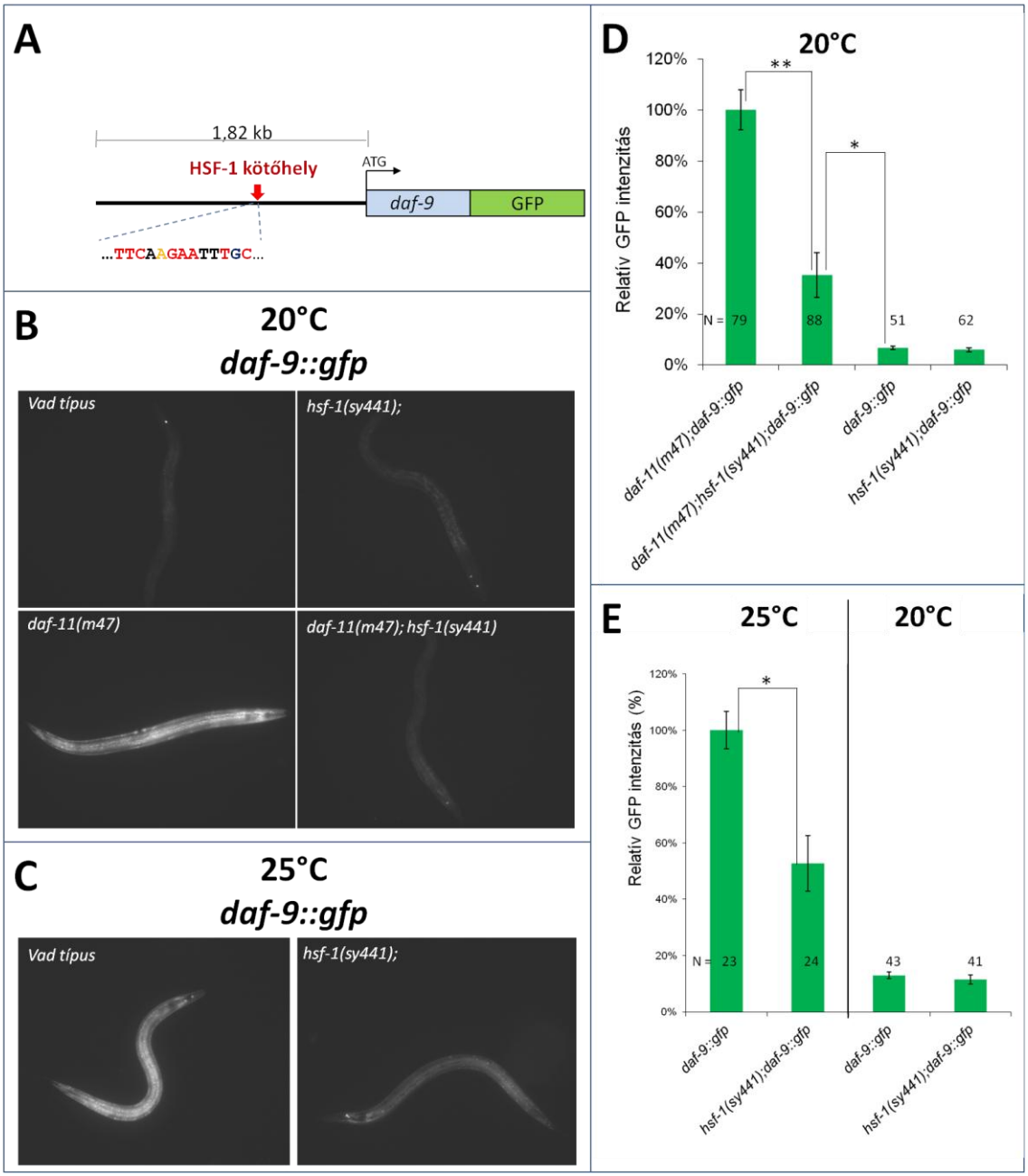


37. ábra: A *daf-9* gén *cisz*- szabályozó régiója konzervált HSF-1 kötőhelyet tartalmaz. A konzervált HSF-1 kötőhely (pozíciója piros nyíllal jelölve) a *daf-9* hosszabb transzkriptumának második intronjában található. Ez éppen a rövidebb izoformát kódoló régió 5' szabályozó szakaszába esik. A kötőhely szekvenciája és pozíciója más *Caenorhabditis* fajokban is konzervált. Az erősen konzervált nukleotidok piros betűvel vannak szedve. *Strand*: az adott DNS szál. A *C. elegans daf-9* gén szerkezetét lila bokszok (exoni szekvenciák) és azokat összekötő vonalak (introni szekvenciák) jelölik. A felső vonalon levő számok a relatív kromoszómális pozíciót jelölik kbp-ban megadva.

6.4.2. A HSF-1 aktiválja a *daf-9* gén expresszióját

A feltételezett hősokk elemet tartalmazó *daf-9::gfp* riporter segítségével kimutattuk, hogy míg a *daf-9::gfp* expressziója a hőmérséklet emelkedésével nő, addig *hsf-1(-)* mutáns

genetikai háttérben az expresszió alacsony bazális szinteket mutat, azaz nem változik (38 C. és E. ábra). Ez azt sugallja, hogy a HSF-1 szükséges a *daf-9* expresszió hőmérséklet-függő aktiválásához.

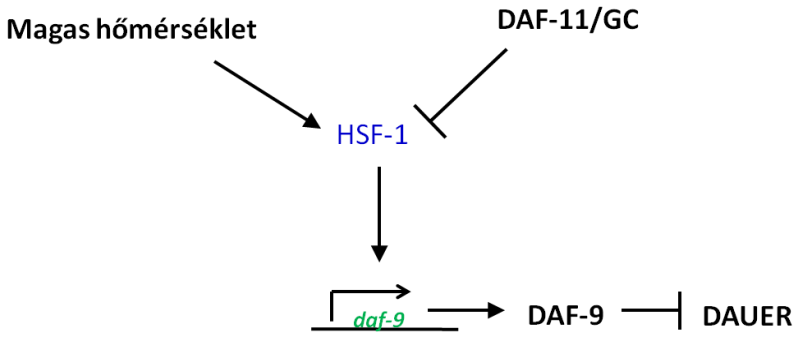


38. ábra: A HSF-1 aktiválja a *daf-9* expresszióját. (A) A *daf-9::gfp* riporter vázlata, amely egy 1,82 kbp hosszú szabályozó régiót tartalmaz. (B) 20°C-on a vad típusú L3 lárvák hipodermiszében *daf-9::gfp* csökkent expressziót mutat a hipodermiszben. *daf-11(-)* mutáns háttéren azonban a *daf-9* expressziós szintje jelentősen megemelkedik. *daf-11(-); hsf-1(sy441)* kettős mutáns állatokban ugyanakkor nem változott a *daf-9::gfp* riporter kifejeződésének szintje. A *daf-9::gfp* hipodermális expressziójának növekedése tehát aktív HSF-1-et igényel. (C) A *daf-9* hipodermális expressziója 25°C-on jelentősen megemelkedik. *hsf-1(-)* mutáns genetikai háttérben a *daf-9* expressziós szintje 25°C-on szignifikánsan alacsonyabb mértékű. A fluoreszcens képek ugyanolyan expozíciós idővel készültek. (D) A *daf-9::gfp* relatív intenzitásának kvantifikálása a hipodermiszben vad típusú,

daf-11(-) és *daf-11(-); hsf-1(sy441)* mutáns L3 lárvákban 20°C-on. (* p<0.05, ** p<0.001; *Student t*-teszt) (E) A *daf-9::gfp* relatív intenzitásának kvantifikálása a hipodermiszben 20 és 25°C-on vad típusú és *hsf-1(sy441)* mutáns L3 lárvákban. N a vizsgált állatok számát jelöli. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik (*: p<0.05; *Student t*-teszt).

A *daf-9* expresszió *daf-11(-)* mutáns háttérben is megnő a nem dauer lárvaként fejlődő egyedekben [190]. *daf-11(-); hsf-1(sy441)* kettős mutáns állatokban ugyanakkor nem változott a *daf-7::gfp* riporter kifejeződésének szintje (38 B és D. ábra). *daf-11(-)* mutáns háttérben tehát a *daf-9* átírásának aktiválásához a HSF-1 szükséges.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HSF-1 transzkripciós faktor a *daf-9* gén kifejeződését magas hőmérsékleten, illetve csökkent GC jelátvitel esetén aktiválja az L4 lárvák hipodermiszében (39. ábra). A *daf-9* tehát a HSF-1 egy további transzkripcionális célgénje lehet. Ennek *in vitro* és *in vivo* igazolása egy jövőbeli kísérlet feladata lenne.



39. ábra: A HSF-1 a *daf-9* aktiválásán keresztül keresztül gátolja a dauer egyedfejlődési programot. Magas hőmérséklet, illetve csökkent guanilát-cikláz jelátvitel esetén a HSF-1 aktiválja a *daf-9* expresszióját a hipodermiszben. A DAF-9 a hipodermiszben a dauer lárva képződést gátolja. A nyilak serkentő, míg a talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek (GC = guanilát-cikláz).

6.5. A HSF-1 fehérje transzkripciós célpontjainak genom-szintű *in silico* meghatározása

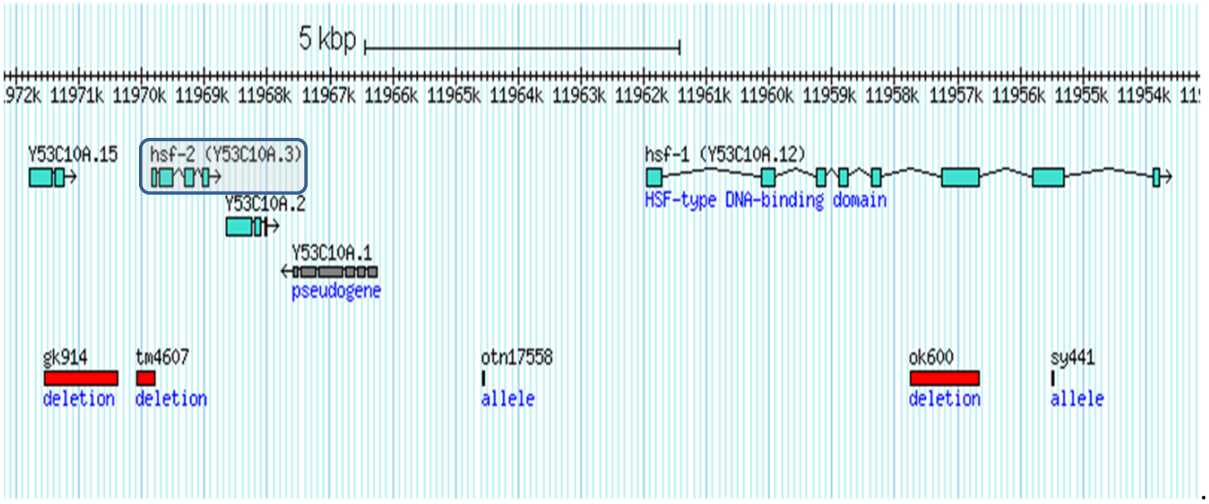
A HSF-1 fehérje további lehetséges célgénjeinek azonosításához *in silico* megközelítést alkalmaztunk A vizsgálat során a Wormenhancer (Genome Enhancer - Open Genomics) program segítségével meghatároztuk azokat a géneket, amelyek 5’ szabályozó régiójában konszenzus HSF-1 kötőhely szekvencia (TTCNNGAANNTTC) található. A program predikciói során nyert feltételezett kötőhelyek közül a továbbiakban kizárólag azokkal foglalkoztunk, amelyek egy evolúciósan rokon faj, *Caenorhabditis briggsae* megfelelő ortológ génjeinek genomi környezetében is konzervált módon megtalálhatóak. Amennyiben a kötőhely mindkét fajban hasonló pozícióban jelen van, az a szabályozó mechanizmus

evolúciós konzervációjára, vagyis a szekvencia funkcionális voltára utal. Az így kapott találatokat a melléklet 1-4. táblázataiban foglaltam össze.

6.6. A HSF-2 a reproduktív egyedfejlődést segíti elő

6.6.1. A *hsf-2* egy HSF-1 paralógot kódol

A *C. elegans* genomban a HSF-1 egy paralógját a *hsf-2* (*Y53C10A.3*) gén kódolja (E érték = $2*10^{-20}$). A *hsf-2* a *WormBase* adatbázis predikciója szerint 4 exonból áll és a *hsf-1* közvetlen genomi környezetében található (40. ábra).

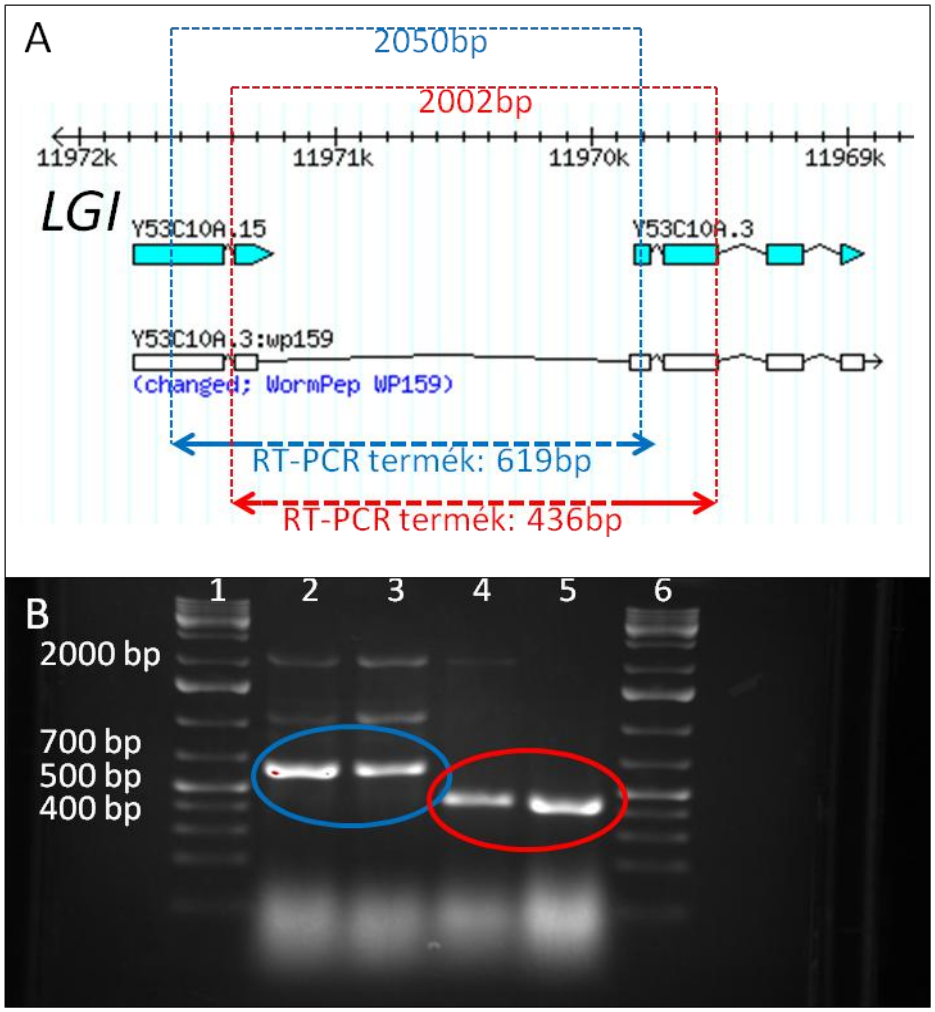


40. ábra: A *hsf-1* genomi környezetében található egy *hsf-1* paralóg, a *hsf-2 (Y53C10A.3).* A világoskék dobozok és az őket összekötő vonalak az exoni és az introni szekvenciákat jelölik. A piros téglalapok a *gk914* és a *tm4607*. valamint az *ok600* allélokban lévő deléciók kiterjedését jelölik.

A SMART domén szerkezetet prediktáló szoftver segítségével megvizsgáltuk a *hsf-2* gén által kódolt feltételezett fehérje szerkezetét. A program a HSF-2 aminosav sorrendje alapján csupán egyetlen konzervált domént, a HSF1-típusú DNS-kötő domént azonosította. A HSF-1 klasszikus doménjei közül tehát a HSF-2 csak a DNS-kötő doménnel rendelkezik.

A *hsf-2* géntől 5’ irányban egy másik gén, az *Y53C10A.15* található (40. ábra). A Wormbase adatbázis egy korábbi verziójában (wp159) az *Y53C10A.15-öt* és *a hsf-2-őt* (*Y53C10A.3*) egy génként annotálták *Y53C10A.3* néven. Ezért RT-PCR segítségével megvizsgáltuk, hogy képződik-e közös átirat az *Y53C10A.15* és *hsf-2* (*Y53C10A.3*) génekről. A PCR-hez olyan primer párokat választottunk, ahol a párok egyik tagja az *Y53C10A.15* exoni szekvenciájához, míg másik tagja a *hsf-2* (*Y53C10A.3*) exoni szekvenciájához képes hibridizálni. A PCR elvégzése után a termékek méretét megvizsgáltuk agaróz gélen (43 B.

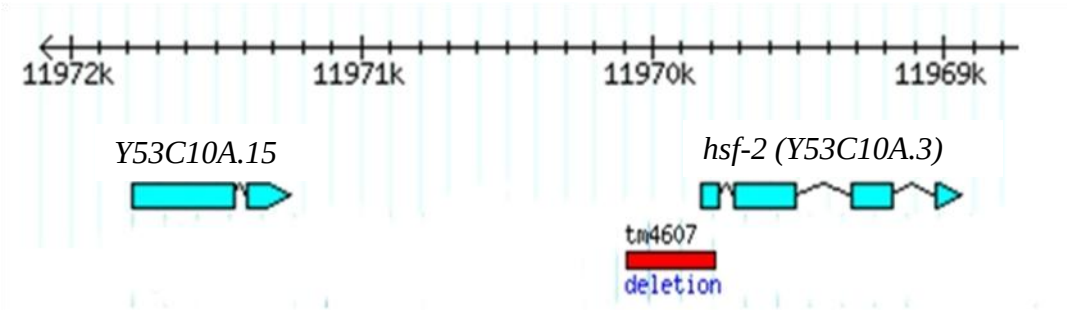
ábra). Két különböző primer párral is olyan méretű terméket kaptunk (619 bp, illetve 436 bp), amelyek csak abban az esetben jöhetnek létre, ha közös transzkriptum képződik a két génről, vagyis a két génről közös átirat is képződik (41 B. ábra).



41. ábra: Az *Y53C10A.15* és a *hsf-2* génekről közös transzkriptum képződik. (A) A *hsf-2* géntől 5' irányban található *Y53C10A.15* gént régebben a *hsf-2* részeként annotálták. A világoskék dobozok és az őket összekötő vonalak az exoni és introni szekvenciákat jelölik. A kék és piros kettős nyilak a prediktált PCR termékeket jelenítik meg. (B) Az RT-PCR reakcióban képződött termékek agaróz gélelektroforetikus képe. A kék, illetve a piros vonallal bekarikázott termékek mérete megegyezik a közös transzkriptum esetén prediktált termékek (619 bp, illetve 436 bp) méretével. Mindkét primer párral elvégzett RT-PCR esetén keletkezik egy kb. 2000 bp hosszú termék is, amely valószínűleg a cDNS templátban lévő genomi DNS szennyeződés következtében jöhet létre. Oszlopok: 1: 1 kb DNS marker (*Fermentas*); 2 és 3: RT-PCR reakció (Fw: 5'-CCTACCAAATGCGGAACAAT-3'; Rv: 5'-TACGAGCATTTTGCTCATCG-3'; 4 és 5: RT-PCR reakció (Fw: 5'-GAGCGGAACGTCACACACTA-3'; Rv: 5'-CCGTGAGAGACGTGGGTAAT-3'); 6: 1 kb DNS marker (*Fermentas*)

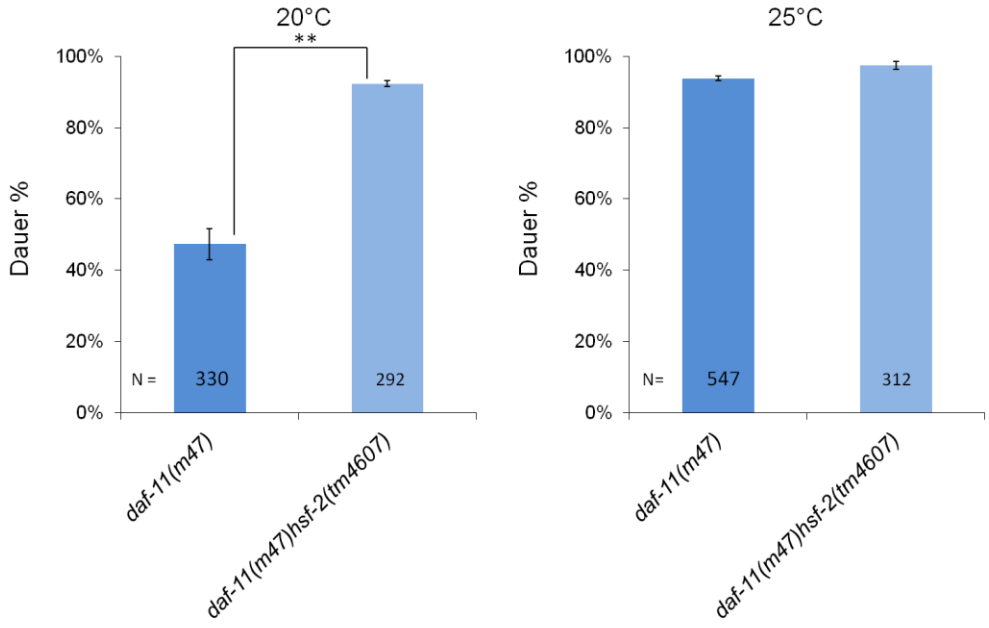
6.6.2. A *hsf-2* gén genetikai vizsgálata

A *tm4607* a *hsf-2* egy deléciós allélje, amelyből hiányzik a gén mintegy 200 bp-nyi 5' szabályozó szekvencia, valamint az első exon legnagyobb része (42. ábra). A *hsf-2(tm4607)* mutáns törzset 4x visszakereszteztük vad típusú hímekkel (izogenizálás), majd megkezdtük fenotípusos jellemzésüket 20°C, 25°C és 27°C-on. A törzs makroszkópikusan vad típusú, a mutáns embriók normális felnőttekké fejlődnek (nem tapasztaltunk embrió vagy lárválís életképtelenséget, valamint a *hsf-2(tm4607)* mutánsok ugyanolyan arányban képeztek dauer lárvát 27°C-on, mint a vad típusú állatok.



42. ábra: A *hsf-2* gén szerkezete. A világoskék téglalapok és az őket összekötő vonalak az exoni és az introni szekvenciákat jelölik. A piros téglalap a *tm4607* allélban lévő deléció kiterjedését jelöli.

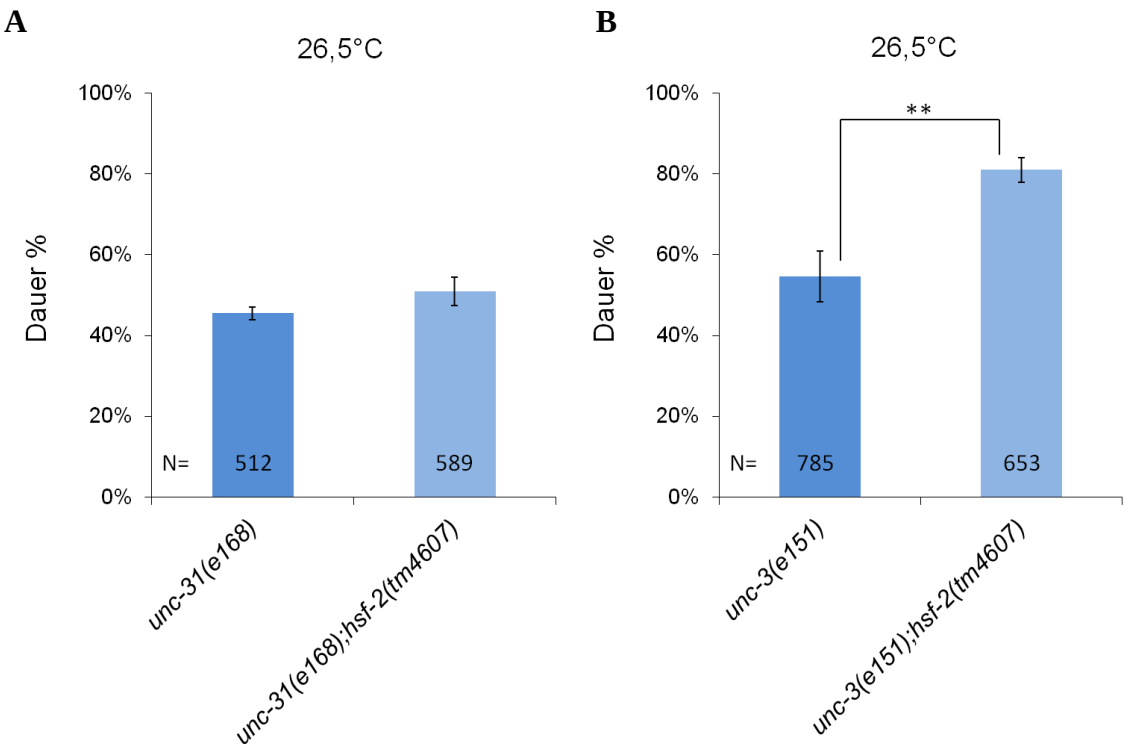
Ezek után kíváncsiak voltunk, hogy a *hsf-1(sy441)*-hez hasonlóan vajon a *hsf-2(tm4607)* befolyásolja-e a Daf-c fenotípus megnyilvánulását *daf-11(-)*/GC mutáns genetikai háttérben. Létrehoztuk tehát a *daf-11(m47); hsf-2(tm4607)* kettős mutáns törzset és azt tapasztaltuk, hogy a *daf-11(m47); hsf-2(tm4607)* kettős mutánsokban jelentősen több dauer lárva képződik, mint a *daf-11(m47)* egyszeres mutánsokban (43. ábra). Vagyis a HSF-2 gátolja a dauer egyedfejlődést.



43. ábra: A *hsf-2* inaktiválása elősegíti a dauer egyedfejlődést *daf-11(-)* mutáns háttérben. *A hsf-2(tm4607)* mutáció megnöveli a dauer lárvák arányát *daf-11(m47)* mutáns genetikai háttérben 20°C.on. 25°C-on a *hsf-2(tm4607)* mutáció nem okoz szignifikáns változást a *daf-11(m47)* mutáns állatok által képzett dauer lárvák arányában (**: p<0.001, *Student t*-teszt). Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik. N a vizsgált állatok számát jelöli.

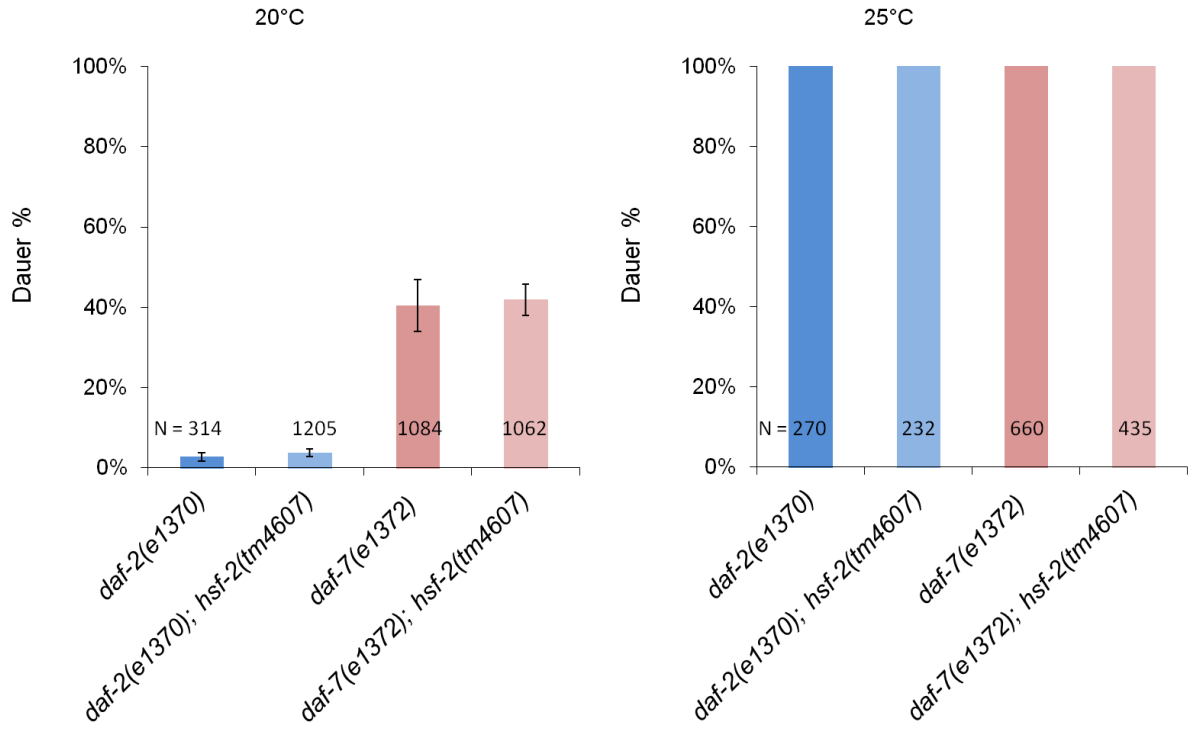
Az *unc-3* és az *unc-31* gének funkció vesztéses mutációi Hid (*High temperature induction of dauer* = magas hőmérséklet indukált dauer) fenotípust okoznak, vagyis 25°C felett a vad típusú állatoknál jelentősen több dauer lárvát képeznek. Az *unc-3* egy transzkripciós faktort kódol, amely az ASI neuronok identitásának kialakulásáért felelős [212]. Az UNC-3 a DAF-7/TGF-β-től *upstream* helyezkedik el. Az UNC-31 a kalcium-szabályozott vezikula fúzióban vesz rész, ezáltal kalcium-függő módon segíti az inzulin-szerű molekulák felszabadulását [207]. Ez a fehérje tehát a DAF-2/IGF-1 útvonaltól *upstream* befolyásolja a dauer egyedfejlődést. Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással bír a *hsf-2(tm4607)* mutáció az *unc-3(e151)*, illetve az *unc-31(e169)* mutánsok dauerképzésére 26,5°C-on. Eredményeink szerint a *hsf-2(tm4607)* nem befolyásolja az *unc-31(e169)* mutánsok Híd fenotípusát (44 A. ábra). *unc-3(e169); hsf-2(tm4607)* kettős mutánsokban azonban jelentősen több dauer lárva képződött 26,5°C-on, mint az *unc-3(-)* egyszeres mutánsokban hasonló körülmények között (44 B. ábra). 26,5°C-on a *hsf-1(sy441)* egyszeres, és az *unc-3(e169); hsf-1(sy441)* valamint *unc-31(e169); hsf-1(sy441)* kettős mutáns törzsek által képezett dauerek arányát nem tudtuk megmérni, mert a *hsf-1(sy441)* állatok 25°C feletti hőmérsékleten nem képesek tovább fejlődni (L1 lárva állapotban megrekednek és elpusztulnak). A fenti eredmények alapján

elképzelhető, hogy a *hsf-2* az *unc-3* génnel parallel hat a dauer egyedfejlődés szabályozásában.



44. ábra: A *hsf-2* inaktiválása *unc-3(e151)* mutáns háttérben elősegíti, de *unc-31(e168)* mutáns háttérben nem befolyásolja a dauer lárva képzést. (A) *unc-31(-)* mutáns háttérben a *hsf-2(tm4607)* mutáció nem befolyásolja a dauer lárvák arányát 26,5°C-on. (B) 26,5°C-on a *hsf-2(tm4607)* mutánsokban *unc-3(-)* mutáns háttéren jelentősen megnövekedik a dauer lárvák aránya (**: $p<0.001$ *Student t*-teszt). Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik. N a vizsgált állatok számát jelöli.

Ezután további episztázis analíziseket végeztünk annak érdekében, hogy pontosabban elhelyezhessük a *hsf-2* gént a dauer egyedfejlődést szabályozó útvonalakban. Létrehoztunk *daf-2(e1370); hsf-2(tm4607)* és *daf-7(e1372); hsf-2(tm4607)* kettős mutáns törzseket, és meghatároztuk a dauer lárvák százalékos arányát 20 és 25°C-on (45. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy egyik hőmérsékleten sem változott a dauer lárvák aránya. Ez azt jelenti, hogy a *hsf-2* a *daf-2* és *daf-7* génektől is *upstream* hat.



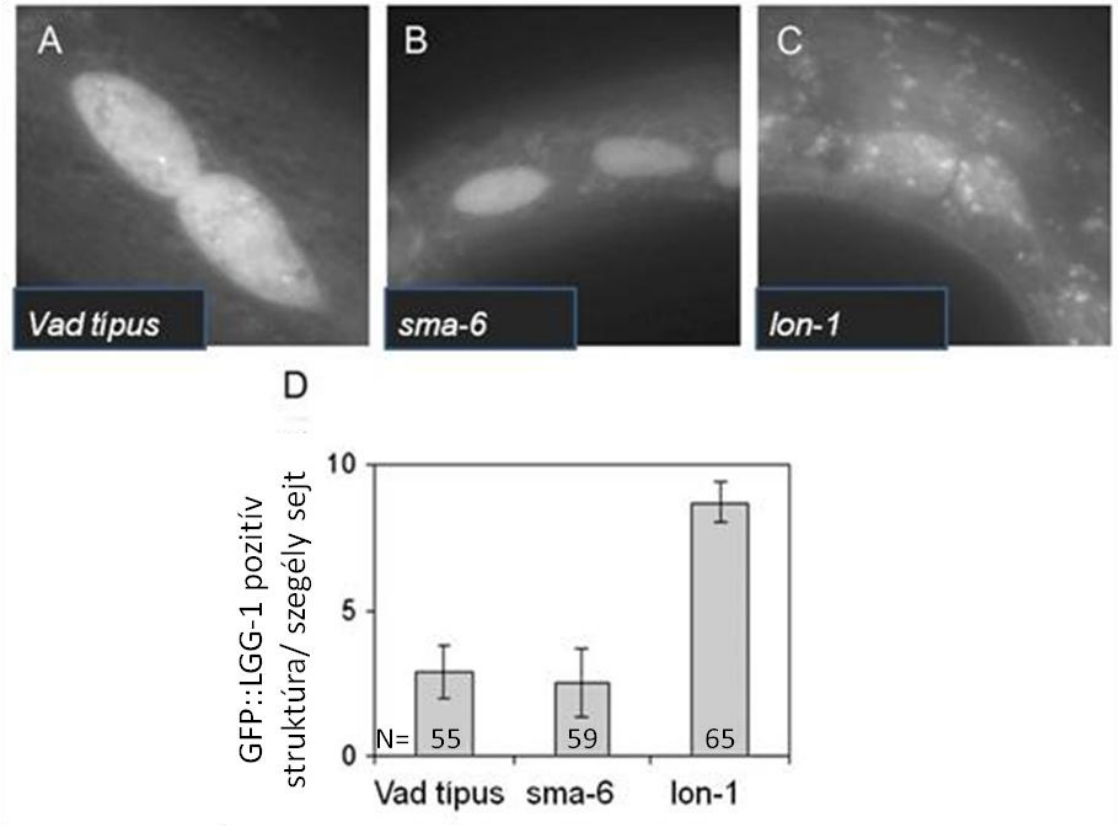
45. ábra: A *hsf-2* inaktiválása nem befolyásolja a dauer lárva képzést *daf-2(e1370)* és *daf-7(e1372)* mutáns háttérben. *hsf-2(tm4607)* mutáció nincs hatással a dauer lárvák arányára *daf-2(e1370)* és *daf-7(e1372)* funkcióvesztéses mutánsokban sem 20, sem pedig 25°C-on. Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik. N a vizsgált állatok számát jelöli.

6.7. A TGF-β jelátvitel aktiválja az autofágiát *C. elegans*ban

A TGF-β jelátvitel részt vesz a sejtek növekedésének és az állat méretének szabályozásában *C. elegans*ban [213]. Mivel a *C. elegans* sejtszáma állandó, ezért a sejtek mérete a testméretben is tükröződik. A DBL-1/TGF-β jelátvitel hiányában az állatok rövid (Sma; *small*), míg konstitutívan aktív jelátvitel esetén hosszú (Lon; *long)* testmérettel rendelkeznek. Csoportunkban az autofág gének szerepét vizsgálták a sejtnövekedésben. Megállapították, hogy a *bec-1* és az *unc-51* autofág gének funkcióvesztéses mutációi rövidebb testméretet és kisebb sejtméretet okoznak. Megfigyelték azt is, hogy a *bec-1(-)* és *unc-51(-)* mutációk szuppresszálják a TGF-β jelátvitel Lon (long =hosszú) fenotípusú mutánsainak megnövekedett test és sejtméretét [214]. Ebbe a munkába a későbbiekben én is bekapcsolódtam.

A fentiek alapján feltételeztük, hogy a TGF-β jelátvitel az autofágia aktiválása révén szabályozza a test- és sejtméretet. Ezért megvizsgáltuk, hogy miképpen változik az autofág aktivitás a DBL-1/TGF-β jelátvitel Lon és Sma fenotípusú mutánsaiban. Az autofág aktivitást

az autofagoszómákat jelölő *gfp::lgg-1* riporter segítségével vizsgáltuk a hipodermális szegély (*seam*) sejtekben (46. ábra). A vizsgálatot megkönnyítette és objektívebbé tette az, hogy az Alicia Melendeztől kapott, a transzgént extrakromoszómálisan hordozó *gfp::lgg-1* törzs [118] genomba integrált változatával végezhettük el [215]. *sma-6(e1482)* mutáns és vad típusú állatokban a szegély sejtek citoplazmájában a riporter megjelenése jórészt homogén, mindössze néhány elkülönült GFP-pozitív strukturát figyeltünk meg (46 A és B. ábra). Ehhez képest *lon-1(e185)* mutáns háttérben a GFP-pozitív fókuszok száma a szegély sejtekben és a környező szövetekben jelentősen megnőtt (46. C ábra). Az így kapott eredményeket kvantifikáltam is (46 D ábra). A DBL-1/TGF-β jelátvitel a *lon-1* gén kifejeződését gátolja. A LON-1 hiányában megnövekedő autofág aktivitás tehát arra utal, hogy a DBL-1/TGF-β útvonal az autofágiát aktiválja.



46. ábra: A GFP::LGG-1 pozitív struktúrák felhalmozódását a „szegély”(*seam*) sejtekben TGF-β komponensek befolyásolják. A: Az autofagoszómákat jelölő GFP::LGG-1 struktúrák megjelenése vad típusú L3 lárvák szegély sejtjeiben. B: GFP::LGG-1 expressziója egy *sma-6(e1482)* mutáns L3 lárva szegély sejtjeiben. C: GFP::LGG-1 pozitív struktúrák egy *lon-1(e185)* mutáns szegélysejtjeiben. D: GFP::LGG-1 pozitív struktúrák átlagos száma L3 lárvák szegély sejtjeiben vad típusú és *sma-6(e1482)* és *lon-1(e185)* mutáns állatokban ($p<0.001$ *Student t*-teszt). Az oszlopok tetején lévő hibasávok a standard hibát jelölik. N a vizsgált szegélysejtek számát jelöli.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

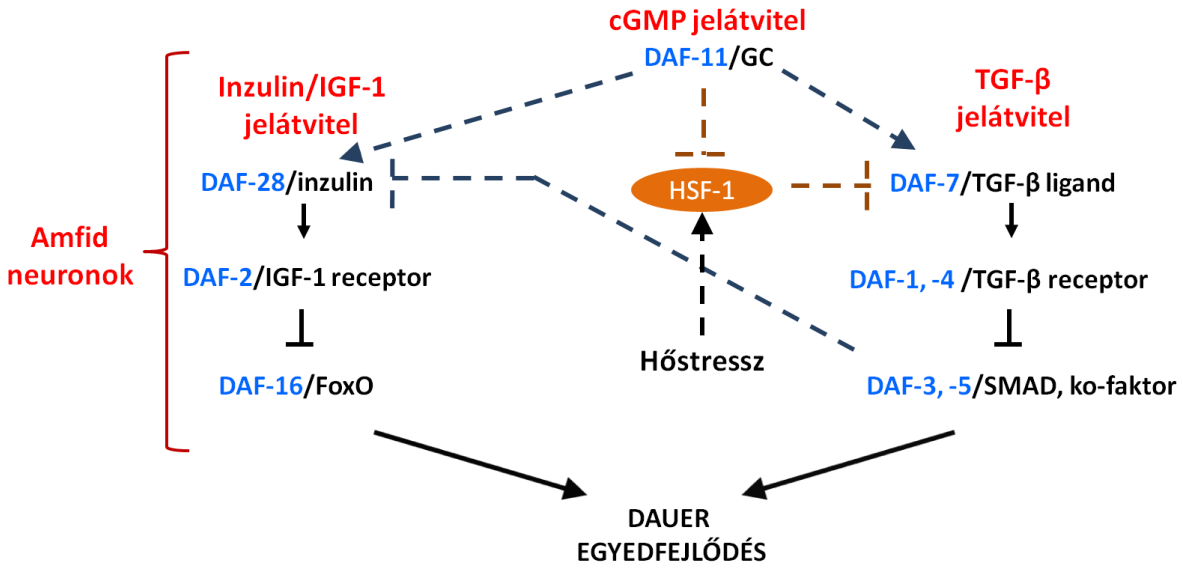
7.1. A HSF-1 transzkripciós faktor nem klasszikus hősokk fehérjéket kódoló géneket szabályoz

Az eddig azonosított HSF1 célgének többsége klasszikus hősokk fehérjét kódol, amelyek a sejtet védik a stressz hatására kialakuló fehérjekárosító hatásoktól [216]. Az utóbbi évek kutatásai során azonban kiderült, hogy a HSF1 a klasszikus hősokk fehérjéket kódoló gének mellett más gének átíródását is szabályozhatja. Számos vizsgálat támasztja ezt alá. Hahn és munkatársai élesztőben olyan HSF1 célgéneket azonosítottak, amelyek által kódolt fehérjéknek az anyagcserében, a vezikuláris transzporban, az energiaháztartásban, valamint a jelátvitelben van szerepük [217]. Néhány közlemény tanúsága szerint az emlős hősokk transzkripciós faktor család tagjainak fejlődésbiológiai folyamatokban is szerepük van: ivarsejtképzés, agykéreg és az érzékszervek kialakulása, öregedés és a rák [37, 39, 40, 45-47, 56-58]. Ennek megfelelően számos nem klasszikus hősokk fehérjét kódoló HSF célgént azonosítottak. Ilyenek többek között a FGF (fibroblaszt növekedési faktor) ligandumot [39], az αB-krisztallint [218], az Il-1 bétát (interleukin-1) [219], és a Lif1-et (*Leukemia inhibitory factor 1*) [220] kódoló gének. Néhány közleményben a HSF-ek transzkripciót gátló szerepéről is beszámoltak [220-222].

Jelen munkában kimutattuk, hogy a HSF-1 két további - nem klasszikus hősokk - fehérjét kódoló gént, a *daf-7/TGF-β* és a *daf-9/cytochrome P450* gén kifejeződését szabályozza *C. elegans*ban. Mindkét gén 5' szabályozó régiójában konzervált HSF-1 kötőhely található, és expressziójuk HSF-1 függő. A *daf-7* esetében a HSF-1 aktivitás mellett a HSF-1 kötőhely is szükséges a génkifejeződés gátlásához *daf-11(-)* mutáns háttérben, tehát a *daf-7* minden bizonnyal a HSF-1 közvetlen transzkripcionális célgénje. A *daf-9* esetében hasonló vizsgálatot nem végeztünk. Jelen adatok alapján tehát nem eldönthető, hogy a HSF-1 közvetlenül szabályozza a *daf-9* transzkripcióját, noha egy nemrég megjelent közlemény szerint egy másik citokróm P450 fehérjét kódoló gén, a *dod-13/cyp35B1,* transzkripcióját a *C. elegans* belét alkotó sejtjeiben a HSF-1 aktiválja [223]. Mindent összevetve tehát a HSF-1 két nem klasszikus hősokk fehérjét kódoló, az egyedfejlődést, az öregedést és az anyagcserét szabályozó jelátvitelben kulcsszerepet játszó gén kifejeződét befolyásolja.

7.2. A HSF-1 transzkripciós faktor gátolja a *daf-7* gén expresszióját

Eredményeink arra utalnak, hogy a HSF-1 közvetlenül gátolja a *daf-7* gén transzkripcióját. A *daf-7* a TGF-β ligandumot kódolja, amely a féreg reproduktív egyedfejlődésének fenntartásához szükséges TGF-β jelátvitelt aktiválja (47. ábra). Ez a szabályozási kapcsolat magyarázatot adhat arra, hogy miért képeznek dauer lárvát a vad típusú fonalférgek megfelelő táplálékellátottság esetén is magas - 25°C feletti - hőmérsékleten. Jól összeegyeztethető ezzel a modellel az is, hogy a hőmérséklet emelésével megnő a HSF-1 aktivitása [224], ugyanakkor a *daf-7* expressziója jelentősen csökken, és alacsony penetranciával a vad típusú állatok is dauer lárvát képeznek [142, 152, 206]. Az a tény azonban, hogy magas hőmérsékleten (27°C) a vad típusú állatoknak csak mintegy 5- 10%-a fejlődik dauer lárvaként [142], magyarázható azzal, hogy DAF-11/GC ezen a hőmérsékleten is képes gátolni a HSF-1-et az ASI neuronokban.



47. ábra: A dauer feromon-szenzitív DAF-11/GC jelátvitel a HSF-1 gátlása révén segíti elő a reproduktív egyedfejlődést. Az ASI amfid neuronokban a DAF-11/GC gátolja a HSF-1-et. A hőmérséklet emelésével azonban nő a HSF-1 aktivitás, aminek következtében a *daf-7* expresszió lecsökken, ezáltal a dauer egyedfejlődési program indukálódik. A nyilak serkentő, míg a talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek. A kék szaggatott vonalak a jelátviteli útvonalak közti kapcsolatot jelölik. A vörös szaggatott vonalak jelen munkában feltárt kapcsolatokat jelölik. (GC = guanilát-cikláz **).**

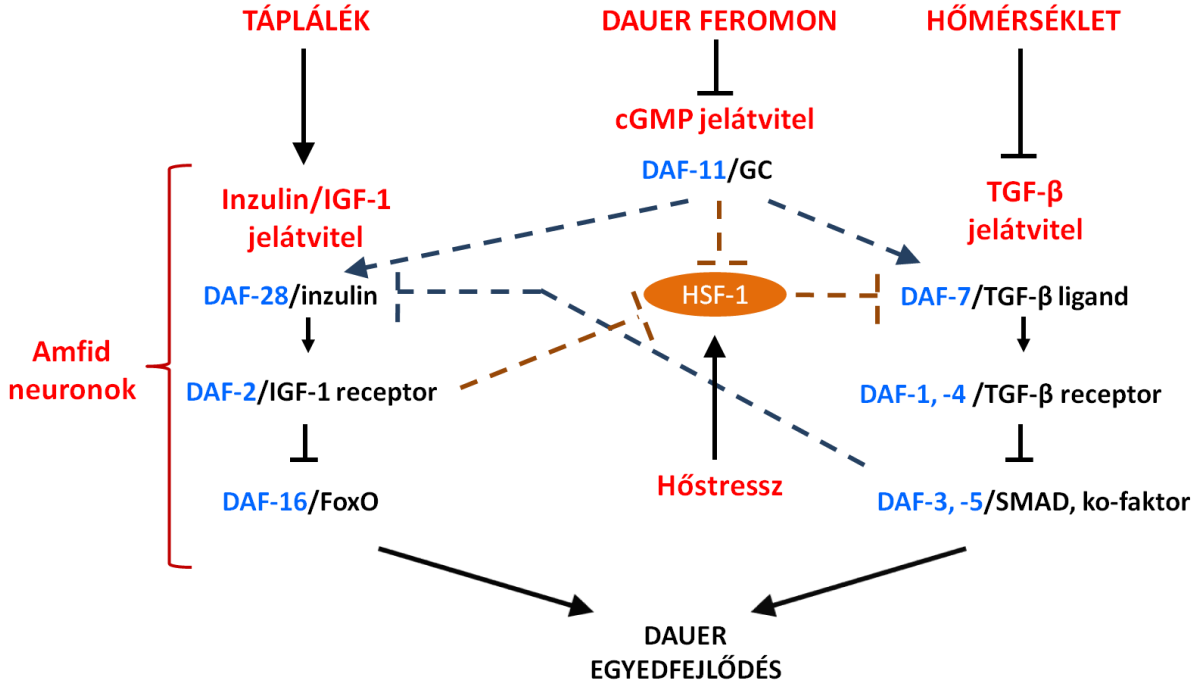
Az a megfigyelés, hogy *daf-11(-)* mutáns háttérben a *daf-7* transzkripcionális gátlása HSF-1 függő, arra is utalhat, hogy a HSF-1 aktivitását a DAF-11 gátolja. A DAF-11 egy receptor guanilát cikláz, amelynek a kémiai anyagok (pl. a dauer feromon) érzékelésében és az állat viselkedésének szabályozásában van szerepe [225]. Érdekes módon különböző állatfajok számos viselkedési mintázatát a környezeti hőmérséklet befolyásolja.

7.3. A HSF-1 integrálja a dauer egyedfejlődést elősegítő tényezők hatását

Az inzulin/IGF-1 és TGF-β jelátviteli útvonalak a *C. elegans* számos egyedfejlődési és élettani aspektusát együttműködve befolyásolják. Ilyenek többek között a dauer vs. normális reproduktív egyedfejlődés eldöntése, az anyagcsere, a stresszel szembeni ellenálló képesség és az élethossz szabályozása [141, 163, 164, 167]. Li és munkatársai kimutatták, hogy *C. elegans*ban egy inzulin-szerű peptidet kódoló *daf-28* expresszióját a guanilát cikláz útvonal mellett a TGF-β jelátvitel is aktiválja [154]. Chiang és munkatársai leírták, hogy az inzulin receptort kódoló *daf-2* funkcióvesztése következtében megnő a HSF-1 aktivitása [210].

Megfigyeléseink szerint az inzulin receptor defektív *daf-2(-)* mutáns állatokban csökken a *daf-7* expressziója, és ehhez a csökkenéshez HSF-1 aktivitásra van szükség (HSF-1 hiányában az expresszió a vad típusra jellemző, tehát erős). Az inzulin/IGF-1 jelátvitel tehát HSF-1 függő módon képes aktiválni a TGF-β útvonalat. Mindezek alapján a HSF-1 szerepét a dauer egyedfejlődés szabályozásában az 48. ábrán látható modell szerint képzelhetjük el.

A modell megmagyarázza a dauer egyedfejlődést elősegítő tényezők (magas hőmérséklet, éhezés, illetve nagy egyedsűrűség) szinergisztikus hatását.



48. ábra: A dauer egyedfejlődést befolyásoló környezeti tényezők hatását a HSF-1 integrálja *C. elegans*ban. A guanilát cikláz útvonal az egyedsűrűséget (az állatok számával arányos dauer feromont), míg az inzulin/IGF-1 jelátvitel a táplálék ellátottságot érzékeli. Mindkét jelátviteli útvonal aktivitása a reproduktív egyedfejlődés fenntartásához szükséges. Éhezés hatására az inzulin/IGF-1, míg dauer feromon jelenlétében a GC jelátvitel aktivitása csökken, és a TGF-β útvonalon keresztül a dauer egyedfejlődési út indukálódik. Magas hőmérsékleten, illetve más fehérjekárosodást kiváltó stressz hatására a HSF-1 aktivása megnő. Az aktív HSF-1 a *daf-7* transzkripcióját gátolja, aminek következtében a TGF-β jelátvitel aktivitása csökken. A jelátviteli útvonalak közti kölcsönösen

serkentő kapcsolatok tehát alkalmassá teszik ezt a szabályozási hálózatot arra, hogy a dauer egyedfejlődést elősegítő és gátló környezeti tényezők integrálódjanak és együttesen határozzák meg azt, hogy az L1 lárva végül a dauer vagy a reproduktív egyedfejlődési út mellett köteleződik el.
A nyilak serkentő, míg a talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek. A kék szaggatott vonalak a jelátviteli útvonalak közti kapcsolatot jelölik. A vörös szaggatott vonalak jelen munkában feltárt kapcsolatokat jelölik. (GC = guanilát-cikláz).

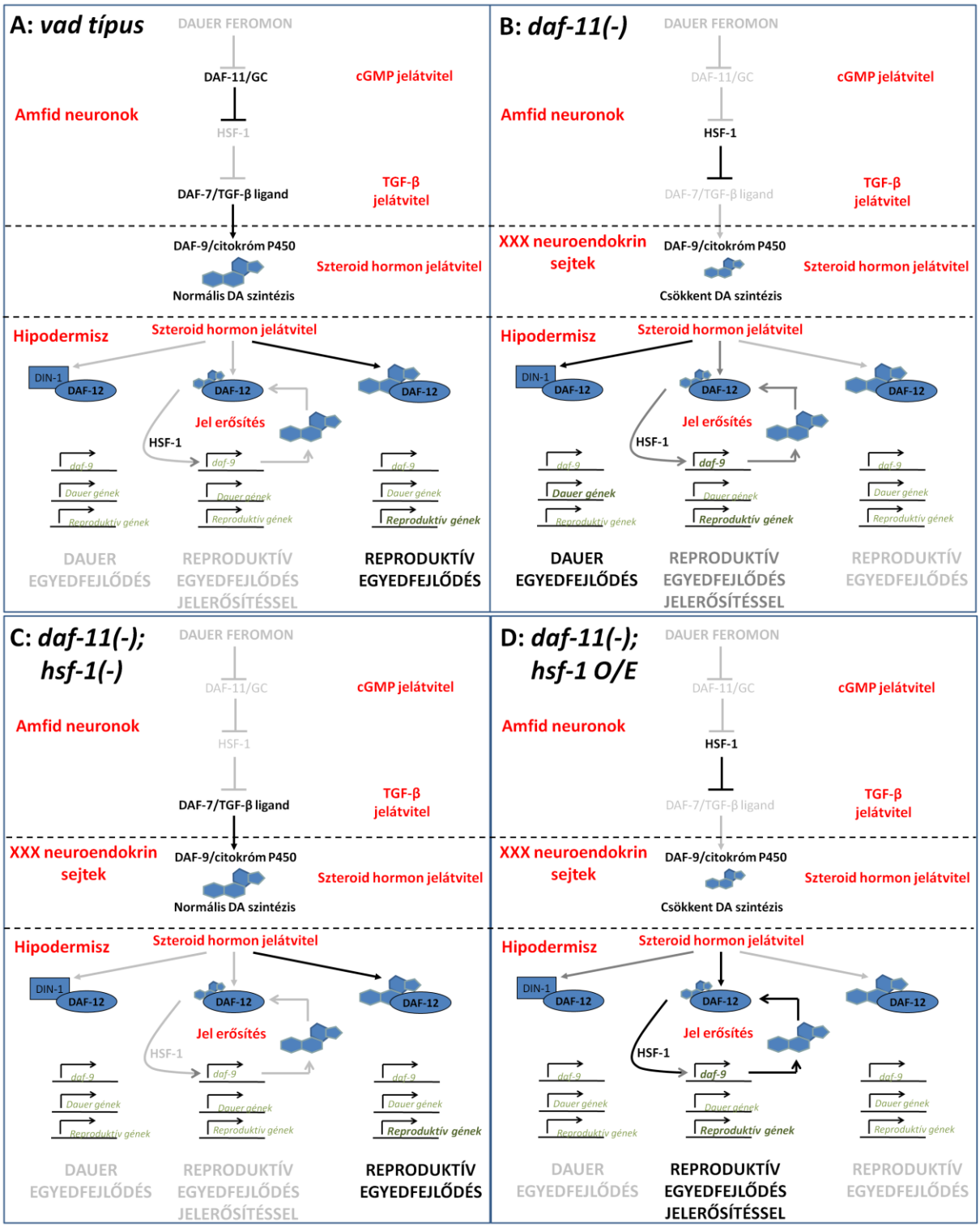
7.4. A HSF-1 szerepe a dauer egyedfejlődés finomszabályozásában

Eredményeink szerint a HSF-1 aktiválja a *daf-9/cytochrome P450* gén kifejeződését a hipodermiszben. A DAF-9 a reproduktív egyedfejlődéshez szükséges hormonszerű dafakronikus sav szintézisében vesz részt. A jelenlegi modell szerint „erős" stressz esetén a GC, inzulin/IGF-1 és DAF-7/TGF-β jelátvitelek csökkent működésének következtében a neuroendokrin XXX sejtekben nem expresszálódik *daf-9*, így nem képződik dafakronikus sav (hormon) sem. Ennek következtében az állatok dauer lárvaként fejlődnek [141] (21. ábra). Enyhébb stressz esetén azonban az XXX sejtekben még kis mennyiségben termelődik hormon, így az XXX sejtek közelében lévő hipodermisz sejtekben kialakulhat a dafakronikus savat kötő DAF-12 magi hormon receptor, amely aztán aktiválja a *daf-9* gén kifejeződését. Ennek hatására ezekben a sejtekben is termelődhet dafakronikus sav, így a szomszédos sejtekben is megemelkedik a hormon-kötött DAF-12 szintje, és beindul a reproduktív egyedfejlődési program. A DAF-9 – dafakronikus sav – DAF-12 – *daf-9* pozitív visszacsatolási kör tehát megakadályozza azt, hogy szteroid hormon koncentráció függvényében a féreg egyes sejtjei a dauer, míg mások a reproduktív egyedfejlődési útra lépjenek (21. ábra) [204].

Eredményeink szerint ezt a folyamatot is befolyásolhatja a HSF-1. Dauer egyedfejlődést indukáló körülmények között [*daf-11(-)* mutánsokban, illetve magas hőmérsékleten] a *daf-9* expressziója jelentősen megemelkedik a reproduktívan fejlődő állatok hipodermiszében. *daf-11(-); hsf-1(sy441)* kettős mutánsokban azonban nem figyelhető meg hasonló *daf-9* expressziós szint változás. A DAF-9 – dafakronikus sav – DAF-12 – *daf-9* jelerősítési kör működését tehát a HSF-1 befolyásolja.

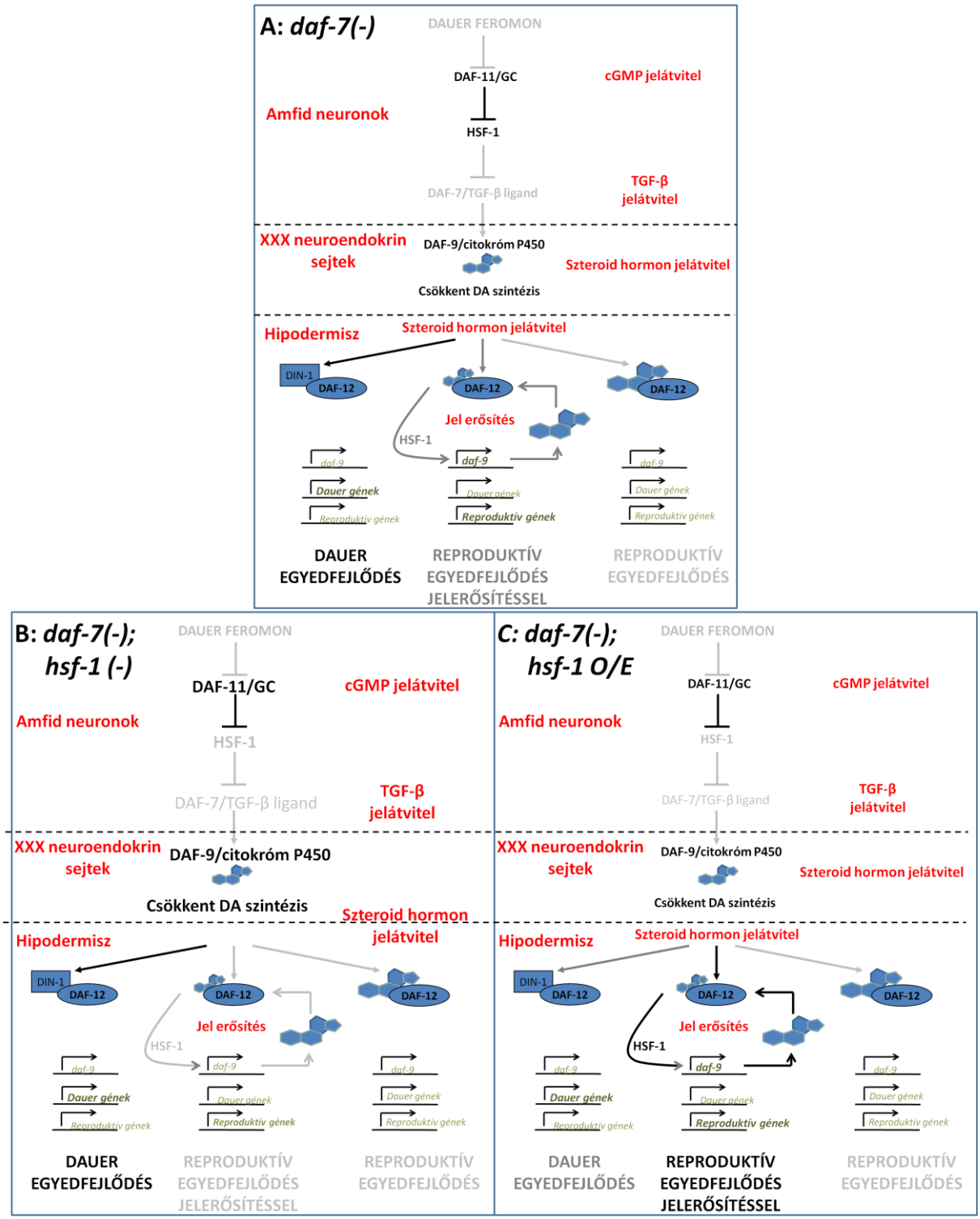
Eredményeink alapján a HSF-1 hatása a *daf-9* génkifejeződésre más módon is magyarázható. *daf-11(-); hsf-1(sy441)* kettős mutáns törzsben ugyanis a *daf-7* expressziója nem gátolt (25. ábra), így elegendő dafakronikus sav képződhet az XXX sejtekben ahhoz, hogy az állat összes sejtjében kialakuljon a szteroid hormonkötött DAF-12. Ebben az esetben nincs szükség a jel hipodermális erősítésére ahhoz, hogy az állatok reproduktívan fejlődjenek.

Ennek ellentmond azonban az a megfigyelésünk, hogy *daf-7(-)* mutáns háttéren a HSF-1 hiányában nő, míg a *hsf-1* túltermelésének hatására csökken a dauer lárvák aránya. Ez az ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy a HSF-1 szerepe a dauer egyedfejlődés szabályozásában kettős: egyrészt a *daf-7* géntől *upstream* az ASI neuronokban a HSF-1 gátolja a *daf-7* kifejeződését, és így a dauer lárva képződést serkenti, másrészt a *daf-7*-től *downstream* az alacsonyabb dafakronikus sav szint által kiváltott hipodermális jelerősítésben betöltött szerepe révén a reproduktív egyedfejlődést segíti elő. E modell szerint (49. és 50. ábra) *daf-7(-); hsf-1(-)* kettős mutáns állatok azért képeznek több dauer lárvát, mint a *daf-7(-)* egyszeres mutánsok, mert csökkent dafakronikus savat termelő – a dauer és a reproduktív egyedfejlődés között „ingadozó" – *daf-7(-); hsf-1(-)* kettős mutáns állatokban a hipodermális jelerősítés nem működik megfelelően. *daf-11(-); hsf-1(-)* kettős mutánsokban azonban több dafakronikus sav képződhet, így az ingadozó állatok aránya is alacsonyabb lehet, vagyis a jelerősítés hatása is kisebb. Ezt a modellt alátámasztaná az, hogy ha *daf-11(-); hsf-1(sy441)* kettős mutáns állatokhoz hasonlóan *daf-7(-); hsf-1(sy441)* kettős mutánsokban is csökkenne a hipodermális *daf-9* expressziója, *daf-7(-)* mutáns állatokban tapasztaltakhoz képest. A modell arra is magyarázatot adhat, hogy miért csökken a dauer lárvák aránya *daf-11(-)* háttérben a *hsf-1* túltermelése [*daf-11(m47); hsf-1O/E*) és hiánya (*daf-11(m47); hsf-1(sy441)*] esetén egyaránt (49. ábra).



49. ábra: *daf-11(-)* mutáns háttérben a HSF-1 hiánya és túltermelése is csökkent dauer képzéshez vezet. (A) Vad típusú állatokban kedvező környezeti feltételek mellett a DAF-11/GC a HSF-1 gátlásán keresztül biztosítja a *daf-7/TGF-β* expresszióját. A TGF-β jelátvitel működése lehetővé teszi, hogy a DAF-9 a neuroendokrin XXX sejtekben a reproduktív egyedfejlődést fenntartó dafakronikus sav (DA) hormont szintetizáljon. A DA-at kötő DAF-12/NHR a reproduktív egyedfejlődési programot indukálja. (B) *daf-11(-)* mutáns genetikai háttérben az ASI idegsejtekben a HSF-1 felszabadul a gátlás alól, és gátolja a *daf-7* gén kifejeződését. Ennek következtében az XXX

neuroendokrin sejtekben lecsökken a *daf-9* gén expressziós szintje, így nem képződik elegendő DA, és a hipodermiszben a dauer egyedfejlődés programot indukáló DIN-1-DAF-12 komplex alakul ki. A csökkent DA szint ellenére reproduktívan fejlődő állatokban a HSF-1 függő jelerősítés hatására megnövekedik a *daf-9* szintje a hipodermiszben. Az így megnövekedett DAF-9 aktivitás lehetővé teszi, hogy elegendő DA képződjön ahhoz, hogy az állat összes sejtjében a reproduktív egyedfejlődési program indukálódjon. (C) *daf-11(-); hsf-1(-)* kettős mutáns háttérben a *daf*-7 expressziója a HSF-1 hiányában nem gátolt, így elegendő DA képződik. Az állatok hipodermális jelerősítés hiányában is reproduktívan fejlődnek. (D) *daf-11(-) ; hsf-1 O/E* genetikai háttérben a a *daf-7* expressziója csökkent, azonban a megnövekedett HSF-1 aktivitás következtében a hipodermális jelerősítés mértéke is megnő, ezáltal az állatok többsége reproduktívan fejlődik. A nyilak serkentő, míg a talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek. A nyilak színének intenzitása a szabályozási kapcsolat „erősségével" arányos. (DA = dafakronikus sav; NHR = nukleáris hormon receptor). A *hsf-1 O/E* HSF-1-et túltermelő törzset jelöl.



50. ábra: *daf-7(-)* mutáns háttérben a HSF-1 hiányában nő, míg túltermelése esetén csökken a dauer lárvák aránya: (A) *daf-7(-)* null mutáns háttérben, a DAF-7/TGF-β jelátvitel hiányában kevesebb DA termelődik az XXX sejtekben. A hipodermiszben a DIN-1-DAF-12 komplex a dauer egyedfejlődést indítja be. Csökkent DA termelés ellenére a reproduktív fejlődési úton elindult állatokban a jelerősítés hatására megnövekedik a DAF-9 szintje a hipodermiszben. (B) Az XXX sejtekben a DA szintézis *daf-7(-); hsf-1(-)* kettős mutáns háttérben is csökkent mértékű. HSF-1 hiányában a hipodermális jelerősítés mértéke csökken, így az egyébként reproduktívan fejlődő állatok is dauer lárvaként fejlődnek. (C) *daf-7(-); hsf-1O/E* genetikai háttérben a csökkent DA szintézist a

megemelkedett HSF-1 szint következtében megnövekedett hipodermális jelerősítés kompenzálja, így a lárvák nagyobb arányban fejlődnek reproduktív felnőtté. A nyilak serkentő, míg a talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek. A nyilak színének intenzitása a szabályozási kapcsolat „erősségével" arányos. (DA = dafakronikus sav; NHR = nukleáris hormon receptor). A *hsf-1 O/E* HSF-1-et túltermelő törzset jelöl.

7.5. A HSF-1 kettős szabályozó szerepének jelentősége a dauer egyedfejlődésben

A HSF-1 a *daf-7* gátlásán keresztül elősegíti, míg a *daf-9* aktiválásán keresztül gátolja a dauer egyedfejlődést. Mi lehet ennek a kettős szabályozási megoldásnak a következménye?

A *C. elegans* faj a mérsékelt és a trópusi égöv alatt terjedt el. Ezeken az éghajlatokon a hőmérséklet gyakran szökik 25°C fölé. Ráadásul a *C. elegans* a természetben gyakran komposztot, rothadó növényi részeket, gyümölcsöket kolonizál [226]. A hőmérséklet ebben a környezetben sokszor meghaladhatja az ideális tartomány felső határát, a 25°C-ot. Ha tápanyag jelenlétében a magas hőmérséklet hatására a *C. elegans* populáció egésze dauer lárvát képezne, akkor az ugyanazt a táplálékot hasznosító más fajokkal szemben hátrányban lenne. Előnyös tehát a faj fennmaradása szempontjából, ha a populációban magas hőmérsékleten reproduktívan fejlődő állatok és kitartó dauer lárvák egyaránt előfordulnak.

A HSF-1 kettős - dauer egyedfejlődést indukáló (*daf-7* represszálásán keresztül), illetve gátló (*daf-9* aktiválásán keresztül) – szabályozó szerepe egyszerre teszi lehetővé, hogy a populáció biztosan túléljen (néhány dauer lárva), illetve szaporodjon (sok reproduktív felnőtt). Ez a „genetikai" megoldás nagyban hozzájárulhatott a *C. elegans* populációk fitneszének maximalizálásához és evolúciós fennmaradásához.

7.6. A HSF-2 a reproduktív egyedfejlődést segíti elő

Gerincesekben a hősokk faktor fehérjecsaládba számos paralóg fehérje tartozik. A gerinctelenek genomjában eddig azonban csak egyetlen hősokk faktort kódoló gént írtak le, a *hsf-1*-et. Munkánk során a *C. elegans* genomjában egy HSF-1 paralógot azonosítottunk, ezt *hsf-2*-nek neveztük el. Gerincesekben a HSF paralógok hasonló doménszerkezettel rendelkeznek: DNS-kötő, HR-A/B és HR-C doménekkel. Ezzel szemben a *hsf-2* által kódolt fehérje a HSF-1 klasszikus doménjei közül csak a DNS-kötő doménnel rendelkezik. Hasonló doménszerkezettel rendelkeznek a humán azoospermiával kapcsolatba hozott *HSFY* géncsaládba tartozó gének által kódolt fehérjék is. Ezen fehérjékben is csupán egyetlen domént, a HSF típusú DNS-kötő domént azonosítottak [227, 228]. E géncsalád tagjai főként a

herében a spermiumokban fejeződnek ki, de kimutatták jelenlétüket a hasnyálmirigyben és az agy szöveteiben is. Pontos funkciójuk azonban jelenleg még nem ismert [228].

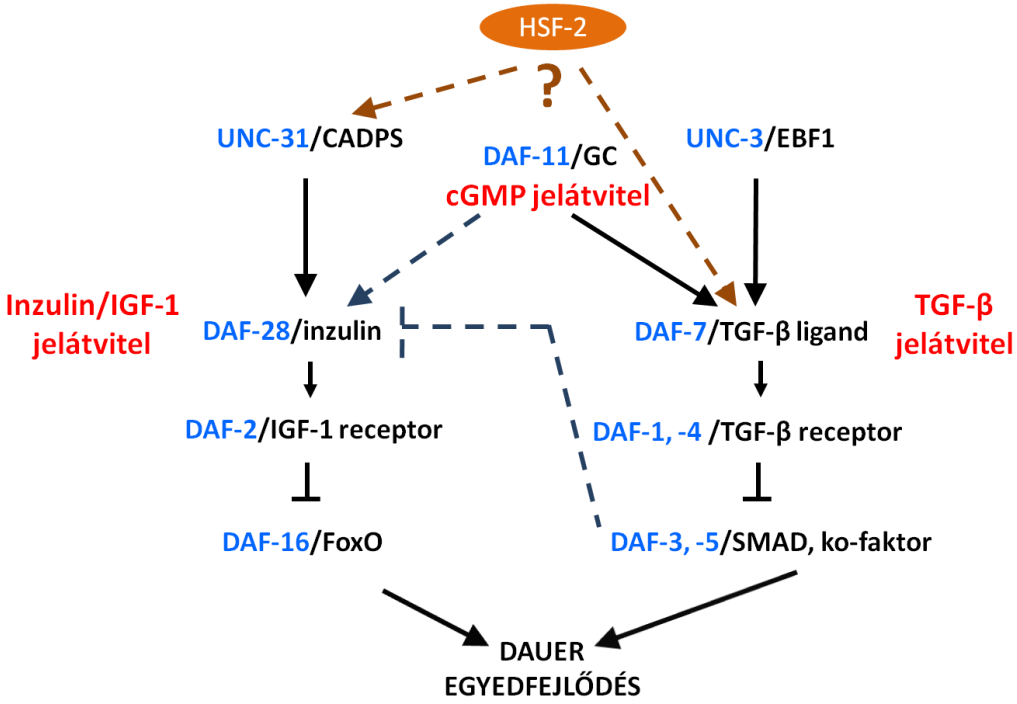
A *hsf-2* gén nem található meg az általam vizsgált más *Caenorhabditis* fajok (*C. briggsae*, *C. remanei*, *C. brenneri* és *C. japonica*) genomjában, ezért a *hsf-2* feltételezhetően e fajok szétválása után bekövetkező részleges tandem génduplikáció eredményeképpen jött létre. Erre utal az is, hogy a *hsf-2* a *hsf-1* közvetlen genomi környezetében helyezkedik el. Kevésbé valószínű, de elképzelhető az is, hogy a *hsf-2* a fentebb említett fajok közös ősében jött létre, majd a később kialakult fajok genomjából elveszett.

A gén duplikációs események nyersanyagot szolgáltatnak az evolúciós innovációk számára. Részleges duplikációval kialakult gének által kódolt fehérjék egyes doménjeik elvesztésének révén új funkciót nyerhetnek. Erre lehet újabb példa a *hsf-2* esete. A HSF-2 a HSF-1 klasszikus doménjei közül csak a DNS-kötő doménnel rendelkezik. A többi domén hiánya új tulajdonsággal ruházhatja fel a fehérjét. A humán HSF4a fehérjéknek például nincs HR-C és transzaktivációs doménjük [53, 229]. Az aktív trimer forma kialakulását gátló HR-C domén hiányában a HSF géncsalád többi tagjával ellentétben a HSF4a trimerek konstitutívan a sejtmagban lokalizálódnak [229]. Túltemelésük esetén pedig a HSF1 célgénjeinek szabályozó régiójaihoz kötnek és gátolják azok transzkripcióját [230, 231]. Elképzelhető tehát, hogy a *C. elegans* HSF-2-nek is hasonló szerepe lehet, azonban ennek alátámasztásához további vizsgálatokra van szükség.

A génduplikáció során a duplikált gén új szabályozási környezetbe kerülhet, így expressziós mintázata is megváltozhat [232]. Sajnos a *hsf-2* esetében az általunk készített *phsf-2::hsf-2::gfp* riporter segítségével nem sikerült gén expressziót detektálnunk. Ennek oka lehet az, hogy a transzgénből hiányoznak olyan szabályozó elemek, amelyek szükségesek a gén kifejeződéséhez. Megfigyelték, hogy a transzgént magas kópiaszámban tartalmazó *C. elegans* törzsekben a transzgének a csíravonalban csendesítődnek [233]. A transzgént egyetlen példányban bejuttató módszerrel [234] a *hsf-2* gén kifejeződése a csíravonalban is vizsgálható lenne.

A génduplikáció által képződött gének sokszor pszeudogénné válnak [235]. A *hsf-2* esetében a funkcióvesztéses mutáns fenotípus megléte azonban arra utal, hogy a *hsf-2* működő gén. A *hsf-2(tm4607)* mutáció a TGF-β jelátvitel működését befolyásoló *daf-11(-)* és *unc-3(-)* mutánsok Daf-c fenotípusát erősíti. Ugyanakkor az inzulin/IGF-1 jelátvitelre ható *unc-31(-)* és *daf-2(e1370)* mutáns állatok Daf-c fenotípusát nem befolyásolja. Mivel a HSF-2 hiánya a TGF-β útvonal defektív *daf-7(e1372)* mutánsok Daf-c fenotípusára sincs hatással, ezért

elképzelhető, hogy a *hsf-2* az *unc-31*-től *upstream* vagy azzal párhuzamosan fejti ki hatását az inzulin/IGF-1 jelátvitelre a dauer egyedfejlődés szabályozásában (51. ábra).



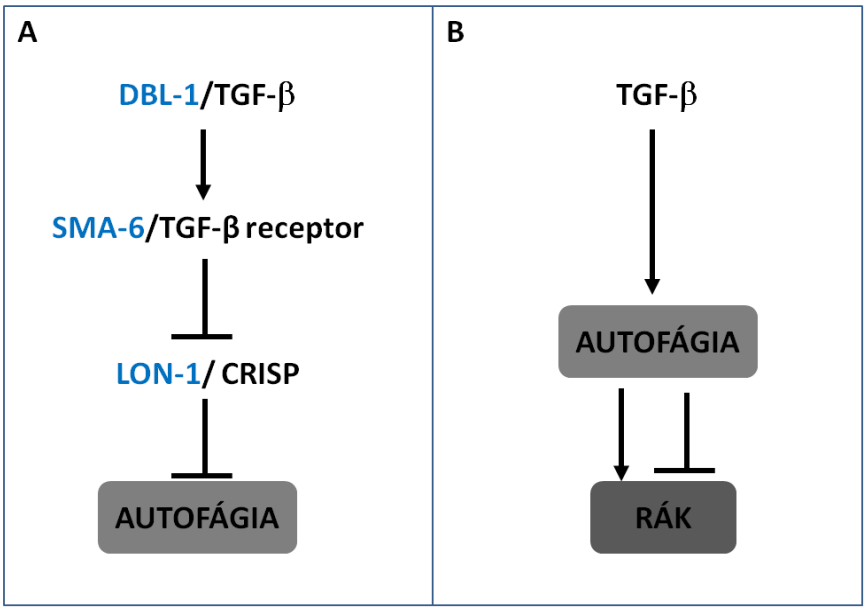
51. ábra: A HSF-2 gátolja a dauer egyedfejlődést. A HSF-2 az episztázis analízisek alapján az UNC-31-től *upstream* vagy azzal párhuzamosan gátolja a dauer egyedfejlődést. A nyilak serkentő, míg a talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek. A kék szaggatott vonalak a jelátviteli útvonalak közti kapcsolatokat jelölik. A vörös szaggatott vonalak jelen munka által sugallt kapcsolatokat jelölik. [GC = guanilát-cikláz; CADPS: kálcium függő szekréció aktivátor fehérje (*calcium-dependent activator protein for secretion*); EBF1: korai B-sejt transzkripciós faktor 1 *(early B-cell factor 1)*].

7.7. A TGF-β jelátvitel aktiválja az autofágiát *C. elegans*ban

Az inzulin/IGF-1 és DBL-1/TGF-β jelátviteli útvonalak részt vesznek a sejt- és testméret szabályozásában *C. elegans*ban [73, 75, 236]. Az inzulin/IGF-1 jelátvitel a TOR kináz aktiválásán keresztül az autofágiát is szabályozza [164]. Az *unc-51/ATG1* és *bec-1/ATG6* autofág gének funkcióvesztéses mutációi következtében a testméret csökken, ami arra utal, hogy az autofág géneknek szintén szerepük lehet a sejtméret szabályozásában.

Az autofág aktivitás vizsgálatára alkalmas *plgg-1::GFP::LGG-1* riporter konstrukciót tartalmazó törzsben a GFP-pozitív pontszerű struktúrák (feltehetően az autofagoszómák) száma *lon-1(e183)* mutánsokban jelentős növekedést mutatott a féreg hipodermális sejtjeiben a vad típusú genetikai háttérrel összehasonlítva. Ez arra utal, hogy a *lon-1* egyik funkciója az autofágia gátlása. A *lon-1* a DBL-1/TGF-β jelátvitel *downstream* komponense, a gén kifejeződését a DBL-1/TGF-β negatívan szabályozza. Eredményeink alapján az autofágiát a

DBL-1/TGF-β jelátvitel a *lon-1* gátlásán keresztül aktiválja. Ezt az eredmény számos más csoport eredménye is megerősíti. Kimutatták, hogy szarvasmarha emlő sejtek [237], valamint máj és emlő karcinóma sejtek [238, 239] tenyészetében a TGF-β aktiválja az autofágiát.



52. ábra: A DBL-1/TGF-β jelátvitel aktiválja az autofágiát. (A) A DBL-1/TGF-β jelátvitel a LON-1/CRISP gátlása révén aktiválja az autofágiát. (B) A TGF-β jelátvitel emlős és *C. elegans* rendszerekben egyaránt aktiválja az autofágiát. Mivel az autofágiának a TGF-β jelátvitelhez hasonlóan tumorszuppresszor és rák kialakulását segítő hatását is kimutatták, elképzelhető, hogy a TGF-β jelátvitel és az autofágia közti szabályozási kapcsolat a rák kialakulásában és fejlődésében is fontos szerepet játszhat. A nyilak serkentő, míg a talpas nyilak gátló kapcsolatot jelölnek. (CRISP = *cysteine-rich secretory protein*).

A TGF-β jelátvitel a sejtnövekedést, differenciációt és sejtvándorlást szabályozza. Az autofágiához hasonlóan [240, 241] a TGF-β jelátvitel rákban betöltött szerepe kettős: tumorszuppresszor és a tumor kialakulását elősegítő szerepe egyaránt ismert [242, 243]. A rák kialakulásának korai fázisában a sejtnövekedés gátlása révén tumorszuppresszor hatású, ugyanakkor a karcinogenezis későbbi fázisaiban a TGF-β az áttétek képződését segítheti elő. Mindezek arra utalnak, hogy a TGF-β jelátvitel és az autofágia közti szabályozási kapcsolat a rák kialakulásában és fejlődésében is fontos szerepet játszhat (52. ábra).

.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A környezeti stressz fehérjekárosító hatásának kivédésére a sejtekben különböző védelmi mechanizmusok indukálódnak. Ilyenek a sejtes komponensek lebontását végző autofágia, valamint a hősokk-válasz, amelynek során a HSF1 (*heat shock transcription factor 1*) *chaperone* gének kifejeződésének aktiválásán keresztül lehetővé teszi a károsodott fehérjék térszerkezetének helyreállítását vagy lebontását. Doktori munkám célja a *C. elegans* stressz-válaszát szabályozó konzervált jelátviteli tengelyek közötti új kapcsolatok feltárása volt.

*C. elegans*ban a DAF-7/TGF-β jelátviteli útvonal az inzulin/IGF-1, és a guanilát-cikláz/GC jelátviteli útvonalakkal szorosan együttműködve szabályozza a kedvezőtlen környezeti feltételek hatására bekövetkező hosszú életű, stressz rezisztens dauer lárva egyedfejlődést és az öregedést. A három említett útvonal végeredményben a reproduktív egyedfejlődés fenntartásához szükséges szteroid hormon, a dafakronikus sav (DA) képződését szabályozza. A DA szintézis egyik kulcslépését a DAF-9/CYP450 katalizálja.

A genetikai modellrendszer fonalféreg *Caenorhabditis elegans* genomjában *in silico* módszerrel konszenzus HSF-1 kötőhelyeket azonosítottunk a *daf-7/TGF-β,* valamint a *daf-9/cyp450* gének cisz szabályozó régiójában.

Kimutattuk, hogy a HSF-1 kettős szerepet tölt be a *C. elegans* lárvális egyedfejlődésének szabályozásában: a *daf-7* represszálása révén elősegíti, míg a *daf-9* gén aktiválásán keresztül gátolja a dauer képződést. A HSF-1 e kettős hatásának eredője teszi lehetővé, hogy kedvezőtlen környezeti körülmények esetén a populáció túléljen (néhány dauer lárva), illetve szaporodjon (sok reproduktív felnőtt). Eredményeink szerint a táplálék ellátottságot érzékelő inzulin/IGF-1 és az egyedsűrűséggel arányos dauer feromont érzékelő DAF-11/GC jelátviteli rendszerek HSF-1-függő módon szabályozzák a TGF-β ligandumot kódoló *daf-7* gén kifejeződését. Vagyis a HSF-1 egy bonyolult szabályozási hálózat központi elemeként hangolja össze az egyedfejlődést, a stressz-választ, és az öregedést befolyásoló konzervált jelátviteli útvonalak működését.

Kimutattuk továbbá, hogy a *C. elegans* genomban a HSF-1 mellett egy további hősokk transzkripciós faktor-szerű fehérjét kódoló gén található. Ezen gén (*hsf-2*) genetikai és expressziós elemzését megkezdtük. Kimutattuk, hogy a *hsf-2* is befolyásolja a *C. elegans* dauer egyedfejlődési programját.

Végül bizonyítékot szolgáltattunk arra, hogy a *C. elegans* DBL-1/TGF-β jelátviteli rendszer aktiválja a sejtnövekedésben szerepet játszó autofágiát.

9. SUMMARY

Protein damage cauesed by various environmental stresses induces distinct cell protective mechanisms, such as autophagy and heat shock response. Autophagy eliminates damaged cellular components. During heat shock response HSF1 (*heatshock trancription factor 1*) helps to refold or to degrade damaged proteins via activation of chaperone gene expression. The aim of my work was to discover crosstalks between signalling pathways that regulate stress response in *C. elegans*. The aim of my work was to discover crosstalks between signalling pathways that regulate stress response in *C. elegans*.

In *C. elegans*, the DAF-7/TGF-β, insulin/IGF-1 and DAF-11/GC signalling regulate dauer larva formation, a highly stress-resistant, longlived larval form induced by unfavorable environmental conditions. These three distinct signalling systems regulate the synthesis of the steroide hormone dafachronic acid (DA). DA promotes reproductive growth and inhibits dauer larva development. A key step of DA synthesis is catalized by DAF-9/CYP450.

We identified in the *C. elegans* genome putative HSF-1 binding sites by *in silico* methods. We found that one of these sites is located in the 5' regulatory region of *daf-7* encoding a TGF-β ligand, and also in the cis-regulatory sequence of *daf-9*, which encodes a cytochrom P450 protein. Thus, *daf-7* and *daf-9* are potential transcriptional targets of HSF-1.

HSF-1 plays a dual role in the regulation of *C. elegans* larval development. First it promotes dauer larva formation by repressing *daf-7*, and second, inhibits dauer development via activation of *daf-9*. The overall impact of HSF-1 is to enhance the ability of *C. elegans* populations to survive (dauer larvae) and reproduce (reproductive adults) simultaneously under harsh environmental conditions. According to our results, systemic nutritional status sensing insulin/IGF-1 and crowding pheromone sensitive DAF-11/guanylate cyclase inhibits the HSF-1 protein, which in turn represses *daf-7* encoding a *TGF-β* ligand. Thus, a complex regulatory interaction mediated by HSF-1 exists among the TGF-β, guanylate cyclase/cGMP and insulin/IGF-1 signaling systems to affect development and lifespan in response to various environmental factors.

We further identified another heat shock factor-related protein (HSF-2), and initiated its genetic analysis. We found that *hsf-2* is also involved in the regulation of *C. elegans* dauer formation; however, unlike *hsf-1*, this gene inhibits dauer development.

Finally, we provided evidence that the *C. elegans* DBL-1/TGF-β pathway activates autophagy in cell growth control.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ritossa, F.M., *Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of Drosophila.* Exp Cell Res, 1964. **35**: p. 601-7.
2. Tissieres, A., H.K. Mitchell, and U.M. Tracy, *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs.* J Mol Biol, 1974. **84**(3): p. 389-98.
3. Lewis, M., P.J. Helmsing, and M. Ashburner, *Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of Drosophila.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3604-8.
4. Lindquist, S., *The heat-shock response.* Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 1151-91.
5. Morimoto, R.I., *Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators.* Genes Dev, 1998. **12**(24): p. 3788-96.
6. Morimoto, R.I., *Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging.* Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1427-38.
7. Eisen, M.B., et al., *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14863-8.
8. Gasch, A.P., et al., *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4241-57.
9. GuhaThakurta, D., et al., *Identification of a novel cis-regulatory element involved in the heat shock response in Caenorhabditis elegans using microarray gene expression and computational methods.* Genome Res, 2002. **12**(5): p. 701-12.
10. Larkindale, J. and E. Vierling, *Core genome responses involved in acclimation to high temperature.* Plant Physiol, 2008. **146**(2): p. 748-61.
11. Matsuura, H., et al., *Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in Arabidopsis thaliana.* Plant Cell Physiol, 2010. **51**(3): p. 448-62.
12. Richter, K., M. Haslbeck, and J. Buchner, *The heat shock response: life on the verge of death.* Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 253-66.
13. Dobson, C.M., *Protein misfolding, evolution and disease.* Trends Biochem Sci, 1999. **24**(9): p. 329-32.
14. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains.* Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
15. Lindquist, S. and E.A. Craig, *The heat-shock proteins.* Annu Rev Genet, 1988. **22**: p. 631-77.
16. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.* Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
17. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(6): p. 670-84.
18. Qiu, X.B., et al., *The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones.* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(22): p. 2560-70.
19. Glover, J.R. and S. Lindquist, *Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins.* Cell, 1998. **94**(1): p. 73-82.
20. Ehrnsperger, M., et al., *Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation.* EMBO J, 1997. **16**(2): p. 221-9.

21. Csermely, P., et al., *The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review.* Pharmacol Ther, 1998. **79**(2): p. 129-68.
22. Buchner, J., *Hsp90 & Co. - a holding for folding.* Trends Biochem Sci, 1999. **24**(4): p. 136-41.
23. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.* Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 306-60.
24. Cohen, E. and A. Dillin, *The insulin paradox: aging, proteotoxicity and neurodegeneration.* Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(10): p. 759-67.
25. Arawaka, S., Y. Machiya, and T. Kato, *Heat shock proteins as suppressors of accumulation of toxic prefibrillar intermediates and misfolded proteins in neurodegenerative diseases.* Curr Pharm Biotechnol, 2010. **11**(2): p. 158-66.
26. Blagosklonny, M.V., *Re: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.* J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(3): p. 239-40.
27. Jolly, C. and R.I. Morimoto, *Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.* J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(19): p. 1564-72.
28. Workman, P. and M.V. Powers, *Chaperoning cell death: a critical dual role for Hsp90 in small-cell lung cancer.* Nat Chem Biol, 2007. **3**(8): p. 455-7.
29. Whitesell, L. and S.L. Lindquist, *HSP90 and the chaperoning of cancer.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 761-72.
30. Morimoto, R.I., *Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes.* Science, 1993. **259**(5100): p. 1409-10.
31. Pirkkala, L., P. Nykanen, and L. Sistonen, *Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond.* FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1118-31.
32. Wu, C., *Heat shock transcription factors: structure and regulation.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 441-69.
33. Amin, J., J. Ananthan, and R. Voellmy, *Key features of heat shock regulatory elements.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(9): p. 3761-9.
34. Akerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 545-55.
35. Fujimoto, M. and A. Nakai, *The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress.* FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4112-25.
36. McMillan, D.R., et al., *Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis.* J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7523-8.
37. Xiao, X., et al., *HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice.* EMBO J, 1999. **18**(21): p. 5943-52.
38. Chang, Y., et al., *Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression.* Genes Dev, 2006. **20**(7): p. 836-47.
39. Fujimoto, M., et al., *HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development.* EMBO J, 2004. **23**(21): p. 4297-306.
40. Min, J.N., et al., *Unique contribution of heat shock transcription factor 4 in ocular lens development and fiber cell differentiation.* Genesis, 2004. **40**(4): p. 205-17.
41. Shi, X., et al., *Removal of Hsf4 leads to cataract development in mice through down-regulation of gamma S-crystallin and Bfsp expression.* BMC Mol Biol, 2009. **10**: p. 10.

42. Fiorenza, M.T., et al., *Complex expression of murine heat shock transcription factors.* Nucleic Acids Res, 1995. **23**(3): p. 467-74.
43. Rallu, M., et al., *Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2392-7.
44. Abane, R. and V. Mezger, *Roles of heat shock factors in gametogenesis and development.* FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4150-72.
45. Kallio, M., et al., *Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice.* EMBO J, 2002. **21**(11): p. 2591-601.
46. McMillan, D.R., et al., *Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 8005-14.
47. Wang, G., et al., *Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis.* Genesis, 2003. **36**(1): p. 48-61.
48. Nakai, A., *Heat shock transcription factors and sensory placode development.* BMB Rep, 2009. **42**(10): p. 631-5.
49. Fujimoto, M., et al., *Analysis of HSF4 binding regions reveals its necessity for gene regulation during development and heat shock response in mouse lenses.* J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29961-70.
50. Rabindran, S.K., et al., *Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper.* Science, 1993. **259**(5092): p. 230-4.
51. Zuo, J., et al., *Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(11): p. 7557-68.
52. Chen, Y., et al., *Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity.* EMBO J, 1993. **12**(13): p. 5007-18.
53. Nakai, A., et al., *HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(1): p. 469-81.
54. Sorger, P.K. and H.R. Pelham, *Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation.* Cell, 1988. **54**(6): p. 855-64.
55. Wiederrecht, G., D. Seto, and C.S. Parker, *Isolation of the gene encoding the S. cerevisiae heat shock transcription factor.* Cell, 1988. **54**(6): p. 841-53.
56. Christians, E., et al., *Maternal effect of Hsf1 on reproductive success.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 693-4.
57. Hsu, A.L., C.T. Murphy, and C. Kenyon, *Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor.* Science, 2003. **300**(5622): p. 1142-5.
58. Morley, J.F. and R.I. Morimoto, *Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 657-64.
59. Walker, G.A., et al., *Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in Caenorhabditis elegans.* FASEB J, 2003. **17**(13): p. 1960-2.
60. Hajdu-Cronin, Y.M., W.J. Chen, and P.W. Sternberg, *The L-type cyclin CYL-1 and the heat-shock-factor HSF-1 are required for heat-shock-induced protein expression in Caenorhabditis elegans.* Genetics, 2004. **168**(4): p. 1937-49.
61. Singh, V. and A. Aballay, *Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for Caenorhabditis elegans immunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13092-7.

62. Singh, V. and A. Aballay, *Heat shock and genetic activation of HSF-1 enhance immunity to bacteria.* Cell Cycle, 2006. **5**(21): p. 2443-6.
63. Mohri-Shiomi, A. and D.A. Garsin, *Insulin signaling and the heat shock response modulate protein homeostasis in the Caenorhabditis elegans intestine during infection.* J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 194-201.
64. Cuervo, A.M., *Autophagy: many paths to the same end.* Mol Cell Biochem, 2004. **263**(1-2): p. 55-72.
65. Ericsson, J.L., *Studies on induced cellular autophagy. II. Characterization of the membranes bordering autophagosomes in parenchymal liver cells.* Exp Cell Res, 1969. **56**(2): p. 393-405.
66. De Duve, C. and R. Wattiaux, *Functions of lysosomes.* Annu Rev Physiol, 1966. **28**: p. 435-92.
67. Tsukada, M. and Y. Ohsumi, *Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Lett, 1993. **333**(1-2): p. 169-74.
68. Harding, T.M., et al., *Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway.* J Cell Biol, 1995. **131**(3): p. 591-602.
69. Thumm, M., et al., *Isolation of autophagocytosis mutants of Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Lett, 1994. **349**(2): p. 275-80.
70. Klionsky, D.J., et al., *A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes.* Dev Cell, 2003. **5**(4): p. 539-45.
71. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.* Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
72. Giguere V, B.R., Dennis EA *Steroid hormone receptor signaling.* Handbook of Cell Signaling, 2003. **Vol. 3**: p. 35–38.
73. McCulloch, D. and D. Gems, *Body size, insulin/IGF signaling and aging in the nematode Caenorhabditis elegans.* Exp Gerontol, 2003. **38**(1-2): p. 129-36.
74. Kamada, Y., et al., *Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy.* Mol Cell Biol, 2010. **30**(4): p. 1049-58.
75. So, S., K. Miyahara, and Y. Ohshima, *Control of body size in C. elegans dependent on food and insulin/IGF-1 signal.* Genes Cells, 2011. **16**(6): p. 639-51.
76. Mizushima, N. and B. Levine, *Autophagy in mammalian development and differentiation.* Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 823-30.
77. Ravikumar, B., et al., *Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology.* Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1383-435.
78. Funderburk, S.F., Q.J. Wang, and Z. Yue, *The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond.* Trends Cell Biol, 2010. **20**(6): p. 355-62.
79. Zhong, Y., et al., *Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 468-76.
80. Ohsumi, Y. and N. Mizushima, *Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(2): p. 231-6.
81. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *The role of Atg proteins in autophagosome formation.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 107-32.
82. Geng, J. and D.J. Klionsky, *The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series.* EMBO Rep, 2008. **9**(9): p. 859-64.
83. Mizushima, N., T. Noda, and Y. Ohsumi, *Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway.* EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3888-96.

84. Mizushima, N., et al., *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells.* J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.
85. Mizushima, N., et al., *Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 9): p. 1679-88.
86. Fujita, N., et al., *The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(5): p. 2092-100.
87. Ichimura, Y., et al., *A ubiquitin-like system mediates protein lipidation.* Nature, 2000. **408**(6811): p. 488-92.
88. Xie, Z., U. Nair, and D.J. Klionsky, *Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3290-8.
89. Abeliovich, H., et al., *Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps.* J Cell Biol, 2000. **151**(5): p. 1025-34.
90. Weidberg, H., et al., *LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis.* EMBO J, 2010. **29**(11): p. 1792-802.
91. Liou, W., et al., *The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles.* J Cell Biol, 1997. **136**(1): p. 61-70.
92. Berg, T.O., et al., *Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes.* J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21883-92.
93. Gordon, P.B., H. Hoyvik, and P.O. Seglen, *Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis.* Biochem J, 1992. **283 (Pt 2)**: p. 361-9.
94. Longatti, A. and S.A. Tooze, *Vesicular trafficking and autophagosome formation.* Cell Death Differ, 2009. **16**(7): p. 956-65.
95. Wang, C.W. and D.J. Klionsky, *The molecular mechanism of autophagy.* Mol Med, 2003. **9**(3-4): p. 65-76.
96. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy.* Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
97. Carrera, A.C., *TOR signaling in mammals.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4615-6.
98. Funakoshi, T., et al., *Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, Saccharomyces cerevisiae.* Gene, 1997. **192**(2): p. 207-13.
99. Scott, R.C., O. Schuldiner, and T.P. Neufeld, *Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body.* Dev Cell, 2004. **7**(2): p. 167-78.
100. Kamada, Y., et al., *Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex.* J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1507-13.
101. Reggiori, F., et al., *Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(5): p. 2189-204.
102. Sengupta, A., J.D. Molkentin, and K.E. Yutzey, *FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes.* J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 28319-31.
103. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo.* Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 458-71.
104. Zhao, J., et al., *FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells.* Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 472-83.
105. Manning, B.D., et al., *Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway.* Mol Cell, 2002. **10**(1): p. 151-62.
106. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.* Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.

107. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint.* Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.
108. Furuta, S., et al., *Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase.* Oncogene, 2004. **23**(22): p. 3898-904.
109. Pattingre, S., C. Bauvy, and P. Codogno, *Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16667-74.
110. Pattingre, S., et al., *Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy.* Cell, 2005. **122**(6): p. 927-39.
111. Pattingre, S., et al., *Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy.* J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2719-28.
112. Wei, Y., et al., *JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy.* Mol Cell, 2008. **30**(6): p. 678-88.
113. Zalckvar, E., et al., *DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy.* EMBO Rep, 2009. **10**(3): p. 285-92.
114. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.* Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
115. Ravikumar, B., et al., *Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins.* Nat Genet, 2005. **37**(7): p. 771-6.
116. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Eaten alive: a history of macroautophagy.* Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 814-22.
117. Kuma, A., et al., *The role of autophagy during the early neonatal starvation period.* Nature, 2004. **432**(7020): p. 1032-6.
118. Melendez, A., et al., *Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans.* Science, 2003. **301**(5638): p. 1387-91.
119. Berry, D.L. and E.H. Baehrecke, *Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila.* Cell, 2007. **131**(6): p. 1137-48.
120. Denton, D., et al., *Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila.* Curr Biol, 2009. **19**(20): p. 1741-6.
121. Sato, M. and K. Sato, *Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in C. elegans embryos.* Science, 2011. **334**(6059): p. 1141-4.
122. Al Rawi, S., et al., *Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission.* Science, 2011. **334**(6059): p. 1144-7.
123. Strome, S., *Specification of the germ line.* WormBook, 2005: p. 1-10.
124. Hird, S.N., J.E. Paulsen, and S. Strome, *Segregation of germ granules in living Caenorhabditis elegans embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation.* Development, 1996. **122**(4): p. 1303-12.
125. DeRenzo, C., K.J. Reese, and G. Seydoux, *Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation.* Nature, 2003. **424**(6949): p. 685-9.
126. Zhang, Y., et al., *SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in C. elegans.* Cell, 2009. **136**(2): p. 308-21.
127. Eisenberg, T., et al., *Induction of autophagy by spermidine promotes longevity.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1305-14.
128. Toth, M.L., et al., *Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in Caenorhabditis elegans.* Autophagy, 2008. **4**(3): p. 330-8.
129. Wong, E. and A.M. Cuervo, *Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases.* Nat Neurosci, 2010. **13**(7): p. 805-11.

130. Hidvegi, T., et al., *An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis.* Science, 2010. **329**(5988): p. 229-32.
131. Ebato, C., et al., *Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet.* Cell Metab, 2008. **8**(4): p. 325-32.
132. Yang, L., et al., *Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance.* Cell Metab, 2010. **11**(6): p. 467-78.
133. Kondo, Y., et al., *The role of autophagy in cancer development and response to therapy.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 726-34.
134. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans.* Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
135. Riddle, D.L., et al., *Introduction to C. elegans*, in *C. elegans II*, D.L. Riddle, et al., Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
136. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans.* Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 110-56.
137. Blumenthal, T., et al., *A global analysis of Caenorhabditis elegans operons.* Nature, 2002. **417**(6891): p. 851-4.
138. Ohkumo, T., et al., *Use of RNAi in C. elegans.* Methods Mol Biol, 2008. **442**: p. 129-37.
139. Cassada, R.C. and R.L. Russell, *The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans.* Dev Biol, 1975. **46**(2): p. 326-42.
140. Riddle, D.L. and P.S. Albert, *Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development*, in *C. elegans II*, D.L. Riddle, et al., Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
141. Fielenbach, N. and A. Antebi, *C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity.* Genes Dev, 2008. **22**(16): p. 2149-65.
142. Ailion, M. and J.H. Thomas, *Dauer formation induced by high temperatures in Caenorhabditis elegans.* Genetics, 2000. **156**(3): p. 1047-67.
143. Dalley, B.K. and M. Golomb, *Gene expression in the Caenorhabditis elegans dauer larva: developmental regulation of Hsp90 and other genes.* Dev Biol, 1992. **151**(1): p. 80-90.
144. Larsen, P.L., *Aging and resistance to oxidative damage in Caenorhabditis elegans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8905-9.
145. Vanfleteren, J.R. and A. De Vreese, *The gerontogenes age-1 and daf-2 determine metabolic rate potential in aging Caenorhabditis elegans.* FASEB J, 1995. **9**(13): p. 1355-61.
146. Klass, M. and D. Hirsh, *Non-ageing developmental variant of Caenorhabditis elegans.* Nature, 1976. **260**(5551): p. 523-5.
147. Golden, J.W. and D.L. Riddle, *A pheromone influences larval development in the nematode Caenorhabditis elegans.* Science, 1982. **218**(4572): p. 578-80.
148. Golden, J.W. and D.L. Riddle, *A pheromone-induced developmental switch in Caenorhabditis elegans: Temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent process.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 819-23.
149. Jeong, P.Y., et al., *Chemical structure and biological activity of the Caenorhabditis elegans dauer-inducing pheromone.* Nature, 2005. **433**(7025): p. 541-5.
150. Butcher, R.A., et al., *Small-molecule pheromones that control dauer development in Caenorhabditis elegans.* Nat Chem Biol, 2007. **3**(7): p. 420-2.
151. Bargmann, C.I. and H.R. Horvitz, *Control of larval development by chemosensory neurons in Caenorhabditis elegans.* Science, 1991. **251**(4998): p. 1243-6.

152. Schackwitz, W.S., T. Inoue, and J.H. Thomas, *Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in C. elegans.* Neuron, 1996. **17**(4): p. 719-28.
153. Ren, P., et al., *Control of C. elegans larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog.* Science, 1996. **274**(5291): p. 1389-91.
154. Li, W., S.G. Kennedy, and G. Ruvkun, *daf-28 encodes a C. elegans insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway.* Genes Dev, 2003. **17**(7): p. 844-58.
155. Sze, J.Y., et al., *Food and metabolic signalling defects in a Caenorhabditis elegans serotonin-synthesis mutant.* Nature, 2000. **403**(6769): p. 560-4.
156. Murakami, M., M. Koga, and Y. Ohshima, *DAF-7/TGF-beta expression required for the normal larval development in C. elegans is controlled by a presumed guanylyl cyclase DAF-11.* Mech Dev, 2001. **109**(1): p. 27-35.
157. Hirose, T., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 controls body size and lifespan in C elegans.* Development, 2003. **130**(6): p. 1089-99.
158. Vowels, J.J. and J.H. Thomas, *Multiple chemosensory defects in daf-11 and daf-21 mutants of Caenorhabditis elegans.* Genetics, 1994. **138**(2): p. 303-16.
159. Daniels, S.A., et al., *egl-4 acts through a transforming growth factor-beta/SMAD pathway in Caenorhabditis elegans to regulate multiple neuronal circuits in response to sensory cues.* Genetics, 2000. **156**(1): p. 123-41.
160. Coburn, C.M., et al., *A cyclic nucleotide-gated channel inhibits sensory axon outgrowth in larval and adult Caenorhabditis elegans: a distinct pathway for maintenance of sensory axon structure.* Development, 1998. **125**(2): p. 249-58.
161. Ortiz, C.O., et al., *Searching for neuronal left/right asymmetry: genomewide analysis of nematode receptor-type guanylyl cyclases.* Genetics, 2006. **173**(1): p. 131-49.
162. Birnby, D.A., et al., *A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in caenorhabditis elegans.* Genetics, 2000. **155**(1): p. 85-104.
163. Hu, P.J., *Dauer.* WormBook, 2007: p. 1-19.
164. Lant, B. and K.B. Storey, *An overview of stress response and hypometabolic strategies in Caenorhabditis elegans: conserved and contrasting signals with the mammalian system.* Int J Biol Sci, 2010. **6**(1): p. 9-50.
165. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.* Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
166. Heldin, C.H., M. Landstrom, and A. Moustakas, *Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition.* Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 166-76.
167. Savage-Dunn, C., *TGF-beta signaling.* WormBook, 2005: p. 1-12.
168. Patterson, G.I. and R.W. Padgett, *TGF beta-related pathways. Roles in Caenorhabditis elegans development.* Trends Genet, 2000. **16**(1): p. 27-33.
169. Estevez, M., et al., *The daf-4 gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling C. elegans dauer larva development.* Nature, 1993. **365**(6447): p. 644-9.
170. Patterson, G.I., et al., *The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF-beta-related receptor signaling in the Caenorhabditis elegans dauer pathway.* Genes Dev, 1997. **11**(20): p. 2679-90.
171. Gunther, C.V., L.L. Georgi, and D.L. Riddle, *A Caenorhabditis elegans type I TGF beta receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development.* Development, 2000. **127**(15): p. 3337-47.

172. Lee, R.Y., J. Hench, and G. Ruvkun, *Regulation of C. elegans DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway.* Curr Biol, 2001. **11**(24): p. 1950-7.
173. Pierce, S.B., et al., *Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse C. elegans insulin gene family.* Genes Dev, 2001. **15**(6): p. 672-86.
174. Kimura, K.D., et al., *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans.* Science, 1997. **277**(5328): p. 942-6.
175. Morris, J.Z., H.A. Tissenbaum, and G. Ruvkun, *A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in Caenorhabditis elegans.* Nature, 1996. **382**(6591): p. 536-9.
176. Paradis, S., et al., *A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in Caenorhabditis elegans.* Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1438-52.
177. Paradis, S. and G. Ruvkun, *Caenorhabditis elegans Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor.* Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2488-98.
178. Hertweck, M., C. Gobel, and R. Baumeister, *C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span.* Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 577-88.
179. Ogg, S., et al., *The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans.* Nature, 1997. **389**(6654): p. 994-9.
180. Lin, K., et al., *Regulation of the Caenorhabditis elegans longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling.* Nat Genet, 2001. **28**(2): p. 139-45.
181. Ogg, S. and G. Ruvkun, *The C. elegans PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway.* Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 887-93.
182. Carmi, I., J.B. Kopczynski, and B.J. Meyer, *The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex.* Nature, 1998. **396**(6707): p. 168-73.
183. Asahina, M., et al., *The conserved nuclear receptor Ftz-F1 is required for embryogenesis, moulting and reproduction in Caenorhabditis elegans.* Genes Cells, 2000. **5**(9): p. 711-23.
184. Gissendanner, C.R., et al., *Expression and function of conserved nuclear receptor genes in Caenorhabditis elegans.* Dev Biol, 2004. **266**(2): p. 399-416.
185. Kostrouchova, M., et al., *Nuclear hormone receptor CHR3 is a critical regulator of all four larval molts of the nematode Caenorhabditis elegans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7360-5.
186. Walthall, W.W. and J.A. Plunkett, *Genetic transformation of the synaptic pattern of a motoneuron class in Caenorhabditis elegans.* J Neurosci, 1995. **15**(2): p. 1035-43.
187. Zhou, H.M. and W.W. Walthall, *UNC-55, an orphan nuclear hormone receptor, orchestrates synaptic specificity among two classes of motor neurons in Caenorhabditis elegans.* J Neurosci, 1998. **18**(24): p. 10438-44.
188. Ashrafi, K., et al., *Genome-wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes.* Nature, 2003. **421**(6920): p. 268-72.
189. Antebi, A., J.G. Culotti, and E.M. Hedgecock, *daf-12 regulates developmental age and the dauer alternative in Caenorhabditis elegans.* Development, 1998. **125**(7): p. 1191-205.
190. Gerisch, B. and A. Antebi, *Hormonal signals produced by DAF-9/cytochrome P450 regulate C. elegans dauer diapause in response to environmental cues.* Development, 2004. **131**(8): p. 1765-76.

191. Hsin, H. and C. Kenyon, *Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans.* Nature, 1999. **399**(6734): p. 362-6.
192. Motola, D.L., et al., *Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in C. elegans.* Cell, 2006. **124**(6): p. 1209-23.
193. Gerisch, B., et al., *A hormonal signaling pathway influencing C. elegans metabolism, reproductive development, and life span.* Dev Cell, 2001. **1**(6): p. 841-51.
194. Mak, H.Y. and G. Ruvkun, *Intercellular signaling of reproductive development by the C. elegans DAF-9 cytochrome P450.* Development, 2004. **131**(8): p. 1777-86.
195. Ohkura, K., et al., *SDF-9, a protein tyrosine phosphatase-like molecule, regulates the L3/dauer developmental decision through hormonal signaling in C. elegans.* Development, 2003. **130**(14): p. 3237-48.
196. Matyash, V., et al., *Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in Caenorhabditis elegans by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16.* PLoS Biol, 2004. **2**(10): p. e280.
197. Li, J., et al., *NCR-1 and NCR-2, the C. elegans homologs of the human Niemann-Pick type C1 disease protein, function upstream of DAF-9 in the dauer formation pathways.* Development, 2004. **131**(22): p. 5741-52.
198. Antebi, A., et al., *daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in C. elegans.* Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1512-27.
199. Snow, M.I. and P.L. Larsen, *Structure and expression of daf-12: a nuclear hormone receptor with three isoforms that are involved in development and aging in Caenorhabditis elegans.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1494**(1-2): p. 104-16.
200. Jia, K., P.S. Albert, and D.L. Riddle, *DAF-9, a cytochrome P450 regulating C. elegans larval development and adult longevity.* Development, 2002. **129**(1): p. 221-31.
201. Glass, C.K. and M.G. Rosenfeld, *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.* Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 121-41.
202. Ludewig, A.H., et al., *A novel nuclear receptor/coregulator complex controls C. elegans lipid metabolism, larval development, and aging.* Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2120-33.
203. Schaedel, O.N., et al., *Hormonal signal amplification mediates environmental conditions during development and controls an irreversible commitment to adulthood.* PLoS Biol, 2012. **10**(4): p. e1001306.
204. Wollam, J., et al., *A novel 3-hydroxysteroid dehydrogenase that regulates reproductive development and longevity.* PLoS Biol, 2012. **10**(4): p. e1001305.
205. Magner, D.B. and A. Antebi, *Caenorhabditis elegans nuclear receptors: insights into life traits.* Trends Endocrinol Metab, 2008. **19**(5): p. 153-60.
206. Ailion, M. and J.H. Thomas, *Isolation and characterization of high-temperature-induced Dauer formation mutants in Caenorhabditis elegans.* Genetics, 2003. **165**(1): p. 127-44.
207. Ailion, M., et al., *Neurosecretory control of aging in Caenorhabditis elegans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7394-7.
208. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
209. Hoogewijs, D., et al., *Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in C. elegans.* BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 9.
210. Chiang, W.C., et al., *HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity.* Cell, 2012. **148**(1-2): p. 322-34.

211. Shaw, W.M., et al., *The C. elegans TGF-beta Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling.* Curr Biol, 2007. **17**(19): p. 1635-45.
212. Kim, K., et al., *The UNC-3 Olf/EBF protein represses alternate neuronal programs to specify chemosensory neuron identity.* Dev Biol, 2005. **286**(1): p. 136-48.
213. Huang, S.S. and J.S. Huang, *TGF-beta control of cell proliferation.* J Cell Biochem, 2005. **96**(3): p. 447-62.
214. Aladzsity, I., et al., *Autophagy genes unc-51 and bec-1 are required for normal cell size in Caenorhabditis elegans.* Genetics, 2007. **177**(1): p. 655-60.
215. Sigmond, T., et al., *Autophagy in Caenorhabditis elegans.* Methods Enzymol, 2008. **451**: p. 521-40.
216. Prahlad, V. and R.I. Morimoto, *Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from C. elegans.* Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 52-61.
217. Hahn, J.S., et al., *Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(12): p. 5249-56.
218. Somasundaram, T. and S.P. Bhat, *Developmentally dictated expression of heat shock factors: exclusive expression of HSF4 in the postnatal lens and its specific interaction with alphaB-crystallin heat shock promoter.* J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44497-503.
219. Xie, Y., et al., *Heat shock factor 1 represses transcription of the IL-1beta gene through physical interaction with the nuclear factor of interleukin 6.* J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 11802-10.
220. Takaki, E., et al., *Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice.* J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4931-7.
221. Wang, J., et al., *HSF1 down-regulates XAF1 through transcriptional regulation.* J Biol Chem, 2006. **281**(5): p. 2451-9.
222. Xie, Y., et al., *Heat shock factor 1 contains two functional domains that mediate transcriptional repression of the c-fos and c-fms genes.* J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4687-98.
223. Iser, W.B., et al., *Co-regulation of the DAF-16 target gene, cyp-35B1/dod-13, by HSF-1 in C. elegans dauer larvae and daf-2 insulin pathway mutants.* PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17369.
224. Anckar, J. and L. Sistonen, *Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease.* Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 1089-115.
225. Bargmann, C.I., *Chemosensation in C. elegans.* WormBook, 2006: p. 1-29.
226. Felix, M.A. and C. Braendle, *The natural history of Caenorhabditis elegans.* Curr Biol, 2010. **20**(22): p. R965-9.
227. Shinka, T., et al., *Molecular characterization of heat shock-like factor encoded on the human Y chromosome, and implications for male infertility.* Biol Reprod, 2004. **71**(1): p. 297-306.
228. Tessari, A., et al., *Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis.* Mol Hum Reprod, 2004. **10**(4): p. 253-8.
229. Nakai, A., *New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4.* Cell Stress Chaperones, 1999. **4**(2): p. 86-93.
230. Frejtag, W., et al., *Heat shock factor-4 (HSF-4a) represses basal transcription through interaction with TFIIF.* J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14685-94.
231. Zhang, Y., et al., *Heat shock factor-4 (HSF-4a) is a repressor of HSF-1 mediated transcription.* J Cell Biochem, 2001. **82**(4): p. 692-703.

232. Gu, X., Z. Zhang, and W. Huang, *Rapid evolution of expression and regulatory divergences after yeast gene duplication.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 707-12.
233. Kelly, W.G., et al., *Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed Caernorhabditis elegans gene.* Genetics, 1997. **146**(1): p. 227-38.
234. Frokjaer-Jensen, C., et al., *Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans.* Nat Genet, 2008. **40**(11): p. 1375-83.
235. Reece-Hoyes, J.S., et al., *Insight into transcription factor gene duplication from Caenorhabditis elegans Promoterome-driven expression patterns.* BMC Genomics, 2007. **8**: p. 27.
236. Wang, J., R. Tokarz, and C. Savage-Dunn, *The expression of TGFbeta signal transducers in the hypodermis regulates body size in C. elegans.* Development, 2002. **129**(21): p. 4989-98.
237. Gajewska, M., B. Gajkowska, and T. Motyl, *Apoptosis and autophagy induced by TGF-B1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells.* J Physiol Pharmacol, 2005. **56 Suppl 3**: p. 143-57.
238. Suzuki, H.I., K. Kiyono, and K. Miyazono, *Regulation of autophagy by transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling.* Autophagy, 2010. **6**(5): p. 645-7.
239. Kiyono, K., et al., *Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells.* Cancer Res, 2009. **69**(23): p. 8844-52.
240. Kimmelman, A.C., *The dynamic nature of autophagy in cancer.* Genes Dev, 2011. **25**(19): p. 1999-2010.
241. Rosenfeldt, M.T. and K.M. Ryan, *The multiple roles of autophagy in cancer.* Carcinogenesis, 2011. **32**(7): p. 955-63.
242. Wakefield, L.M. and A.B. Roberts, *TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis.* Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 22-9.
243. Bierie, B. and H.L. Moses, *Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 506-20.

10. MELLÉKLET

1. táblázat: A konzervált HSF-1 kötőhelyet tartalmazó *C. elegans* gének egy része hősokk fehérjéket kódol.

ORF	Gén neve	Feltételezett biológiai funkció	Kötőhely szekvenciája	Kötőhely helyzete
C30C11.4	*C30C11.4*	Hsp70 családba tartozó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtcGAAtaTTC *C. briggsae:* TTCtcGAAgtTTCtaGAA	-257bp (+) -120bp (+)
Y46H3A.2	*hsp-16.41*	16-kD családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAcaTTC *C. briggsae:* TTCtgGAAtaTTC	-102bp (+) -99bp (+)
Y46H3A.3	*hsp-16.2*	16-kD családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAcaTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAccTTC	-103bp (-) -102bp (-)
T27E4.3	*hsp-16.48*	16-kD családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAcaTTC *C. briggsae:* TTCtcGAAgcTTC	-111bp (+) -102bp (+)
T27E4.8	*hsp-16.1*	16-kD családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAcaTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAtcTTC	-96bp (-) -102bp (-)
T27E4.9	*hsp-16.49*	16-kD családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAcaTTC *C. briggsae:* TTCtcGAAgcTTC	-112bp (+) -102bp (+)
T27E4.2	*hsp-16.11*	16-kD családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAcaTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAtcTTC	-96bp (-) -101bp (-)
C47E8.5	*daf-21*	Hsp90 családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtcGAAtgTTC *C. briggsae:* TTCgaGAAtgTTC	-1331bp (+) -1313bp (+)
C12C8.1	*hsp-70*	Hsp70 családba tartotó hősokk fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAccTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAccTTC	-111bp (+) -98bp (+)
C01G10.8	*C01G10.8*	HSP90 aktivátor ATPáz homológ	*C. elegans:* TTCatGAAttTTCtcGAA *C. briggsae:* TTCttGAAttTTCtcGAA	-205bp (+) -195bp (+)

2. táblázat: A konzervált HSF-1 kötőhelyet tartalmazó *C. elegans* gének egy része nem klasszikus hősokk fehérjéket kódol (erős konzerváltság).

ORF	Gén neve	Feltételezett biológiai funkció	Kötőhely szekvenciája	Kötőhely helyzete
B0412.2	*daf-7*	TGF-β családba tartozófehérje	*C. elegans:* TTCtgGAAgcTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAgcTcC *C. remanei:* TTCCagAAaaTTC	-276bp (-) -280bp (-) -317bp (-)
F57B10.11	*bag-1*	Az emberi BAG-fehérjecsaládba tartozó ko-chaperon homológ	*C. elegans:* TTCtaGAAgtTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAatTTC	-117bp (+) -181bp (+)
C29E4.3	*ran-2*	RanGAP (GTPáz aktiváló fehérje) homológ	*C. elegans:* TTCggGAAaaTTC *C. briggsae:* TTCtgGAAatTTC	-317bp (+) -986bp (+)
C30C11.2	*rpn-3*	26S proteaszóma nem ATPáz szabályozó alegysége	*C. elegans:* TTCtaGAAatTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAacTTC	-345bp (+) -450bp (+)
F49D11.8	*cpn-4*	calponin homológ	*C. elegans:* TTCtgGAAtgTTC *C. briggsae:* TTCtgGAAtgTTC	-405bp (+) -378bp (+)
M03F4.7	*calu-1*	CALUmenin (kálcium kötő fehérje) homológ	*C. elegans:* TTCgaGAAtcTTC *C. briggsae:* TTCgaGAAccTTC	-1303bp (-) -1403bp (-)
H22K11.1	*asp-3*	aszpartil proteáz homlóg	*C. elegans:* TTCtaGAAagTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAacTTC	-470bp (-) -491bp (-)
H22K11.4	*sgca-1*	50kd disztrofin asszociált glikoprotein homológ	*C. elegans:* TTCttGAAttTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAacTTC	-727bp (+) -696bp (+)
C17F4.6	*gcy-19*	transzmembrán guanilil cikláz	*C. elegans:* TTCagGAAttTTC *C. briggsae:* TTCgaGAAatTTC	-203bp (+) -235bp (-)
C04G2.1	*ttr-39*	transzthyretin-szerű családba tartozó fehérje	*C. elegans:* TTCtaGAAaaTTC *C. briggsae:* TTCcaGAAtcTTC	-228bp (+) -248bp (-)
R07B1.4	*gst-36*	glutathion S-transzferáz	*C. elegans:* TTCtaGAAaaTTC *C. briggsae:* TTCtaGAAttTTC	-247bp (+) -199bp (-)
ZC334.9	*ins-28*	Inzulin-szerű peptid	*C. elegans:* TTCtaGAAttTTC *C. briggsae:* TTCcaGAActTTC	-50bp (+) -300bp (+)
Y37D8A.23	*unc-25*	GABA neurotranszmitter bioszintetikus enzim; glutaminsav dekarboxiláz (GAD)	*C. elegans:* TTCaaGAAttTTC *C. briggsae:* TTCttGAAttTTC	-347bp (+) -1082bp(+)

3. táblázat: A konzervált HSF-1 kötőhelyet tartalmazó *C. elegans* gének egy része nem klasszikus hősokk fehérjéket kódol (erős konzerváltság).

ORF	Gén neve	Feltételezett biológiai funkció	Kötőhely szekvenciája	Kötőhely helyzete
Y71D11A.1	*cdh-12*	Cadherin (sejt adhézió)	*C. elegans:* TTCcaGAAgcTTC *C. briggsae:* TTCttGAAttTTg	-399bp (+) -805bp (+)
R107.7	*gst-1*	Glutation S-transzferáz	*C. elegans:* TTCtaGAAacTTC *C. briggsae:* gTCcaGAAttTTC	-253 bp(-) -329 bp(-)
Y87G2A.3	*atg-4.1*	Cisztein proteáz (autofágia)	*C. elegans:* TTCgaGAAaaTTC *C. briggsae:* TTCtcGAAatTcC	-150bp (-) -513bp (-)
B0336.6	*abi-1*	Abl interactor (epidermális sejt migráció)	*C. elegans:* TTCatGAAatTTC *C. briggsae:* TgCttGAAatTTC	-60bp (+) -42bp (+)
F58A4.3	*hcp-3*	CENP-A homológ (sejtosztódás)	*C. elegans:* TTCtaGAAttTTC *C. briggsae:* TTCtgGAAaaaTC	-594bp (+) -1021bp(+)
Y104H12A.1	*nhr-41*	Nukleáris hormon receptor	*C. elegans:* TTCacGAAatTTC *C. briggsae:* TTggaGAAatTTC	-744bp (-) -526bp (-)
K02E2.4	*ins-35*	Inzulinszerű peptid	*C. elegans:* TTCacGAAatTTC *C. briggsae:* TTTcaGAAgcTTC	-317bp (+) -205bp (-)
C45H4.2	*cyp-33c1*	Citokróm P450	*C. elegans:* TTCtaGAAatTTC *C. briggsae:* TTCttGAAagTTG	-437bp (-) -331bp (-)
C34B7.3	*cyp-36a1*	Citokróm P450	*C. elegans:* TTCtaGAAagTTC *C. briggsae:* TTCcaGAAttaTC	-1325bp (+) -786bp (+)
ZK430.3	*sod-5*	Szuperoxid dizmutáz	*C. elegans:* TTCtaGAAgcTTC *C. briggsae:* gTCttGAAaaTTC	-257bp (-) -205bp (-)

4. táblázat: A konzervált HSF-1 kötőhelyet tartalmazó *C. elegans* gének egy része nem klasszikus hősokk fehérjéket kódol (gyengébb konzerváltság).

ORF	Gén neve	Feltételezett biológiai funkció	Kötőhely szekvenciája	Kötőhely helyzete
T13C5.1	*daf-9*	Citokróm P450 CYP2 alcsaládba tartozó fehérje	*C. elegans:* TTCaaGAAttTgC *C. briggsae:* TTCtaGAAaagTC *C. remanei:* TTCgaGAAaagaC	-98bp (+) +281bp (+) +275bp (+)
Y71D11A.1	*cdh-12*	Cadherin (sejt adhézió)	*C. elegans:* TTCcaGAAgcTTC *C. briggsae:* TTCttGAAttTTg	-399bp (+) -805bp (+)
R107.7	*gst-1*	Glutation S-transzferáz	*C. elegans:* TTCtaGAAacTTC *C. briggsae:* gTCcaGAAttTTC	-253 bp(-) -329 bp(-)
Y87G2A.3	*atg-4.1*	Cisztein proteáz (autofágia)	*C. elegans:* TTCgaGAAaaTTC *C. briggsae:* TTCtcGAAatTcC	-150bp (-) -513bp (-)
B0336.6	*abi-1*	Abl interactor (epidermális sejt migráció)	*C. elegans:* TTCatGAAatTTC *C. briggsae:* TgCttGAAatTTC	-60bp (+) -42bp (+)
F58A4.3	*hcp-3*	CENP-A homológ (sejtosztódás)	*C. elegans:* TTCtaGAAttTTC *C. briggsae:* TTCtgGAAaaaTC	-594bp (+) -1021bp(+)
Y104H12A.1	*nhr-41*	Nukleáris hormon receptor	*C. elegans:* TTCacGAAatTTC *C. briggsae:* TTggaGAAatTTC	-744bp (-) -526bp (-)
K02E2.4	*ins-35*	Inzulinszerű peptid	*C. elegans:* TTCacGAAatTTC *C. briggsae:* TTTcaGAAgcTTC	-317bp (+) -205bp (-)
C45H4.2	*cyp-33c1*	Citokróm P450	*C. elegans:* TTCtaGAAatTTC *C. briggsae:* TTCttGAAagTTG	-437bp (-) -331bp (-)
C34B7.3	*cyp-36a1*	Citokróm P450	*C. elegans:* TTCtaGAAagTTC *C. briggsae:* TTCcaGAAttaTC	-1325bp (+) -786bp (+)
ZK430.3	*sod-5*	Szuperoxid dizmutáz	*C. elegans:* TTCtaGAAgcTTC *C. briggsae:* gTCttGAAaaTTC	-257bp (-) -205bp (-)

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás vagyok a Tanszék összes munkatársának, hogy megfelelő hátteret biztosítottak eredményeim eléréséhez. Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Vellai-Takács Krisztinának és Dr. Vellai Tibornak, hogy bevezettek a kutatómunka világába, és munkámat mindvégig odaadóan irányították úgy elméleti, mint gyakorlati téren.

Köszönöm továbbá Prof. Orosz Lászlónak, az ELTE TTK Biológia Doktori Iskola Klasszikus és Molekuláris Genetikai Program vezetőjének, hogy lehetőséget kaptam a fokozatszerzésre.

Hálával tartozom Kosztelnik Mónikának, Princz Andreának, Kutnyánszky Veronikának, Dr. Hargitai Balázsnak, Dr. Tóth Mártonnak valamint a Vellai labor számos korábbi és jelenlegi tagjának, hogy munkájukkal és hasznos ötleteikkel hozzájárultak e munka elkészítéséhez és a felmerülő problémák megoldásához.

Köszönet illeti a tanszékünk asszisztenseit, Simon Rezsőné Sári nénit, Komjáti Katalint és Pénzes Imréné Tündét, hogy biztosították a kísérletek elvégzéséhez szükséges technikai hátteret.

Végül szeretném megköszönni szüleimnek mindazt a fáradtságos munkát, amivel lehetővé tették számomra, hogy tanulhassak és kutathassak, valamint feleségemnek, Dr. Deák Veronikának szellemi és lelki támogatását.