

Az autofág gének szerepe az idegsejtpusztulás, a sejtméret és az öregedési folyamat szabályozásában *Caenorhabditis elegans*ban

Doktori értekezés

Tóth Márton Lóránt



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A Doktori Iskola vezetője: dr. Erdei Anna akadémikus
Programvezető: dr. Orosz László akadémikus
Témavezető: dr. Vellai Tibor docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Genetikai Tanszék

Budapest
2008

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. Autofágia	7
2.1.1. A makroautofágia szabályozásának kezdeti lépései	9
2.1.2. Az autofágia szerepe a sejtműködésben	11
2.2. <i>C. elegans</i> modell organizmus	13
2.3. Neurodegeneratív betegségek	15
2.3.1. Neurodegeneratív betegségek csoportosítása	15
2.3.2. Neurodegeneratív betegségek vizsgálatához használt állati modellek	17
2.3.2.1. Aggregáción alapuló modellek	17
2.3.2.2. Excitotoxikus modellek	17
2.4. A sejt méret szabályozása	21
2.5. Az öregedési folyamat biológiája	24
2.5.1. Öregedő társadalmak	24
2.5.2. Öregedési elméletek	25
2.5.3. Az öregedési folyamat	26
2.5.4. Öregedést befolyásoló főbb genetikai és környezeti faktorok	27
2.5.4.1. Inszulin/IGF-1 jelátviteli útvonal	27
2.5.4.2. TOR kináz	28
2.5.4.3. Kalóriakorlátozás	28
2.5.4.4. Mitochondriális légzési lánc	28
2.5.4.5. Az autofág gének hatása az élethosszra	29
2.5.5. Az öregedési folyamat vizsgálata	29
3. CÉLKITŰZÉSEK	31
3.1. Az autofág gének szerepének vizsgálata a neurodegenerációban	31
3.2. Az autofág gének szerepének vizsgálata a sejt méret szabályozásában	31
3.3. Az autofág gének szerepének vizsgálata az öregedési folyamat szabályozásában	31
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
4.1. A vizsgált autofág gének	33
4.2. Törzsfenntartás	34
4.3. RNS interferencia	34

4.4. Sejthalál vizsgálatok	35
4.5. Élethossz mérések	38
4.6. Az öregedési pigment tartalom vizsgálata	39
4.7. Izomdegeneráció nyomonkövetése	39
4.8. Elektronmikroszkópia	40
4.8.1. Előkészítés	40
4.8.2. Fixálás	40
4.8.3. Mosás, kontrasztosítás	40
4.8.4. Beágyazás, metszés	41
5. EREDMÉNYEK	42
5.1. Az autofág gének <i>C. elegans</i> ortológjainak jellemzése	42
5.1.1. <i>C. elegans</i> autofág gének expressziós vizsgálata	42
5.1.2. Az <i>bec-1</i> autofág gén inaktiválása abnormális autofág vakuólák képződéshez vezet	45
5.1.3. Az <i>lgg-1</i> RNSi kezelés gátolja az LGG-1 fehérje kifejeződését	45
5.2. Az autofág gének inaktiválása gátolja az excitotoxikus neurodegenerációs modellekben az idegsejtek pusztulását	46
5.2.1. A sejtpusztulási ráta meghatározása hiperaktív degenerin alapú neurodegenerációs modellekben	47
5.2.2. Az autofág gének gátlása csökkenti az idegsejtek pusztulását degenerin alapú neurodegenerációs modellekben	47
5.2.3. Az <i>unc-51</i> és <i>bec-1</i> autofág gének inaktiválása gátolja a 6-OHDA által indukált neurodegenerációt	53
5.2.4. Az autofág gének gátlása növeli a degenerin mutánsok érzékenységet	53
5.2.5. Az éhezés és a <i>let-363/TOR2</i> gén gátlása csökkenti a neuronok túlélését degenerin alapú neurodegenerációs modellekben	55
5.3. Az <i>unc-51</i> és a <i>bec-1</i> autofág gének inaktiválása csökkent sejt méretet okoz <i>C. elegans</i> ban	56
5.3.1. Az <i>unc-51</i> és a <i>bec-1</i> autofág gének az inzulin/IGF-1 és a TGF- β genetikai útvonalakkal kölcsönhatva szabályozzák a sejt méretet <i>C. elegans</i> ban	57
5.4. Az autofág gének inaktiválása felgyorsítja az öregedési folyamatot	59
5.4.1. Az autofág gének gátlása rövidíti az élethosszt <i>C. elegans</i> ban	60
5.4.2. Az autofág gének gátlása felgyorsítja az öregedési pigment felhalmozódását	62
5.4.3. Az autofág gének inaktiválása felgyorsítja az izomdegenerációt	64
5.4.4. Az autofág gének az élethosszt szabályozó („longevity”) jelátviteli útvonalaktól „downstream” hatnak	65
5.4.4.1. Az autofág gének inaktiválása részlegesen szuppresszálja a csökkent inzulin/IGF-1 jelátvitel által kialakított hosszú élethossz fenotípust	66
5.4.4.2. Az autofág gének inaktiválása szuppresszálja a <i>let-363(RNSi)</i> állatok hosszú élethossz fenotípusát	66
5.4.4.3. Az autofág gének inaktiválása szuppresszálja a csökkent mitokondriális működés okozta hosszú élethossz fenotípust	67
6. KÖVETKEZTETÉSEK	69
6.1. Az autofág gének minden szövettípusban és minden egyedfejlődési stádiumban kifejeződnek <i>C. elegans</i> ban	69

6.2. A <i>bec-1</i> és <i>unc-51</i> autofág gének szükségesek az autofágia normális működéséhez <i>C. elegans</i> ban	70
6.3. Az autofág gének szükségesek a degenerinek és a 6-OHDA kiváltotta neurodegeneratív folyamatokhoz	71
6.4. Az autofág gének szükségesek a normális a sejt méret kialakításához <i>C. elegans</i> ban	75
6.5. Az autofág gének befolyásolják az öregedési folyamatot	76
7. ÖSSZEFOGLALÁS	81
8. SUMMARY	82
9. FELHASZNÁLT IRODALOM	83
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95

Rövidítések jegyzéke

6-OHDA	6-hydroxydopamine (6-hidroxidopamin)
AMP	Adenosine monophosphate (adenozin monofoszfát)
AMPK	AMP activated Protein Kinase (AMP aktivált fehérje kináz)
Ape1	Aminopeptidase 1
ATP	Adenosine triphosphate (adenozin trifoszfát)
CMA	Chaperone Mediated Autophagy (chaperone-közvetített autofágia)
Cvt	Cytoplasm to Vacuole Targeting (citoplazma – vakuolum bioszintetikus útvonal)
DNS	deoxiribonukleinsav
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
GFP	Green Fluorescent Protein (Zöld Fluoreszcens Fehérje)
IGF	Insulin-like Growth Factor (inzulinszerű növekedési faktor)
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactoside (izopropil-beta-D-tiogalaktozid)
MAP1-LC3	Microtubule associated protein 1 – light chain 3 (mikrotubulus asszociált fehérje 1 – könnyű lánc 3)
NGM	Nematode Growth Medium (nematoda tenyésztő médium)
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid (N-metil-D-aszparaginsav)
PAS	Pre-autophagosomal structure (pre-autofagosomális struktúra)
PCD	Programmed cell death (programozott sejthalál)
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
PE	Phosphatidylethanolamine (foszfatidiletanolamin)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase (foszfatidilinozitol 3-kináz)
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3 phosphate (foszfatidilinozitol 3 foszfát)
Pmn	Piecemeal microautophagy of the nucleus (a sejtmag „piecemeal” autofágiára)
RNSi	RNS interferencia
RNS	ribonukleinsav
ROS	Reactive oxygen species (reaktív oxigén specieszek)
TOR	Target of Rapamycin (a Rapamycin immunosuppresszáns antibiotikum célpontja)

1. Bevezetés

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott önbontó folyamata, amely során a citoplazma egy részlete a lizoszómákba jut, ahol savas hidrolázok által lebontódik. A felszabaduló molekulák a felépítő folyamatokban újra hasznosulnak. Az autofágia tehát a citoplazma makromolekuláinak és a sejtservecskék turnoverjében játszik fontos szerepet. Az autofágia működésének zavarát számos emberi betegséggel (például neurodegeneratív elváltozások, szív és érrendszeri betegségek, különböző eredetű és fajtájú tumorok, sejten belüli parazita fertőzések) hozták összefüggésbe. Az autofágia szerepet játszik számos alapvető biológiai folyamatban, mint például az egyedfejlődésben, a vörösvértestek érésében és az immunrendszer működésében. Az autofág folyamatot az 1990-es évekig csak elektronmikroszkópos módszerekkel lehetett vizsgálni. Az utóbbi másfél évtizedben azonban az autofágia vizsgálata élesztőben (amelyben fénymikroszkóppal is kimutatható az autofágia működésének zavara) lehetővé tette a folyamat molekuláris vizsgálatát. Ezt a lehetőséget kiaknázva kezdtem meg kutatásaimat az autofágia területén napjaink egyik legizgalmasabb genetikai modell organizmusán, a *Caenorhabditis elegans* fonalférgen.

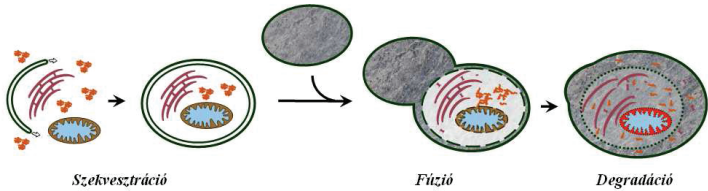
Dolgozatomban az autofág géneknek az excitotoxikus neurodegeneratív folyamatokban, valamint a sejtméret és az öregedési folyamat szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltam. Kimutattam, hogy a funkciónyeréses mutáns ionsatorna, illetve a 6-hidroxidopamin neurotoxin által kiváltott sejtpusztulást a *bec-1*, *unc-51* és *lgg-1* autofág gének inaktiválása gátolja. A *bec-1* és *unc-51* funkcióvesztéses mutációk a sejtméret csökkentésén keresztül a testméretet is befolyásolják. A *bec-1*, *unc-51* és *atg-18* autofág génekről kimutattam, hogy inaktiválásuk befolyásolja az élethosszat. Az élettartam rövidítésén túl a vizsgált *bec-1*, *unc-51* és *atg-18* funkcióvesztéses mutációk felgyorsították az öregedési folyamatot jellemző markerek (például öregedési pigment) felhalmozódását, valamint az izomsorvadás folyamatát. Eredményeimmel igazoltam, hogy az autofág gének a neurodegeneratív folyamat, a sejtméret és az öregedés szabályozásában fontos szerepet töltenek be. Ezek az eredmények elvezethetnek számos emberi betegség molekuláris hátterének jobb megértéséhez.

2. Irodalmi áttekintés

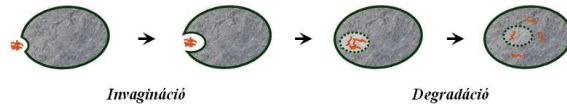
2.1. Autofágia

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott önlebontó folyamata. Először 1957-ben újszülött egér vese epitheliális sejtek elektronmikroszkópos vizsgálata nyomán írták le [1]. Az autofágia során a citoplazma bizonyos része a lizoszómális rendszer segítségével bontódik le. A lebontásra kijelölt citoplazma részlet lizoszómába kerülése alapján az autofágia három főbb típusát különböztetjük meg: mikroautofágia, makroautofágia, illetve chaperone-közvetített autofágia (CMA) [2]. A mikroautofágia során a lizoszóma melletti citoplazmarészletet magukba foglaló vezikulák fűződnek le a lizoszóma egyszeres membránjából invaginációval, majd a lizoszóma belső terébe jutva lebomlanak. CMA-val a KFERQ peptidszekvenciát hordozó fehérjék bomlanak le. Egy chaperone rendszer felismeri a KFERQ motívumot, majd az azt hordozó fehérjét a lizoszómához továbbítja. A lebontandó fehérje a lizoszómába egy membrántranszport rendszer segítségével kerül be. A makroautofágia során egy kettősmembrán, az ún. izoláló membrán veszi körbe a lebontandó citoplazma részletet (szekvesztráció). A kettős membrán bezárulásával kialakuló vakuólát (elsődleges) autofagoszómának, vagy autofág vakuólának (AV) nevezzük. Az AV bármely sejtalkotót magába foglalhatja. Mérete sejt és fajfüggő, leggyakrabban 0,1-1 mikrométer nagyságrendű. Az elsődleges autofagoszóma külső membránja képes lizoszómával fuzionálni. Mivel a lizoszóma kisebb, mint az autofagoszóma, nem a lebontandó citoplazma kerül a lizoszóma belső terébe, hanem a lizoszómális enzimek jutnak be az autofagoszóma két határoló membránja közé. A lizoszómális protonpumpáknak és egyéb membránfehérjéknek az autofagoszóma külső membránjában való megjelenésétől kezdve beszélhetünk másodlagos autofagoszómáról (1. ábra). Az AV a lizoszómával nemcsak közvetlenül, hanem a heterofág eredetű endoszómával való fúziót követően is egyesülhet. A lebontás során felszabadult molekulák visszakérülnek a citoplazmába, a maradék pedig egy sűrű maradványtestet képez.

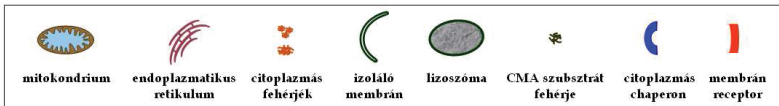
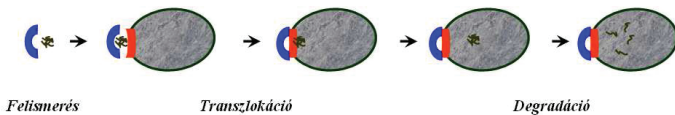
A. Makroautofágia



B. Mikroautofágia



C. Chaperon közvetített autofágia (CMA)



1. ábra Az autofágia főbb típusai. A: a makroautofágia során egyes citoplazma komponenseket a képződő izolálómembrán körbezár (szekvesztráció). A kettős izolálómembránnal körbevett (elsődleges) autofagoszóma, vagy autofág vakuóla külső membránja fuzionál a lizoszómával (fúzió). A lizoszómális protonpumpák savanyítják a másodlagos lizoszóma, vagy autofagolizoszóma belső terét, ezáltal a lizoszómális hidrolázok aktiválódnak és lebontják a tartalmat (degradáció). B: a mikroautofágia során a lizoszómát körbevevő citoplazma komponensek lizoszóma membránnal együtt jutnak a lizoszóma belső terébe (invagináció), ahol lebomlanak (degradáció). C: a chaperone-közvetített autofágia (CMA) során a KFERQ motívumot hordozó fehérjéket citoplazmatikus chaperoneok ismerik fel (felismerés). A chaperone - szubsztrát fehérje komplex a lizoszóma membrán-receptoraihoz szállítódik. A receptor segítségével a fehérje bejut a lizoszóma belső terébe (transzlokáció), majd lebomlik (degradáció). A képen látható struktúrák sematikusak.

2.1.1. A makroautofágia szabályozásának kezdeti lépései

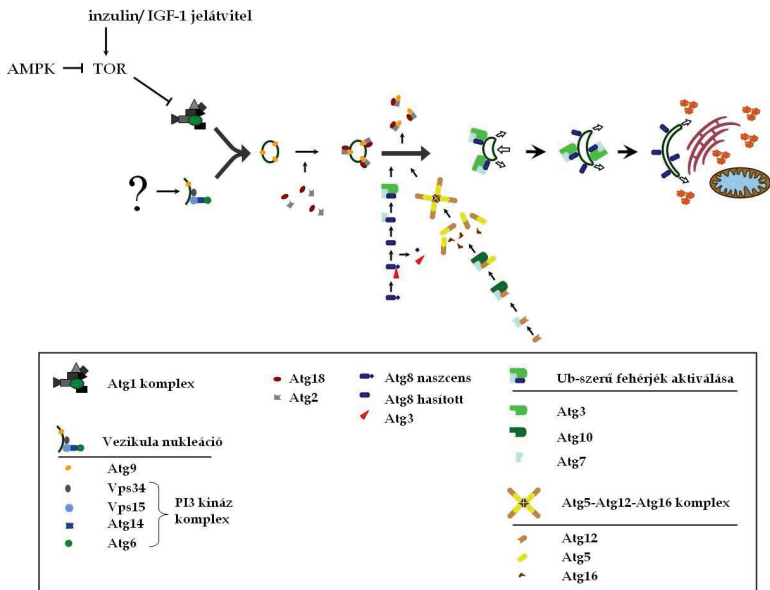
Dolgozatomban a makroautofágia szabályozásának kezdeti lépéseiben résztvevő géneket vizsgáltam. Mind az *unc-51/ATG1*, *bec-1/ATG6*, *lgg-1/ATG8* és *atg-18/ATG18* gének által kódolt fehérjék az autofágia szabályozásának az autofagoszóma kialakulásáig tartó szakaszában fejtik ki hatásukat. (Először a *C. elegans*, majd az élesztő ortológ nevét tüntettem fel, mivel az autofág gének élesztőben használt nevezéktana egységesebb a *C. elegans* ortológokénál.) Ezért ebben az alfejezetben az autofágia szabályozásának az autofág vakuola létrejöttéig tartó szakaszát mutatom be. Mivel az autofágia főbb típusai közül a makroautofágia mechanizmusában résztvevő géneket vizsgáltam, a továbbiakban autofágia megnevezés alatt a makroautofágia értendő.

Az autofágia szabályozása taxononként jelentősen eltérő lehet. Az egysejtű élesztőben például megfelelő tápanyagellátottság mellett az autofág lebontás szerepe elhanyagolható, de tápanyag megvonás hatására nagymértékben aktiválódik a folyamat. Emlősökben az autofágia az éhezésre adott „stresszválasz”, de e mellett számos egyéb funkciót is betölt. Bár az autofágia szabályozása fajoként eltérő lehet, az autofág gének és szabályozásban résztvevő jelátviteli útvonalak erősen konzerváltak. Az élesztőben feltárt gének közül számos az emlősökben, *Drosophilában* és *C. elegansban* is megtalálható. Az élesztőből, *C. elegansból*, *Drosophilából* és emlős modellekből származó adatok alapján felvázolhatunk egy konzervált autofág mechanizmust [3]. Az Atg1 kinázt tartalmazó komplex aktiválja az autofágia molekuláris mechanizmusát. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal és a citoplazma AMP/ATP arányát érzékelő AMP-függő kináz (AMPK) jó tápanyagellátottság mellett a TOR komplexen keresztül meggátolja az aktív Atg1 komplex kialakulását. Az Atg1 komplex gátlása élesztőben bizonyítottan a TOR komplex szabályozásán keresztül valósul meg. Élesztőben éhezés, vagy a Tor2 genetikai, kémiai inaktíválása esetén az Atg13 és további fehérjék az Atg1 komplexbe integrálódnak. Az így létrejött aktív Atg1 komplex serkenti az izoláló membrán képződését, ezáltal az autofagoszóma kialakulását. Az új membrán nukleációját a Vps34/Atg14/Atg6 által alkotott III-as típusú PI3 kinázt tartalmazó komplex serkenti. A PI3 (III) kináz komplex a Vps15 segítségével az Atg9 által megjelölt membránhoz kapcsolódik.

Az autofágia iniciációjában részt vevő fehérjék közül egyelőre csak 2 transzmembrán fehérjéről tudunk, ezek az Atg9 és az Atg27 [4]. Az Atg27 csak akkor vesz részt az autofágia iniciációjában, amennyiben nagy mennyiségű autofagoszóma képződik. Atg9-cel megjelölt membránt, melyet az izolálómembrán eredetének tekintenek,

élesztőben a sejtmag melletti pre-autofagoszómális struktúrából (PAS) mutatták ki [2]. Hasonló képződményt többsejtű élőlényekben nem írtak le. A PAS-ra jellemző fehérjemarkerek metazoákban nem egy meghatározott helyen összpontosulnak, hanem a citoplazmában elszórva találhatóak [2]. Metazoákban tehát a mai napig nem ismert, hogy pontosan mi az izoláló membrán forrása. Elképzelhető, hogy endoplazmatikus retikulum membrán eredetű és a jelenlegi elektronmikroszkópos technikákkal nem vizsgálható, 50nm-nél kisebb átmérőjű vezikulákban szállítódik az autofagoszóma összeállítódásának a helyére [5]. Egy másik elmélet szerint az izoláló membrán de novo képződik, azonban erre még nincs bizonyíték [2].

A formálódó autofagoszómában az Atg9 és az Atg27 már nem mutatható ki (2. ábra). Az Atg9 visszanyerésében valószínűleg az Atg2 és az Atg18 perifériás membránfehérjéknek van szerepe. A formálódó autofagoszóma membrán fő molekuláris markerének az Atg8-at tekintik. Az Atg8 ubikvitin-szerű, alacsony molekulatömegű, citoplazmatikus fehérje. Az autofagoszóma membránjához egy ubikvitinilációhoz hasonló folyamat során kovalensen kötődik. A kötés az Atg8 C terminálisán található glicin aminosavmaradék és a membrán egyik lipidkomponense, a foszfátidiletanolamin (PE) között alakul ki. Az Atg8 transzlációját követően a fehérje C terminális hosszabb, azon nem glicin aminosavmaradék található, a terminális glicint az Atg4 proteáz szabadítja fel. Az Atg8 membránhoz kötése előtt még számos lépés zajlik le (a teljes folyamatot lásd az 2. ábrán). A meghasított Atg8 fehérje a továbbiakban aktiválódik. Az aktiválást Atg7 E1 típusú fehérje végzi ATP felhasználásával. Az aktiválás során az Atg8 kovalensen kötődik az Atg7-hez, majd ezt követően az Atg5-Atg12/Atg16 komplex, illetve az E2 típusú Atg3 enzim segítségével a PE-hoz kötődik. Az Atg5-Atg12/Atg16 komplex kialakításában szintén részt vesz az Atg7, mely aktiválja az Atg5-öt. Az Atg5 ezt követően az E2 típusú Atg10 segítségével konjugálódik az ubikvitin-szerű Atg12-höz. Az Atg5-Atg12 alegységek egy Atg16 molekulából álló mag köré szerveződve alakítják ki a kész Atg5-Atg12/Atg16 komplexet. Az autofagoszóma bezáródása után az Atg8 lehasítódik a membránról. Mivel a kettős membránnal körbevett autofagoszóma külső és belső oldala is Atg8-cal jelölt, a belső térbe került Atg8 a kialakuló üregbe zárul és csak az autofagoszóma beltartalmával együtt bomlik le. A lizoszómával történő fúzióhoz szükséges további, kizárólag az autofágiában résztvevő fehérjék nem ismertek.



2. ábra A makroautofágia szabályozásának kezdeti lépései. Az iniciációhoz szükséges Atg1 komplex aktivitását a TOR komplexen keresztül az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal és az AMPK határozza meg. Az iniciációhoz szükséges továbbá a vezikula nukleáció is, amely szabályozásának részletei pontosan nem ismertek.

2.1.2. Az autofágia szerepe a sejtműködésben

Az autofágia a sejt anyagainak lebontására szolgáló mechanizmus. A proteaszóma mellett az autofágia a mennyiségileg legjelentősebb fehérjedegradációs rendszer [2]. Aktiválódását előidézhetheti az éhezés okozta energiahiány, vagy a felépítő anyagcsere folyamatokhoz szükséges aminosavak, nitrogénvegyületek hiánya, illetve a károsodott makromolekulák felhalmozódása. Az autofágiának fontos szerepe van számos egyedfejlődési és sejtteni folyamat szabályozásában. Autofágiával bomlik le például a *Drosophila melanogaster* lárvá zsírteste [6], vagy emlősökben a vörösvértestek képződésekor a sejtmag kilökődése után az endoplazmatikus retikulum és a mitokondriumok [7, 8]. Az autofágia szükséges az emlős immunrendszer működése során, az MHCII-vel történő antigén prezentációhoz [9, 10]. Szerepe van a kórokozók elleni védekezésében, és az intracelluláris paraziták (pl. Mycobacterium, vírusok) elpusztításában [11, 12].

Az autofágia különböző típusai szelektívek lehetnek a lebontandó organelumokra (például pexofágia esetén a peroxiszómára, mitofágia esetében a mitokondriumokra), vagy molekulacsoportokra (például a KFERQ hordozó fehérjékre a chaperone-közvetített autofágiánál), illetve egyes molekulák szelektív felvételére is [2]. Élesztőben az Ape1 fehérje a makroautofágiával nagyrészt azonos molekuláris háttérű ún. Cvt útvonal segítségével jut a vakuumba [2].

A lebontó folyamatok közül az autofágia képes a citoplazma legnagyobb részét adott idő alatt lebontani. Éhezés során perfundált emlős májban [13], vagy izolált emlős májsejtekben [14] 1 óra alatt a citoplazma 4-5%-a is lebomolhat autofágiával. Ugyanez az érték emlős embrionális őssejtekben 2% [15], emlős fibroblasztokban és élesztőben pedig 1% [16, 17].

Kizárólag az autofágia képes a nagyméretű, membránnal határolt sejtalkotók eltávolítására, ami a hosszú életű ideg-, vagy izomsejtek túléléséhez nélkülözhetetlen. Az autofágia gátlása egérben súlyos, progresszív idegrendszeri tünetekhez vezet. A központi idegrendszerben bekövetkező jelentős neuron pusztulás után az állatok 80%-a még 4 hónapos koruk előtt elpusztul. A pusztulás oka feltehetően az autofágia által el nem távolított összecsapódott fehérjék és sejtalkotók károsító hatása [18, 19].

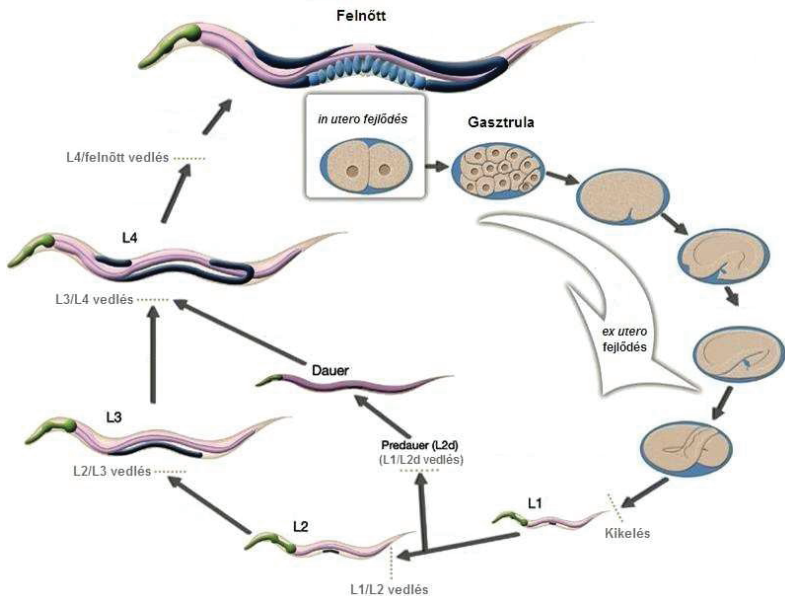
Az autofágia a sejtek pusztulását is okozhatja, ezért egyes kutatók az autofágiát a programozott sejthalál önálló típusának tekintik (PCD II-es típus) [20, 21]. Ezt alátámasztja, hogy a *Drosophila* nyálmirigysejtjei nem pusztulnak el amennyiben az autofágia működése gátolt [22]. Az autofágia szoros összefüggésben áll az I-es típusú programozott sejthalállal, az apoptózissal. A túlaktivált autofágia közvetett módon, apoptózis indukálásával is okozhatja a sejt pusztulását [23, 24].

2.2. *C. elegans* modell organizmus

A *Caenorhabditis elegans* (továbbiakban *C. elegans*) mérsékelt övi, szabadon élő, baktériumokkal táplálkozó, kifejlett állapotban 1,1-1,2 mm hosszúak fonalféreg. Normál körülmények között a vad típusú állatok 25°C-on kevesebb, mint 3 nap alatt, négy lárvastádiumon keresztül (L1-L4) fejlődnek ki (4. ábra) és átlagosan 2 hétig élnek. Nagy egyedsűrűség és tápanyagihiány mellett egy alternatív harmadik, úgynevezett dauer lárvastádiumon keresztül fejlődnek. A dauer lárva akár fél évig is élhet, kutikulája ellenálló és vastag. A *C. elegans*t speciális ivari dimorfizmus jellemzi; a populációt hím és híműs egyedek alkotják (3. ábra). Az önmegtermékenyítő híműsök a tiszta genetikai vonalak fenntartását, a hímek a genetikai vonalak kombinálását teszik lehetővé. Az oocitákat és spermiumokat is termelő híműs egyedek 25°C-on 3 nap után kezdenek embriókat képezni, a hím külső megtermékenyítése nélkül maximálisan 200-250 darabot. A hermafroditának 959, a hímnek 1031 testi sejtje van [25]. A sejtek egyedfejlődési leszármazása – egyedülként az eddig vizsgált élőlények között – invariáns és fénymikroszkóp segítségével meghatározott [25]. A haploid genom 5 testi, és 1 ivari kromoszómába szerveződve mintegy 100 Mb-ból áll, és körülbelül 19000 gént kódol. A *C. elegans* génjeinek legalább 50%-a szignifikáns szekvencia hasonlóságot mutat emberi génekkel [26]. 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 (több gén közös szabályozó régióval rendelkezik), amely az eukarióták között csak a fonalféregben ismert. A laboratóriumi kísérletek során a *C. elegans* törzsek a mikroorganizmusokhoz hasonlóan műanyag petri lemezekben, vagy folyadékkultúrában tenyészthetők.



3. ábra A *C. elegans* ivari dimorfizmusa. A természetes populációt többnyire hermafroditák (fent) alkotják, a hímek (lent) csak 0,2%-ban fordulnak elő. A képen látható két felnőtt állat között 3 lerakott pete látható.



4. ábra A *C. elegans* életciklusa. A *C. elegans* generációs ideje mindössze 3 nap 25°C-on. Az életciklus főbb stádiumai a következők: a zárt peteburkon belül végbemenő embriogenezis; a kikelést követően a lethargusnak nevezett nyugalmi állapotokkal és az azt követő vedlésekkel elhatárolt 4 lárvastádiumot magában foglaló lárvális fejlődés, majd a felnőttkor. Az L1 lárvállapotot követően magas hőmérséklet, táplálékhiány, vagy az úgynevezett dauer feromon hatására egy alternatív L3 lárvastádium, a dauerlárva alakulhat ki.

Az évek során felhalmozódott tudást az egyik első integrált adatbázis, a WormBase tartalmazza (www.wormbase.org). A képi adatbázist a WormAtlas (www.wormatlas.org) címen lehet elérni. Számos folyamatosan aktualizált irodalmi forrás található a Wormbookban (www.wormbook.org). A nemzetközi törzsgyűjteményt a Minnesotai egyetemen tartják fenn (CGC: Caenorhabditis Genetics Center, <http://dbw.msi.umn.edu/cgcbd/search.php>). A *C. elegans* fonálférgen végzett kutatásokat 2002-ben (Sydney Brenner, John Sulston és Robert H. Horvitz) és 2006-ban (Andrew Z. Fire és Craig C. Mello) orvosi Nobel-díjjal jutalmazták.

2.3. Neurodegeneratív betegségek

Neurodegeneratív betegségeknek nevezzük mindazokat a betegségeket, amelyek során a központi, vagy a környéki idegrendszerben idegsejtek károsodnak, vagy pusztulnak el, összefoglalóan, amelyek során neurodegeneráció következik be. Az emberi testben naponta külső beavatkozás nélkül is több mint 100 milliárd sejt pusztul el és termelődik újjá. A testet ért sérülések során egyes szervek, mint például a bőr, vagy a máj jelentős mértékű megújulásra képesek, az idegsejtek azonban korlátozott osztódási és regeneratív potenciállal rendelkeznek. A híres neuroanatómus Santiago Ramon y Cajal által a huszadik század elején felállított dogma szerint a kifejlett idegrendszerben „bármi elpusztulhat, de semmi sem regenerálódhat” [27]. Noha ez a dogma megdőlt, a neurogenesis térben és időben csak korlátozottan mehet végbe.

A neurodegeneratív betegségek emberek millióit érintik. Lefolyásuk általában lassú és főleg idősebb korban jelentkezik. Nőknél a reprodukív kor lezárultával, férfiak esetében a 60-as években nő meg a betegség megjelenésének a valószínűsége. A neurodegeneratív betegségek során először általában csak a sejtek funkciója károsodik [28]. Később a neuronok egyre gyorsuló mértékben elpusztulnak. Az idegrendszer plaszticitása miatt a tünetek akár az egyes funkcióért felelős neuronok 80%-ának elvesztéséig sem észlelhetők (például a Parkinson-kór esetében [29, 30]). A neuronok típusától függően sérülhetnek kognitív, motoros és szenzoros funkciók.

2.3.1. Neurodegeneratív betegségek csoportosítása

A neurodegeneratív betegségeket a molekuláris mechanizmus alapján csoportosítva, beszélhetünk fehérjék aggregálódásával járó konformációs neurodegeneratív betegségekről, illetve excitotoxikus hatás (az ingerlő szinapszisokban található receptorok túlaktiválása miatt fellépő hatás) által kiváltott neurodegeneratív folyamatról [31, 32]. Az Alzheimer, Parkinson, Huntington-kór és számos további neurodegeneratív betegség esetében szinte mindig ki lehet mutatni fehérjeaggregációt. Sokáig azt feltételezték, hogy az összecsapódott fehérjeplakkok állnak az egyes betegségek hátterében. A legújabb kutatások szerint azonban a fehérjeplakkok jelenléte, mérete és az elszennvedett károsodás mértéke nincs közvetlen összefüggésben. Sokkal valószínűbb, hogy a plakkok kialakulása a sejtekben megjelenő abnormális konformációjú fehérjékre adott védekező válasz eredménye [33-37]. A nem megfelelően „feltekeredett” fehérjék mellett, hogy képtelenek eredeti funkciójukat betölteni, a fehérjemagból kiszabadult hidrofób aminosav

oldalláncaikkal a legkülönbözőbb sejtalkotókhoz csapódhatnak ki. A hidrofób felszíneiknél fogva megkötött sejtvázelemek, hősokkfehérjék, transzkripciós faktorok, membrán csatornák károsodása a sejt pusztulásához vezethet. A sérült fehérjék aggregálódása a sejt a túlélését szolgálja, nem pedig a pusztulást okozza [33-37].

A neuronok membránreceptorainak túlzott mértékű, vagy túl hosszú ideig tartó ingerlése nyomán excitotoxikus hatás lép fel. A fehérjeaggregációs betegségekhez hasonlóan ez is az idegsejtek funkcióvesztésével, majd pusztulásával járó jelenség. Excitotoxikus hatás alakulhat ki, ha az ionsatorna funkciójú receptor liganduma a sejten kívüli térben a fiziológiásnál hosszabb ideig, vagy nagyobb mértékben van jelen. Ezt okozhatja az adott ingerületátvivő anyag termelődésének abnormális mértékű fokozódása, vagy a visszanyerésének csökkenése [32]. A visszanyerés mértéke romolhat például sérülés nyomán bekövetkező iszkémia miatt (vérrellátási zavar következtében kialakult oxigénhiány). Az iszkémia során azért halmozódhat fel a fiziológiásnál nagyobb mennyiségű ingerületátvivő anyag, mert ezek eltávolítása a sejtközi térből energiaigényes folyamat, az oxigén-, illetve glükózhány viszont lokális energiahányt okoz [38, 39]. Excitotoxicitás mesterségesen is kiváltható neurotranszmitter analógok beadásával.

Az excitotoxikus hatás során a sejtártya ionsatornáinak túlzott aktiválása az idegsejtek depolarizációját okozza, az ionsatorna ligandumának folyamatos jelenléte miatt pedig nem tud repolarizálódni a sejt. A nyitott csatorna következtében az intracelluláris Ca^{2+} szint tartósan megnő, és ez idővel a mitokondriumok károsodását, illetve foszfolipázok, endonukleázok és proteázok (például a calpainok) aktiválódását okozza. Az idegsejt végül apoptotizál, vagy szabályozott, de az apoptotiztól különböző, kaspázfüggetlen módon nekrozissal pusztul el [40].

Számos olyan betegség ismert, amelyben az excitotoxikus hatásmechanizmusnak szerepe van. Ilyen például a sztrók, a traumás agysérülések, az Alzheimer-kór, az amiotrófiás laterális szklerózis, a Parkinson-kór és a Huntington-kór [41-47]. A sztrók és a traumás agysérülések esetében a fizikai károsodás következtében fellépő iszkémia miatti glutamát felhalmozódás, az Alzheimer-kór, az amiotrófiás laterális szklerózis, a Parkinson-kór és a Huntington-kór esetében pedig az aggregálódó fehérjék ionsatornákat befolyásoló hatása állhat a háttérben.

2.3.2. Neurodegeneratív betegségek vizsgálatához használt állati modellek

2.3.2.1. Aggregáción alapuló modellek

Az emberi neurodegeneratív folyamatokban bizonyítottan résztvevő fehérjék hatását in vivo állati modellekben vizsgálják. A betegségben érintett fehérjét kódoló gént szövetspecifikus promóterrel vad típusú állatokban expresszáltatják. A transzsgén kifejeződésének hatása ezt követően élettani, molekuláris biológiai eszközökkel vizsgálható. Ilyen modellt készítettek már *Caenorhabditis elegans*ban, *Drosophila melanogaster*ben, *Zebra dani*óban és egérben [48-51].

2.3.2.2. Excitotoxikus modellek

Az idegrendszer működése során termelődő ingerületátvivő anyagok, mint például a glutamát és a dopamin, illetve mesterséges vegyületek, (mint például a glutamát receptorokra ható agonisták, az N-metil-D-aszparaginsav (NMDA), vagy a kainát sav) megfelelő mennyiségben képesek úgynevezett excitotoxikus hatást kiváltani [52]. Felhasználásuk nem korlátozódik az emlős vagy gerinces modellekre. A kezelés célpontjának számító ioncsatornák konzerváltsága miatt olyan nem gerinces modellorganizmusokon is alkalmazhatóak, mint a *Caenorhabditis elegans* és a *Drosophila melanogaster* [53]. A kémiai kezeléshez hasonló hatásúak bizonyos gének mutációi. Ilyenek a sejtthártyában található degenerin család tagjai (DEG/ENaC) tagjait kódoló gének.

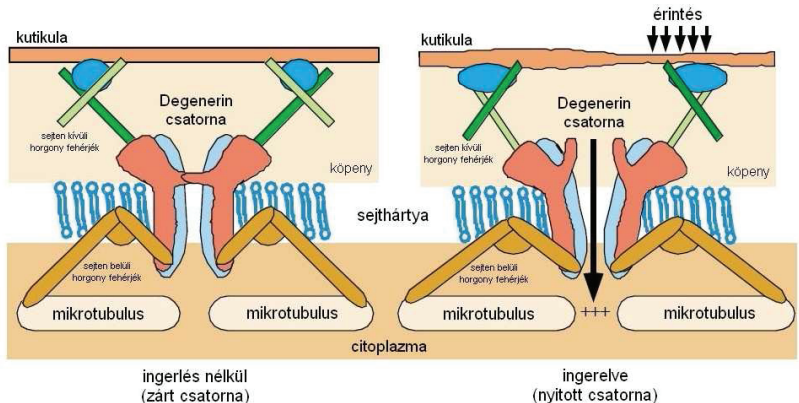
Az excitotoxikus modellek vizsgálata nem csak a trauma nyomán fellépő neurodegeneratív folyamatok jobb megértése miatt fontos. Az aggregáción alapuló és az excitotoxikus neurodegeneratív folyamatok egyszerre jelentkezhetnek számos betegség esetében (például: Alzheimer-kór, az amiotrófiás laterál szklerózis, a Parkinson-kór és a Huntington-kór [41-47]).

2.3.2.2.1. Degenerin modellek *C. elegans*ban

A Degenerin/Epithelial amiloride-sensitive Sodium Channel (DEG/ENaC) fehérjecs család tagjai nem feszültségfüggő, amiloride érzékeny kationcsatornák. A fehérjecs család tagjai számos gerinces és gerinctelen fajban megtalálhatóak [54]. A degenerin fehérjecs család és más ioncsatorna alegységek hiperaktív mutáns formáinak

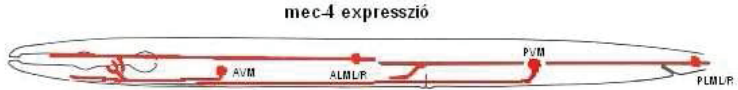
segítségével *C. elegans*-ban vizsgálható az excitotoxikus neurodegeneráció mechanizmusa. A *deg-3* gén a konzervált nikotinos acetilkolin receptor (nAChR) *C. elegans* ortológjának alfa alegységét kódolja [55]. A *C. elegans* nAChR a degenerinekhez hasonlóan kationcsatornaként működik. A *deg-3(u662)* funkcióyerékes mutáció által kiváltott idegsejtpusztulás nem mutat eltérést a degenerin mutációk által kiváltott pusztulástól [40]. A funkcionális hasonlóság miatt dolgozatomban a *deg-3* gént, bár nem degenerin, nem különítem el a degenerinektől.

A degenerin MEC-4 és DEG-1, illetve a degenerinekhez hasonló működésű DEG-3 fehérjék neuronokban fejeződnek ki, a sejthártyában található ioncsatornák felépítésében vesznek részt. Funkcióyerékes alléjaik az ioncsatornák túlműködését, ezáltal a neuronok duzzadását, majd nekrotikus pusztulását okozhatják [56].



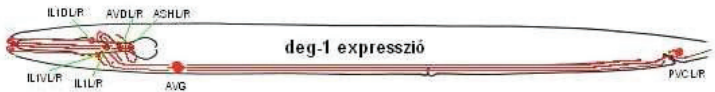
5. ábra A MEC-4/MEC-10 ioncsatorna felépítése és működése. A: zárt degenerin csatorna sematikus képe. A csatorna a neuron sejthártyájában helyezkedik el, de horgonyfehérjékkel mind a kutikulához, mind a sejten belüli mikrotubuláris rendszerhez ki van pányvázva. Mechanikus inger (érintés) hatására, a horgonyfehérjék közvetítésével a csatorna ingerlődik és kinyílik. B: nyitott degenerin csatorna, amelyen át kationok áramolhatnak a neuron citoplazmájába, ezáltal depolarizálva a sejthártyát. ([57], módosítva)

A *mec-4* gén egy amiloride érzékeny, nátrium-csatorna alegységet kódol, melynek mutációja 6 érintésérzékelő idegsejtet érint (6. ábra, [58]). A mutáció által érintett sejtek pusztulása az embrionális fejlődés során megkezdődik. A legtöbb sejt az L2 stádiumban pusztul el, de a pusztulás csökkent mértékben egészen az állatok haláláig tart.



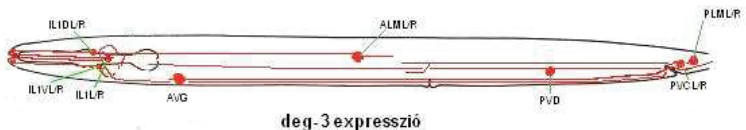
6. ábra A *mec-4* idegsejtpusztulási modell. A MEC-4 fehérje az AVM, ALML, ALMR, PVM, PLML és PLMR érzékelő idegsejtekben fejeződik ki.

A *deg-1* gén is amiloride érzékeny, kation csatorna alegységet kódol. Számos inter-, amphid- és érintésérzékítő neuronban fejeződik ki (7. ábra, [59]). A sejtek pusztulása a *deg-1* mutánsokban embrionális korban kezdődik és az L1-L2 stádiumban a legintenzívebb.



7. ábra A *deg-1* idegsejtpusztulási modell. A DEG-1 fehérje az AVG, AVDL, AVDR, PVCL, PVCR inter-, ASHL, ASHR amphid- és IL1L, IL1R, IL1DL, IL1DR, IL1VL, IL1VR érintésérzékítő neuronokban fejeződik ki.

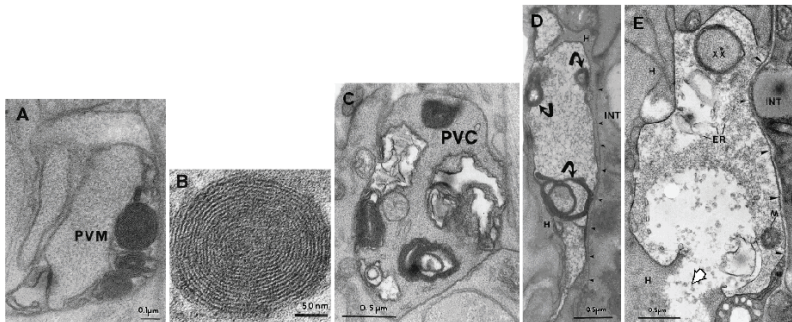
A *deg-3* a nikotinos acetilkolin receptor (nAChR) alfa alegységét kódoló gén. Funkcióyerékes mutációja számos interneuront és érintésérzékítő neuront érint (8. ábra). Ezen sejtek pusztulása főleg az L1-L3 stádiumban figyelhető meg.



8. ábra A *deg-3* idegsejtpusztulási modell. A DEG-3 fehérje az AVG, PVCL, PVCR interneuronokban és az érintésérzékítő ALML, ALMR, IL1L, IL1R, IL1DL, IL1DR, IL1VL, IL1VR, PLML, PLMR, PVD neuronokban fejeződik ki.

A *mec-4*, *deg-1* és *deg-3* gének funkcióyerékes mutációi folyamatosan aktív állapotban tartják a sejtmembránban elhelyezkedő ioncsatornákat, amely a sejtek pusztulását okozhatja [60]. A mutánsokban nem hal meg minden érintett sejt, mivel véletlen faktortól is függ, hogy az érintett sejtek képesek-e kompenzálni a károsító hatást [61].

A *mec-4*, *deg-1* és *deg-3* funkcióyeréses mutánsokban az elpusztuló sejtek egy jól karakterizálható nekrotikus folyamaton mennek keresztül. Kezdetben a sejt megduzzad és megváltoznak optikai tulajdonságai. Ebben az állapotban a pusztuló sejt kis nagyítású fénymikroszkóppal is könnyen azonosítható. A maximális méret elérése után a sejt zsugorodni kezd, majd végül eltűnik. A degeneráció 4-24 órán belül zajlik le. A duzzadó sejt mérete változó, a farokban található sejtek például hatalmas hólyaggá duzzadhatnak fel [61]. Az elektronmikroszkópos megfigyelések alapján a pusztuló sejtben sokszorosan feltekeredett membrán struktúrák képződnek. A citoplazmában kisebb vakuolák jelennek meg és a maganyag a sejtmaghártya belső felszínén kisebb csomókba áll össze. A degeneráció előrehaladtával a sejt egyre jobban megduzzad és lekerekedik, eldobja axonjait és dendritjeit, nagy vakuolák jelennek meg benne. A sejtmag eltorzul, betűrődések és lefűződések jelennek meg benne, a maganyag szétföredezik. A citoplazma áttetszővé válik, ami a citoplazmatikus komponensek degradációjára utal. A mitokondriumok ekkor még épek, csak a pusztulási folyamat végén bomlanak le. A pusztulás végső fázisában már nincs felismerhető sejtmag, sejt szervecske. Maradékaik kompakt, elektrondenz testecskék formájában figyelhetők meg a citoplazmában. Az elpusztuló sejtet a szomszédos sejtek bekebelezhetik, vagy a nyúlványaikkal teljesen elszigetelhetik az alaphártyától, illetve a többi sejtől (mielinizáció). A degeneráció késői fázisától a sejt nekrotizálhat, vagyis a sejthártya felszakadásával ellenőrizetlen, szabályozatlan pusztulási folyamaton mehet keresztül.

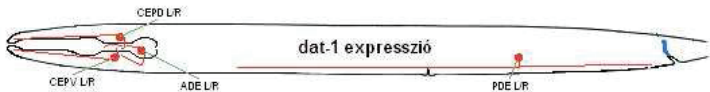


9. ábra Pusztuló sejtek elektronmikroszkópos képe *C. elegans* degenerin mutánsokból. A: a degenerálódás elején lévő PVM sejt transzmissziós elektronmikroszkópos képe. B: a kinagyított spirális membrán struktúrák. C: a pusztulás előrehaladott fázisában lévő PVC sejt. D,E: Késői fázisban lévő PVM sejtek, melyekben sejtmag, vagy más ép sejt szervecske már egyik síkban sem volt megtalálható. A D képen egy intakt sejtmembránú, a hypodermális sejt nyúlványával körbevett sejt, míg az E képen egy lizáló sejt látható. A teli

nyílak az autofág vakuolákra mutatnak, míg az üres nyíl a lizáló sejt felszakadt sejtmembránját jelzi ([61], módosítva).

2.3.2.2.2. 6-hidroxidopamin neurotoxinon alapuló *C. elegans* modell

Számos mesterségesen előállított neurotranszmitter, vagy neurotranszmitter analóg válthat ki neurodegenerációs betegségekre jellemző neuron pusztulási mintázatot. Ilyen anyag például a 6-hidroxidopamin (6-OHDA) neurotoxin. Segítségével a degenerineken alapuló modellhez nagyon hasonló neurodegeneratív modell hozható létre. A modell alapja egy olyan transzgénikus *C. elegans* törzs melynek mind a 8 dopaminerg neuronja GFP-vel (Green Fluorescent Protein) jelölt. A *gfp* gén aktivitását a neurotoxinra specifikus receptort kódoló gén (*dat-1*) promotere szabályozza, ami így csak a neurotoxinra érzékeny sejtekben fejeződik ki (*pdat-1::gfp*). A transzgénikus állatokat 6-OHDA-nal kezelik, majd 24 óra elteltével megszámlálják hány neuron, illetve idegsejtnyúlvány pusztult el. A GFP használata azért szükséges, mert a degenerin-indukált pusztulással szemben ebben a modellben nem duzzadnak meg a sejtek. Így Nomarski mikroszkópiával nem állapítható meg, melyik idegsejt pusztul el és melyik él túl.



10. ábra *pdat-1::gfp* idegsejtpusztulási modell. A DAT-1 dopamin receptor a CEPDL, CEPDR, CEPVL, CEPVR, ADEL, ADER, PDEL és PDER neuronokban fejeződik ki.

2.4. A sejt méret szabályozása

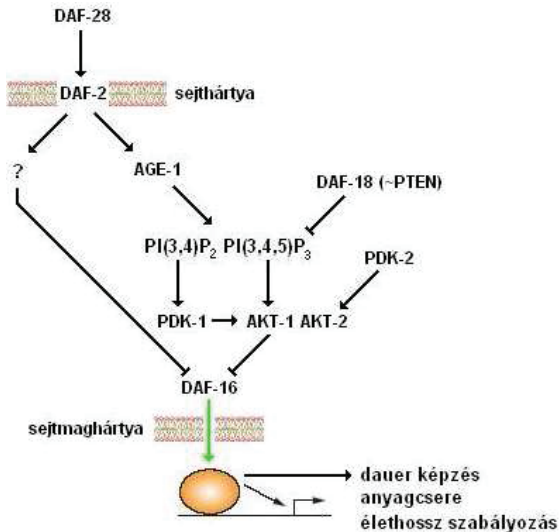
A többsejtű élőlények testének méretét alapvetően az azt felépítő sejtek száma és mérete határozza meg. A sejt méretet a lebontó és a felépítő folyamatok viszonya, a sejtszámot az osztódások gyakorisága határozza meg. A sejt ciklus szabályozása intenzíven vizsgált és viszonylag jól megértett terület. A sejtek méretének szabályozásáról azonban keveset tudunk [62].

A sejt méretet szabályozó mechanizmusok közé tartozik a ciklin – ciklin-függő kináz rendszer, amely a sejtosztódás előtt ellenőrzi, hogy a sejt elérte-e az osztódáshoz szükséges minimális méretet [63, 64]. A sejt méretet befolyásolja a ploideasint is. A genom kópiaszámának növekedése számos fajban a sejt méret növekedésével jár [65]. *Drosophilában* az alacsony hőmérséklet a szárnyak, a lábak és a szemek

megnagyobbodását okozza, a sejtek számának gyarapodása nélkül [66]. A hőmérséklet tehát ugyancsak hatással lehet a sejtméretre.

Az inzulin/Inzulinszerű Növekedési Faktor 1 (inzulin/ Insulin-like Growth Factor-1; rövidítve: inzulin/IGF-1) genetikai útvonal minden többsejtű állatban megtalálható. Bizonyos komponensei már az egysejtűekben, így például az élesztőben is jelen vannak. Nevét onnan kapta, hogy az inzulin/IGF-1 útvonal által közvetített hatásokat emlősökben két, az inzulin és az IGF-1 jelmolekulákkal jellemezhető genetikai útvonal közvetíti. Mind az inzulin, mind az IGF-1 alacsony molekulatömegű peptid [67]. Az inzulin hormon, amely a hasnyálmirigy Langerhans sejtjeiben termelődik és főleg a glükóz anyagcsere szabályozásában vesz részt. Emellett hat a lipid anyagcserére és anabolikus hatása is van [68]. Az IGF-1 hormonnaként és növekedési faktorként is működik [69]. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal aktivitása elsősorban a tápanyagok mennyiségétől függ. Az útvonal befolyásolja az energiaháztartást, a sejt növekedést, a sejtosztódást, az élettartamot és az idegrendszer működését [70].

Az inzulin/IGF-1 útvonal receptorának (InR receptor) inaktíválása *Drosophilában*, illetve csökkent aktivitása emlősökben kis testméretet eredményez [71, 72]. *C. elegansban* az inzulin/IGF-1 útvonal receptora a DAF-2 fehérje. Citoplazmatikus komponensei, az AGE-1, PDK és AKT fehérjék. A jelátviteli útvonal aktivitása a „downstream” helyzetű DAF-16/FOXO transzkripciósi faktor inaktíválását eredményezi (11. ábra). A DAF-16 több száz célgén kifejeződését szabályozza közvetlenül [73-75]. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonalnak *C. elegansban* több szignálmolekulája van (INS-1, INS-7, INS-18 és DAF-28; [76, 77]. A tirozin kináz aktivitású DAF-2 receptor a ligandum kötés hatására dimerizálódik és aktiválja az AGE-1 foszfoinozítid-3-kináz molekulát. Utóbbi a foszfoinozítid-3,4-difoszfátot (PIP₂) foszforillálja tovább foszfoinozítid-3,4,5-trifoszfáttá (PIP₃). Az AKT-1 részben a PDK-1 foszfoinozítid-függő kinázon, részben a foszfoinozítid-3,4,5-trifoszfáton át közvetlenül aktiválódik. Az AKT-1 protein kináz a DAF-16-ot foszforillálja [78]. A foszforillált DAF-16 nem képes a sejtmagba jutni. Az inzulin/IGF-1 útvonal egyetlen gátló tagja a DAF-18 foszfatáz, amely a PTEN humán tumor szuppresszor ortológja [79]. Az AKT-1 és a DAF-16 által szabályozott gének egyike a *CeTor/let-363* [23]. A *CeTor* az élesztő *TOR2* ortológja, amely az autofágia egyik fő szabályozó faktora. *C. elegansban* az inzulin/IGF-1 útvonal fontos szerepet játszik az alternatív egyedfejlődési állapotot képviselő dauer lárva kialakításában, hatással van a fertilitásra, az életképességre és a HRP-1 fehérjén keresztül a telomer szerkezet kialakítására is [80].



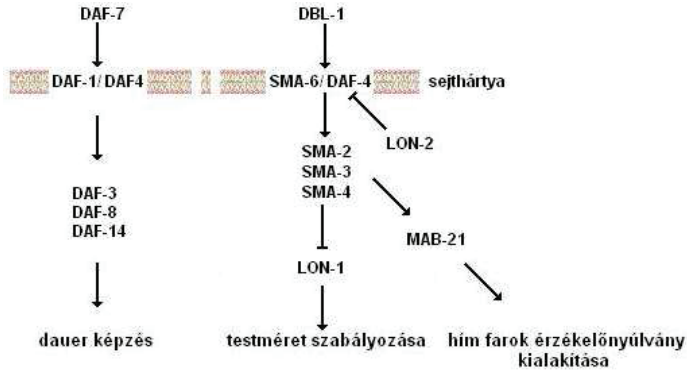
11. ábra Inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal *C. elegans*ban.

Emlősökben a TGF- β családba tartozó molekulák (Bone Morphogenetic Proteins 2-7, BMPs) szabályozzák a csont, porc és izomfejlődést, hatással vannak a sejtosztódásra, differenciálódásra, celluláris szenescenciára és autokrin növekedési faktorként is működhetnek [81]. *Drosophilában* a *decapentaplegic* nevű morfogén egy TGF- β ortológ. Gyümölcsleányban a TGF- β jelátviteli útvonal az idegrendszer fejlődésében [82], illetve a csíravonal és a spermatogenezis szabályozásában is részt vesz [83].

*C. elegans*ban a TGF- β genetikai útvonal a sejtek méretének szabályozásán keresztül befolyásolja a testméretet [84]. Az útvonal a receptorok szintjén sajátosság változatosságot mutat. A TGF- β receptor heterodimer, amely az összetételétől függően különböző folyamatok szabályozásában vehet részt. Amennyiben a DAF-4 és a DAF-1 receptor alegységek kapcsolódnak össze, akkor az útvonal a dauer lárva fejlődést szabályozza. Amennyiben a DAF-4 és a SMA-6 receptor alegységek kapcsolódnak, akkor az útvonal a testméret szabályozásában vesz részt [85].

A TGF- β útvonalban a *daf-7*, *daf-1*, *daf-4*, *daf-8* gének mutációi Daf-c (dauer formation constitutive, konstitutívan dauer lárva képző), míg a *daf-3* és *daf-14* gének mutációi Daf-d (dauer formation defective, dauer lárva képzésre képtelen) fenotípust eredményeznek. Ugyanezen útvonal testhossz meghatározásért felelős részében a *dbl-1*,

sma-6, *sma-2*, *sma-3*, *sma-4* mutációk fenotípusa Sma (Small, rövid testhosszú), míg a *lon-2*, *lon-1* mutációk fenotípusa Lon (Long, nagy testhosszú). A *mab-21* gén a hím állatok pázásban részt vevő farki érzékelő-struktúráinak kialakításában vesz részt, így funkcióvesztéses mutációja Mab (Male-tail abnormal) fenotípust eredményez [86].

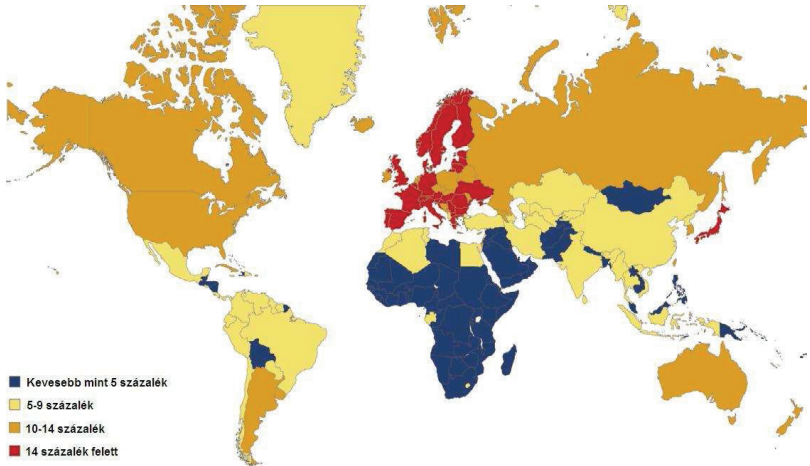


12. ábra TGF- β jelátviteli útvonal *C. elegans*ban.

2.5. Az öregedési folyamat biológiája

2.5.1. Öregedő társadalmak

A XXI. században számos ország néz szembe a társadalom előregedésének problémájával. Európa, Észak-Amerika, Ausztrália, Új-Zéland és Ázsia fejlett országaiban a várható élettartam a 80 évet is meghaladhatja. Az ENSZ jelentéseit is összeállító PRB (Population Reference Bureau, www.prb.org) 2007-es becslése szerint a gyerekvállalási kedv csökkenése, illetve a várható élettartam emelkedése tovább folytatódik a következő 50 évben. Az előrejelzés szerint 2050-re a fejlett országok lakosságának 26%-a, a világ népességének 16%-a lesz 64 évesnél idősebb (State of World Population 2007, <http://www.unfpa.org/>). Az idős emberek arányának növekedése miatt fontos, hogy megismerjük az öregedés biológiai alapjait. Ennek a tudásnak a birtokában megelőzhető vagy késleltethető lenne az öregedés során fellépő káros folyamatok kialakulása, ezáltal jobb életminőség lenne elérhető.



13. ábra A 64 évesnél idősebbek aránya a népességben belül a világ országaiban, 2007-ben. (World Population Data Sheet 2007, <http://www.prb.org/>).

2.5.2. Öregedési elméletek

Számos öregedési elmélet született evolúciós és mechanisztikus alapon (1. táblázat). Ezek általában csak egy szempontból vizsgálták az öregedés komplex folyamatát. A legutóbbi elméletek a többi elmélet figyelembevételével, hálózatalméleti alapon készültek [87].

1. táblázat. Az öregedést magyarázó főbb evolúciós elméletek

Mutáció akkumulációs elmélet [88]	A reprodukív kort követően csökken a szelekciós nyomás. Az emiatt felhalmozódó mutációk okozzák az öregedést.
Antagonisztikus pleiotrópia elmélet [89]	A fiatal korban előnyös gének a kor előrehaladtával károsá válnak (gyorsabb metabolizmus, nagyobb szabadgyökök terhelés).
Felesleges test elmélet [87, 90]	A test a reprodukív időszak után „eldobhatóvá” válik, a karbantartását végző mechanizmusokra tovább nincsen szükség.
Hibakatasztrófa elmélet [91]	A transláció során véletlenszerűen bekövetkező hibák a translációs mechanizmus komponenseit is károsítják. Emiatt csökken a transláció pontossága. Az így létrejövő egyre csökkenő hatékonyságú pozitív visszacsatolási ciklus okozza az öregedést.
Szomatikus mutáció elmélet [91]	A szomatikus sejtek osztódása során felhalmozódó mutációk teszik működésképtelenné a szervezetet.
Mitochondriális elmélet [91]	A szomatikus mutációk először a kevésbé hatékony DNS hibajavító mechanizmussal rendelkező mitokondriumok génjeit teszik tönkre, a hibás organelumok pedig megzavarják a sejtek működését.
Szabadgyökök elmélet [92]	Az oxidatív foszforilláció során keletkező reaktív oxigén gyökök (ROS) károsítják a sejt makromolekuláit, ami öregedéshez vezet.
A nitrogén oxid elmélet [93]	A stressz, gyulladás és fertőzések során felszabaduló nitrogén oxidok hosszabb távon károsítják a szervezetet és öregedéshez vezetnek.

2.5.3. Az öregedési folyamat

Az öregedés soktényezős, progresszív jellegű, a szervezet állapotának folyamatos romlásával együtt járó folyamat [94]. Károsító hatások állandóan érik a szervezetet, de számos hibajavító mechanizmus felügyeli a szervezet épségét. Az örökítőanyagban keletkező hibákat a DNS hibajavító rendszerek (BER, Base excision repair; NER,

Nucleotide excision repair; MMR, Mismatch repair; NHEJ, non-homologous end joining és a rekombinációs hibajavítás) küszöbök ki [95]. A károsodott, vagy nem megfelelően szintetizált fehérje molekulákat a fehérje homeosztázis puffer (chaperone rendszer, proteaszomális és autofág fehérje lebontás) hivatott kijavítani [95]. A sejt érzékeli a sejtszervecskék sérülését is, ezek az autofágia aktiválásával távolíthatók el [95]. A hibajavítás sikertelensége esetén a nem megfelelően működő sejtek belső jelekre (DNS károsodás esetén a p53 aktiválódás, sérült mitokondriumnál a citoplazmába kiszabaduló citokrom c, lyukas membránon beáramló Ca^{2+} aktivált calpainok által, stb.) vagy a környezetükből érkező inger hatására (T limfocita által kifejezett „halál-ligandumok”, illetve a sejten található Fas-, TRAIL-R, TNF-R1, IL-1R „halál-receptorok”) programozott sejthalállal pusztulnak el [95]. Helyüket szöveti őssejtekből, vagy a környező sejtekből képződött új sejtek foglalják el.

A hibajavító mechanizmusok a reprodukív korban funkcionálisan képesek közel állandó szinten tartani a szervezet állapotát. A bekövetkező károsodások azonban nyomot hagyhatnak. A fehérjemolekulák megőrzik létezésük végéig apró szerkezeti torzulások formájában egy részleges denaturáció emlékét. A testi sejtek örökítőanyagában mutációk halmozódnak fel, a fehérjék az öregedéssel karbonilálódnak. A betegségek és az apró sérülések következtében megváltozik a szöveti struktúra, növekedik a kötőszövet aránya. 60-65 év felett a felgyülemelő, ki nem javított hibák a szervezet elhasználódásához, civilizációs betegségek megjelenéséhez vezethetnek. Ilyenek a fentebb részletesen jellemzett neurodegeneratív betegségek (közülük is főleg az Alzheimer-kór), az újabban fiatalokban is jelentkező elhízás, a rák megannyi formája, a csökkent inzulin termelés, vagy az inzulin rezisztencia által kiváltott II-es típusú cukorbetegség, a szív és érrendszeri betegségek, a vesebetegségek, az autoimmun betegségek, az időskori izomsorvadás (szarkopénia), a csontritkulás, a sztrók és a depresszió. Ezekkel a korfüggő megbetegedésekkel egy új orvosi szakma, a geriátria foglalkozik.

2.5.4. Öregedést befolyásoló főbb genetikai és környezeti faktork

2.5.4.1. Inzulin/IGF-1 jelátviteli út vonal

Az inzulin/IGF-1 jelátviteli út vonal kapcsolatban van az eddig leírt öregedést befolyásoló genetikai és környezeti faktork szinte mindegyikével [78, 95]. *C. elegans* fonálféregben az út vonal receptorának, a DAF-2-nek a gátlása az élethossz

megkétszereződéshez vezet. Az inzulin/IGF-1 jelátvitel gátlása élettartam növelő hatású *Drosophilában* és egérben is [96-98]. Az inzulin/IGF-1 útvonal gátlása az élethossz befolyásolásán túl számos egyéb, az öregedési folyamatra jellemző tünet megjelenését is késlelteti. *C. elegans*ban az időskori izomdegeneráció miatti bénulás a vad típusra jellemző 8-9 nap helyett hetekkel később jelenik meg [99]. Az öregedési pigmentek felhalmozódása 25°C-on 5 nap helyett 20 nap alatt éri el a vad típus esetében megfigyelhető értéket [100].

2.5.4.2. TOR kináz

A TOR (Target of Rapamycin) nevét az eredetileg antifungális antibiotikumnak fejlesztett, majd immunzsuppresszív hatása miatt a szervátültetések során alkalmazott Rapamycinnek köszönheti. A TOR jelátviteli út központi eleme a TOR kináz. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal, az aminosavak elérhetősége és az AMP függő kináz (AMPK) egyaránt szabályozza aktivitását [101]. A TOR kináz élesztőben és emlős modellekben az autofágiát és a transláció aktivitását is befolyásolja (KEGG signaling pathways, <http://www.genome.jp/kegg>). Inaktiválása *C. elegans* [23], *Drosophila* [102] és élesztő [103] modell rendszerekben az élethossz jelentős növekedésével jár.

2.5.4.3. Kalóriakorlátozás

A kalória korlátozás során a szokásosnál lényegesen kevesebb, de a túléléshez még éppen elegendő mennyiségű táplálékhoz jut a szervezet. McCay és Crowell 1934-es megfigyelései szerint patkányok napi táplálékadagját bizonyos határig csökkentve megfelelő minőség és összetétel esetén a szervezet nem károsodik, sőt az élethossz jelentősen megnő [104]. Később ezeket az eredményeket egéren [105], *Drosophilán* [106], *C. elegans*on [107] és *Macaca mulatta*-n [108] végzett kísérletek megerősítették. *C. elegans*ban a kalória korlátozás által kiváltott élettartam növekedéshez szükséges a *pha-4/FOXA* és a *skn-1* gén működése, de a genetikai háttér részleteiben még nem tisztázott [107, 109].

2.5.4.4. Mitochondriális légzési lánc

A mitokondrium citoplazmatikus, önálló cirkuláris kromoszómával rendelkező, kettősmembránnal határolt, anyai öröklődésű sejtszervecske. A sejt energiaközpontja, az ATP szintézis színhelye, az egyik fő Ca^{2+} raktár. A mitokondriumok elektron

transzportláncának működése során képződő reaktív oxigéngyökök (ROS) a szervezetet érő oxidatív károsodás fő forrásai.

Mivel számos emberi betegség mitokondriális rendellenességre vezethető vissza, a mitokondriális gének inaktiválásától az élethossz csökkenése várható. Ezzel ellentétben *C. elegans*-ban számos mitokondriális gén RNS interferenciával történő „csendesítése” 20-200%-os élethossz növekedést okoz [110]. Az ellentmondást Rea és mtsai 2007-es cikkükben azzal oldják fel, hogy ez a hatás csak bizonyos, csökkent mértékű inaktiválás esetén áll fenn és a háttérben az egyedfejlődés bizonyos pontján a sejtosztódást szabályozó DNS ellenőrző pontokkal kialakuló kölcsönhatás állhat [110].

2.5.4.5. Az autofág gének hatása az élethosszra

Az autofágia szerepét az öregedésben először 2003-ban Meléndez és mtsai írták le [111]. A *daf-2(e1370)* inzulin/IGF-1 mutáns hosszú élet fenotípusát a *bec-1* RNSi kezeléssel képes részlegesen szuppresszálni. A *daf-2(e1370)* mutáns vad típushoz képest megnövekedett élethosszának kialakításához szükséges a *bec-1* autofág gén működése. Hars és mtsai 2007-es cikkükben két másik RNS interferencia segítségével inaktivált autofág génről (*Atg7*, *Atg12*) bizonyították, hogy azok is szükségesek a vad típusú élethossz eléréséhez [112].

2.5.5. Az öregedési folyamat vizsgálata

Az élettartam önmagában nem informál az élőlény „egészségi” állapotáról. Az öregedést számos sejt és szervezet-szintű öregedési jelenség kíséri, például izomsorvadás, öregedési pigment felhalmozódás, testméret csökkenés, fehérje karboniláció és bizonyos enzimek (pl. tirozin kinázok, lizoszómális hidrolázok) aktivitásának csökkenése [113]. Ezek a szervezet fiziológiai állapotával és/vagy az öregedéssel szoros összefüggésben lévő paraméterek, amelyek nyomkövetésével kvantifikálhatjuk az öregedés folyamatát.

A sejt lebontó szervecskéiben, a lizoszómákban folyamatosan halmozódnak a tovább már nem bontható maradékanyagok, amelyeket öregedési pigmenteknek hívunk. Ezek számos keresztlinket tartalmazó fluoreszcens anyagcseretermékek, melyek jórészt a szintén összetett lipofuszcinnból és AGE-ből (Advanced Glycation Endproducts) állnak [100]. Az öregedés során a regenerációra csak korlátozottan képes vázizomzat fokozatosan leépülni. A folyamat neve szarkopénia, vagy korfüggő izomdegeneráció, amely minden elkülönült izomzattal rendelkező élőlényben megfigyelhető. A leépülés korrelál az

öregedési folyamat sebességével, idővel mozgászavarokat, majd kiteljesedett formában teljes bénulást eredményez. További jól használható öregedési marker a sejten belüli AMP/ATP arány, amely a sejt öregedésének előrehaladtával fokozatosan emelkedik [114]. Az emberi gyógyászatban ezt a módszert már több mint 20 éve rutinszerűen használják [115]).

C. elegans specifikus módszer a thermotolerancia mérése [116, 117]. Ennek során az állatok teljes hőstresszel szembeni ellenálló képességét mérjük, nyomon követve, hogy meddig képesek elviselni a számukra letális 35°C-os hőmérsékletet. Ez közvetve összefüggésben van a hősokkfehérjék termelésének a képességével, mely a thermotoleranciával együtt csökken az öregedés során [118]. Ugyancsak *C. elegans* specifikus a garatpumpálás vizsgálata, illetve a defekációs frekvencia meghatározása is: mindkettő csökkenést mutat az öregedéssel [113].

3. Célkitűzések

3.1. Az autofág gének szerepének vizsgálata a neurodegenerációban

C. elegans modellrendszerben az éhezés befolyásolja a hiperaktív degenerinek által kiváltott sejtpusztulást [40]. Az éhezés hatására csökken a pusztulásban érintett aszpartil-proteázok aktivitása, gátlódik az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal működése és fokozódik az autofág aktivitás. Az autofágiáról ismert, hogy szabályozásában az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonalnak kitüntetett szerepet van [111]. A neurodegenerációs modellek vizsgálata során jellegzetes membrán átrendeződéssel járó folyamatokat írtak le, amelyek jelenléte az autofágia aktiválódására utalhatnak. Ezek a körülmények arra engedtek következtetni, hogy a degenerinek által kiváltott sejtpusztulásban az autofágiának is szerepe lehet.

Kísérleteimben azt vizsgáltam, hogy az autofág géneknek milyen szerepe van a hiperaktív degenerinek, illetve a 6-hidroxiopamin neurotoxin által kiváltott sejtpusztulásban *C. elegans*ban.

3.2. Az autofág gének szerepének vizsgálata a sejt méret szabályozásában

A sejt méretet a lebontó és a felépítő anyagcsere folyamatok aktivitása határozza meg. Az autofágia az eukarióta sejtek legnagyobb kapacitású lebontó mechanizmusa, ezért logikusnak tűnt, hogy megvizsgáljam szerepét a sejt méret szabályozásban. *C. elegans*ban ismert, hogy mind az inzulin/IGF-1 mind a TGF- β jelátviteli útvonal a sejtek méretének szabályozásán keresztül befolyásolja a testhosszat.

Kísérleteimmel arra kerestem a választ, hogy az autofág gének szabályozzák-e a sejt méretet *C. elegans*ban és amennyiben igen, milyen kapcsolatban állnak az inzulin/IGF-1 és TGF- β genetikai útvonalakkal.

3.3. Az autofág gének szerepének vizsgálata az öregedési folyamat szabályozásában

Az öregedés egy progresszív az egész szervezet állapotának romlásával járó folyamat, amelyhez számos degeneratív betegség társulhat. Az autofágia szerepét kimutatták számos korfüggő betegségben, a legújabb eredmények alapján az élethossz meghatározásában is közvetlenül vesz részt. Az utóbbi húsz évben kiderült, hogy az öregedés nagymértékben genetikailag meghatározott folyamat. Azok a funkcióvesztéses

mutációk, amelyek csökkentik az inzulin/IGF, vagy a TOR kináz által közvetített jelátviteli útvonalak aktivitását, a mitokondriális működést és a kalória felvételt jelentősen megnövelik az élethosszat filogenetikailag egymástól távol álló állatfajokban.

Kísérleteim során az autofág gének öregedésben betöltött szerepét vizsgáltam az élethossz és az öregedési pigment felhalmozódás mérésével, az izomdegeneráció nyomonkövetésével. Továbbá vizsgáltam az autofág gének és az élethossz szabályozásban szerepet játszó korábban leírt genetikai útvonalak kölcsönhatását.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgált autofág gének

Kísérleteim megkezdésekor az autofág gének *C. elegans* ortológjai közül csak az *unc-51* és a *bec-1* gének funkcióvesztéses alléljai voltak elérhetőek. Ezenkívül az *Igg-1* gént RNSi technika segítségével „csendesítettem”. Az öregedés szabályozásával kapcsolatos kísérletek elvégzésekor már rendelkezésemre állt az *atg-18* gén deléciós allélja, ezért ezt a gént is bevontam a vizsgálatokba.

A *bec-1* gén az élesztő *ATG6/VPS30*, illetve a humán *beclin-1* gén ortológja. A *bec-1* gén egy coiled-coil fehérjét kódol [111, 119], amely valószínűleg egy PI3 kináz komplex tagja [120]. Az *bec-1(ok691)* és *bec-1(ok700)* funkcióvesztéses allélok a gén több exonjára is kiterjedő deléciós nullmutások. A *bec-1* gén hiánya nagy penetranciájú embrionális letalitást okoz. Az embrionális fejlődésen túljutó állatok (0,3% *bec-1(ok691)*, illetve 0,2% *bec-1(ok700)* [120]) fenotípusa pleiotróp. Testméretük kicsi, a vedlések során nem tudnak kibújni a kutikulából, fragilisek, és ha eljutnak a felnőttkorig, akkor sterilek. A *bec-1(ok691)*, illetve *bec-1(ok700)* funkcióvesztéses mutáns törzsek fenntartása heterozigóta formában, vagy balancer kromoszóma használatával lehetséges. Kísérleteim során egy olyan konstrukciót hordozó törzset használtam, amelyben a *bec-1* letalitását egy a funkcionális *bec-1* gént hordozó instabil (extrakromoszomális) plazmid részlegesen menekítette (*swEx520[pbec-1::BEC-1::GFP + rol-6(su1006)*], a továbbiakban *Ex[bec-1(+)]* [120]). A plazmidot az egyedfejlődés során a sejtek véletlenszerűen elveszthetik, ezáltal az állat genotípusa mozaikos lesz. Mivel a plazmid gyakran elvesz, az állatok fertilitása alacsony és testi sejtjeik nagy része *bec-1* *-/-* genotípusú.

Az *unc-51* gén az élesztő *ATG1*, illetve a humán ULK-1 gén ortológja [121, 122]. Az UNC-51 fehérje szerin/treonin kináz aktivitású. A gén inaktíválása pleiotróp fenotípus megjelenéséhez vezet. A funkcióvesztéses mutások testmérete kicsi, gyakorlatilag teljesen mozgásképtelenek (Unc fenotípus – Uncoordinated- ; koordinálatlan mozgású), csak korlátozott számú petét tudnak lerakni, és a hermafroditában kikelő lárvák elpusztítják az anyaállatot (Bow fenotípus - Bag of worms). Az *e369* allél egy nonszensz mutáció, amely a kódoló régióban a Gln553STOP (CAT → TAG, amber) tranzíciót okozza [123]. Az *e1189* allél esetében nincs információ a mutáció pontos helyzetéről, mivel transzkriptum a génről nem képződik, feltehetően a gén szabályozó régiójában található. Mindkét *unc-51* allél teljes funkcióvesztéses nullmutánsnak tekinthető [123].

Az *lgg-1* gén az élesztő *ATG8* és a humán MAP-LC3 gének főreg ortológja [111]. Az LGG-1 ubikvitin-szerű, alacsony molekulatömegű fehérje. Az *lgg-1* esetében nem áll rendelkezésre mutáns allél, ezért a gént RNS interferencia (RNSi) technika alkalmazásával „csendesíttem”. Az *lgg-1* RNSi kezelés hatására alacsony penetranciával megakad az embrionális fejlődés (elpusztult peték figyelhetőek meg a petri lemezen), illetve a lárvális fejlődés során rendellenességek fordulnak elő (például a kutikula morfológiájában). A kifejlett *lgg-1(RNSi)* állatok látható morfológiai vagy viselkedési abnormalitást nem mutatnak.

Az *atg-18* gén az élesztő *ATG18*, illetve a humán WIPI2 gén ortológja [111]. Az ATG-18 foszfoinozítid kötő fehérje, amely az autofágia mellett a dauerképzés folyamatában vesz részt. A *atg-18(gk378)* allél egy kiterjedt deléciót hordoz, amely a kódoló régió első 3 exonját érinti. A *atg-18(gk378)* állatok látható morfológiai vagy viselkedési abnormalitással nem rendelkeznek, fertilitásuk azonban csökkent.

4.2. Törzsfenntartás

A *C. elegans* törzseket laboratóriumi körülmények között 15 és 25°C között, termosztátokban, petri lemezekbe öntött NGM agaron lévő *E. coli* OP50 baktériumpázsiton (a továbbiakban NGM lemezen) tartjuk fent [124]. Az állatokat egyedileg platina tű, vagy szempilla segítségével rakhatjuk át egyik NGM lemezről a másikra. Nagyobb mennyiségű állat mozgását kisméretű spatula segítségével végezhetjük el az agar darab kivágásával, és áthelyezésével. A *C. elegans* fenntartásának egyszerűségét a mikroorganizmusokéhoz lehet hasonlítani. Stabil homozigóta mutációk esetében elég a törzseket 1-2 havonta friss lemezre áthelyezni. Folyékony nitrogénben a törzseket évekig is tárolhatjuk. Az NGM agar alapváltozatának módosításával specifikus lemezeket készíthetünk. Például „etetéses” RNSi alkalmazásához a lemezbe kevert szelektivitást biztosító ampicilin és tetraciklin antibiotikumokkal és az indukcióhoz IPTG-dal, élethossz mérésekhez a sterilitást biztosító FUDR-nel, számoláshoz az állatokat bénító NaN₃-dal.

4.3. RNS interferencia

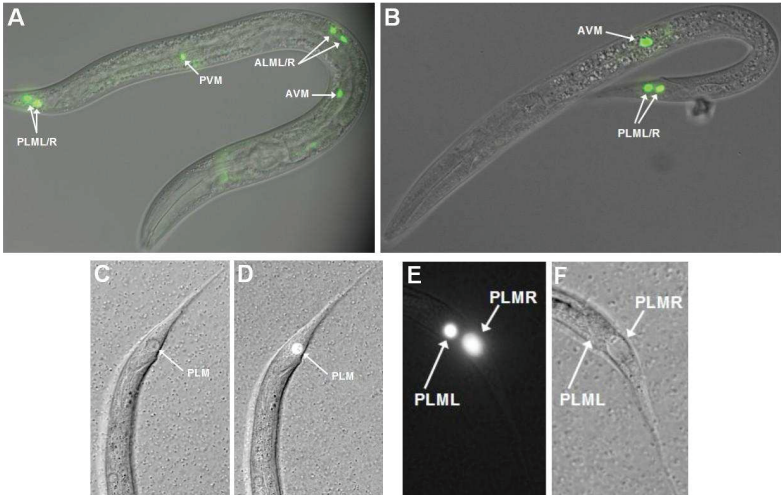
Az etetéssel alkalmazott RNS interferencia a *C. elegans* genetikában széleskörűen használt módszer egyedi gének inaktiválásához („csendesítéséhez”). A csendesíteni kívánt gén mRNS-éből egy körülbelül 900 bázispáros szakaszt reverz transzkriptázzal cDNS-re írtam át, majd PCR reakció segítségével megsokszoroztam. A kapott cDNS-t T-vektorba klónoztam, majd RNSi vektorba (pPD129.36, [125]) szubklónoztam. Az ampicilin

rezisztenciagént hordozó RNSi vektort egy speciális tetraciklin rezisztens HT115 nevű *E. coli* törzsbe transzformáltam, amit RNSi lemezekre cseppentettem. A baktériumsejtek ezeken a lemezeken az induktív IPTG hatására átírják a célgénre specifikus DNS szakaszt. A baktérium sejtek elfogyasztásával a duplaszálú RNS a *C. elegans* belébe kerül, onnan felszívódik, majd szétterjed az egész szervezetben és „csendesíti” a szekvenancia-specifikus genomi szakaszokat [126].

4.4. Sejthalál vizsgálatok

A *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* funkciónyerékes mutáns *C. elegans* törzsekben az elpusztuló idegsejtek megduzzadnak. A megduzzadt sejtek Nomarski optikával jól megfigyelhetők. A vizsgált törzsből szinkronizált populációt hoztam létre, a duzzadó sejteket az L1 stádium végén számoltam. A duzzadt neuronok száma megfelel az L1 stádium végén elpusztuló idegsejtek számának, mert a pusztulási folyamat nem visszafordítható. Mivel a neuronpusztulás embrionális korban kezdődik és az állat élete végéig tart (az L1 stádium végén a legintenzívebb), egy adott állapotban elpusztuló összes idegsejtnak csak egy részéről nyerhető így információ. Emiatt szükséges a mérés előtt ellenőrizni, hogy a vizsgált genetikai, vagy környezeti hatás nem tolja el a maximális pusztulási periódust a vizsgált időtartamon kívülre. Ez kisszámú állatban, a teljes élethossz során az összes elpusztuló sejt számának meghatározásával lehetséges. Ennek hiányában előfordulhatna, hogy a vizsgált hatás csak a pusztulás időbeli lefolyását változtatja meg, az elpusztult sejtek számát viszont nem érinti.

A fenti probléma kiküszöbölhető olyan transzgenikus törzsekkel, amelyekben a degenerálódó neuronokat fluoreszcens GFP fehérje jelöli meg. A *gfp* gént hordozó transzgenikus törzset a degenerin mutánsal összekeresztelve olyan kettős mutánsok hozhatóak létre, amelyekben a vizsgálat pillanatáig elpusztult összes idegsejt száma meghatározható. Az elpusztult idegsejtek nem fluoreszkálnak. Az összes jelölt idegsejt számából kivonva a még világító idegsejtek számát megkapjuk az elpusztult idegsejtek számát.

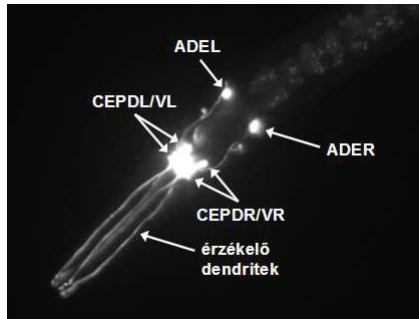


14. ábra A *mec-4* neurodegenerációs modellben fénymikroszkóppal nyomonkövethető a neuronok pusztulása. A: a *pmec-4::gfp* transzgénikus állatban a *mec-4* gén promóterével kifejeztetett GFP 6 érintésérzékelő idegsejtet jelöl meg. B: a *mec-4(u231);pmec-4::gfp* genotípusú L2 stádiumú állatban a *mec-4(u231)* funkciónyeres mutáció indukálta idegsejtpusztulás miatt a maximális 6 idegsejtből már csak 3 van életben. C: a *mec-4(u231);pmec-4::gfp* transzgénikus állatban az egyik PLM sejt vakuolarizációjáról Nomarski optikával készült kép. D: az C képen látható állatról készült GFP jelenléte a pusztuló sejtben mutatja, hogy a *mec-4(u231)* mutáció jelenléte okozza a vakuolarizációt. E-F: a *mec-4(u231);pmec-4::gfp* állatban a *mec-4(u231)* funkciónyeres mutáció nem minden esetben okozza a szenzoros neuronok pusztulását. A fluoreszcens mikroszkópos E képen mindkét PLM sejt látható (a *pmec-4::GFP*-vel azonosíthatóak), a Nomarski optikával készült F képen viszont csak a duzzadt (vakuolarizálódó) PLMR idegsejt látható.

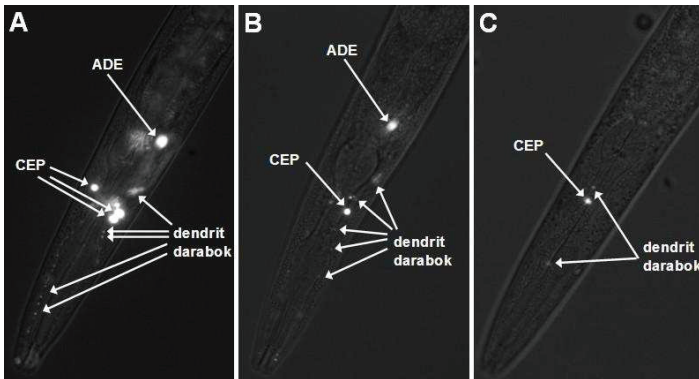
A populáció szinkronizálása során 30 hermafrodita szülőt 2-4 órán át hagytam petézni (150-300 pete), majd a szülőket eltávolítottam. Ezt követően az embrionális és a lárvális fejlődés során lejátszódik a sejtpusztulás. Az adatgyűjtéshez a még petéket nem tartalmazó fiatal felnőtt állatok a legmegfelelőbbek. Vizsgálatonként minimum 50-100 állat szükséges.

A 6-hidroxidopamin (6-OHDA) neurotoxin-indukált sejtpusztulás vizsgálatához *pdar-1::gfp* transzgénikus állatok szükségesek. A *pdar-1::gfp* transzgen a *C. elegans* 8 dopaminerg idegsejtjében fejeződik ki. A 6-OHDA ezeket a GFP jelölt sejteket károsítja. A szinkronizált fiatal felnőtt egyedeket 10mM aszkorbinsav kontroll oldatban, illetve 50 mM

6-hidroxidopamin, 10 mM aszkorbinsav oldatban inkubáltam 60 percen keresztül. A kezelést követően az állatokat üres NGM lemezre helyeztem. 24 órával a kezelést követően fluoreszcens mikroszkópiával meghatároztam a sérült dendritek, illetve az elpusztult dopaminerg idegsejtek számát.



15. ábra A *C. elegans*ban található 8 dopaminerg idegsejt és azok nyúlványai jól azonosíthatóak a *pdat-1::gfp* konstrukció segítségével. Az ábrán egy fiatal felnőtt elülső testtájáról, a garatról és annak környékéről készült fluoreszcens mikroszkópos kép látható. A 8 DAT-1 dopamin transzportert kifejező sejtből csak 6 látható, 2 további dopaminerg idegsejt (PDEL és PDER) az állat hátulso testfelében helyezkedik el.



16. ábra 6-OHDA kezelés hatására a dopaminerg idegsejtek nyúlványai elhalnak és az idegsejtek egy része elpusztul. A *pdat-1::gfp* genotípusú állatokban fluoreszcens mikroszkópiával ez a folyamat jól megfigyelhető. A: 6-OHDA kezelt *pdat-1::gfp* genotípusú állat 4 túlélő dopaminerg idegsejttel (a 2. ADE sejt nincs a fókuszban) és azok nyúlványainak feldarabolódott maradványaival. B: 6-OHDA kezelt *pdat-1::gfp* genotípusú állat a degeneráció magasabb fokán, mindösszesen 2 túlélő neuronnal. C: 6-OHDA kezelt *pdat-1::gfp* genotípusú állat, amelyben szinte minden GFP jelölt idegsejt elpusztult.

A pusztuló, illetve a GFP jelölt sejteket mindig azonos hőmérsékleten, szinkronizált populációból származó állatokban, kontroll felvétele mellett számoltam. A vizsgálatokat Nomarski optikával felszerelt Zeiss Axiovert 135 mikroszkóp százszoros nagyítású objektívjével végeztem, tárgylemezen kialakított, vékony agarpadra cseppentett 0,1 mM koncentrációjú levamisole oldatban. Zeiss Axioskop 20 mikroszkóp 10, 20 és negyvenszeres nagyítású objektívjével NGM lemezen in situ megfigyeléseket is végeztem. A kapott adatok statisztikai elemzését kétmintás t-próba segítségével végeztem el (SPSS 14 statisztikaprogram). Az eltéréseket $p < 0,05$ értéknél tekintettem szignifikánsnak.

4.5. Élethossz mérések

A törzseket 20°C-on legalább 2 generáción keresztül tiszta, éhezésmentes állapotban növesztettem. Az állatokat 3 órán át petéztetve szinkronizált populációt hoztam létre, majd a szinkronizált állatokat fiatal („non-gravid”) felnőtt állapotban 300 µg/ml FUDR-ot (5-fluoro-2'-deoxyuridine, Sigma) tartalmazó lemezekre helyeztem és 25°C-on tartottam. A FUDR megátolja a DNS szintézist, így az állatok szaporodását, ám a szomatikus sejteket nem érinti, mivel azok már nem osztódnak tovább. A szaporodás gátlása az *unc-51* és a *bec-1* mutánsok Egl (egg laying defective - peterákásra képtelen) fenotípusa miatt volt szükséges, mivel ennek hiányában a nem lerakott petékből még az anyában kikelő lárvák elpusztítják szüleiket, és ezáltal ellehetetlenítik az élethossz mérést. A FUDR használatának további előnye, hogy kiküszöböli a mutáns törzsek esetlegesen eltérő csírvonal aktivitásából adódó különbségeket. Az állatokat 20°C-on növesztettem fiatal felnőtt korig, mert a vizsgált törzsek közül a *daf-2* mutánsok hőérzékenyek és ennél magasabb hőmérsékleten az alternatív L3 lárvá stádiumba, a dauer lárvá stádiumba jutnak, ahol egyedfejlődésük megreked. Mivel az élethossz mérések szempontjából a 25°C ideális (jelentős időmegtakarítást jelent), de ezen a hőmérsékleten nem lehet szinkronizált, felnőtt *daf-2* mutáns populációt létrehozni, az embrionális és lárvális fejlődés ideje alatt az állatokat 20°C-on tartottam.

RNSi alkalmazása mellett nem lehetett FUDR lemezt használni, mivel az RNSi hatás kialakulásához szükséges a baktériumsejtek lemezen történő szaporodása. A FUDR 12-24 órán át tartó alkalmazása végleg sterilizálja az állatokat, így ezekben a kísérletekben az RNSi kezelést megelőzően, a fiatal felnőtt állatokat a sterilitás eléréséig FUDR lemezen tartottam, majd továbbraktam őket a megfelelő RNSi lemezekre.

Az állatokat naponta ellenőriztem és az elpusztultakat eltávolítottam. Elpusztultnak az az állat tekinthető, amelyik már spontán nem mozog és a platinatűvel való érintésre sem reagál. A mérés az utolsó állat pusztulásáig tart. A kapott adatokból az SPSS 14-es statisztika program segítségével Kaplan-Meier görbékét képeztem, lefutásuk különbözőségét Log rank módszerrel vizsgáltam. Az eltéréseket $p < 0,05$ értéknél tekintettem szignifikánsnak.

4.6. Az öregedési pigment tartalom vizsgálata

A fluorimetriás méréseket Spex Fluoromax spektrofluoriméterrel (Edison, NJ, USA), Gerstbrein és mtsai 2005-ös cikke alapján [100], kisebb módosításokkal végeztem. Minden méréshez legalább 30 szinkronizált állatot gyűjtöttem, majd a bakteriális szennyeződéstől ultra-tiszta vízzel megtisztítottam. A mintákat ezután 1 ml ultra-tiszta vízben háromszor 30 másodpercig szonikáltam (Branson Sonifier 250, output level 2, duty cycle 50%, Branson Ultrasonics Corp. Danbury, CT, USA), a szonikálások között jégen inkubáltam. A szonikálást követően 30 másodperc 3000 rpm-es centrifugálással eltávolítottam a lebegő részeket, majd a felülúszót azonnal mértem. Az öregedési pigment tartalom a 290 nm/330 nm (gerjesztési/detektálási hullámhossz), illetve a 340 nm/430 nm-en kapott értékek hányadosaként került megállapításra. Az utóbbi hullámhossz párt Gerstbrein és munkatársai szerint [100] a sejtek lipofuscin és AGE pigment tartalmára jellemző érték, míg az előbbi a triptofán aminosavmaradékok által kibocsátott jel (TRP). A TRP jel mérésére az állatok eltérő térfogata miatt, az összes fehérje mennyiségen alapuló normáláshoz szükséges. Mivel a mérés az állatok pusztulásával jár, minden mérési ponthoz külön populációt indítottam. A mérési napon az élő állatok közül 30-at véletlenszerűen kiválasztottam. Minden mérést legalább háromszor végeztem el. A mérési napok a felnőttkor elérését követő 2., 5., 8., 15., 18. napok. Így jellemeztem a reprodukív időszak elejét és végét (2., 5. nap), illetve a posztreprodukív időszakot is. Minden mérési napon a készüléket a gyártó által megadottaknak megfelelően kalibráltam. A kapott adatokat az SPSS 14-es statisztika program segítségével értékeltem. Az eltéréseket $p < 0,05$ értéknél tekintettem szignifikánsnak.

4.7. Izomdegeneráció nyomonkövetése

Fiatal felnőtt korban és a felnőtté válás utáni 4-5 napban minden vad típusú állat képes spontán, szinuszoid alakú mászó mozgásra. Ezt követően a természetes

izomdegeneráció a mozgásmintázat szétesésével, a mozgásképesség fokozatos romlásával jár [99]. A szinuszoid mozgás amplitúdója és frekvenciája megváltozik, folyamatossága megtörik, így az állatok mozgása koordinálatlanná válik. Az állatok haladási sebessége csökken, spontán mozgásra külső ingerléssel (például szempillával, vagy a platinatüvel való megérintéssel) rábírhatók. A végső fázis (teljes bénulás) elérésekor az állat helyváltoztató mozgásra már nem, csak helyzetváltoztató mozgásra képes. Az állatok mászni már nem tudnak, de még képesek összehúzódni. A mintákban az izomdegeneráció mértékét a helyváltoztató mozgásra képtelen állatok teljes mintára vetített arányával jellemeztem. A populáció folyamatosan pusztul, ezért az izomdegenerációs görbe egy adott pontja azt az arányt mutatja, ami az addig a napig lebénult összes állat (élő és halott) és a minta teljes egyedszáma hányadosaként kapható. Amennyiben az állatok egy része bénulás nélkül hal meg, úgy a görbe végül nem éri el a 100%-ot. Ennek információértéke van, hiszen ez is az öregedés minőségére jellemző paraméter.

4.8. Elektronmikroszkópia

4.8.1. Előkészítés

Az elektronmikroszkópos felvételek készítésénél először megfelelő korú és állapotú állatokat kell kiválasztani. Az autofág mutánsok vizsgálatánál 20°C-on tartott, nem éhezett, nem fertőzött állatokat fixáltam.

4.8.2. Fixálás

Fixálás során a sejteket 0,2% glutáraldehidet, 3,2% formaldehidet és 0,15 M cacodylát puffert tartalmazó oldatban rögzítettem. Ahhoz hogy a rögzítőszer a vastag és ellenálló kutikulán áthatolhasson, az állatokat mérettől függően 2-4 darabba vágtam. A rögzítés egy éjszakán át 4°C-on történt.

4.8.3. Mosás, kontrasztosítás

A rögzített állatokból a maradék fixálószer a túlrögzítés elkerülése végett újból egy nap 0,1 M cacodylate pufferes mosással távolítottam el. Mosás közben, hogy a gyakran sztereomikroszkóppal is nehezen látható mintákat könnyebben megtaláljam és mozgathassam, ruténiumvörös festék hozzáadásával enyhén megfestettem. Ez a fénymikroszkópos festés a későbbi elektronmikroszkópos megfigyelést nem akadályozza.

4.8.4. Beágyazás, metszés

Beágyazás során a fixált mintákat az orientálhatóság végett agarba ágyaztam, és a 0,5%-os cacodylate pufferes, OsO_4 -os utófixálás, és 2%-os uranyl acetátos festés, majd felszálló etil-alkohol soros, és végül propylene oxidos víztelenítés után azzal együtt ágyaztam be Durcupan (Fluka) négykomponensű műgyantába. Metszést, a mintákat tartalmazó műgyantablokk kifaragása után praktikus szempontok alapján (a legtöbb sejt így látható egyetlen metszeten) az állatok hossz tengelyével párhuzamosan végeztem Reichert-Jung Ultracut-E type ultramikrotómmal. A metszeteket ólom citráttal festettem, és a megfigyelést JEM100CX II elektronmikroszkóppal végeztem el.

5. Eredmények

5.1. Az autofág gének *C. elegans* ortológjainak jellemzése

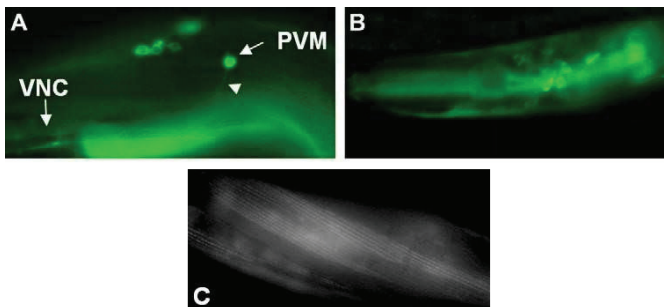
Az autofágia molekuláris mechanizmusát mindössze másfél évtizede vizsgálják élesztőben [17]. Az első *C. elegans*on végzett autofágia tanulmányt 2003-ban írták [111]. Ebben az élőlényben az autofág gének expressziójának jellemzése nagymértékben hiányos maradt, elektronmikroszkóposan pedig egyáltalán nem vizsgálták vajon inaktiválásuk befolyásolja-e az autofág folyamat működését. Emiatt először az *unc-51/ATG1*, *bec-1/ATG6*, *lgg-1/ATG8* és az *atg-18/ATG18* autofág gének expresszióját tanulmányoztam, majd vizsgáltam, hogy inaktiválásuk érinti-e az autofágoszómák képződését. Az *unc-51* és az *atg-18* géneket *C. elegans*ban autofágiával kapcsolatban kollégáimmal mi vizsgáltuk először.

5.1.1. *C. elegans* autofág gének expressziós vizsgálata

Autofág gének mutáns alléljeivel végzett kísérletek értékeléséhez ismernünk kell az adott gén expresszióját. Ennek tanulmányozására adott autofág gén promóterével szabályozott transzkripciós és translációs GFP konstrukciókat használtam.

A *bec-1* gén expresszióját az *Ex[bec-1(+)]* transzgénikus törzs segítségével vizsgáltam [23]. Az *Ex[bec-1(+)]* a funkcionális *bec-1* gént tartalmazza, a fehérje C-terminális végéhez egy GFP riporter van fuzionáltatva. Az extrakromoszomális *Ex[bec-1(+)]* a csíravonalat leszámítva minden sejtben kifejeződik az egyedfejlődés folyamán és a kifejlett állatokban is. Az ideg, izom, hipodermisz és bélsejtek citoplazmájában tapasztaltam a legerősebb *bec-1* expressziós aktivitást (17. ábra).

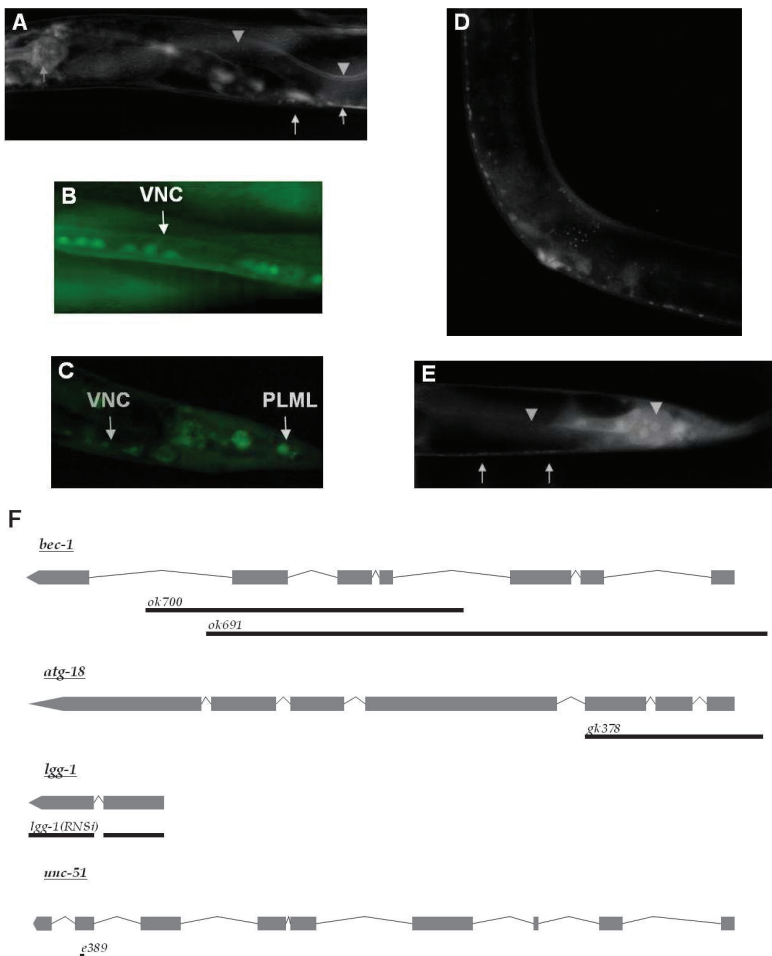
Az *lgg-1* gén expresszióját a *p[lgg-1::gfp::lgg-1]* transzgénikus törzs segítségével vizsgáltam. Az extrakromoszomális *p[lgg-1::gfp::lgg-1]* translációs fúziós riporter rendszer az *lgg-1* gén promótere után a fehérje N terminálisához kapcsolva tartalmazza a *gfp* riporter gént [111]. Ez azért szükséges, mert az LGG-1 fehérje érése során a C terminálisát egy proteáz eltávolítja. A *p[lgg-1::gfp::lgg-1]* riporter konstrukció tehát alkalmas az LGG-1 fehérje expressziójának nyomonkövetésére a szervezet szintjén és intracelluláris szinten is. A *p[lgg-1::gfp::lgg-1]* konstrukció embrionális kortól bazális aktivitással minden sejtben és minden egyedfejlődési stádiumban expresszálódik. A bélben, a hipodermiszben és a „ventral nerve cord” bizonyos idegsejtjeiben az *lgg-1* expressziója erős.



17. ábra A *bec-1* gén kifejeződése ideg, izom, hipodermisz és bélsejtekben. A: a *Ex[bec-1(+)]* transzgén a PVM neuronban és a „ventral nerve cord” idegsejtjeiben is kifejeződik. B: a *Ex[bec-1(+)]* expressziója a garatban és a garatideggyűrű neuronjaiban. Az A és B képeken a neuronok háttérében a bél, a hipodermisz és az izmok fluoreszcenciája látszik. C: A *Ex[bec-1(+)]* transzgén kifejeződése egy vázizomsejtben.

Az *atg-18* gén expresszióját az *sIs13209* integrált transzgén hordozó törzs segítségével vizsgáltam [127]. A transzgén transzkripció konstrukció, azaz csak az *atg-18* gén promóterét tartalmazza, a kódoló részt a *gfp* riporter gén kódoló részével helyettesítették. Az *sIs13209* transzgén idegsejtekben („ventral nerve cord”, feji és farki idegducok), a vulvában, a hipodermiszben és a bélben is kifejeződik.

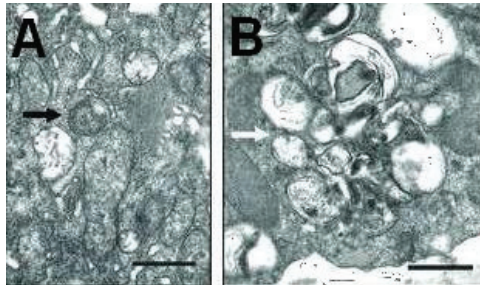
Az *unc-51* gén expressziójával kapcsolatban irodalmi adatokra hagyatkoztam [123]. Az *unc-51* gén főleg ideg- és izomsejtekben fejeződik ki embrionális, lárvális és felnőtt korban is.



18. ábra *C. elegans* autofág gén expressziója és a tanulmányozott allélok felépítése
 Az *lgg-1* és *atg-18* gének kifejeződnek a bélben, az idegsejtekben és a hipodermisben. A: a *p[lgg-1::gfp::lgg-1]* transzgen kifejeződik a bélben (háromszögek), illetve a hipodermisben is (nyilak). B és C: a *p[lgg-1::gfp::lgg-1]* transzgen expressziója a ventral nerve cord (VNC) neuronjaiban és a PLML neuronban. D: a *patg-18::gfp* transzgen kifejeződése a „ventral nerve cord”-ban és a hipodermisben (a testfal pontszerű, illetve diffúz fluoreszcenciájaként figyelhető meg). E: a *patg-18::gfp* transzgen kifejeződése a bélben (háromszögek), a hipodermisben és bizonyos neumokban (nyilak). F: a tanulmányozott autofág gének exon (szürke négyszög) – intron (vonal) szerkezete, illetve az allélokban található mutációk relatív helyzete. Az RNSi allélnál a duplaszálú RNSre átirított mRNS szakaszt tüntetem fel.

5.1.2. Az *bec-1* autofág gén inaktiválása abnormális autofág vakuólák képződéséhez vezet

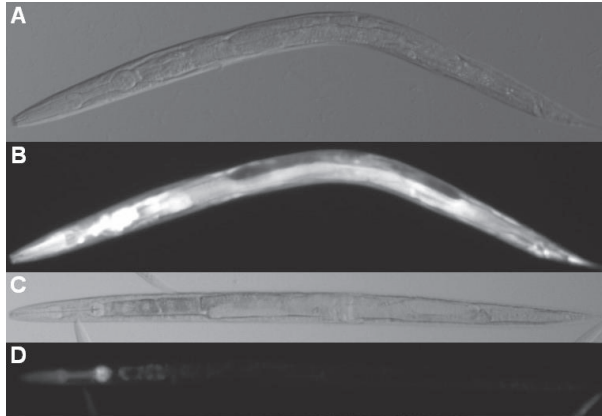
Az autofagoszómákat biztosan csak elektronmikroszkópiával lehet azonosítani. Az autofagoszómák vad típusú állatokban 1 μm alatti, kettős membránnal körbevett, szabályos kerek képletek. *bec-1(ok691)* autofág mutánsban a vad típusú autofagoszómák helyett membránnal sokszorosán körbevett, több autofág vakuolából összecsapzódott, méretükben és szerkezetükben torz struktúrák találhatók (19. ábra).



19. ábra. Rendellenes autofagoszómák *bec-1(ok691)* mutáns állatban. A: vad típusú állatban található autofág vakuola (fekete nyíl). A lebontandó citoplazma részlet kettős membránnal van körbevéve. B: *bec-1(ok691)* autofág mutáns citoplazmájában a vad típusú autofág vakuolától eltérő abnormális autofág struktúrák találhatók (fehér nyíl). Transzmissziós elektronmikroszkópos képek, a fekete vonal 1 μm -t jelöl.

5.1.3. Az *lgg-1* RNSi kezelés gátolja az LGG-1 fehérje kifejeződését

lgg-1 RNSi kezelt állatokban a képződő autofagoszómák a *plgg-1::gfp::lgg-1* konstrukció segítségével megjelölhetőek, mivel az LGG-1 fehérje az autofagoszóma membránjához kötődik. *lgg-1* RNSi kezelés hatására a GFP::LGG-1 eltűnik, ami az endogén LGG-1 fehérje expressziójának gátlását mutatja.



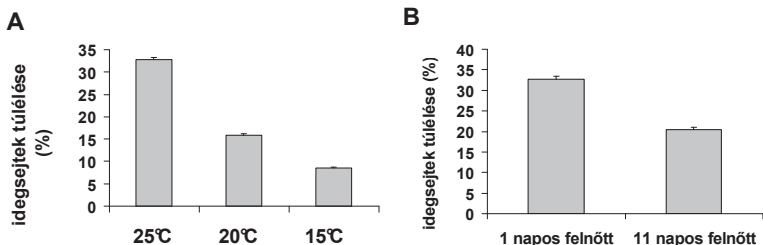
20. ábra. Az RNSi technika segítségével meggátolható az LGG-1 fehérje kifejeződése. A: kontroll RNSi kezelést kapott *p_{lgg-1}::gfp::lgg-1* genotípusú állat Nomarski mikroszkópos képe. B: az A képen látható állatról készült fluoreszcens mikroszkópos kép. A GFP::LGG-1 fehérje a csíravonal kivételével az összes szövetben kifejeződik. C: *lgg-1* RNSi kezelt *p_{lgg-1}::gfp::lgg-1* genotípusú állat Nomarski mikroszkópos képe. D: a C képen látható állatról készült fluoreszcens mikroszkópos kép. Az *lgg-1* RNSi kezelés hatására a GFP::LGG-1 fehérje expressziója eltűnt. Csupán a garat mutat a vektorból származó háttér expressziót.

5.2. Az autofág gének inaktiválása gátolja az excitotoxikus neurodegenerációs modellekben az idegsejtek pusztulását

*C. elegans*ban az éhezés gátolja a hiperaktív degenerinek által kiváltott sejtpusztulást [40]. Az éhezés hatására gátlódik az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal működése és fokozódik az autofág aktivitás. Az autofágiáról ismert, hogy szabályozásában az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonalnak kitüntetett szerepet van [111]. Továbbá a neurodegenerációs modellek vizsgálata során jellegzetes membrán átrendeződési folyamatokat írtak le, amelyek az autofág folyamat aktivitására utalhatnak. Ezek a körülmények, illetve az autofág gének intenzív idegrendszeri expressziója arra engedtek következtetni, hogy a hiperaktív degenerinek által kiváltott sejtpusztulásban az autofág géneknek is szerepe lehet. Kísérleteimben ezért azt vizsgáltam, hogy az autofág gének befolyásolják-e a mutáns degenerinek, illetve a 6-hidroxidopamin neurotoxin által kiváltott sejtpusztulást *C. elegans*ban.

5.2.1. A sejtpusztulási ráta meghatározása hiperaktív degenerin alapú neurodegenerációs modellekben

A *mec-4*, *deg-1* és *deg-3* gének funkciónyerékes mutációi által indukált idegsejtpusztulás a mutáns populációra jellemző átlagos pusztulási rátával jellemezhető. Ez az érték megmutatja, hogy az idegsejtek hány százaléka pusztul el adott egyedfejlődési állapotig (a pusztuló sejtekre specifikus GFP markerrel történő megfigyelés esetében), vagy egy adott időtartam alatt (GFP marker nélkül, a vakuolarizáció alapján). A degenerin alapú modellek vizsgálatával kimutattam, hogy az idegsejtek pusztulása az egyszeres degenerin mutánsokban is kor- és hőmérsékletfüggő. 15°C-on 1 napos kifejtett *mec-4(u231);pmec-4::gfp* genotípusú állatokban az érintésérzékelő idegsejtek 8,49 ± 0,18%-a él. 20°C-on ezzel szemben az idegsejtek 15,86 ± 0,40%-a, 25°C-on pedig 32,70 ± 0,67%-a él. A sejtpusztulás ebben a modellben az embrionális kortól a felnőtt állat pusztulásáig tart. 1 napos korukra a *mec-4(u231);pmec-4::gfp* genotípusú kifejtett állatok érintésérzékelő idegsejtjeinek 32,70 ± 0,67%-a marad életben 25°C-on, 11 napos korukra azonban csak 20,43 ± 0,59%-a. Releváns különbséget kimutatni a neuron pusztulásban tehát csak a fejlődési stádiumok és a tartási hőmérséklet figyelembe vételével lehetséges.

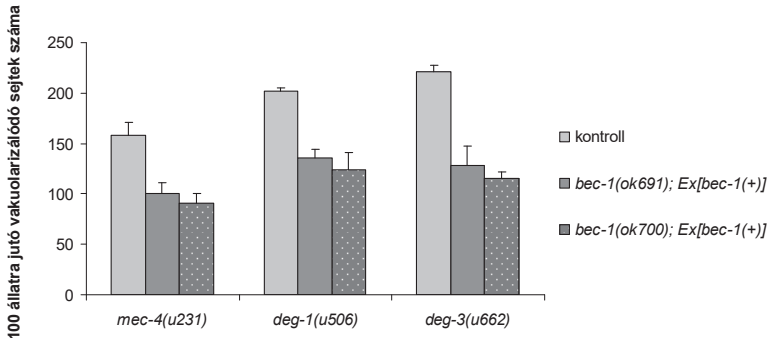


21. ábra. A *mec-4* gén funkciónyerékes mutációja által indukált sejtihalál kor és hőmérsékletfüggő. A: 15°C-on nagyobb mértékű idegsejtpusztulás figyelhető meg a lárvális kor végéig *mec-4(u231);pmec-4::gfp* genotípusú állatokban, mint 20°C, vagy 25°C-on. B: a felnőttkor elérése után tovább pusztulnak a neuronok *mec-4(u231);pmec-4::gfp* genotípusú állatokban 25°C-on.

5.2.2. Az autofág gének gátlása csökkenti az idegsejtek pusztulását degenerin alapú neurodegenerációs modellekben

Elsőként a *bec-1* gén két mutáns alléljának (*ok691*, *ok700*) hatását vizsgáltam meg a degenerin indukált neurodegenerációs modellekben. BEC-1 hiányos állatokban a *mec-*

4(*u231*) funkcióyeréses mutáció által előidézett vakuolarizáció számottevően csökkent (22. ábra). A továbbiakban a *bec-1* gén inaktiválásának a *deg-1(u506)* és a *deg-3(u662)* funkcióyeréses mutációk által kiváltott idegsejtpusztulásra gyakorolt hatását vizsgáltam. A vakuolarizálódó sejtek száma a *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* egyszeres mutánsokban megfigyelt értékekhez képest szignifikánsan csökkent a kettős mutánsokban (22. ábra).



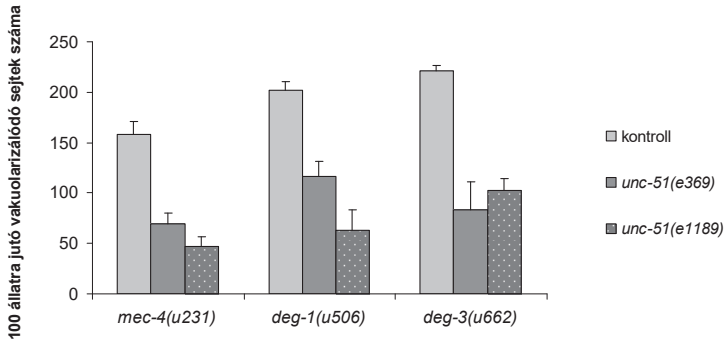
22. ábra A *bec-1* gén inaktiválása csökkenti a *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* funkcióyeréses mutációk által indukált idegsejtpusztulást.

2. táblázat. A *bec-1* gén inaktiválása csökkenti a degenerinek által indukált idegsejtpusztulást

genotípus	100 állatra jutó vakuolarizálódó sejtek száma	szignifikancia
<i>mec-4(u231)</i>	158,5 ± 12,0	
<i>mec-4(u231);bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	100,0 ± 2,8	p<0,001
<i>mec-4(u231);bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]</i>	90,7 ± 6,4	p<0,001
<i>deg-1(u506)</i>	202,2 ± 10,6	
<i>deg-1(u506);bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	135,4 ± 8,7	p<0,001
<i>deg-1(u506);bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]</i>	123,5 ± 18,9	p<0,001
<i>deg-3(u662)</i>	221,5 ± 9,5	
<i>deg-3(u662);bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	128,4 ± 17,5	p<0,001
<i>deg-3(u662);bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]</i>	115,2 ± 6,9	p<0,001

A *bec-1* gén inaktiválása csökkenti a degenerinek által indukált idegsejtpusztulást. A táblázatban a 100 késői L1 stádiumú állatban megfigyelhető vakuolarizálódó (pusztuló) idegsejtek számát tüntettem fel (20°C). 100 *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* egyszeres mutáns, az összes többi genotípus esetében 200 állat mérésenként. A feltüntetett adatok átlagértékek, a +/- szórással kiegészítve. A szignifikancia a kontroll egyszeres mutáns és a kettős mutánsok adatainak eltérésére vonatkozik (kétmintás t-próba).

Az *unc-51* gén két mutáns allélját (*e369*, *e1189*) vizsgáltam. A *mec-4(u231)* által indukált vakuolarizációt mindkét allél jelentős mértékben csökkentette. Hasonló hatást figyeltem meg a *deg-1(u506)* és a *deg-3(u662)* mutációk által kiváltott sejtpusztulás esetében is. Az *unc-51* gén inaktiválása mindkét funkciónyeréses mutáció esetében jelentősen csökkentette a degeneráló sejtek számát. Továbbá a vakuolarizáció időtartama a *mec-4(u231)* egyszeres mutánsoknál megfigyelt átlagos 7 óra helyett *unc-51(-)* genetikai háttérben 9 órára növekedett.



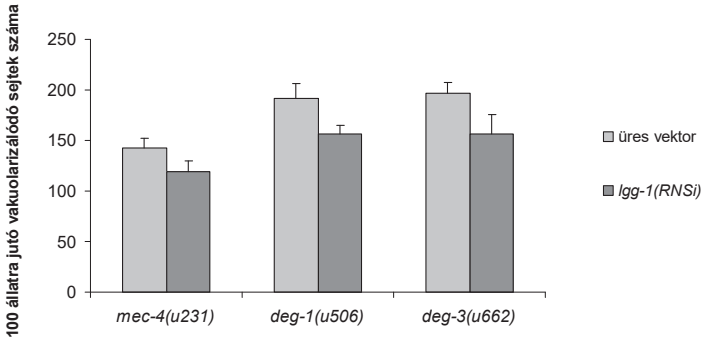
23. ábra Az *unc-51* gén inaktiválása csökkenti a *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* funkciónyeréses mutációk által indukált idegsejtpusztulást.

3. táblázat. Az *unc-51* gén inaktiválása csökkenti a degenerinek által indukált idegsejtpusztulást

genotípus	100 állatra jutó vakuolarizálódó sejtek száma	szignifikancia
<i>mec-4(u231)</i>	158,5 ± 12,0	
<i>mec-4(u231);unc-51(e369)</i>	69,6 ± 8,0	p<0,001
<i>mec-4(u231);unc-51(e1189)</i>	46,9 ± 5,2	p<0,001
<i>deg-1(u506)</i>	202,2 ± 10,6	
<i>deg-1(u506);unc-51(e369)</i>	116,0 ± 15,3	p<0,001
<i>deg-1(u506);unc-51(e1189)</i>	63,4 ± 28,3	p<0,001
<i>deg-3(u662)</i>	221,5 ± 9,5	
<i>deg-3(u662);unc-51(e369)</i>	82,8 ± 19,8	p<0,001
<i>deg-3(u662);unc-51(e1189)</i>	102,8 ± 11,5	p<0,001

Az *unc-51* gén inaktiválása csökkenti a degenerinek által indukált idegsejtpusztulást. A táblázatban a 100 késői L1 stádiumú állatra jutó vakuolarizálódó (pusztuló) idegsejtek számát tüntettem fel (20°C). Mérésenként 100 *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* egyszeres mutáns állatot, az összes többi genotípus esetében 200 állatot vizsgáltam meg. A feltüntetett adatok átlagértékek, a +/- szórással kiegészítve. A szignifikancia a kontroll egyszeres mutáns és a kettős mutánsok adatainak eltérésére vonatkozik (kétmintás t-próba).

Az *lgg-1* gént RNSi-val „csendesíttem”. Az *lgg-1* RNSi kezelés hatására mind a *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* genetikai háttérben szignifikánsan kevesebb pusztuló sejt megfigyelhető.



24. ábra Az *lgg-1* gén inaktiválása csökkenti a *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* funkciónyeréses mutációk által indukált idegsejtpusztulást.

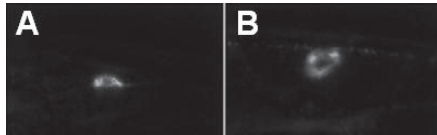
4. táblázat. Az autofág gének inaktiválása csökkenti a degenerinek által indukált idegsejtpusztulást

genotípus	100 állatra jutó vakuolarizáló sejtek száma	szignifikancia
<i>mec-4(u231)</i>	142,6 ± 9,7	
<i>mec-4(u231);lgg-1(RNSi)</i>	118,9 ± 5,5	p<0,01
<i>deg-1(u506)</i>	191,0 ± 15,0	
<i>deg-1(u506);lgg-1(RNSi)</i>	156,2 ± 13,2	p<0,01
<i>deg-3(u662)</i>	197,2 ± 9,9	
<i>deg-3(u662);lgg-1(RNSi)</i>	156,6 ± 21,2	p<0,018

Az *lgg-1* gén inaktiválása csökkenti a degenerinek által indukált idegsejtpusztulást. A táblázatban a 100 késői L1 stádiumú állatra jutó vakuolarizáló (pusztuló) idegsejtek számát tüntettem fel (20°C). 100 *mec-4(u231)*, *deg-1(u506)* és *deg-3(u662)* egyszeres mutáns, 200 *lgg-1* RNSi kezelt állat mérésenként. A feltüntetett adatok átlagértékek, a +/- szórással kiegészítve. A szignifikancia a kontroll egyszeres mutáns és a kettős mutánsok adatainak eltérésére vonatkozik (kétmintás t-próba). Az RNSi kísérletekben a kontroll állatok üres feeding vektorral transzformált *E. coli* HT115 baktériumpázsiton voltak tartva.

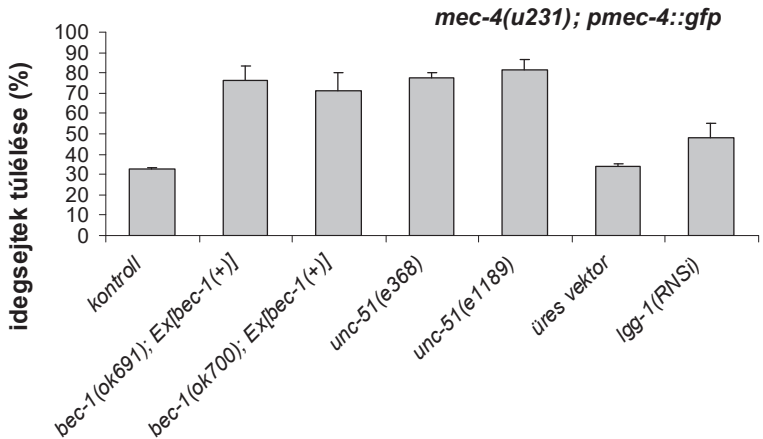
A *pmec-4::gfp* (a *gfp* gén a *mec-4* gén promóterének szabályozása alatt) és a *pmec-4::mec-4::gfp* (az endogén gén *gfp*-vel jelölve) konstrukciók segítségével vizsgáltam, hogy az autofág gének inaktiválása hogyan befolyásolja a degenerinek expresszivitását és expresszióját. Vad típusú genetikai háttérben a *pmec-4::gfp* transzgén átlagosan 5,6 sejtben

fejeződik ki állatonként ($n=493$). *unc-51(e369)* mutánsokban 5,38 ($n=263$), *bec-1(ok691)* mutánsokban 5,47 ($n=37$), *lgg-1(RNSi)* állatokban 5,67 ($n=168$) sejt expresszálja átlagosan a *pme-4::gfp* transzgénét. A *pme-4::gfp* transzgén expresszivitásában tehát az autofág gének inaktiválása nem okoz statisztikailag szignifikáns különbséget (kétmintás T-próba, $p<0,05$). A *pme-4::mec-4::gfp* konstrukciót hordozó állatokban a *bec-1* RNSi kezelés a kontrollhoz képest nem volt jelentős hatással a a MEC-4 fehérje kifejeződésére (25. ábra).



25. ábra Az autofág gének inaktiválása nem befolyásolja a mutáns MEC-4 fehérje kifejeződését. A: *pme-4::mec-4::gfp* állat PLM sejtje RNSi kontroll háttérben. B: *pme-4::mec-4::gfp; bec-1(RNSi)* állat PLM sejtje azonos nagyítással és expozíciós idővel. A *mec-4::gfp* expressziója *bec-1(RNSi)* genetikai háttérben azonos a kontrollal.

A vakuolarizálódó sejtek számolásán túl vizsgáltam az autofág gének inaktiválásának a hatását a *mec-4(u231); pme-4::gfp* állatokban. Ez a konstrukció lehetővé tette, hogy a felnőttkorig túlélő sejtek számát határozzam meg. Az érintésérzékítő idegsejtek szignifikánsan nagyobb arányban élnek túl a *bec-1*, az *unc-51* és az *lgg-1* funkcióvesztéses mutáns állatokban, mint a kontroll állatokban (26. ábra).



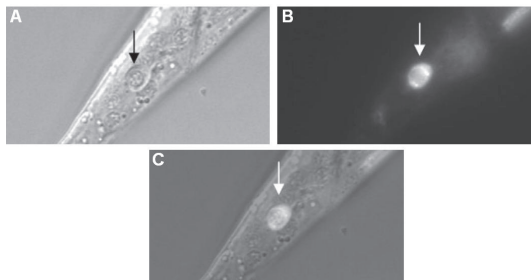
26. ábra A *bec-1*, *unc-51* és az *lgg-1* gének inaktiválása növeli a *pme-4::gfp*-t kifejező érintésérzékítő neuronok túlélését *mec-4(u231)* mutáns háttérben.

5. táblázat. Az autofág gének inaktiválása növeli az idegsejtek túlélését *mec-4(u231)* mutáns degeneratív háttérben

genotípus	idegsejtek túlélése (%)	szignifikancia
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp</i>	32,7 ± 0,7	
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp;bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	76,3 ± 6,9	p<0,001
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp;bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]</i>	71,5 ± 8,5	p<0,001
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp;unc-51(e368)</i>	77,4 ± 2,8	p<0,001
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp;unc-51(e1189)</i>	81,3 ± 5,4	p<0,001
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp</i> kontroll (üres RNSi vektor)	33,9 ± 1,6	
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp::lgg-1(RNSi)</i>	48,2 ± 7,2	p<0,01

Az autofág gének inaktiválása növeli a *pmec-4::gfp*-t kifejező idegsejtek túlélését *mec-4(u231)* genetikai háttérben. A táblázatban a fiatal felnőtt állatokban számolt GFP pozitív sejtek százalékos arányát tüntettem fel (25°C). 285 *lgg-1* RNSi kezelt állat, az összes többi genotípus esetében 200 állat mérésenként. A feltüntetett adatok átlagértékek, a +/- szórással kiegészítve. A szignifikancia a kontroll egyszeres mutáns és a kettős mutánsok adatainak eltérésére vonatkozik (kétmintás t-próba). Az RNSi kísérletekben a kontroll állatok üres „feeding” vektorral transzformált *E. coli* HT115 baktériumpázsiton voltak tartva.

A továbbiakban azt vizsgáltam, hogy vajon az autofág gének expresszálódnak-e a pusztuló neuronokban. A *mec-4(u231);plgg-1::gfp::lgg-1* genotípusú állatokban a megduzzadó, pusztuló neuronok erős GFP::LGG-1 expressziót mutattak.



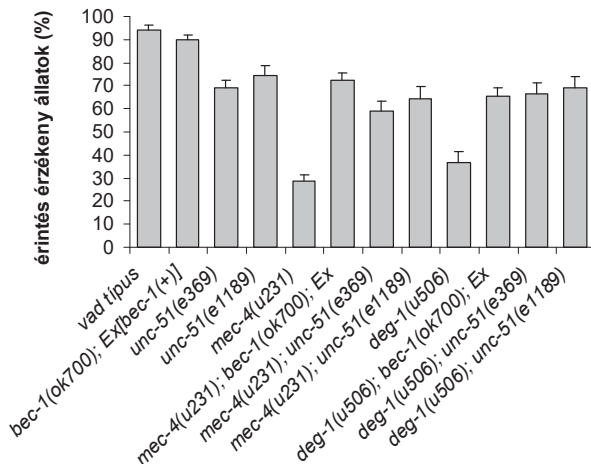
27. ábra A GFP::LGG-1 autofág marker intenzíven expresszálódik a *mec-4(u231)* mutáns állat pusztuló PLM neuronjában. A: *mec-4(u231);plgg-1::gfp::lgg-1* genotípusú állat duzzadó PLM neuronjáról készült Nomarski mikroszkópos kép. B: az A képen látható területéről készült fluoreszcens mikroszkópos kép. C: az A és a B kép összemontírozásából készült kép.

5.2.3. Az *unc-51* és *bec-1* autofág gének inaktiválása gátolja a 6-OHDA által indukált neurodegenerációt

A hiperaktív degenerin alapú modelleken kívül vizsgáltam az autofág gének inaktiválásának hatását a 6-hidroxidopamin (6-OHDA) neurotoxin által indukált sejtthalálra. 24 órával a 6-OHDA kezelést követően a neuronok épek tekinthetők, ha mind a nyúlványaik, mind a sejttestük épek látszik. A szinkronizált populációkból származó vad típusú állatokban 24 órával az 50 mM-os 6-OHDA kezelést követően 10%-nál kevesebb ép neuron maradt. A neuronok többségében ez a dendritek degenerálódását jelenti, de az állatok jelentős részében az idegsejtek mérete is csökken, vagy akár el is pusztulhatnak (16. ábra). Ezzel szemben az *unc-51(e369)* és *unc-51(e1189)* mutációk, illetve a *bec-1(RNSi)* képes volt részlegesen szuppresszálni a neuronok pusztulását ebben a modellben. Az *unc-51(e369)* mutáció esetében a neuronok 39%-a, az *unc-51(e1189)* mutáció esetében az 53%-a, míg a *bec-1(RNSi)* állatokban a neuronok 37%-a maradt épen.

5.2.4. Az autofág gének gátlása növeli a degenerin mutánsok érintésérzékenységét

A degenerin mutáns állatok érintésérzékeli idegsejtjeinek jelentős része elpusztul, ezért a mutáns állatok a vad típushoz képest csökkent mértékben reagálnak a mechanikai ingerlésre. Az autofág gének inaktiválása gátolja a neuronok pusztulását, ezért érdemes megvizsgálni, hogy a sejtek érintésérzékeliésében bekövetkező csökkenést is szuppresszálják-e? A vad típusú fiatal felnőtt állatok 93,9%-ban reagálnak az elülső testtáj finom érintésére. A *mec-4(u231)* és *deg-1(u506)* mutáns állatok, amelyek felnőttkorukra az érintésérzékeli neuronjaik jelentős részét elvesztik 27%, illetve 39%-ban reagálnak az érintésre. Az *unc-51* és a *bec-1* mutánsok a vad típusnál rosszabbul, de a *mec-4* és *deg-1* mutánsoknál jobban reagálnak az elülső testtáj finom érintésére. A *mec-4(u231)* és *deg-1(u506)* mutáció érintésérzékeliésre gyakorolt negatív hatását az *unc-51* és a *bec-1* gének inaktiválása szuppresszálja.



28. ábra A *bec-1* és az *unc-51* autofág gének inaktíválása szuppresszálja a degenerin mutások csökkent érintésérzékenységét. 150 állat mérésenként, $p < 0,0001$, kétmintás t-próba.

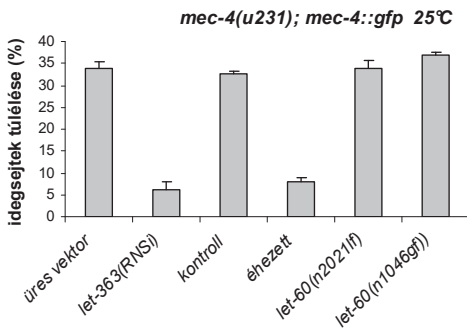
6. táblázat. Az autofág gének gátlása növeli a degenerin mutások érintésérzékenységét

genotípus	érintésérzékeny állatok (%)	szignifikancia
vad típus	93,9 ± 2,24	
<i>bec-1(ok700); Ex[bec-1(+)]</i>	89,8 ± 2,27	
<i>unc-51(e369)</i>	69 ± 3,11	
<i>unc-51(e1189)</i>	74,6 ± 3,89	
<i>mec-4(u231)</i>	28,6 ± 2,76	
<i>mec-4(u231); bec-1(ok700); Ex[bec-1(+)]</i>	72,4 ± 2,89	$p < 0,001$
<i>mec-4(u231); unc-51(e369)</i>	58,8 ± 4,24	$p < 0,001$
<i>mec-4(u231); unc-51(e1189)</i>	64,3 ± 5,26	$p < 0,001$
<i>deg-1(u506)</i>	36,9 ± 4,6	
<i>deg-1(u506); bec-1(ok700); Ex[bec-1(+)]</i>	65,3 ± 3,83	$p < 0,001$
<i>deg-1(u506); unc-51(e369)</i>	66,6 ± 4,43	$p < 0,001$
<i>deg-1(u506); unc-51(e1189)</i>	69,2 ± 4,65	$p < 0,001$

A degenerin mutások érintésérzékenységét növeli az autofág gének inaktíválása. A táblázatban a fiatal felnőtt korban a platina tüvel történő finom érintésre reagáló állatok arányát tüntettem fel. 100 állat mérésenként, a feltüntetett adatok átlagértékek, a +/- szórással kiegészítve. A szignifikancia az egyszeres degenerin mutáns és a kettős mutánsok adatainak eltérésére vonatkozik (kétmintás t-próba). Az *unc-51* egyszeres mutánsok értékei nem térnek el szignifikánsan a kettős mutánsokétól ($p > 0,05$), a *bec-1(ok700); Ex[bec-1(+)]* genotípusú állatok értékei viszont szignifikánsan eltérnek a kettős mutánsoktól ($p < 0,01$)

5.2.5. Az éhezés és a *let-363/TOR2* gén gátlása csökkenti a neuronok túlélését degenerin alapú neurodegenerációs modellekben

Az autofág gének inaktíválása befolyásolta az idegsejtpusztulást két *C. elegans* neurodegenerációs modellben. Az autofágia aktiválásának hatását éheztetéssel, vagy az autofágia-gátló *let-363/TOR2* gén „csendesítésével” tudtam vizsgálni. Kontrollként ellenőriztem a Ras genetikai útvonalba tartozó *let-60* gén funkcióvesztés és funkciónyeres mutációjának hatását. A *let-363(RNSi)* állatokban nagymértékben lecsökkent a túlélő neuronok száma (29. ábra). Éhezést követően szintén a neuronok számának csökkenését tapasztaltam. A *let-60* funkcióvesztés és funkciónyeres álléljainak nem volt szignifikáns hatása a *mec-4(u231)* degenerin által indukált sejtpusztulásra.



29. ábra Az éhezés és a *let-363/TOR2* RNSi kezelés csökkenti az érintésérzékélő idegsejtek túlélését

mec-4(u231);pmec-4::gfp állatokban. A *let-60* gén nem befolyásolja az idegsejtek pusztulását. A *let-60(n2021)* allél funkcióvesztés, míg az *let-60(n1046)* funkciónyeres mutáció. 300 állat mérésenként, *let-363(RNSi)* és éhezés: $p < 0,0001$, *let-60* allélek: $p > 0,05$ (kétmintás t-próba).

7. táblázat. Az éhezés és a *let-363/TOR2* RNSi kezelés csökkenti az érintésérzékélő idegsejtek túlélését *mec-4(u231);pmec-4::gfp* állatokban

genotípus	idegsejtek túlélése (%)	szignifikancia
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp</i> (üres RNSi vektor)	33,8 ± 1,56	
<i>let-363(RNSi);mec-4(u231);pmec-4::gfp</i>	6,26 ± 1,71	$p < 0,001$
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp</i>	32,69 ± 0,6	
<i>mec-4(u231);pmec-4::gfp</i> (éhezett)	8,05 ± 0,9	$p < 0,001$
<i>let-60(n2021lf);mec-4(u231);pmec-4::gfp</i>	34,0 ± 1,57	$p > 0,05$
<i>let-60(n1046gf);mec-4(u231);pmec-4::gfp</i>	37,0 ± 0,6	$p < 0,05$

A táblázatban a fiatal felnőtt állatokban számolt GFP pozitív sejtek százalékos arányát tüntettem fel (25°C). 100 állat mérésenként. A feltüntetett adatok átlagértékek, a +/- szórással kiegészítve. A szignifikancia a kontroll és kezelt, illetve kettős mutánsok állatok adatainak eltérésére vonatkozik (kétmintás t-próba). Az RNSi kísérletben a kontroll állatok üres feeding vektorral transzformált *E. coli* HT115 baktériumpázsiton voltak tartva.

5.3. Az *unc-51* és a *bec-1* autofág gének inaktiválása csökkent sejt méretet okoz *C. elegans*ban

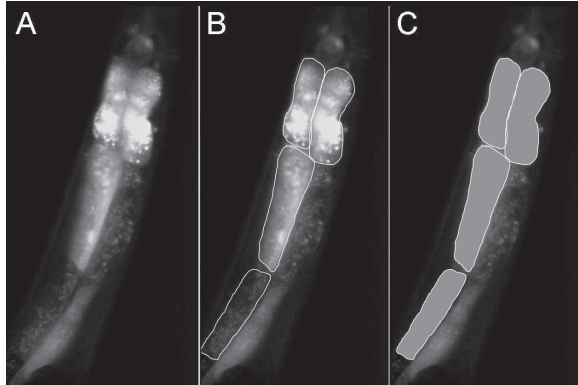
A sejt méretet a lebontó és a felépítő anyagcsere folyamatok aktivitása határozza meg. Az autofágia az eukarióta sejtek legnagyobb kapacitású lebontó mechanizmusa, ezért logikusnak tűnt, hogy megvizsgáljam az autofág gének befolyásolják-e a sejt méretet *C. elegans*ban.

A vad típusú *C. elegans* átlagos testhossza méréseim szerint 1,28 mm. A kis test méret (Sma – small - fenotípus) az *unc-51* és a *bec-1* autofág mutánsok jellemző fenotípusa. Az *unc-51* mutánsok átlagos testhossza ~0,9 mm, a *bec-1* mutánsoké ~1,0mm (9. táblázat). A testhossz csökkenését - állandó testtérfogat mellett - okozhatja az állatok átmérőjének növekedése, vagy a sejtek számának csökkenése is. Ezért vizsgáltam a két autofág gén egy-egy funkcióvesztéses mutáns törzsének az átmérőjéből és a testhosszából számolt testtérfogatát. Az átmérő a *bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]* mutánsoknál nem változott szignifikánsan, az *unc-51(e1189)* mutánsok esetében körülbelül 8%-kal csökkent (8. táblázat). A testtérfogat a *bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]* mutánsoknál a harmadával, az *unc-51(e1189)* mutánsok esetében közel a felére csökkent (8. táblázat).

8. táblázat. Az *unc-51* és *bec-1* mutánsok testtérfogata kisebb a vad típusénál

Genotípus	Testhossz (mm)	Átmérő (μm)	Térfogat (mm ³)	Térfogat (%)	Darabszám
Vad típus	1.2 ± 0.02	0.083 ± 0.0015	0.00619 ± 0.0002	100	8
<i>unc-51(e1189)</i>	0.86 ± 0.07	0.076 ± 0.0013	0.0036 ± 0.00019	58.17	11
<i>bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]</i>	1.02 ± 0.15	0.083 ± 0.001	0.0041 ± 0.0003	66.88	11

A mozaikos *pprk-1::gfp* transzgénikus konstrukció segítségével a vizsgált törzsek egyedeinek sejt méret változását is megmértem. A *pprk-1::gfp* transzgén csak az inert GFP fehérjét fejezi ki, egyéb hatása nincsen. A GFP pozitív sejtek átlagos átmérője vad típusú genetikai háttérben 56,1 ± 3,2 μm (n=30), míg *unc-51(e369)* mutánsokban 41,9 ± 1,9 μm (n=39) volt.



30. ábra Az extrakromoszomális *pprk-1::gfp* transzgén által kifejezett GFP-vel a belsejtek elkülöníthetők a környező sejtektől. A: a *pprk-1::gfp* konstrukciót hordozó állat belének elülső régiója. A *pprk-1::gfp* konstrukció az osztódások során véletlenszerűen elveszett, ezért egyes belsejtekből hiányzik a fluoreszcens GFP fehérje. B: az A képen látható belsejtek jelölődése eltérő, ez alapján határvonaluk meghatározható. C: az A képen látható állat belsejtjeinek keresztmetszeti felülete.

A sejtszám változásának vizsgálatára különböző szövetekben kifejeződő GFP konstrukciókat hordozó törzseket használtam. Nem volt lehetőségem mind a 959 hermafrodita testi sejt leszámlolására, a *pme-7::gfp* által jelölt idegsejtek és a CDH-3::GFP-t és AJM-1::GFP-t kifejező „seam” sejtek mennyiségében nem volt eltérés a vad típushoz képest.

5.3.1. Az *unc-51* és a *bec-1* autofág gének az inzulin/IGF-1 és a TGF- β genetikai útvonalakkal kölcsönhatva szabályozzák a sejtméretet *C. elegans*ban

*C. elegans*ban ismert, hogy mind az inzulin/IGF-1 mind a TGF- β jelátviteli útvonalak befolyásolják a testhosszat a sejtméret szabályozásán keresztül. Mivel az autofág gének inaktiválása szintén befolyásolja a sejtméretet, a továbbiakban az autofág gének és az inzulin/IGF-1, illetve a TGF- β genetikai útvonal kapcsolatát vizsgáltam.

Az inzulin/IGF-1 jelátvitel receptorának inaktiválása, illetve a TGF- β jelátvitel serkentése egyaránt a testméret növekedésével jár. Az inzulin/IGF-1 jelátvitel receptorának a DAF-2-nek az inaktiválása $1,36 \pm 0,08$ mm-re növeli az átlagos testhosszat. A funkcióvesztéses TGF- β *lon-1(e185)* mutáns testhossza $1,72 \pm 0,08$ mm, míg a *lon-2(e678)* mutánsé $1,51 \pm 0,09$ mm (9. táblázat). A TGF- β útvonal egyik ligandumának, a DBL-1-nek

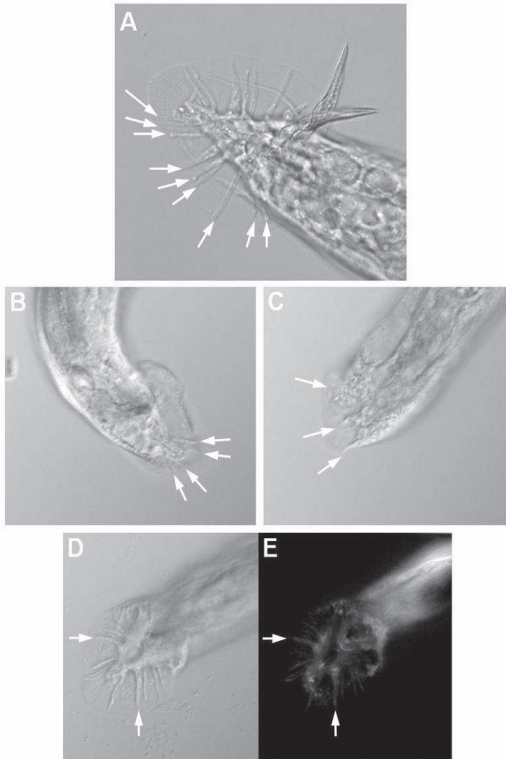
az overexpressziója (a genotípus jelölése: *dbl-1(+++)*) szintén Lon (hosszú) fenotípust eredményez, a *dbl-1(+++)* genotípusú állatok átlagos testhossza 1.38 ± 0.09 mm. Az *unc-51(e369)* és *bec-1(ok691)* valamint a *daf-2*, *lon-1*, *lon-2* funkcióvesztéses mutációk, illetve a *dbl-1(+++)* genotípus kölcsönhatását episztázis (kettős mutáns) analízissel vizsgáltam. A kettős mutánsok testhosszát lemérve az autofág mutánsok rövid testhossz fenotípusa (Sma) minden esetben episztatikusnak bizonyult az inzulin/IGF-1 és a TGF- β komponensek mutációinak, illetve overexpressziójának, hosszú fenotípusa (Lon) felett. Az *unc-51* és a *bec-1* mutánsokkal képzett kettős mutánsok testhossza majdnem teljesen megegyezett az egyszeres mutánsokra jellemző rövid testhosszal (9. táblázat).

9. táblázat. Az *unc-51* és *bec-1* autofág gének, az inzulin/IGF-1 és a TGF- β jelátvitellel együttthatva befolyásolja a testméretet

Genotípus	Testhossz (mm)	Darabszám	Fenotípus
N2	1.28 ± 0.07	241	vad típus
<i>unc-51(e369)</i>	0.87 ± 0.09	266	Sma
<i>unc-51(e1189)</i>	0.9 ± 0.08	304	Sma
<i>bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	0.99 ± 0.08	157	Sma
<i>bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]</i>	1.04 ± 0.14	154	Sma
<i>lon-1(e185)</i> [TGF- β]	1.72 ± 0.08	228	Lon
<i>lon-2(e678)</i> [TGF- β]	1.51 ± 0.09	243	Lon
<i>dbl-1(+++)</i> [TGF- β]	1.38 ± 0.09	252	Lon
<i>daf-2(e1370)</i> [insulin/IGF-1]	1.36 ± 0.08	185	Lon
<i>unc-51(e1189);lon-1(e185)</i>	1.12 ± 0.1	288	Sma
<i>unc-51(e1189);dbl-1(+++)</i>	1.05 ± 0.06	279	Sma
<i>unc-51(e1189);daf-2(e1370)</i>	0.98 ± 0.06	250	Sma
<i>unc-51(e369);lon-1(e185)</i>	1.07 ± 0.06	225	Sma
<i>unc-51(e369);lon-2(e678)</i>	1.16 ± 0.11	253	Non-Lon
<i>unc-51(e369);dbl-1(+++)</i>	1.05 ± 0.09	265	Sma
<i>bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)];lon-2(e678)</i>	1.1 ± 0.22	47	Sma
<i>bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)];dbl-1(+++)</i>	1.04 ± 0.17	58	Sma
<i>bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)];lon-2(e678)</i>	1.08 ± 0.2	47	Sma
<i>bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)];dbl-1(+++)</i>	1.12 ± 0.13	42	Sma
<i>bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)];lon-1(e185)</i>	1.08 ± 0.1	65	Sma
<i>bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)];daf-2(e1370)</i>	1.02 ± 0.09	89	Sma

Autofág mutánsok, az inzulin/IGF-1 és TGF- β komponensekben mutáns állatok testhossza, illetve a keresztezéssel előállított kettős mutáns állatok testhossza. Az autofág gének rövidítik, a csökkent IGF-1 és TGF- β jelátvitel, illetve a DBL-1 túlaktiválása növeli a testméretet. Az autofág mutánsok rövid testhossz fenotípusa episztatikus az inzulin/IGF-1 és a TGF- β mutánsok hosszú testhossz fenotípusa felett. A táblázatban a vad típusú (N2), a funkcióvesztéses autofág mutáns, a funkcióvesztéses TGF- β gátló mutánsok (*lon-1*, *lon-2*), a TGF- β ligandumot túltermelő konstrukciót hordozó transzgenikus (*dbl-1(+++)*) és a funkcióvesztéses inzulin/IGF-1 receptor mutáns (*daf-2*) *C. elegans* törzsek testhosszát tüntettem fel. Sma: rövid testhossz, Lon: hosszú testhossz.

A TGF- β jelátviteli útvonal *C. elegans*ban a hím párzószeret fejlődését is szabályozza. Például a *mab-21* gén mutációja a hím párzószeret rendellenes fejlődését okozza. Az *unc-51* és *bec-1* autofág mutánsokban a hím párzószeret struktúrája szintén abnormalis (31. ábra). A vitorla általában megtalálható, de csökkent méretű, a vad típusban megtalálható idegsejtnyúlványok hiányosak, vagy csökevényesek.



31. ábra Az *unc-51* és *bec-1* autofág gének funkcióvesztéses mutánsaiban sérül a hím párzószeret fejlődése. A: vad típusú hím párzószeret. A vitorlának nevezett kutikulanyúlványba oldalanként 3x3, összesen 18 érzékelő idegsejtnyúlvány ágazódik be (fehér nyilakkal jelölve). B: *unc-51(e369)* mutáns hím farki régiója. A párzószeret idegsejtnyúlványai szinte teljesen hiányoznak. C: egy *bec-1(ok700); Ex[bec-1(+)]* genotípusú hím állat párzószerete. Az idegsejtnyúlványok szintén hiányoznak, vagy csökevényesek. D, E: egy *bec-1(ok700); Ex[bec-1(+)]* hím állatról készült Nomarski és fluoreszcens mikroszkópos kép. A D képen látható, hogy az érzékelő nyúlványok nem mindegyike fejlődött ki, míg az E képen az *Ex[bec-1(+)]* konstrukciót hordozó állatban látható, hogy a *bec-1* gén kifejeződik az érzékelő nyúlványokban (a fehér nyilak csak a legjobban látható nyúlványokra mutatnak).

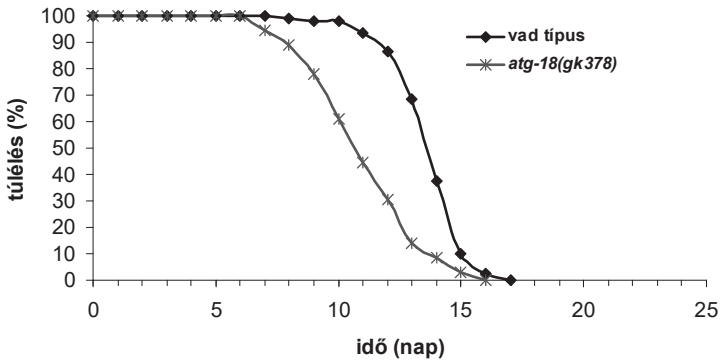
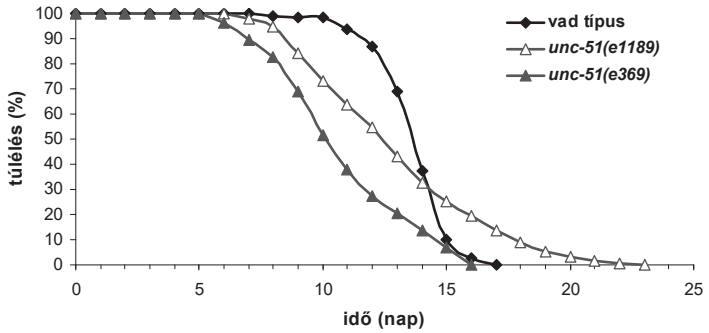
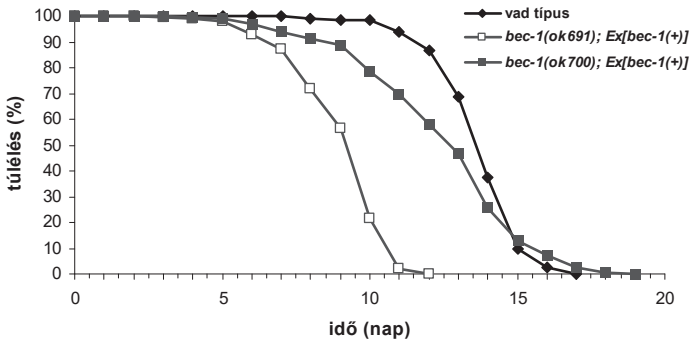
5.4. Az autofág gének inaktiválása felgyorsítja az öregedési folyamatot

A szervezet öregedését és számos öregkori betegséget (pl. rák, neurodegeneráció, izomsorvadás) a sejtes hibák progresszív felhalmozódása kíséri. A hibák károsodott sejtalkotók megjelenéséhez vezetnek, amelyek eltávolításának egyik legfontosabb

mechanizmusa az autofágia. Nem véletlen, hogy számos korfüggő degeneratív betegségben mutatták ki az autofágia szerepét. A legújabb eredmények alapján az autofágia az élethossz meghatározásában is közvetlenül részt vesz. Kísérleteim során ezért az autofág gének öregedésben betöltött szerepét vizsgáltam az élethossz és az öregedési pigment felhalmozódás mérésével, az izomdegeneráció nyomonkövetésével. Az utóbbi hús évben kiderült, hogy az öregedést genetikai faktorok nagymértékben befolyásolják. Például azok a funkcióvesztéses mutációk, amelyek csökkentik az inzulin/IGF vagy a TOR kináz által közvetített jelátviteli útvonalak aktivitását, a mitokondriális működést és a kalória felvételt jelentősen megnövelik az élethosszt filogenetikailag egymástól távol álló állatfajokban. További kísérleteimben ezért ezen faktorok és az autofág gének kölcsönhatását tanulmányoztam.

5.4.1. Az autofág gének gátlása rövidíti az élethosszt *C. elegans*ban

Eredményeim szerint a vad típusú *C. elegans* átlagos féléletideje 25°C-on 15 nap. Az *unc-51*, *bec-1* és *atg-18* gének mutációs inaktiválása a vad típusra jellemzőnél szignifikánsan rövidebb élethosszt eredményezett (32. ábra és 10. táblázat).



32. ábra Az autofág gének inaktiválása rövidíti az élethosszat *C. elegans*-ban. Az élethossz méréseket 20°C-on, szinkronizált populációval végeztem.

10. táblázat. Az autofág gének inaktiválása rövidíti az élethosszt *C. elegans*-ban.

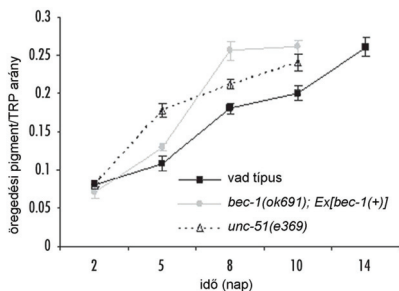
Genotípus	Átlagos élethossz ± szórás (napokban)	50%	darabszám	Szignifikancia (P érték)
vad típus	14.9 ± 0.1	13	112	
<i>bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	10.3 ± 0.1	9	174	<0.0001
<i>bec-1(ok700);Ex[bec-1(+)]</i>	13.7 ± 0.2	12	183	<0.0181
<i>unc-51(e369)</i>	13.9 ± 0.3	12	132	<0.0023
<i>unc-51(e1189)</i>	13.1 ± 0.3	10	130	<0.0046
<i>atg-18(gk378)</i>	12.2 ± 0.1	10	185	<0.0001

Az autofág mutánsok a vad típusnál szignifikánsan rövidebb ideig élnek. Az élethossz mérést, tiszta, szinkronizált populációval végeztem 300µg/ml FUDR-ot tartalmazó lemezeken, 25°C-on. A szignifikancia a vad típus és az egyszeres mutánsok adatainak eltéréseire vonatkozik (Log-rank teszt).

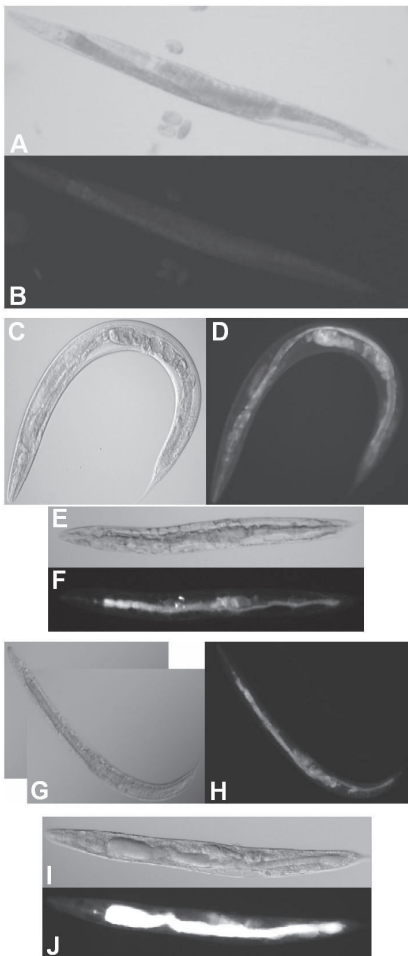
5.4.2. Az autofág gének gátlása felgyorsítja az öregedési pigment felhalmozódását

Az öregedő állatok lipofuszcinnből és AGE-ből (Advanced Glycation Endproducts) álló autofluoreszcens öregedési pigmentet halmoznak fel [100], ami fluorimetriával és fluoreszcens mikroszkópiával nyomon követhető (a részletek az anyagok és módszerek fejezetben). Vad típusban késői L4 lárvastádiumig még nincsen mérhető mennyiségű öregedési pigment felhalmozódás. 2 napos felnőtt egyedekben, amelyek a csíravonalat leszámítva már csak differenciált sejtekből állnak, mérhető mennyiségű öregedési pigment halmozódik fel (34. ábra). Vad típusban az öregedési pigment mennyisége a 18. napig emelkedő tendenciát mutat és eléri a 0,25 körüli értéket (33. ábra). A grafikonon a 15. és 18. mérési nap nincs feltüntetve, mert a mutáns törzsek a 15. napra gyakorlatilag kipusztulnak.

Az autofág mutáns állatok már a 10. napon elérik a vad típus késői időskorára jellemző 0,25 körüli AGE pigment – TRP arányt. A 34. ábrán látszik, hogy azonos mikroszkóp beállítások mellett a 6 napos *unc-51(e369)* autofluoreszcenciája erősebb, mint a 6 napos N2 állaté, illetve a 10 napos *unc-51(e369)* sokkal erősebben fluoreszkál, mint a 9 napos N2.



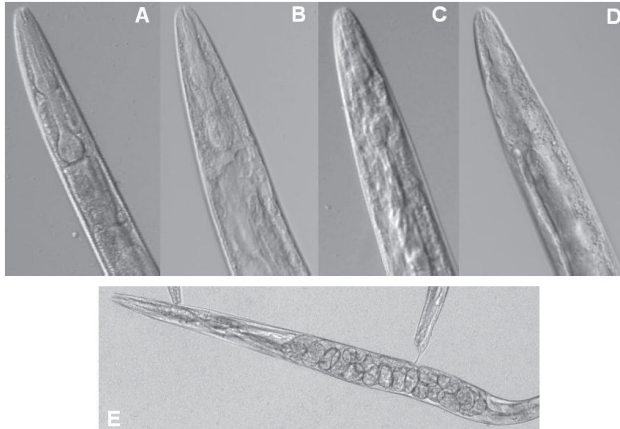
33. ábra. A *bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]* és az *unc-51(e369)* genotípusú állatokban gyorsabban halmozódik fel az őregedési pigment, mint a vad típusú kontroll állatokban.



34. ábra. *unc-51(e369)* autofág mutánsban az autofluoreszcens őregedési pigmentek hamarabb érik el az időskorra jellemző szintet, mint a vad típusban. A: kiszagytású Nomarski mikroszkópos kép egy vad típusú, 1 napos felnőtt állatról. B: az A képen látható állatról készült fluoreszcens mikroszkópos kép. A bél autofluoreszcenciája alig kivehető. C: 6 napos vad típusú felnőtt állatról készült kiszagytású Nomarski mikroszkópos kép. D: A C képen látható állatról készült fluoreszcens mikroszkópos kép. A bél autofluoreszcenciája megnőtt és az átmérője is csökkent. E: 6 napos felnőtt *unc-51(e369)* állatról készült kiszagytású Nomarski mikroszkópos kép. F: Az E képen látható állatról készült fluoreszcens mikroszkópos kép. A bél autofluoreszcenciája meghaladja a vad típusét. G: kiszagytású Nomarski mikroszkópos kép egy 9 napos felnőtt vad típusú állatról. A kép a jobb minőség elérése érdekében ugyanazon állatról egy időben készült 2 fótó összeszerkezésével készült. H: Az G képen látható állatról készült fluoreszcens mikroszkópos kép. A bél teljesen elvékonyodott, a gonad degenerálódott maradéka is erőteljesen autofluoreszcens. I: kiszagytású Nomarski mikroszkópos kép egy 10 napos felnőtt *unc-51(e369)* állatról. J: Az I képen látható állatról készült fluoreszcens mikroszkópos kép. A bél fluoreszcenciája jóval erősebb a vad típusénál. A képek nem egy időben, de azonos expozíciós idővel készültek.

5.4.3. Az autofág gének inkativálása felgyorsítja az izomdegenerációt

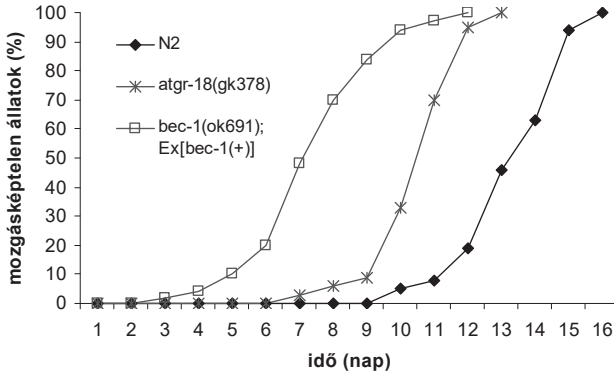
Az idősebb állatok mozgásának sebessége csökken, koordináltsága romlik. Ennek oka, hogy a kor előrehaladtával az izmok degenerálódnak. A garatizom sejtek a reprodukív kort követően sorvadni kezdenek, a garatpumpálás megszűnik és az állatok abbahagyják a táplálkozást (35. ábra).



35. ábra. Az öregedés során a *C. elegans*ban izomsorvadás figyelhető meg. A-D: vad típusú, 25°C-on tartott, a felnőttkor elérésétől számolva A: 1, B: 6, C: 9, D: 14 napos állatok elülső testrégiójáról készült Nomarski mikroszkópos képek. Az öregedés hatása jól megfigyelhető a *C. elegans* garatján, amelynek izomzata a korral előrehaladva fokozatosan degenerálódik. E: 5 napos felnőtt *bec-1(ok691);bec-1::gfp* állat le nem rakott petékkal. Az öregedés során a vulva izmok is degenerálódnak, így a reprodukív periódus végén keletkező petéket sokkal lassabban, vagy egyáltalán nem rakják le a hermafroditák.

A populációban az időskori izomdegeneráció által súlyosan érintett egyedek arányát a helyváltoztató mozgásra képtelen (bénult) állatok arányával jellemeztem. A vad típusú, a *bec-1(ok691);Ex [bec-1(+)]* és az *atg-18(gk378)* genotípusú állatok fiatal felnőtt korban képesek spontán, szinusoid alakú mászó mozgást végezni (az *unc-51* autofág mutánsok nem képesek helyváltoztató mozgásra – Unc, azaz „Uncoordinated” fenotípusúak). Az azonos genotípusú állatok a természetes izomdegeneráció tekintetében nagymértékű variabilitást mutatnak. A vad típus első egyedei a 8-9. napon kezdenek lebénulni, a *bec-1(ok691);Ex [bec-1(+)]* mutánsok esetében ez már a 3. napon bekövetkezik. Az *atg-18(gk378)* mutánsok az 5. és 6. napon kezdenek lebénulni. A bénulási görbe időbeli lefutása az összes populációban közel azonos arányú, így a

kezdetben kialakult különbség a populációk kihalásáig megmarad. A pusztulás előtt az összes állat elérte a teljesen bénult állapotot.



36. ábra. Az izomdegeneráció miatti bénulás hamarabb jelentkezik a *bec-1(ok691)* és az *atg-18(gk378)* állatokban. A méréseket 20°C-on, tiszta, szinkronizált populációval végeztem.

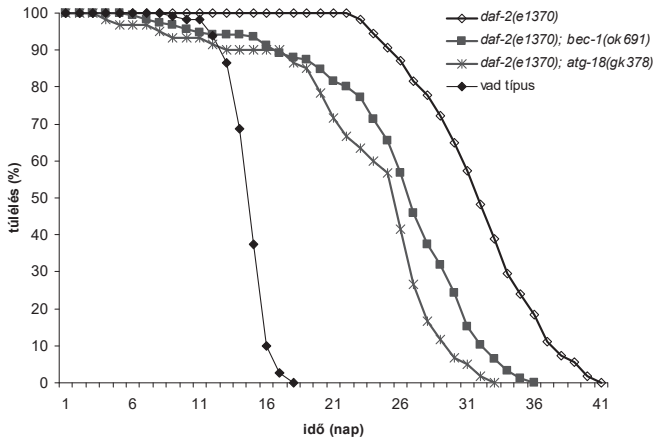
A vulvaizmok a testfal izmaihoz hasonlóan sorvadnak az öregedés során. A működésképtelen vulvaizmok miatt csökken a peterakási képesség, a testben maradó petékből kikelő lárvák pedig elpusztítják a hermafrodita állatot (bow fenotípus). A vad típusú állatok közül elenyészően kevés pusztul el a bennük kikelő peték miatt, míg a *bec-1* és *unc-51* funkcióvesztéses mutánsok esetében a populáció közel 100%-a pusztul el ilyen módon a reprodukív időszak végére (35. ábra).

5.4.4. Az autofág gének az élethossz szabályozó („longevity”) jelátviteli útvonalaktól „downstream” hatnak

Noha majdnem 300 gént és számos „longevity” útvonalat írtak már le *C. elegans*-ban, csak kevés esetben vizsgálták, hogy azok hogyan működnek együtt az élethossz szabályozásában. A továbbiakban ezért episztázis analízissel vizsgáltam, hogy az autofág gének milyen kölcsönhatásban állnak az inzulin/IGF és a TOR kináz által közvetített jelátviteli útvonalakkal és a mitokondriális működést meghatározó génekkel.

5.4.4.1. Az autofág gének inaktíválása részlegesen szuppresszálja a csökkent inzulin/IGF-1 jelátvitel által kialakított hosszú élethossz fenotípust

A *C. elegans* inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal receptora a DAF-2 fehérje [128]. A *daf-2(e1370)* mutánsok, több mint kétszer hosszabb ideig élnek a vad típusnál [70]. A *bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)];daf-2(e1370)* és az *atg-18(gk378);daf-2(e1370)* kettős mutánsok élethossza lényegesen rövidebb a *daf-2(e1370)* egyszeres mutánsok élethosszánál. A *bec-1* és az *atg-18* gének inaktíválása azonban csak részlegesen szuppresszálja a *daf-2(e1370)* egyszeres mutánsok Age (aging, hosszú életű) fenotípusát, az egyszeres autofág mutánsok rövid élethosszát nem állítja helyre. (37. ábra, illetve 11. táblázat).

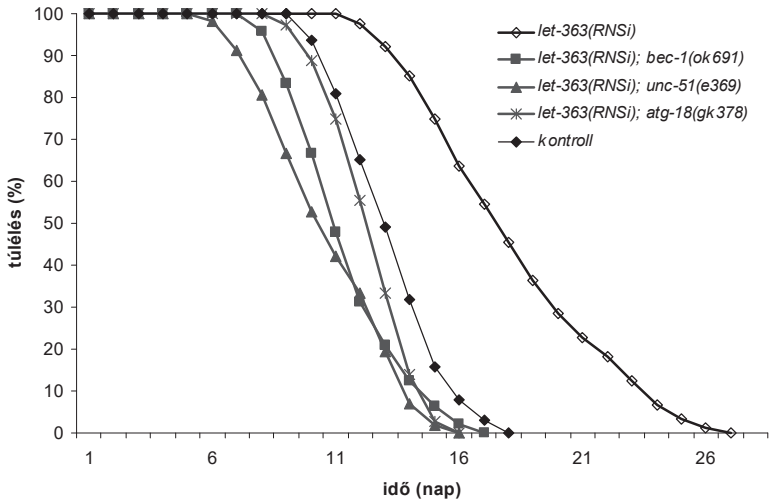


37. ábra. A *bec-1* és *atg-18* autofág gének funkcióvesztéses mutációi részlegesen szuppresszálják a *daf-2(e1370)*/IGF-1 mutáns állatok fenotípusát. A jelmagyarázatban a *bec-1(ok691)* genotípus a *bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]* genotípusnak felel meg.

5.4.4.2. Az autofág gének inaktíválása szuppresszálja a *let-363(RNSi)* állatok hosszú élethossz fenotípusát

Az élesztő TOR2 génjének *C. elegans* ortológja a *let-363/CeTor*. Funkcióvesztéses mutációja jelentős élethossz növekedést eredményez [23], a homozigóta mutáns állatok fejlődése azonban L3 stádiumban megreked. Emiatt mutáns törzs helyett a *let-363(RNSi)* állatokat használtam az episztázis analízis elvégzéséhez. A *let-363(RNSi);bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]*, *let-363(RNSi);unc-51(e369)* és *let-363(RNSi);atg-18(gk378)* genotípusú állatok a *let-363(RNSi)* állatoknál szignifikánsan rövidebb ideig élnek.

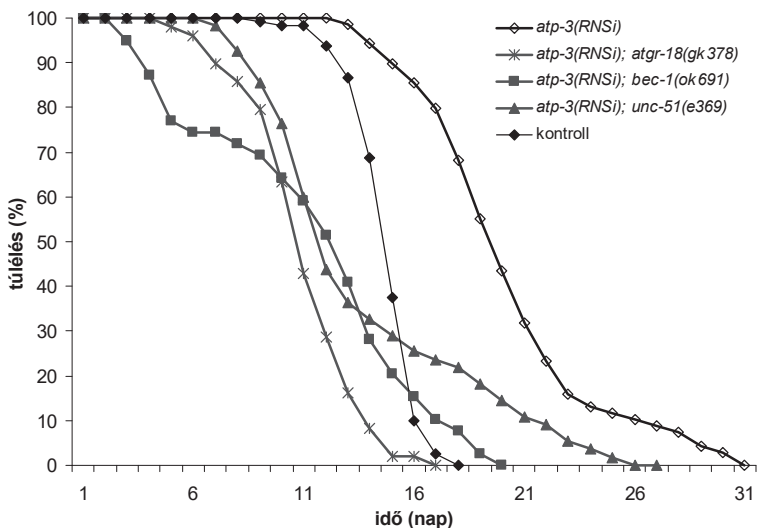
Élethosszuk rövidebb a vad típusénál és nem térnek el jelentősen a *let-363* RNSi-val nem kezelt egyszeres autofág mutánsok élethosszától.



38. ábra. Az autofág gének funkcióvesztéses mutációi szuppresszálják a *let-363(RNSi)* fenotípusát. A funkcióvesztéses autofág mutánsok rövid élethossza episztatikus a *let-363/CeTor* RNSi kezelt állatok megnyúlt élethossz fenotípusa felett. A jelmagyarázatban a *bec-1(ok691)* genotípus a *bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]* genotípusnak felel meg.

5.4.4.3. Az autofág gének inaktiválása szuppresszálja a csökkent mitokondriális működés okozta hosszú élethossz fenotípust

Az *atp-3* gén a mitokondriális ATP szintáz egyik alegységét kódolja [110]. Inaktiválása a sejt ATP termelő képességét lecsökkenti, viszont megnöveli az állatok élethosszát [110]. Az *atp-3* RNSi-vel végzett méréseknél az anyagok és módszerek részben leírt általános eljárással ellentétben a lárvális fejlődés kezdetétől *atp-3(RNSi)* lemezekon tartottam az állatokat, mivel az *atp-3* gátlása az L3 lárvastádium során fejt ki a hatását, később alkalmazva már hatástalan. Az *atp-3(RNSi)* állatok átlagos élethossza több mint 5 nappal hosszabb a vad típusénál, a maximális élethosszbeli eltérés még ennél is több. Az *atp-3(RNSi);bec-1(ok691)*, *atp-3(RNSi);unc-51(e369)* és az *atp-3(RNSi);atg-18(gk378)* genotípusú állatok élethossza megegyezik az egyszeres autofág funkcióvesztéses mutánsokéval.



39. ábra. Az autofág gének funkcióvesztéses mutációi szuppresszálják az *atp-3(RNSi)* fenotípusát. A jelmagyarázatban a *bec-1(ok691)* genotípus a *bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]* genotípusnak felel meg.

11. táblázat. Az autofág gének inaktiválása szuppresszálja az inzulin/IGF-1 és TOR jelátvitel és a csökkent mitokondriális működés következtében megnyúlt élethosszat

Genotípus	Átlagos élethossz ± szórás (napokban)	darabszám	Szignifikancia
<i>daf-2(e1370)</i>	32.1 ± 0.6	64	
<i>daf-2(e1370);bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	26.1 ± 0.5	185	p<0.0001
<i>daf-2(e1370);atg-18(gk378)</i>	24.2 ± 0.5	147	p<0.0001
vad típus [üres RNSi vektor]	14.3 ± 0.4	66	
<i>let-363(RNSi)</i>	18.4 ± 0.4	88	
<i>let-363(RNSi);bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	11.4 ± 0.3	82	p<0.0001
<i>let-363(RNSi);atg-18(gk378)</i>	11.7 ± 0.3	46	p<0.0001
<i>let-363(RNSi);unc-51(e369)</i>	11.5 ± 0.2	129	p<0.0001
vad típus [üres RNSi vektor]	14.1 ± 0.4	66	
<i>atp-3(RNSi)</i>	20.4 ± 0.5	69	
<i>atp-3(RNSi);bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]</i>	11.5 ± 0.8	56	p<0.0001
<i>atp-3(RNSi);atg-18(gk378)</i>	10.3 ± 1.6	39	p<0.0001
<i>atp-3(RNSi);unc-51(e369)</i>	14.2 ± 0.7	55	p<0.0001

Az élethossz mérést, tiszta, szinkronizált populációval végeztem 300µg/ml FUDR-ot tartalmazó lemezekon, 25°C-on. A szignifikancia az egyszeres és a kétszeres mutánsok adatainak eltéréseire vonatkozik (Log-rank teszt).

6. Következtetések

A neurodegeneráció, a sejtek növekedése és az öregedés is a sejttes hibákkal kapcsolatban álló folyamatok. A sejttes hibák felhalmozódása vezet el a neuronok funkcióvesztéséhez és pusztulásához, a sejtek növekedésének háttérében álló intenzív anyagcsere-folyamatok károsítják a sejtet, a külső és belső károsító hatások következtében egyre növekvő mennyiségű károsodott sejtalkotó halmozódik fel az öregedő sejt citoplazmájában. Ezen folyamatok egyedfejlődési és orvosi biológiai jelentősége ellenére keveset tudnak a károsodások ellen ható sejtteni mechanizmusokról. Az autofágia az eukarióta sejtek meghatározó lebontó folyamata, amely alkalmas a károsodott sejtalkotók eltávolítására. Doktori értekezésemben azért azt vizsgáltam, hogyan befolyásolja a neurodegenerációt, a sejtmet szabályozást és az öregedési folyamatot az autofágia.

6.1. Az autofág gének minden szövettípusban és minden egyedfejlődési stádiumban kifejeződnek *C. elegans*ban

A neurodegeneráció, a sejtmet és az öregedés szabályozásában bizonyos szövettípusoknak kiemelt szerepe van. Annak megállapításához, hogy az autofág gének *C. elegans* ortológjai közvetlenül hatnak-e ezekre a folyamatokra, először az autofág gének expresszióját vizsgáltam. Az általam tanulmányozott autofág gének majdnem minden szövettípusban expresszálódnak az egyedfejlődés során és a kifejlett állatokban. A kifejeződés intenzitása szövettípusonként eltérő, az idegsejtben, a hipodermisben és a bélben a legerősebb. Az *unc-51* gén kivétel, amely kizárólag csak az ideg- és izomsejtben fejeződik ki. *C. elegans*ban a transzgenek kifejeződése gátolt a csírvonalban, emiatt ebben a szövettípusban az autofág gének expresszióját nem tudtam vizsgálni.

A neurodegeneratív betegségekben az emberi idegsejtek túléléséhez, megfelelő működéséhez más sejtípusok is hozzájárulnak, ezért például a gliákban kifejeződő géneknek is fontos szerepük van az idegsejtek túlélésében. Fonálféregben a magasabb rendűek gliáinak megfelelő sejtípusok hiányoznak, funkcióikat maguk az idegsejtek, vagy a környező szövetek például a hipodermisz látja el. Az idegsejtpusztulásban tehát a legfontosabb szerepük az érintett sejtekben, illetve a hipodermisben kifejeződő géneknek van. Az idegrendszernek kitüntetett szerepe van az öregedési folyamat szabályozásában *C. elegans*ban. A szövetek közül egyedül az idegszövet sejtjei nem pusztulnak a kor

előrehaladtával [99]. Az öregedési folyamat szabályozásában az idegsejteken kívül a szervezet metabolikus egyensúlyának fenntartásában fontos bélsejtek is szerepet játszanak [114, 129]. A sejtméret szabályozásában közvetlenül a nagyméretű izom és bélsejtek, közvetetten a hormonális szabályozás által az idegsejtek bírnak fontos szereppel. Az autofág gének *C. elegans*ban tehát kifejeződnek a neurodegenerációban, a sejtméret és az öregedési folyamat szabályozásában résztvevő szövettípusokban, ezekre a folyamatokra gyakorolt hatásuk feltételezhetően közvetlen.

6.2. A *bec-1* és *unc-51* autofág gének szükségesek az autofágia normális működéséhez *C. elegans*ban

Az élesztő *ATG1* és *ATG6* géneket inaktíválva élesztőben az autofágia működése gátolt. Az élesztő gének *C. elegans* ortológjainak, az *unc-51/ATG1* és *bec-1/ATG6* gének inaktíválásának az autofágiára gyakorolt hatását még nem tanulmányozták. A *C. elegans* *unc-51* és *bec-1* gének multifunkcionálisak [120, 123], emiatt elképzelhető, hogy mutációik nem az autofágián keresztül befolyásolják a neurodegenerációt, a sejtméret szabályozást és az öregedési folyamatot. Ezért kollégáimmal meg kellett vizsgálnom, hogy az *unc-51* és *bec-1* gének hogyan befolyásolják az autofágia folyamatát. Ennek ellenőrzésére először mi végeztük el autofág génben mutáns férgek elektronmikroszkópos vizsgálatát. A 19. ábrán jól látható, hogy a *bec-1(ok691)* mutáns állatban méretüket és felépítésüket tekintve abnormális autofág vakuolák találhatók. A kettős membránnal burkolt egyszerű autofagoszómák helyett torz, mielinizált, összetett struktúrák figyelhetők meg. Kolléganóm, Sigmond Tímea hasonló megfigyelést tett *unc-51(e369)* mutáns állatok elektronmikroszkópos vizsgálata során. Mivel a normális felépítésű autofagoszómák jelenléte szükséges az autofágia működéséhez, ezért feltételezhetjük, hogy az *unc-51* és a *bec-1* gének funkcióvesztéses mutációi csökkent mértékű autofágiát eredményeznek.

lgg-1 RNSi kezelt és *atg-18* funkcióvesztéses mutáns állatokban nem tudtam az autofagoszóma képződést elektronmikroszkópiával vizsgálni. Az *lgg-1(RNSi)* állatokban a *p/lgg-1::gfp::lgg-1* konstrukció segítségével azonban közvetetten tanulmányozhattam az *lgg-1* inaktíválásának autofágiára gyakorolt hatását. Az irodalmi adatok szerint az autofágia működéséhez elengedhetetlen az LGG-1 fehérje jelenléte [130]. Az *lgg-1* RNSi kezelés gyakorlatilag teljes mértékben megakadályozta a GFP::LGG-1 fehérje termelődését (20. ábra). Az RNSi mechanizmusa miatt ez egyben az endogén LGG-1 fehérje gátlását is jelenti. Tehát az *lgg-1* RNSi-val végzett kísérleteimben joggal feltételezhettem, hogy az autofág folyamat per se gátolt.

Összességében kijelenthető, hogy a *C. elegans unc-51*, *bec-1* és *lgg-1* autofág génnek inaktíválása az autofágia mechanizmusának sérülésével jár. Az expressziós vizsgálatok alapján az autofág génnek a legtöbb sejt típusban kifejeződnek és inaktíválásuk pleiotróp fenotípus megjelenését okozza. Ezek a megállapítások jól mutatják, hogy az autofág génnek funkciója alapvetően szükséges a szervezet megfelelő működéséhez.

6.3. Az autofág génnek szükségese a degenerinek és a 6-OHDA kiváltotta neurodegeneratív folyamatokhoz

A neurodegeneratív betegségek emberek millióit érintik. Az általuk okozott idegrendszeri károsodás gyógyítása ma még nem lehetséges. A *C. elegans* neurodegeneratív modellek segítségével jobban megismerhetjük a neurodegeneratív betegségek során lezajló idegsejt pusztulás genetikai hátterét. Az általam tanulmányozott degenerin és 6-OHDA alapú *C. elegans* neurodegenerációs modellek az excitotoxikus idegsejt károsodás modelljei. Ilyen károsodás felléphet sztrók, traumás agysérülések, Alzheimer és Parkinson valamint Huntington-kór során.

Kísérleteinkkel elsőként bizonyítottuk be, hogy a neurodegenerációt kiváltó *mec-4*, *deg-1* vagy *deg-3* funkcióvesztéses mutációk által indukált idegsejtpusztulást az *unc-51* és a *bec-1* autofág génnek funkcióvesztéses mutációi, illetve az *lgg-1* RNSi kezelés szignifikáns mértékben gátolták. Ez a gátlás mind a GFP jelölt idegsejtek túlélésének növekedésében, mind a vakuolarizálódó sejtek számának csökkenésében megmutatkozott (22-24. és 26. ábra). Az *unc-51* és a *bec-1* génnek nullmutáns alléljainak nagyobb hatása volt, mint az *lgg-1* RNSi kezelésnek. Az *lgg-1* RNSi alkalmazásakor megfigyelt kisebb hatás az RNSi technika sajátosságaival magyarázható. Az RNSi ugyanis nem képes a megcélzott gént teljes mértékben elhallgattatni. Ezért nem is vártam a nullmutánsokhoz hasonló mértékű változást. Az autofág génnek gátlása gátolja a neurodegenerációt, tehát az autofág génnek és feltehetően maga az autofág folyamat szükséges a neurodegeneráció végbemeneteléhez.

A kísérletek során felmerült, hogy az autofág génnek inaktíválása a neurodegeneráció csökkentésén túl más módon is okozhatja a pusztuló sejtek számának csökkenését. Amennyiben az autofág génnek mutációi megváltoztatják a degenerinek expresszióját, az a vakuolarizálódó, illetve a GFP pozitív sejtek számának változását okozza, ami pedig torzíja a mérések eredményeit. Például kisebb mértékű degenerin expresszió az autofág mutánsokban eleve kisebb sejtkárosító hatást eredményezne. A *mec-4* promótert hordozó transzkripciósi GFP riporter konstrukció segítségével leszámoltam az autofág mutánsokban az érintésérzékítő idegsejtek számát. A *mec-4* gén szabályozó és

kódoló régióját is tartalmazó transzlációs GFP riporter konstrukcióval pedig az autofág mutánsok egyedi sejtjeiben tanulmányoztam a degenerinek expresszióját. Szignifikáns eltérést egyik esetben sem tapasztaltam a vad típushoz képest.

A hiperaktív degenerin alapú *C. elegans* neurodegenerációs modellben a neuron pusztulás embrionális korban kezdődik és az állat élete végéig folytatódik. A vakuolarizáció megfigyelésével azonban ennél jóval rövidebb időtartam során elpusztuló sejtek számáról nyerhető információ. Amennyiben az autofág gének inaktiválása megváltoztatja a degenerin expresszáló sejtek pusztulásának időbeli profilját az a pusztuló sejtek számának látszólagos csökkenését eredményezheti. Ennek kizárására a degenerin és az autofág mutánsokból képzett kettős mutánsokkal kisszámú mintán végigkövettem a teljes egyedfejlődés során a sejtpusztulás alakulását. A kettős mutánsokban abszolút értékben kevesebb sejt halt meg mint a degenerin mutánsokban, és a sejtpusztulás időbeli lefutása nem változott meg.

A neurodegeneratív betegségekben előfordul, hogy a tünetek már a kimutatható idegsejtpusztulás előtt jelentkeznek. A károsodás tehát a neuronok pusztulásától függetlenül funkcionális inaktivitást okozhat. A neurodegeneratív betegségek kezelése során ezért az idegsejtek túlélésének biztosításán túl azok funkcionális aktivitásának fenntartása is fontos szempont. A *C. elegans* neurodegeneratív modellben a neurodegeneratív betegségeknek ez a sajátossága is vizsgálható. Az *unc-51* és a *bec-1* autofág gének inaktiválása jelentősen javította az állatok mechanoszenzoros képességeit. A kettős mutánsok az egyszeres mutánsokkal közel megegyező érzékszérzékeléssel rendelkeztek. Az autofág gének inaktiválása következtében túlélő idegsejtek funkciójukban tehát épek maradtak.

Az autofágia aktiválásának hatását éheztetéssel, illetve az autofágiát gátló *let-363/TOR2* gén „csendesítésével” vizsgáltam. A TOR az autofágia negatív regulátora, „csendesítése” élesztőben és emlős sejtekben az autofágia aktiválódását eredményezi. A *let-363* RNSi kezelés hatására a *mec-4* modellben megnőtt az elpusztuló neuronok száma (29. ábra). Hasonló mértékű idegsejtpusztulás fokozódást tapasztaltam 24 órás éheztetés követően. A két kezelés idegsejtpusztulásra gyakorolt hatása megegyezett (29. ábra). Az autofágia aktiválása tehát a hiperaktív degenerin indukált sejtpusztulást fokozza.

A Ras jelátvitel befolyásolja a sejtciklust, a szövetek kialakulását, a sejtadhéziót, a sejtmigrációt, az apoptózist, illetve ezeken az alapvető jelenségeken keresztül a szövetek regenerációját és a tumorképződést. Csökkent működése *C. elegans*-ban a vad típusénál kisebb, míg túlműködése nagyobb sejtszám kialakulását eredményezi. Kísérleteimben az

autofág gének kontrolljaként használt sem a *let-60(n2021lf)* (Ras funkcióvesztés mutáció), sem a *let-60(n1046gf)* (Ras funkciónyeréses mutáció) nem változtatta meg a degenerin modellben a pusztuló sejtek számát. A Ras által befolyásolt jelátviteli útvonalak tehát nem vesznek részt a neurodegeneráció genetikai hátterének kialakításában.

A degenerin alapú modelleken túl az autofág gének gátlásának a hatását egy másik neurodegenerációs modellrendszerben is vizsgáltam. A 6-OHDA neurotranszmitter analóg a dopamin transzportert (*C. elegans* ortológja a DAT-1) kifejező idegsejtekben nyúlvány és sejt degenerációt vált ki. Eredményeim azt mutatják, hogy az *unc-51* funkcióvesztéses mutációi és a *bec-1* RNSi kezelés képes részlegesen menekíteni az excitotoxikus hatásnak kitett neuronokat.

Eredményeinkkel elsőként igazoltuk, hogy az autofág gének inaktíválása csökkenti az idegsejtpusztulást a degenerin és a 6-OHDA kiváltotta neurodegenerációs modellekben *C. elegans*-ban. Bizonyítottuk, hogy ezt a csökkenést nem az autofág géneknek a degenerin kifejeződését érintő aspecifikus hatása okozza. Bemutattuk, hogy az autofág gének inaktíválásával nem csak az idegsejtek túlélése, de azok funkcionális állapota is javítható. Vizsgáltam az éhezés és a TOR jelátviteli gátlásának a hatását, bemutattam, hogy ezek az autofágiát aktiváló hatások rontják az idegsejtek túlélését a modellekben. Bemutattam, hogy a Ras jelátviteli útvonal nem vesz részt az excitotoxikus idegsejtpusztulás szabályozásában. Összességében elmondható, hogy az autofág gének hozzájárulnak az excitotoxikus idegsejtpusztuláshoz *C. elegans*-ban.

Kutatásomat megelőzően az autofág gének inaktíválásának a hatását csak fehérjeaggregáción alapuló neurodegeneratív modellekben vizsgálták [53]. Számos humán neurodegeneratív betegségben megfigyelhető, hogy bizonyos fehérjék az extra, vagy intracelluláris térben felhalmozódnak és kicsapódva aggregátumot képeznek. Ezeket a fehérjéket – például huntingtin (Huntington-kór); Tau, amiloid-béta (Alzheimer-kór); α -synuclein (Parkinson-kór) – különböző modellekben kifejeztetve aggregátum képződés, illetve az adott betegségre jellemző sejtes tünetek megjelenése figyelhető meg [131-133]. Az autofágia ezekben a modellekben az aggregáló fehérjetömeg és az általuk károsított sejtalkotók lebontásával a sejtek túlélését segítheti elő [134]. Az autofágia gátlása ezekben a modellekben tehát siettet a sejtek pusztulását, a serkentése pedig a túlélést segíti [18, 19].

Mindkét általam alkalmazott degenerációs modell különbözik az aggregációs modellektől. A degenerin alapú és a 6-OHDA modellekben a degenerációt az excitotoxikus

sokkhoz hasonlóan az idegsejtek sejthártyájában található ionszarnák túlműködése váltja ki. A túlműködésről már korábban kimutatták, hogy specifikus aszpartil és kalpain proteázokat indukálnak, amelyek egy apoptózistól független nekrotikus folyamatban okozzák a sejt pusztulását [40]. Az aszpartil és kalpain proteázok mellett a vakuoláris H⁺-ATP-ázok is szükségesek a folyamat lezajlásához [135]. Utóbbiak a lizozómák működéséhez nélkülözhetetlenek, amelyek az autofág lebontási útvonal részei. Kimutatták, hogy az autofágia aktiválódik az excitotoxikus hatásra bekövetkező pusztulás során [136]. Azonban nem vizsgálták az autofág gének szerepét a sejtpusztulásban mutációs analízissel, vagy riporter konstrukciók segítségével [136-138]. Az irodalmi adatok és saját eredményeim alapján a neurodegeneratív folyamatok két típusában, az aggregálódó fehérjék által kiváltott és az excitotoxikus folyamatban az autofágia szerepe tehát különbözik. Míg az aggregációs modellekben az aggregálódó fehérjetömeg és az általuk károsított sejtalkotók lebontásával az autofágia a sejtek túlélését segíti elő, addig az excitotoxikus sokknak kitett neuronokban az autofágia a sejtek pusztulásához járul hozzá. Eredményeimet megerősíti Samara és mtsai 2007-es cikke [139], amelyben hasonló megfigyelésekről számolnak be.

Az aggregálódó fehérjék által kiváltott és az excitotoxikus neurodegeneráció mechanizmusában közös elemek is találhatóak. Az aggregálódó fehérjék negatív hatásának egyik lehetséges mechanizmusa, hogy az összecsapzódó oligomerek képesek a sejthártya fehérjeihez, például az ionszarnákhoz kötődni és azok működését befolyásolni. Ezáltal az excitotoxikus károsodáshoz hasonló módon túlaktiválódhatnak egyes ionszarnák. Amennyiben ez a hatás mindkét esetben az autofágiát serkenti, úgy az megmagyarázhatja a megfigyelt különbözőséget. Aggregáció esetén az összecsapzódott fehérjetömeg eltakarításával az autofágia segíti, míg excitotoxikus folyamat során az egyébként is stresszelt sejt további forrásait lekötve az autofágia csökkenti a sejtek túlélését. (Az autofágia aktiválódása például fogyasztja a neuronok túlélését elősegítő ionpumpák működéséhez szükséges ATP-t, illetve csökkenti a pufferként is működő citoplazma térfogatát.) Ez egy lehetséges magyarázat arra nézve, hogy az autofágia miért szolgálja a sejtek túlélését az aggregáció által kiváltott neuronpusztulás esetén, és miért nem az excitotoxikus esetekben.

Eredményeim közül nagyon fontosnak tartom kiemelni, hogy az autofág gének inaktiválása nemcsak a neuronok túlélésében, hanem azok funkcióképességének megőrzésében is szerepet játszik. Sok regenerációval, vagy neurodegenerációval

kapcsolatos publikációban ezt a tényezőt egyáltalán nem vizsgálják, pedig humán orvosi vonatkozásban a funkció helyreállítása jelenti a valódi célt.

6.4. Az autofág gének szükségesek a normális a sejtméret kialakításához *C. elegans*ban

Ismert, hogy az inzulin/IGF-1, illetve a TGF- β útvonalak részt vesznek a test és a sejtméret szabályozásában *C. elegans*ban. Az azonban nem ismert, hogy milyen intracelluláris végrehajtó mechanizmusokon keresztül fejtik ki sejtnövekedést szabályozó hatásukat. Az *unc-51/ATG1* és a *bec-1/ATG6* autofág gének funkcióvesztéses mutációi által *C. elegans*ban kialakított kis testméret arra utal, hogy az autofág gének részt vehetnek a sejtméret szabályozásában. Ennek vizsgálatához először azt tanulmányoztam, hogy vajon az autofág mutánsok rövid testhosszát a sejtméret csökkenése okozza-e. Mivel az autofág mutánsok testtérfogata kisebb a vad típusénál, a sejtszámuk pedig nem különbözik, a testhossz rövidülést a sejtméret csökkenés okozza. Ezt igazolják további adataim is, miszerint a tanulmányozott belsejtek mérete kisebb az autofág mutánsokban, mint a vad típusban. Az autofág gének tehát részt vesznek a sejtnövekedés szabályozásában, inaktíválásuk a sejtméret csökkenését okozza.

Ezt követően episztázis analízissel vizsgáltam, hogy az autofág gének milyen kapcsolatban állnak az inzulin/IGF-1 és a TGF- β útvonalba tartozó génekkel. Méréseim szerint a *daf-2(e1370)* inzulin/IGF-1 receptor funkcióvesztéses mutációja, illetve a TGF- β útvonal aktivitását gátló *lon-1* és *lon-2* gének *e185*, illetve *e678* funkcióvesztéses allélja valamint a *dbl-1* TGF- β ligandum túltermeltetése a vad típusnál hosszabb testhosszát eredményez. Az *unc-51* és *bec-1* autofág gének funkcióvesztéses mutációinak rövid testhossz fenotípusa episztatikus mindkét útvonal mutáns komponenseinek fenotípusával szemben (9. táblázat). Az autofág gének tehát a két útvonaltól „downstream” hatnak. Mivel az episztázis nem volt teljes (a kettős mutánsok hossza nem egyezett meg teljesen az egyszeres autofág mutánsok testhosszával), feltételezhető, hogy az inzulin/IGF-1 és TGF- β genetikai útvonalak az autofág génektől különböző, azokkal párhuzamos mechanizmusokon keresztül is szabályozzák a test- és sejtméretet. Már kísérleteim előtt ismert volt, hogy a *bec-1* autofág gén működését az élethossz szabályozással kapcsolatban az inzulin/IGF-1 útvonal szabályozza [111]. A *bec-1* gén és a TGF- β jelátviteli útvonal kölcsönhatását azonban még nem tanulmányozták. A TGF- β jelátviteli útvonal *C. elegans*ban a hím párzószerv megfelelő struktúrájának a kialakításáért is felelős. Az *unc-51* és *bec-1* mutáns hímek párzószerve egyaránt abnormalis (31. ábra). Ez a testhossz-

mérésekből levont következtetéseimet megerősíti, hogy az autofág gének a TGF- β jelátvitellel genetikailag kölcsönhatnak.

Az éhezés során a sejtek saját anyagaikat bontják le a túlélés érdekében: ezért a tápanyagmegvonás negatívan befolyásolja a sejtek méretét. Egér fibroblasztok mérete 10 óra éhezés után 10%-os, míg *Drosophila* sejtek mérete 45 óra éhezés után több mint 50 százalékos csökkenést mutat [24, 140]. *Atg5* deficiens egerek fibroblasztjaiban, ahol az autofágia működése gátolt, Tet-off rendszerrel az autofágia működését indukálhatóvá alakították [140]. Ezáltal szelektíven mérhetővé vált az autofágia hiányának sejt méretváltozásra gyakorolt hatása. *Drosophilán* *Atg1* mutánsokkal hasonló kísérleteket végeztek [24]. Mindkét kutatócsoport arra a következtetésre jutott, hogy az autofágia felnőttkori gátlása jól táplált felnőtt állatokban nem okoz komolyabb tüneteket, éhezést követően azonban nem következik be a sejt méret csökkenése. Az *Atg5* és az *Atg7* autofág gének konstitutív funkcióvesztéses mutációi egérben testméret csökkenést okoznak [18, 19].

Drosophilában, egérben és - az eredményeim alapján - *C. elegans*ban az autofág gének szabályozzák a sejt méretet [18, 19, 24, 140]. Amennyiben az egyedfejlődés során gátolt az autofágia működése, az kifejlett állatokban kis sejt méret kialakulásához vezet. Az autofágia az inzulin/IGF-1 és TGF- β genetikai útvonalakkal kölcsönhatásban befolyásolja a sejt méretet. Összességében kijelenthető, hogy az autofágia működése szükséges a normális sejt méret kialakításához, azonban a szabályozás részleteinek megértése további kutatást igényel.

6.5. Az autofág gének befolyásolják az öregedési folyamatot

Az élet során a sejt károsodások folyamatosan halmozódnak, mennyiségük növekedése kíséri az öregedési folyamatot. A sérült sejtalkotók eltávolításában az autofágiának kitüntetett szerepe van, a nagyméretű, membránnal határolt sejt szervecskéket pedig csak az autofágia képes eltávolítani. Ezért feltételezhető volt, hogy az autofág gének inaktiválása befolyásolja az öregedési folyamatot. Valóban, 2003-ban Meléndez és munkatársai kimutatták, hogy a *daf-2* gén funkcióvesztéses mutációja által okozott élethossz növekedéshez szükséges a *bec-1* autofág gén működése [111]. Az inzulin/IGF-1 jelátvitel tehát a *bec-1* autofág génen keresztül (is) szabályozza az élethosszat. 2007-ben Hars és munkatársai kimutatták, hogy a *C. elegans atg-7* és az *atg-12* autofág gének nélkülözhetetlenek a normál élethossz kialakításához vad típusú genetikai háttérben, valamint a megnyúlt élethossz kialakulásához *daf-2* mutáns állatokban [112]. Az autofág

gének tehát az inzulin/IGF-1 jelátviteltől függetlenül, önmagukban is befolyásolják az élethosszat. Ezt kísérleteinkkel mi is igazoltuk. Ezen kívül először mutattuk ki, hogy a *bec-1*, *unc-51* és az *atg-18* autofág gének funkcióvesztéses mutációi rövidítik az állat élettartamát (32. ábra).

Az öregedés komplex folyamat, amelynek időbeli alakulása sok paraméterrel jellemezhető. Az öregedés során öregedési pigment halmozódik fel, az izmok degenerálódnak, a testméret csökken, a fehérjék karbonilálódnak és számos enzim aktivitása csökken. Vizsgáltam vajon az autofág gének inaktiválása befolyásolja-e az öregedési pigment felhalmozódását és az izomdegeneráció megjelenését. Fluorimetriás mérésekkel kimutattam, hogy az *unc-51* és a *bec-1* autofág mutáns állatok a vad típusnál hamarabb, már a felnőttkor 10. napján elérték a késői időskorra jellemző 0,25 körüli AGE pigment – TRP arányt. A *bec-1(ok691);Ex[bec-1(+)]* genetikai mozaikok és az *atg-18(gk378)* mutáns állatok a vad típusnál legalább 2 nappal hamarabb kezdtek mozgásképtelenné válni. A mozgásképtelenség a korfüggő izomdegeneráció hatására lép fel [99]. Az élethossz, az öregedési pigment felhalmozódás és az izomdegeneráció vizsgálata során kapott adatok együttesen arra utalnak, hogy az autofág gének inaktiválása az élettartam rövidülését az öregedési folyamat felgyorsításával okozza.

Csikós György és Sass Miklós *Drosophila melanogaster*-ben vizsgálták az autofág gének élettartamot befolyásoló hatását. Az *Atg3* gén az élesztő *Atg3* autofág gén ortológia, szükséges a makroautofágia normális működéséhez [141]. Az *SNF4* gén a *Drosophila* AMPK egyik alegységének ortológia, amely éhezés során a TOR gátlásával aktiválja az autofágiát [142, 143]. Az éhezés és egyéb intracelluláris AMP szintet növelő folyamatok az *SNF4* funkcióvesztéses mutánsokban tehát nem képesek az autofágia serkentésére. Eredményeink szerint az *Atg3(RNSi)* és az *SNF4(RNSi)* állatok élethossza is rövidebb volt a vad típusénál.

Az *Atg7* funkcióvesztéses autofág mutáns egerek átlagos élethossza mindössze 6 hét, míg a kontroll törzs példányai több mint egy évig élnek [18]. Az autofág gének inaktiválása *Drosophila melanogaster*-ben egérben és eredményeink szerint *Caenorhabditis elegans*-ban az élettartam rövidülését okozza. Ebből következően az autofág géneknek az élettartam szabályozásában betöltött szerepe evolúciósan konzervált nem fajspecifikus, feltételezhető, hogy számos eukarióta taxonban általános jelenség.

C. elegans-ban már majdnem 300 élettartamot szabályozó gént írtak le [95, 144]. Ezen gének egy része evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalakba tartozik. A különböző élethosszt szabályozó („longevity”) útvonalak kapcsolata nem ismert, így az öregedést

szabályozó genetikai hálózat felépítése még kérdéses. A továbbiakban az élettartam komplex szabályozásának jobb megértése céljából az autofág gének kölcsönhatását tanulmányoztam az inzulin/IGF és TOR jelátviteli útvonalakhoz tartozó, illetve a mitokondriális működést és a kalória felvételt befolyásoló génekkel.

A *bec-1*, az *atg-7* és az *atg-12* génekkel kapcsolatban már leírták, hogy RNS interferenciával történő inaktiválásuk részlegesen gátolja a *daf-2* funkcióvesztéses mutáns állatok megnyúlt élethosszát [111, 112]. Az autofág géneket tehát az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal gátolja [145]. Vizsgálataim során deléciós genetikai null mutáns alléleket használtam. Ennek ellenére egyik vizsgált autofág gén mutációja sem szuppresszája teljes mértékben a *daf-2(e1370)* mutáns férgek hosszú élettartamát (37. ábra). Ez megerősíti azokat a korábbi következtetéseket miszerint az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal több párhuzamosan működő mechanizmuson keresztül fejt ki hatását az öregedési folyamatra.

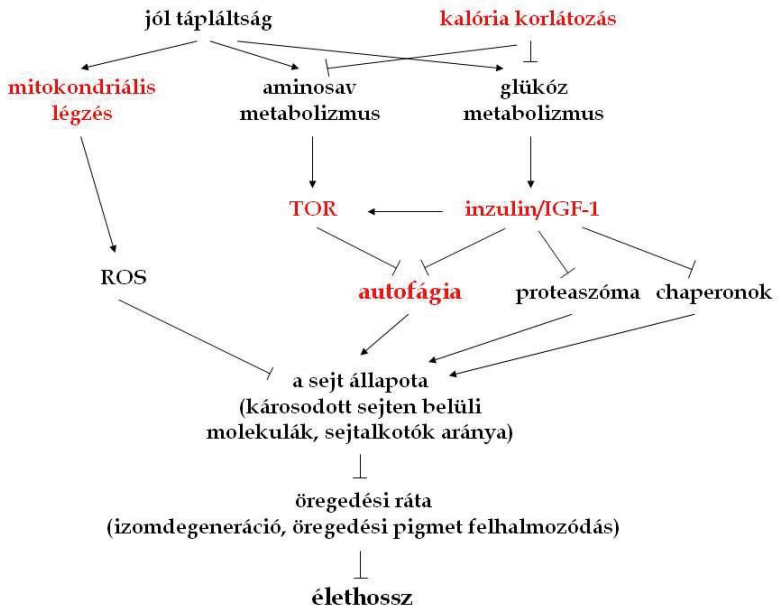
A TOR jelátviteli rendszer gátlása *C. elegans*ban, *Drosophilában* és élesztőben az élettartamot megkettőzi [23, 102, 103]. A *bec-1*, *unc-51* és *atg-18* autofág gének funkcióvesztéses mutációi ezt a fenotípust teljesen szuppresszálták (38. ábra). A TOR jelátvitel az élethosszot tehát az autofág géneken keresztül szabályozza.

Mérésem alapján a mitokondriális ATP szintázt inaktiválva, harmadával nő meg a *C. elegans* átlagos élettartama. Ezt az élethossz növekedést a *bec-1*, *unc-51*, *atg-18* autofág gének funkcióvesztéses mutációi szuppresszálták. Az *atp-3* inaktiválása tehát csak megfelelően működő autofág gének mellett okoz élettartam növekedést.

Sigmond Tímea kolléganóm az *eat-2* gén és az autofág gének kölcsönhatását is vizsgálta. Az *eat-2* gén a *C. elegans* acetilkolin receptorának egyik alegységét kódolja, amelynek funkcióvesztéses mutációja a garatizmok működésének zavarával jár [146]. Az emiatt táplálkozni alig képes állatok a kalória korlátozás tüneteit mutatják. A kalória korlátozás jelentősen megnöveli az élethosszat minden eddig tanulmányozott metazoóban [104-108]. Az autofág gének gátlása kolléganóm megfigyelése szerint szuppresszáta ezt a fenotípust. A TOR jelátvitelhez hasonlóan a kalória korlátozás élettartam befolyásoló hatásához is szükséges az autofág gének normális működése. Mivel a kalória korlátozás a TOR aktivitás csökkenésével jár [147-149] az *eat-2(ad1116)* mutáció tanulmányozásával nyert adatok a TOR jelátvitel vizsgálata során kapott eredményeimet támasztják alá.

Dolgozatomban kimutattam, hogy az autofág gének inaktiválása rövidíti a *C. elegans* élettartamát. *Drosophilán* és egéren végzett vizsgálatok eredménye [18], valamint saját eredményeink alapján feltételezhető, hogy az autofág gének más fajokban is befolyásolják az élethosszat. Az időskori izomsorvadás és az öregedési pigment felhalmozódás vizsgálatával kimutattuk, hogy az autofág gének inaktiválása *Caenorhabditis elegans* fonalféregben az öregedési folyamatot gyorsítja fel. Ezzel közelebb kerülhetünk az öregedés genetikai hátterének megértéséhez. Ezt támaszthatja alá, hogy egérben az *Atg5* és *Atg7* autofág gének inaktiválásának vizsgálatok kimutatták, hogy már fiatal korban a Parkinson és az Alzheimer-kórhoz hasonló progresszív neuronpusztulás következik be [18, 19]. Ez emlősökben az idős egyedekre jellemző. A jelenség úgy is felfogható, hogy az autofág gének funkcióvesztéses mutációi egérben is egyfajta felgyorsult öregedést (progeria) okoztak. További vizsgálataim során kimutattam, hogy az autofág gének az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonaltól „downstream”, más mechanizmusokkal párhuzamosan fejtik ki élethossz befolyásoló hatásukat. Ilyen mechanizmus lehet például a proteaszómális fehérjelebontás [150], amelynek feladata részben átfed az autofágiáéval, vagy a chaperone rendszer. Eredményeim alapján a TOR jelátviteli útvonal, a kalória korlátozás és a mitokondriális működés az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonallal ellentétben csak az autofág folyamaton keresztül fejt ki élethossz befolyásoló hatását, ezen útvonalak közös „downstream” effektora tehát az autofágia.

Hogyan lehetséges, hogy az autofágia ennyi különböző élethossz szabályozó mechanizmus hatásait közvetítse? Az inzulin/IGF-1 és TOR jelátviteli útvonalak aktivitását alapvetően a táplálék mennyisége határozza meg, az anyagcsere folyamatok befolyásolásán keresztül. Az inzulin/IGF-1 és TOR jelátviteli útvonalak számos a citoplazma „karbantartását” végző mechanizmus működését szabályozzák. Ilyen folyamatok például az autofágia, a proteasóma és a chaperonok. Ezek a karbantartó mechanizmusok távolítják el az energiatermelő folyamat (mitokondriális légzés) során keletkezett ROS által károsított sejtalkotókat. A károsító hatások és a karbantartó mechanizmusok egyensúlya határozza meg a sejt állapotát (hiba arány). Amennyiben a sejtek állapota gyorsan romlik, az öregedési folyamat felgyorsul, ha nem, vagy csak lassan romlik akkor az öregedési folyamat is lassú. Mivel az élethosszt az öregedési folyamat sebessége határozza meg az élethossz szabályozó „longevity” útvonalak hatásukat az autofágián és az ezzel párhuzamosan működő karbantartó mechanizmusokon keresztül fejtik ki.



40. ábra Az autofágia az öregedést befolyásoló jelátviteli útvonalak központi mechanizmusa. A táplálék mennyisége az anyagcsere-folyamatok befolyásolásán keresztül meghatározza az élethosszt szabályozó inzulin/IGF-1 és TOR jelátviteli útvonalak aktivitását. Az inzulin/IGF-1 és TOR jelátviteli útvonalak szabályozzák a citoplazma „karbantartását” végző mechanizmusok működését. Az autofágia, a proteaszóma és a chaperonok távolítják el az energiatermelő folyamat (mitokondriális légzés) során keletkezett ROS által károsított sejtalkotókat. A károsító hatások és a karbantartó mechanizmusok egyensúlya határozza meg a sejt állapotát (hiba arány). Amennyiben a sejtek állapota gyorsan romlik, az öregedési folyamat felgyorsul, ha nem, vagy csak lassan romlik akkor az öregedési folyamat is lassú. Az öregedési folyamat sebessége határozza meg az adott élőlény élethosszát.

7. Összefoglalás

Az autofágia az eukarióta sejtek mennyiségileg legfontosabb lebontó mechanizmusa. Az autofágia szabályozott működése nélkülözhetetlen a szervezet működőképességének fenntartásához, zavara emlősökben kontrollálatlan sejtosztódás (rák), neurodegeneratív elváltozások, szív és érrendszeri betegségek kialakulásához, valamint sejten belüli paraziták megjelenéséhez vezethet. Dolgozatomban az autofág géneknek az excitotoxikus neurodegeneratív folyamatokban, a sejtméret és az öregedési folyamat szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltam. Kísérleteimhez a *Caenorhabditis elegans* genetikai modellrendszert használtam.

Neurodegeneratív modellként hiperaktív degenerin mutáns *C. elegans* törzseket és a 6-hidroxi-dopamin neurotoxin által kiváltott sejtpusztulást vizsgáltam. A degenerin fehérjék neuronokban fejeződnek ki. Funkciónyeréses mutációik a neuronok sejtthártyájában található ioncsatornák túlműködését és ezzel a neuronok pusztulását okozzák. A 6-hidroxi-dopamin a dopaminerg neuronokat károsítja. A vizsgált autofág gének inaktiválása mindkét modellben csökkentette a degenerálódó sejtek számát. Az autofágia (vagy autofág gének) tehát az excitotoxikus hatásnak kitett neuronok pusztulásához szükséges.

Kimutattam, hogy az autofág gének funkcióvesztéses mutációi megrövidült testhosszat eredményeznek, de nem változtatják meg a sejtek számát és a test átmérőjét. Az állatok testhosszának rövidülése tehát a sejtek méretének csökkenése miatt következik be. Ezt igazoltam egyedi sejtek méretének vizsgálatával is. Az autofág gének működése a sejt és testméretet meghatározásában az episztázis analízis alapján az inzulin/IGF-1 és a TGF- β genetikai útvonal is szabályozza.

Az aktív öregkor eléréséhez érdemes megismernünk azokat a genetikailag meghatározott folyamatokat, amelyek szerepet játszanak az öregedési folyamatban. Bemutattam, hogy az autofág gének inaktiválása az élettartamot rövidíti, az öregedési folyamatot felgyorsítja. Számos öregedési folyamatot befolyásoló mechanizmus, mint pl. a kalória korlátozás, a mitokondriális légzés, az inzulin/IGF-1 és TOR jelátvitel az autofágián keresztül fejt ki élethossz befolyásoló hatását.

Eredményeimmel igazoltam, hogy az autofág gének a neurodegeneratív folyamatok, a sejtméret és az öregedés szabályozásában is fontos szerepet töltenek be. Az autofág gének működésének megismerésével munkám számos emberi betegség hátterének jobb megértését segítheti elő.

8. Summary

Autophagy is the major catabolic process of eukaryotic cells. The molecular characterisation of autophagy is far from complete and its role has not been examined from many physiological and pathological aspects. I have used the genetic model organism *Caenorhabditis elegans* to study role of autophagy genes in excitotoxic-like necrotic cell death, cell growth and aging.

Gain-of-function mutations in genes of the degenerin gene family and exposure to the neurotoxin 6-hydroxydopamine lead to degeneration of a subset of neurons in *C. elegans*. Excitotoxic-like neuronal demise caused by ion channel hyperactivity is accompanied by the formation of cytoplasmic vacuoles and intense degradation of cytoplasmic contents. These findings suggest a role for autophagy in the process of excitotoxic-like neurodegeneration. Here I show that function of three autophagy genes contribute to excitotoxic-like neurotoxicity in *C. elegans*.

I also demonstrate that loss-of-function mutations in autophagy genes *unc-51* and *bec-1* reduce body length and body volume in *C. elegans*. Neither mutations affect cell number, therefore reduction in body size may be due to reduced cell size. I confirmed these results by measuring individual cell size in mutant animals. The insulin/IGF-1 and TGF- β signaling pathways are major regulators of cell growth. I present genetic evidence that autophagy genes affect cell size via acting downstream of both Insulin/IGF-1 and TGF- β signaling. Hence autophagy might act as a central regulatory mechanism of cell growth.

Aging is a multifactorial process influenced by diverse signaling (longevity) pathways, biochemical events and environmental factors. I show that inactivation of autophagy genes, which are involved in the degradation of damaged cytoplasmic constituents that accumulate during aging significantly reduces lifespan and accelerates the rate at which the tissue age in *C. elegans*. I also demonstrate that autophagy genes suppress lifespan extension in mutant nematodes with inherent dietary restriction, aberrant insulin/IGF-1 or TOR signaling, and reduced mitochondrial respiration. Together these findings imply that autophagy may act as a central regulatory mechanism of animal aging: It appears as a common effector mechanism of conserved signaling pathways to regulate cell growth and the aging process.

9. Felhasznált irodalom

1. Clark, S.L., Jr.; *Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope*. J Biophys Biochem Cytol, 1957. **3**(3): p. 349-62.
2. Klionsky, D.J.; *Autophagy*. Molecular biology intelligence unit. 2004, Georgetown, Tex.
3. Klionsky, D.J.; *The molecular machinery of autophagy: unanswered questions*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 7-18.
4. Legakis, J.E., Yen, W.L., and Klionsky, D.J.; *A cycling protein complex required for selective autophagy*. Autophagy, 2007. **3**(5): p. 422-32.
5. Kovacs, A.L., Palfia, Z., Rez, G., Vellai, T., and Kovacs, J.; *Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 655-62.
6. Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A., and Stenmark, H.; *Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway*. Dev Cell, 2004. **7**(2): p. 179-92.
7. Kent, G., Minick, O.T., Volini, F.I., and Orfei, E.; *Autophagic vacuoles in human red cells*. Am J Pathol, 1966. **48**(5): p. 831-57.
8. Fader, C.M. and Colombo, M.I.; *Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation*. Autophagy, 2006. **2**(2): p. 122-5.
9. Strawbridge, A.B. and Blum, J.S.; *Autophagy in MHC class II antigen processing*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(1): p. 87-92.
10. Schmid, D. and Munz, C.; *Localization and MHC class II presentation of antigens targeted for macroautophagy*. Methods Mol Biol, 2008. **445**: p. 213-25.
11. Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A.; *Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells*. Science, 2007. **315**(5817): p. 1398-401.
12. Biswas, D., Qureshi, O.S., Lee, W.Y., Croudace, J.E., Mura, M., and Lammas, D.A.; *ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 35.
13. Schworer, C.M., Shiffer, K.A., and Mortimore, G.E.; *Quantitative relationship between autophagy and proteolysis during graded amino acid deprivation in perfused rat liver*. J Biol Chem, 1981. **256**(14): p. 7652-8.
14. Seglen, P.O. and Gordon, P.B.; *3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1889-92.

15. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T.; *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.
16. Fuertes, G., Martin De Llano, J.J., Villarroya, A., Rivett, A.J., and Knecht, E.; *Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 1): p. 75-86.
17. Tsukada, M. and Ohsumi, Y.; *Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1993. **333**(1-2): p. 169-74.
18. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K.; *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 880-4.
19. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N.; *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
20. Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., and Schulte-Hermann, R.; *Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?*; Ann N Y Acad Sci, 2000. **926**: p. 1-12.
21. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S.; *Another way to die: autophagic programmed cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1528-34.
22. Berry, D.L. and Baehrecke, E.H.; *Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1137-48.
23. Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., and Muller, F.; *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 620.
24. Scott, R.C., Juhasz, G., and Neufeld, T.P.; *Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death*. Curr Biol, 2007. **17**(1): p. 1-11.
25. Sulston, J.E. and Horvitz, H.R.; *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 110-56.
26. Riddle, D.L., *C. elegans II*. Cold Spring Harbor monograph series, 1997, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. xvii, 1222 p.
27. Ramón y Cajal, S., *Degeneration & regeneration of the nervous system*. 1959, New York.; Hafner Pub. Co. 2 v. (xx, 769 p.).

28. Selkoe, D.J.; *Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1375-81.
29. Deutch, A.Y.; *Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 67-70.
30. Esposito, E., Di Matteo, V., and Di Giovanni, G.; *Death in the substantia nigra: a motor tragedy*. Expert Rev Neurother, 2007. **7**(6): p. 677-97.
31. Liu, D., Xu, G.Y., Pan, E., and McAdoo, D.J.; *Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury*. Neuroscience, 1999. **93**(4): p. 1383-9.
32. Mattson, M.P.; *Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders*. Neuromolecular Med, 2003. **3**(2): p. 65-94.
33. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E.; *Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions*. Cell, 1998. **95**(1): p. 55-66.
34. Kuemmerle, S., Gutekunst, C.A., Klein, A.M., Li, X.J., Li, S.H., Beal, M.F., Hersch, S.M., and Ferrante, R.J.; *Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease*. Ann Neurol, 1999. **46**(6): p. 842-9.
35. Taylor, J.P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C.M., Taye, A., Markovic-Plese, S., and Fischbeck, K.H.; *Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(7): p. 749-57.
36. Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S.; *Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 805-10.
37. Tanaka, M., Kim, Y.M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., and Mouradian, M.M.; *Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4625-31.
38. Di Filippo, M., Tozzi, A., Costa, C., Belcastro, V., Tantucci, M., Picconi, B., and Calabresi, P.; *Plasticity and repair in the post-ischemic brain*. Neuropharmacology, 2008. **55**(3): p. 353-62.
39. Hossain, M.A.; *Hypoxic-ischemic injury in neonatal brain: involvement of a novel neuronal molecule in neuronal cell death and potential target for neuroprotection*. Int J Dev Neurosci, 2008. **26**(1): p. 93-101.
40. Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., and Tavernarakis, N.; *Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in C. elegans*. Nature, 2002. **419**(6910): p. 939-44.

41. Olney, J.W., Wozniak, D.F., and Farber, N.B.; *Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. New hypothesis and new therapeutic strategies.* Arch Neurol, 1997. **54**(10): p. 1234-40.
42. Mitchell, J.D. and Borasio, G.D.; *Amyotrophic lateral sclerosis.* Lancet, 2007. **369**(9578): p. 2031-41.
43. Hazell, A.S.; *Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies.* Neurochem Int, 2007. **50**(7-8): p. 941-53.
44. Gil, J.M. and Rego, A.C.; *Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease.* Eur J Neurosci, 2008. **27**(11): p. 2803-20.
45. Beal, M.F.; *Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis.* Ann Neurol, 1998. **44**(3 Suppl 1): p. S110-4.
46. Dodd, P.R.; *Excited to death: different ways to lose your neurones.* Biogerontology, 2002. **3**(1-2): p. 51-6.
47. Yi, J.H. and Hazell, A.S.; *Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury.* Neurochem Int, 2006. **48**(5): p. 394-403.
48. Newman, M., Musgrave, I.F., and Lardelli, M.; *Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(3): p. 285-97.
49. Link, C.D.; *C. elegans models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease.* Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 1007-13.
50. Rockenstein, E., Crews, L., and Masliah, E.; *Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development.* Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(11): p. 1093-102.
51. Gotz, J., Deters, N., Doldissen, A., Bokhari, L., Ke, Y., Wiesner, A., Schonrock, N., and Ittner, L.M.; *A decade of tau transgenic animal models and beyond.* Brain Pathol, 2007. **17**(1): p. 91-103.
52. Kristensen, B.W., Norberg, J., and Zimmer, J.; *Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures.* Brain Res, 2001. **917**(1): p. 21-44.
53. Driscoll, M. and Gerstbrein, B.; *Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration.* Nat Rev Genet, 2003. **4**(3): p. 181-94.
54. Bianchi, L., Gerstbrein, B., Frokjaer-Jensen, C., Royal, D.C., Mukherjee, G., Royal, M.A., Xue, J., Schafer, W.R., and Driscoll, M.; *The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation.* Nat Neurosci, 2004. **7**(12): p. 1337-44.

55. Treinin, M. and Chalfie, M.; *A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in C. elegans*. *Neuron*, 1995. **14**(4): p. 871-7.
56. Chalfie, M. and Sulston, J.; *Developmental genetics of the mechanosensory neurons of Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 1981. **82**(2): p. 358-70.
57. Driscoll, M. and Tavernarakis, N.; *Closing in on a mammalian touch receptor*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(12): p. 1232-4.
58. Chalfie, M. and Wolinsky, E.; *The identification and suppression of inherited neurodegeneration in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1990. **345**(6274): p. 410-6.
59. Goodman, M.B., Ernstrom, G.G., Chelur, D.S., O'Hagan, R., Yao, C.A., and Chalfie, M.; *MEC-2 regulates C. elegans DEG/ENaC channels needed for mechanosensation*. *Nature*, 2002. **415**(6875): p. 1039-42.
60. Ellis, H.M. and Horvitz, H.R.; *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. *Cell*, 1986. **44**(6): p. 817-29.
61. Hall, D.H., Gu, G., Garcia-Anoveros, J., Gong, L., Chalfie, M., and Driscoll, M.; *Neuropathology of degenerative cell death in Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 1997. **17**(3): p. 1033-45.
62. Hafen, E. and Stocker, H.; *How are the sizes of cells, organs, and bodies controlled?*; *PLoS Biol*, 2003. **1**(3): p. E86.
63. Stanger, B.Z.; *Organ size determination and the limits of regulation*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(3): p. 318-24.
64. Lang, F.; *Mechanisms and significance of cell volume regulation*. *J Am Coll Nutr*, 2007. **26**(5 Suppl): p. 613S-623S.
65. Brodsky, W.Y. and Uryvaeva, I.V.; *Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function*. *Int Rev Cytol*, 1977. **50**: p. 275-332.
66. Azevedo, R.B., French, V., and Partridge, L.; *Temperature modulates epidermal cell size in Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 2002. **48**(2): p. 231-237.
67. Mukhopadhyay, A., Oh, S.W., and Tissenbaum, H.A.; *Worming pathways to and from DAF-16/FOXO*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(10): p. 928-34.
68. Rechler, M.M.; *Insulin-like growth factors: polypeptides with diverse physiological roles*. *Mead Johnson Symp Perinat Dev Med*, 1988(32): p. 12-20.
69. Pollak, M.N., Schernhammer, E.S., and Hankinson, S.E.; *Insulin-like growth factors and neoplasia*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(7): p. 505-18.
70. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R.; *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. *Nature*, 1993. **366**(6454): p. 461-4.
71. Sutter, N.B., Bustamante, C.D., Chase, K., Gray, M.M., Zhao, K., Zhu, L., Padhukasahasram, B., Karlins, E., Davis, S., Jones, P.G., Quignon, P., Johnson,

- G.S., Parker, H.G., Fretwell, N., Mosher, D.S., Lawler, D.F., Satyaraj, E., Nordborg, M., Lark, K.G., Wayne, R.K., and Ostrander, E.A.; *A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs*. Science, 2007. **316**(5821): p. 112-5.
72. Goberdhan, D.C. and Wilson, C.; *The functions of insulin signaling: size isn't everything, even in Drosophila*. Differentiation, 2003. **71**(7): p. 375-97.
 73. Patterson, G.I.; *Aging: new targets, new functions*. Curr Biol, 2003. **13**(7): p. R279-81.
 74. Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C., and Ruvkun, G.; *DAF-16 target genes that control C. elegans life-span and metabolism*. Science, 2003. **300**(5619): p. 644-7.
 75. Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., and Kenyon, C.; *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 277-83.
 76. Kawano, T., Ito, Y., Ishiguro, M., Takuwa, K., Nakajima, T., and Kimura, Y.; *Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode Caenorhabditis elegans*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(2): p. 431-6.
 77. Murphy, L.J.; *The role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in glucose homeostasis*. Exp Diabesity Res, 2003. **4**(4): p. 213-24.
 78. Vanfleteren, J.R. and Braeckman, B.P.; *Mechanisms of life span determination in Caenorhabditis elegans*. Neurobiol Aging, 1999. **20**(5): p. 487-502.
 79. Ogg, S. and Ruvkun, G.; *The C. elegans PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 887-93.
 80. Joeng, K.S., Song, E.J., Lee, K.J., and Lee, J.; *Long lifespan in worms with long telomeric DNA*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 607-11.
 81. Barnard, J.A., Bascom, C.C., Lyons, R.M., Sipes, N.J., and Moses, H.L.; *Transforming growth factor beta in the control of epidermal proliferation*. Am J Med Sci, 1988. **296**(3): p. 159-63.
 82. Cayuso, J. and Marti, E.; *Morphogens in motion: growth control of the neural tube*. J Neurobiol, 2005. **64**(4): p. 376-87.
 83. Loveland, K.L. and Hime, G.; *TGFbeta superfamily members in spermatogenesis: setting the stage for fertility in mouse and Drosophila*. Cell Tissue Res, 2005. **322**(1): p. 141-6.
 84. Tewari, M., Hu, P.J., Ahn, J.S., Ayivi-Guedehoussou, N., Vidalain, P.O., Li, S., Milstein, S., Armstrong, C.M., Boxem, M., Butler, M.D., Busiguina, S., Rual, J.F., Ibarrola, N., Chaklos, S.T., Bertin, N., Vaglio, P., Edgley, M.L., King, K.V., Albert, P.S., Vandenhaute, J., Pandey, A., Riddle, D.L., Ruvkun, G., and Vidal, M.; *Systematic interactome mapping and genetic perturbation analysis of a C. elegans TGF-beta signaling network*. Mol Cell, 2004. **13**(4): p. 469-82.

85. Savage-Dunn, C., Maduzia, L.L., Zimmerman, C.M., Roberts, A.F., Cohen, S., Tokarz, R., and Padgett, R.W.; *Genetic screen for small body size mutants in C. elegans reveals many TGFbeta pathway components*. *Genesis*, 2003. **35**(4): p. 239-47.
86. Chow, K.L., Hall, D.H., and Emmons, S.W.; *The mab-21 gene of Caenorhabditis elegans encodes a novel protein required for choice of alternate cell fates*. *Development*, 1995. **121**(11): p. 3615-26.
87. Kirkwood, T.B. and Kowald, A.; *Network theory of aging*. *Exp Gerontol*, 1997. **32**(4-5): p. 395-9.
88. Medawar, P.B. *An unsolved problem of biology*. 1952, London,: Published for the college by H. K. Lewis. 24 p.
89. Williams, G.C.; *Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence.*; *Evolution*, 1957. **11**: p. 398-411.
90. Kirkwood, T.B.; *Evolution of ageing*. *Nature*, 1977. **270**(5635): p. 301-4.
91. Vina, J., Borrás, C., and Miquel, J.; *Theories of ageing*. *IUBMB Life*, 2007. **59**(4-5): p. 249-54.
92. Harman, D.; *Free radicals in aging*. *Mol Cell Biochem*, 1988. **84**(2): p. 155-61.
93. McCann, S.M., Licinio, J., Wong, M.L., Yu, W.H., Karanth, S., and Rettorri, V.; *The nitric oxide hypothesis of aging*. *Exp Gerontol*, 1998. **33**(7-8): p. 813-26.
94. Mandavilli, B.S., Santos, J.H., and Van Houten, B.; *Mitochondrial DNA repair and aging*. *Mutat Res*, 2002. **509**(1-2): p. 127-51.
95. Guarente, L., Partridge, L., and Wallace, D.C., *Molecular biology of aging*. 2008, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.
96. Holzenberger, M., Kappeler, L., and De Magalhaes Filho, C.; *IGF-1 signaling and aging*. *Exp Gerontol*, 2004. **39**(11-12): p. 1761-4.
97. Piper, M.D., Selman, C., McElwee, J.J., and Partridge, L.; *Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice?*; *J Intern Med*, 2008. **263**(2): p. 179-91.
98. Tissenbaum, H.A. and Guarente, L.; *Model organisms as a guide to mammalian aging*. *Dev Cell*, 2002. **2**(1): p. 9-19.
99. Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M., Brown, P.A., Listner, K.M., Sakano, Y., Paupard, M.C., Hall, D.H., and Driscoll, M.; *Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing C. elegans*. *Nature*, 2002. **419**(6909): p. 808-14.
100. Gerstbrein, B., Stamatias, G., Kollias, N., and Driscoll, M.; *In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 2005. **4**(3): p. 127-37.

101. Meijer, A.J. and Codogno, P.; *AMP-activated protein kinase and autophagy*. *Autophagy*, 2007. **3**(3): p. 238-40.
102. Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., and Benzer, S.; *Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway*. *Curr Biol*, 2004. **14**(10): p. 885-90.
103. Kaeberlein, M., Powers, R.W., 3rd, Steffen, K.K., Westman, E.A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E.O., Kirkland, K.T., Fields, S., and Kennedy, B.K.; *Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients*. *Science*, 2005. **310**(5751): p. 1193-6.
104. McCay, C.M., Crowell, M.F., and Maynard, L.A.; *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size*. 1935. *Nutrition*, 1989. **5**(3): p. 155-71; discussion 172.
105. Weindruch, R. and Walford, R.L., *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. 1988, Springfield, Ill., U.S.A.: C.C. Thomas. xvii, 436 p.
106. Lee, K.P., Simpson, S.J., Clissold, F.J., Brooks, R., Ballard, J.W., Taylor, P.W., Soran, N., and Raubenheimer, D.; *Lifespan and reproduction in Drosophila: New insights from nutritional geometry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(7): p. 2498-503.
107. Bishop, N.A. and Guarente, L.; *Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in C. elegans*. *Nature*, 2007. **447**(7144): p. 545-9.
108. Ramsey, J.J., Colman, R.J., Binkley, N.C., Christensen, J.D., Gresl, T.A., Kemnitz, J.W., and Weindruch, R.; *Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study*. *Exp Gerontol*, 2000. **35**(9-10): p. 1131-49.
109. Panowski, S.H., Wolff, S., Aguilaniu, H., Durieux, J., and Dillin, A.; *PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of C. elegans*. *Nature*, 2007. **447**(7144): p. 550-5.
110. Rea, S.L., Ventura, N., and Johnson, T.E.; *Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(10): p. e259.
111. Melendez, A., Talloczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., and Levine, B.; *Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans*. *Science*, 2003. **301**(5638): p. 1387-91.
112. Hars, E.S., Qi, H., Ryazanov, A.G., Jin, S., Cai, L., Hu, C., and Liu, L.F.; *Autophagy regulates ageing in C. elegans*. *Autophagy*, 2007. **3**(2): p. 93-5.
113. Collins, J.J., Huang, C., Hughes, S., and Kornfeld, K.; *The measurement and analysis of age-related changes in Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 2008: p. 1-21.

114. Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P.S., and Curtis, R.; *The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3004-9.
115. Stocchi, V., Cucchiari, L., Magnani, M., Chiarantini, L., Palma, P., and Crescentini, G.; *Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells*. *Anal Biochem*, 1985. **146**(1): p. 118-24.
116. Lithgow, G.J., White, T.M., Hinerfeld, D.A., and Johnson, T.E.; *Thermotolerance of a long-lived mutant of Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol*, 1994. **49**(6): p. B270-6.
117. Duhon, S.A., Murakami, S., and Johnson, T.E.; *Direct isolation of longevity mutants in the nematode Caenorhabditis elegans*. *Dev Genet*, 1996. **18**(2): p. 144-53.
118. Wu, D., Rea, S.L., Yashin, A.I., and Johnson, T.E.; *Visualizing hidden heterogeneity in isogenic populations of C. elegans*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(3): p. 261-70.
119. Jia, K. and Levine, B.; *Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in C. elegans*. *Autophagy*, 2007. **3**(6): p. 597-9.
120. Takacs-Vellai, K., Vellai, T., Puoti, A., Passannante, M., Wicky, C., Streit, A., Kovacs, A.L., and Muller, F.; *Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in C. elegans*. *Curr Biol*, 2005. **15**(16): p. 1513-7.
121. Yan, J., Kuroyanagi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tokumitsu, H., Tomoda, T., Shirasawa, T., and Muramatsu, M.; *Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to C. elegans UNC-51*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **246**(1): p. 222-7.
122. Ogura, K. and Goshima, Y.; *The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the Netrin receptor UNC-5 in Caenorhabditis elegans*. *Development*, 2006. **133**(17): p. 3441-50.
123. Ogura, K., Wicky, C., Magnenat, L., Tobler, H., Mori, I., Muller, F., and Ohshima, Y.; *Caenorhabditis elegans unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase*. *Genes Dev*, 1994. **8**(20): p. 2389-400.
124. Brenner, S.; *The genetics of Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974. **77**(1): p. 71-94.
125. Timmons, L. and Fire, A.; *Specific interference by ingested dsRNA*. *Nature*, 1998. **395**(6705): p. 854.
126. Timmons, L., Court, D.L., and Fire, A.; *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.

127. Dupuy, D., Bertin, N., Hidalgo, C.A., Venkatesan, K., Tu, D., Lee, D., Rosenberg, J., Svrzikapa, N., Blanc, A., Carnec, A., Carvunis, A.R., Pulak, R., Shingles, J., Reece-Hoyes, J., Hunt-Newbury, R., Viveiros, R., Mohler, W.A., Tasan, M., Roth, F.P., Le Peuch, C., Hope, I.A., Johnsen, R., Moerman, D.G., Barabasi, A.L., Baillie, D., and Vidal, M.; *Genome-scale analysis of in vivo spatiotemporal promoter activity in Caenorhabditis elegans*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(6): p. 663-8.
128. Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., and Ruvkun, G.; *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Science, 1997. **277**(5328): p. 942-6.
129. Wolkow, C.A., Kimura, K.D., Lee, M.S., and Ruvkun, G.; *Regulation of C. elegans life-span by insulinlike signaling in the nervous system*. Science, 2000. **290**(5489): p. 147-50.
130. Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J.; *Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3290-8.
131. Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., and Rubinsztein, D.C.; *Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 25009-13.
132. Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C.; *Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 1107-17.
133. Rubinsztein, D.C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R.A., Qin, Z.H., Ravikumar, B., Stefanis, L., and Tolkovsky, A.; *Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair*. Autophagy, 2005. **1**(1): p. 11-22.
134. Komatsu, M., Kominami, E., and Tanaka, K.; *Autophagy and neurodegeneration*. Autophagy, 2006. **2**(4): p. 315-7.
135. Syntichaki, P., Samara, C., and Tavernarakis, N.; *The vacuolar H⁺ -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in C. elegans*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1249-54.
136. Caldero, J., Tarabal, O., Casanovas, A., Ciutat, D., Casas, C., Llado, J., and Esquerda, J.E.; *Excitotoxic motoneuron disease in chick embryo evolves with autophagic neurodegeneration and deregulation of neuromuscular innervation*. J Neurosci Res, 2007. **85**(12): p. 2726-40.
137. Borsello, T., Croquelois, K., Hornung, J.P., and Clarke, P.G.; *N-methyl-D-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(3): p. 473-85.
138. Shacka, J.J., Lu, J., Xie, Z.L., Uchiyama, Y., Roth, K.A., and Zhang, J.; *Kainic acid induces early and transient autophagic stress in mouse hippocampus*. Neurosci Lett, 2007. **414**(1): p. 57-60.

139. Samara, C., Syntichaki, P., and Tavernarakis, N.; *Autophagy is required for necrotic cell death in Caenorhabditis elegans*. Cell Death Differ, 2007.
140. Hosokawa, N., Hara, Y., and Mizushima, N.; *Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size*. FEBS Lett, 2007. **581**(15): p. 2623-9.
141. Juhasz, G., Csikos, G., Sinka, R., Erdelyi, M., and Sass, M.; *The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development*. FEBS Lett, 2003. **543**(1-3): p. 154-8.
142. Lippai, M., Csikos, G., Maroy, P., Lukacsovich, T., Juhasz, G., and Sass, M.; *SNF4Agamma, the Drosophila AMPK gamma subunit is required for regulation of developmental and stress-induced autophagy*. Autophagy, 2008. **4**(4).
143. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M.; *Growing roles for the mTOR pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 596-603.
144. Smith, E.D., Tsuchiya, M., Fox, L.A., Dang, N., Hu, D., Kerr, E.O., Johnston, E.D., Tchao, B.N., Pak, D.N., Welton, K.L., Promislow, D.E., Thomas, J.H., Kaeblerlein, M., and Kennedy, B.K.; *Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species*. Genome Res, 2008. **18**(4): p. 564-70.
145. Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K.; *Insulin-like growth factor-1 and TNF-alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells*. Immunol Cell Biol, 2006. **84**(5): p. 448-54.
146. Thomas, J.H.; *Genetic analysis of defecation in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1990. **124**(4): p. 855-72.
147. Klionsky, D.J. and Emr, S.D.; *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
148. Koubova, J. and Guarente, L.; *How does calorie restriction work?*; Genes Dev, 2003. **17**(3): p. 313-21.
149. Lakowski, B. and Hekimi, S.; *The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13091-6.
150. Ghazi, A., Henis-Korenblit, S., and Kenyon, C.; *Regulation of Caenorhabditis elegans lifespan by a proteasomal E3 ligase complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(14): p. 5947-52.
151. Mironova, E.V., Evstratova, A.A., and Antonov, S.M.; *A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture*. J Neurosci Methods, 2007. **163**(1): p. 1-8.
152. Golden, W.C. and Martin, L.J.; *Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo*. Neuroscience, 2006. **137**(1): p. 133-44.

153. Ientile, R., Macaione, V., Teletta, M., Pedale, S., Torre, V., and Macaione, S.; *Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina*. J Neurochem, 2001. **79**(1): p. 71-8.

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni édesanyámnak mindazt a fáradtságos munkát, amivel lehetővé tette számomra, hogy tanulhassak és kutathassak.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Vellai Tibornak és tanszékvezetőmnek Dr. Orosz Lászlónak, hogy lehetősvé tették és segítették kutatásomat.

Hálával tartozom Dr. Kovács Attilának az elektronmikroszkópia világába történő bevezetésért. Köszönet illeti továbbá a segítségért Aladzsity Istvánt, Barna Jánost, Erdélyi Pétert, Hargitai Balázst, Karácsony Emesét, Sigmond Tímeát, Simon Pétert, Simon Rezsőné, Szabó Emesét, Vellainé Takács Krisztinát, és a Vellai labor számos további tagját.