

A HSP-90 chaperon biológiai szerepének vizsgálata *C. elegans*-ban

Doktori értekezés

Somogyvári Milán

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sóti Csaba, D.Sc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Sigmond Tímea, Ph.D., egyetemi tanársegéd
Dr. Szöllősi András, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sirokmány Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Barna János, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest

2019

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	1
2. Rövidítések jegyzéke	3
3. Bevezetés	5
3.1 A <i>Caenorhabditis elegans</i> fonálféreg, mint genetikai modellorganizmus	5
3.2 Az öregedéskutatás alapjai	6
3.3 A HSP-90 működése és szerepe	7
3.4 DAF-16 és az élettartam szabályozása	11
3.5 A szirtuinok	14
4. Célkitűzések	21
5. Módszerek	22
5.1 Törzsek és anyagok	22
5.2 A törzsek tisztán tartása	23
5.2.1 Átpakolásos tisztítás	23
5.2.2 Eggprep	24
5.3 MG132 tartalmú lemezek	24
5.4 Keresztezés és genotipizálás	24
5.4.1 A <i>daf-2</i> és <i>daf-16</i> kettős mutáns létrehozása	24
5.4.2 A <i>daf-16a::rfp</i> transzgenikus és <i>rle-1</i> mutáns törzsek összekeresztzése	25
5.5 RNS interferencia	25
5.6 Élettartam-mérések	26
5.7 Termotolerancia	27
5.8 Fluoreszcens mikroszkópia	27
5.9 mRNS expresszió analízis	28
5.10 Fehérjeszint meghatározás	29
5.11 Dauer-fenotípus vizsgálat	30
5.12 Morfológiai jellemzés	30
5.13 Fertilitás vizsgálat	30
5.14 Statisztikai analízis	30
6. Eredmények	32
6.1 A HSP-90-csendesítés hatásának jellemzése	32
6.1.1 A <i>hsp-90</i> csendesítése csökkenti a HSP-90 fehérje-expressziót, valamint indukálja a hősokk-választ	32
6.1.2 A HSP-90 kapacitás csökkenése korlátozza a normális élettartamot	36
6.2 A HSP-90 hatása a csökkent ILS által indukált élettartam szabályozására	37
6.2.1 A <i>hsp-90</i> a lárvális fejlődés során is szükséges a csökkent ILS által kiváltott megnövekedett élettartamhoz	37
6.2.2 A <i>hsp-90</i> neurális csendesítése a dauer fenotípus megjelenéséhez	41

vezet vad típusban, perifériás csendesítése azonban nem befolyásolja a <i>daf-2</i> mutánsok dauer fejlődését	
6.2.3 A HSP-90 elősegíti a DAF-16A transzlokációját a sejtmagba	43
6.2.4 A HSP-90 szükséges a DAF-16A függő transzkripcionális funkcióhoz	50
6.2.5 A HSP-90 nem szükséges a DAF-16A stabilitásához, és a sejtmagi importjától upstream fejt ki hatását	55
6.2.6 A HSP-90 biztosítja a <i>daf-16a</i> -függő élettartam növekedést	60
6.3 A HSP-90 hiánya a SIR-2.1 proteasomális lebontásához vezet	61
7. Megbeszélés	66
7.1 Következtetések a HSP-90 szerepéről az élettartam szabályozásában	66
7.2 A HSP-90 az ILS által szabályozott folyamatokra kifejtett hatásával kapcsolatos következtetések	68
7.3 Következtetések a HSP-90 SIR-2.1 stabilizálásában betöltött szerepével kapcsolatban	72
8. Következtetések	76
9. Összefoglalás	77
10. Summary	78
11. Irodalomjegyzék	79
12. Saját publikációk jegyzéke	99
13. Köszönetnyilvánítás	100
14. Függelék	102
15. Ábrák és táblázatok jegyzéke	112
15.1 Ábrák	112
15.2 Táblázatok	113

2. Rövidítések jegyzéke

<u>Rövidítés</u>	<u>C. elegans név/Emlős ortológ neve</u>
AAK-2/AMPK	<u>A</u> MP- <u>A</u> ctivated <u>K</u> inase <u>2</u> / <u>A</u> MP-Activated <u>K</u> inase
AGE-1	<u>A</u> geing alteration <u>1</u>
AKT1/2	Protein kinase B <u>1/2</u>
COL-183	<u>C</u> ollagen <u>183</u>
CTL-1/2	<u>C</u> atalase <u>1/2</u>
DAF-16/FOXO	<u>D</u> aue <u>r</u> <u>F</u> ormation <u>16</u> / <u>F</u> orkhead box protein <u>O</u>
DAF-2/IGFR	<u>D</u> aue <u>r</u> <u>F</u> ormation <u>2</u> / <u>I</u> nsulin-like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulf <u>o</u> xide
EAT-2	<u>E</u> ating: abnormal pharyngeal pumping <u>2</u>
FAT-7	<u>F</u> atty acid desaturase <u>7</u>
FTT-2	<u>F</u> ourteen- <u>t</u> hree- <u>t</u> hree family <u>2</u>
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
GST-20	<u>G</u> lutathione <u>S</u> - <u>T</u> ransferase <u>20</u>
HSP-12.6	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein <u>12.6</u>
HSP-16.2	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein <u>16.2</u>
HSP-70	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein <u>70</u>
HSP-90	<u>H</u> eat- <u>s</u> hock <u>P</u> rotein <u>90</u>
ILS	<u>I</u> nsulin/IGF- <u>l</u> ike <u>S</u> ignaling
JNK-1	c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inase <u>1</u>
LEA-1	plant <u>L</u> ate <u>E</u> mbryo <u>A</u> bundant related <u>1</u>
LET-363/mTOR	<u>L</u> ethal 363/ <u>m</u> ammalian <u>T</u> arget <u>O</u> f <u>R</u> apamycin
MTL-1	<u>M</u> etallothionein <u>1</u>
NGM	<u>N</u> ematode <u>G</u> rowth <u>M</u> edium

OLD-1	<u>O</u>verexpression <u>L</u>ongevity <u>D</u>eterminant <u>1</u>
PKD	<u>P</u>rotein <u>K</u>inase <u>D</u>
RFP	<u>R</u>ed <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein
SBP-1	<u>S</u>terol regulatory element <u>b</u>inding <u>p</u>rotein <u>1</u>
SCL-1	<u>S</u>CP-<u>L</u>ike extracellular protein <u>1</u>
SCL-20	<u>S</u>CP-<u>L</u>ike extracellular protein <u>20</u>
SIR-2.1/SIRT1	<u>S</u>ilent <u>I</u>nformation <u>R</u>egulator <u>2.1</u>/<u>S</u>irtuin <u>1</u>
SOD-3	<u>S</u>upero<u>x</u>ide <u>D</u>ismutase <u>3</u>

3. Bevezetés

3.1 A *Caenorhabditis elegans* fonálféreg, mint genetikai modellorganizmus

„...with a few toothpicks, some petri dishes and a microscope, you can open the door to all of biology.” (Sidney Brenner, *C. elegans* II, 1996)

A *Caenorhabditis elegans* fonálféreg a *Rhabditidae* család tagja. Széleskörűen elterjedt organizmus a mérsékelt égövi talajokban. Táplálékául baktériumok szolgálnak. A felnőtt kort elérve a vad típusú állatok 1-1,5 mm hosszúak, ezt a méretet hozzávetőlegesen 2,5-3 nap alatt érik el 20°C-on tartva. A felnőttkorig 4 lárva-stádiumon esnek át L1-től L4-ig. Amennyiben ez idő alatt huzamosabb környezeti stressz, vagy táplálékhiány lép fel, az állatok képesek az L1-es lárvaállapotot követően kitaró lárva, egy ún. dauer lárva állapot formájában alternatív fejlődési útvonalra térni. Így átvészeltetik az ínséges időszakot akár hónapokon keresztül is, majd annak elmúltával folytathatják a normális életciklusukat. A fiatal, L1-es lárvastádiumban lévő állatok lefagyaszthatóak, így törzsbankok hozhatók létre a különféle genetikai hátterű vonalakból. A legnagyobb törzsbank a Minnesota-i Egyetem által működtetett *Caenorhabditis* Genetics Center, melyben jelenleg több, mint 20000 törzset tárolnak. A *C. elegans* populációit hermafrodita és kis számban előforduló hím egyedek alkotják. A hermafroditák önmegtermékenyítők, így velük könnyen tarthatók fenn tiszta genetikai vonalak, míg a hímek segítségével különböző vonalak keresztezése valósítható meg. Egy önmegtermékenyítő hímnős egyed hozzávetőlegesen 250-300 petét rak a szaporodási periódus alatt, ami a felnőtt kor elérésétől mintegy 3-4 napon át tart. Amennyiben hím termékenyíti meg a hímnős egyed, a lerakott peték száma elérheti az 1000 darabot is.

Az állatok sejtszáma állandó – az egyedfejlődés bevégeztével a nem ivari szövetekben nem zajlik sejtosztódás, „posztmitotikusak” – sejtjeik leszármazási sora jól ismert (1). A hímnős egyedek 959, míg a hímek 1031 sejtből állnak. Ezek közül 302 idegsejt a hímnősek esetében, míg a hímeknél ez a szám 381. A hímek extra idegsejtjei elsősorban a szaporodást segítik. A haploid genom 5 testi és 1 ivari kromoszómába szerveződik, ami összesen körülbelül 100 millió bázispár hosszúságú, és megközelítőleg 19800 fehérjekódoló gént tartalmaz. Az intronok aránya 26% körüli, míg a génsűrűség 5 kb/gén. A

nemeket az különbözteti meg kromoszomális szinten, hogy míg a hermafroditák két X-kromoszómával rendelkeznek a sejtjeikben, addig a hímek csupán egyetlen X-kromoszómát hordoznak ugyanott. A *C. elegans* génjeit is jellemzi az eukarióták között csupán a fonálférgekre jellemző operonos szerkezet. A faj teljes genetikai állományának szekvenciája ismert, génjeinek annotációja igen magas. A *C. elegans* génjeinek hozzávetőlegesen 38%-a mutat ortológiát humán génekkel (2), ami által sok esetben alkalmas modellorganizmusnak bizonyult humán genetikai kórképek vizsgálatára.

A *Caenorhabditis elegans* génjeire vonatkozó információk, az alkalmazható metodikák és az egyéb felgyülemlett ismeretek gyűjtőhelyeként a Wormbase (wormbase.org), valamint a Wormbook (wormbook.org) weboldalak szolgálnak, míg az említett, kiterjedt nemzetközi törzsgyűjtemény a Caenorhabditis Genetics Center honlapján (cbs.umn.edu/CGC/) érhető el.

3.2 Az öregedéskutatás alapjai

Az öregedés folyamatának megállítása, vagy legalábbis lelassítása már a legkorábbi fennmaradt írásos emlékeinkben is felbukkan témaként. A modern orvoslás megjelenése a felvilágosodás korától kezdve komoly eredményeket tudott felmutatni a várható élettartam megnövelésében. Ezt azonban nem a természetes öregedési folyamat befolyásolásán keresztül vitte véghez, hanem a korai halálokok kivédése, megszüntetése révén. Az életmentő műtétek, az érzéstelenítés/altatás, valamint az antibiotikumok megjelenése következtében a XX. század első felében a születéskor várható élettartam a duplájára nőtt, és ez a tendencia – noha némiképp lelassult formában, de – továbbra is megfigyelhető (Forrás: http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_hosszu/h_wdsd001b.html). Mindazonáltal a várható élettartam növekedésének lassulása felhívja a figyelmet arra, hogy könnyen lehet, hogy közeledünk ahhoz a határhoz, amit a rendelkezésre álló módszerekkel elérhetünk az élettartam megnyújtása érdekében. A további élettartam-növeléshez olyan beavatkozásokra lehet szükség, melyek túlmutatnak az egészség megőrzésén, és jelenleg is számos helyen képezik kutatás témáját (3).

Mindemellett azonban ezen kutatások egy másik szempontból is kritikus jelentőséggel bírnak. Ismert, hogy a kor előrehaladásával a szervezet fokozatosan érzékenyebbé válik bizonyos kórképek kialakulására. Ezeket a betegségeket emiatt gyakran öregedéssel

összefüggő kórképeknek nevezik. Közéjük tartozik a kettes típusú cukorbetegség, a szív- és érrendszeri betegségek, valamint a daganatos elváltozások is. Miközben múlt század során a fertőzések és élősködők által okozott halálozások száma drasztikusan csökkent az egyre fejlettebbé váló kezeléseknek köszönhetően, s ugyanez mondható el például a légzőrendszer betegségeit illetően is, addig daganatos betegségek, valamint a keringési rendszer elváltozásai miatt bekövetkezett halálozások száma és aránya is jelentős mértékben megnőtt (Forrás: http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_hosszu/h_wdsd001c.html?down=99.9587631225586). Ez a jelenség – az esetleges környezeti ártalmak és életmódbeli változások mellett – minden bizonnyal annak tudható be, hogy a megnőtt születéskor várható élettartam miatt az egyének nagyobb eséllyel érik meg azt a kort, amikor ezen kórképek valószínűsége emelkedni kezd. Ezek a betegségek azonban mindeddig le nem küzdött kihívást jelentenek az orvostudomány számára, tekintettel arra, hogy sok esetben csak a tüneteket vagyunk képesek kezelni, miközben a kiváltó ok kívül esik a jelenlegi eszközeink hatókörén.

Éppen emiatt kulcsfontosságú, hogy az ehhez vezető folyamatokat jobban megértsük, és azonosítsunk olyan pontokat a szabályozásukban, ahol beavatkozhatunk annak érdekében, hogy idő előtt megakadályozhassuk a kórképek kialakulását, illetve lehetőség szerint visszafordíthassuk, mérsékelhessük a progressziójukat.

Ennek a több évtizede zajló kutatási munkának eredményeként betekintést nyertünk azokba a molekuláris mechanizmusokba, melyek befolyásolják nem csupán a biológiai élettartamot, hanem a fent említett kórképek kialakulását is. Az évek során összegyűlt adatokból több próbálkozás is született egy átfogó, az öregedési folyamat és a kapcsolódó betegségek kialakulásának magyarázatát nyújtó átfogó paradigma megalkotására (4,5).

3.3 A Hsp90 működése és szerepe

A fehérjekészlet működőképességének kialakítása és fenntartása elengedhetetlen a sejt túlélése szempontjából. Ennek biztosítása érdekében egy konzervált, ún. “fehérje homeosztázis hálózat” is működik a sejtben a transzlálódó fehérjelánc natív szerkezetének kialakításától a denaturált fehérjék konformációjának helyreállításától az aggregálódásra való hajlamosságuk miatt a sejt integritását veszélyeztető fehérjék proteaszóma általi irányított lebontásáig. Ennek a minőség-biztosítási eszközkészletnek központi elemei a dajkafehérjék, chaperonok. Ezek a fehérjék képesek megkötni és

stabilizálni egy másik fehérje instabil konformerét (6). Kapcsolataik a sejt interakciós hálózatán belül többnyire alacsony affinitásúak, dinamikusak és ideiglenesek (7). Nem csupán a stressz hatására kitekeredett fehérjék aggregálódását akadályozzák meg a megfelelő szerkezet helyreállítása, vagy a kitekert fehérjék eliminálása révén, hanem normál körülmények között is fontos funkciókat látnak el: elősegítik a makromolekulák transzportját, valamint részt vesznek a nagyobb protein-komplexek összeszerelésében és átrendeződésében is (8–10).

A 90 kDa molekulatömegű hőszokkfehérje egy evolúciósan konzervált chaperon, mely az egyik leggyakoribb a dajkafehérje-rendszer tagjai közül – a sejt fehérjékészletének 2-4%-át teszi ki (11). Minden eukarióta organizmus számára esszenciális, mivel a nullmutánsok nem életképesek egyik vizsgált eukarióta fajban sem. Felmerült a modern enzimek evolúciójában betöltött szerepe is (12), különös tekintettel a kinázok evolúciójára (13).

Számos olyan fehérjét azonosítottak már, melyek szerkezeti stabilitásáért, illetve aktiválható állapotban való tartásáért a Hsp90 felel (14) de ezek köre továbbra is folyamatosan növekszik. Az ilyen, a Hsp90 által stabilizált fehérjéket klienseknek nevezzük. Köztük fellelhető számos kináz, mint például az Akt (15), sejtmagi hormon receptorok (16); transzkripciós faktorok, mint a HSF1 (17), a HIF-1 α (18), vagy a PPAR γ (19); illetve a kalmodulin is (20). Emellett nagy számban azonosítottak kinázokat, mint a Hsp90 klienseit (13). A Hsp90 klienseinek átfogó listája megtalálható a Picard laboratórium honlapján (www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf). Ezek a fehérjék számos nagy jelentőségű folyamatban vesznek részt a sejten belül, mint a sejtosztódás, jelátvitel és a túlélési jelpályák. Emlősökben a Hsp90 homodimer formában működik, ami 2-3 kovalensen kötött foszfátcsoportot is tartalmaz monomerenként (21). Nem ironos detergentek, vagy hőszokk hatására oligomer formába is összeállhat, ami tovább növeli chaperon aktivitását (22). Elsősorban a citoplazmában helyezkedik el, bár transzlokálódhat a sejtmagba is (23). Ismert mitokondriális változata, a TRAP-1 (24), melynek expressziója jelentősen emelkedett primer tumorokban (25). A főként citoszolikus Hsp90-nek két izoformája van, a Hsp90 α és a Hsp90 β , melyek között 76%-os homológia mutatható ki, s melyek egy hozzávetőlegesen 500 millió évvel ezelőtti génduplikációs esemény következményei (26,27). Az α izoforma különféle stresszek hatására indukálódik és nagyobb szövet-specificitást mutat, míg a némiképp nagyobb

méretű β izoforma konstitutívan kifejeződik minden szövettípusban (28). Szerkezetét tekintve három doménre osztható: az N-terminális, a középső, valamint a C-terminális régióra. A Hsp90 meglehetősen hidrofób molekula, azonban rendelkezik töltött szakaszokkal is, amik leginkább a középső régióban, valamint a C-terminális doménben találhatóak, és ezen szakaszok felelnek az instabil fehérjék kötéséért (11). A Hsp90 számára az ATP hidrolízise biztosítja a szükséges energiát, emellett pedig más kochaperonokat is igényel a megfelelő kliens-kötés kialakításához, mint a Hsp70, a Hop fehérje (29), immunifilinek, CDC37, és p23 (30,31) (1./a ábra). ATP-kötő zseb található az N-terminális régióban (32), valamint a C-terminális doménben is (33–35). Ezek az ATP kötő zsebek a Hsp90 specifikus gátlását teszik lehetővé kompetitív inhibitorok révén. Tekintettel a Hsp90 kliensek nagy számára, nem meglepő, hogy olyan fehérjék is igénylik működésükhöz, melyek részt vesznek a tumorképződés szabályozásában. Emiatt intenzív figyelem övezi a Hsp90 inhibitorok fejlesztését (36). Az inhibitor hatására a chaperon nem képes aktiválható formában tartani klienseit, melyek ezt követően a proteaszóma által kerülnek lebontásra (37).

Mindezekből látható, a 90 kDa-os hő sokkfehérje szerteágazó interakciós hálózata révén milyen központi szerepet tölt be a sejt számos folyamatának szabályozásában.

energiáját használja a kliens átvételéhez. A folyamatban több kofaktor is részt vesz, melyek vagy ledisszociálnak (Hsp70/40, HOP), vagy a komplex részei maradnak (Cdc37). Aktív formáját elérve a kliensek egy része komplexben marad a Hsp90-nel, más részük ledisszociál és önállóan is funkcióképes. (b) A két *Homo sapiens* Hsp90 fehérje elsődleges szerkezetének összehasonlítása a *C. elegans* HSP-90, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* HSP82 nevű ortológjával. Az N-terminális régiót zöld, a középső régiót kék, míg a C-terminális régiót sárga színnel jelöltem. Az ezeken kívüli homológ szekvenciákat piros szín jelöli.

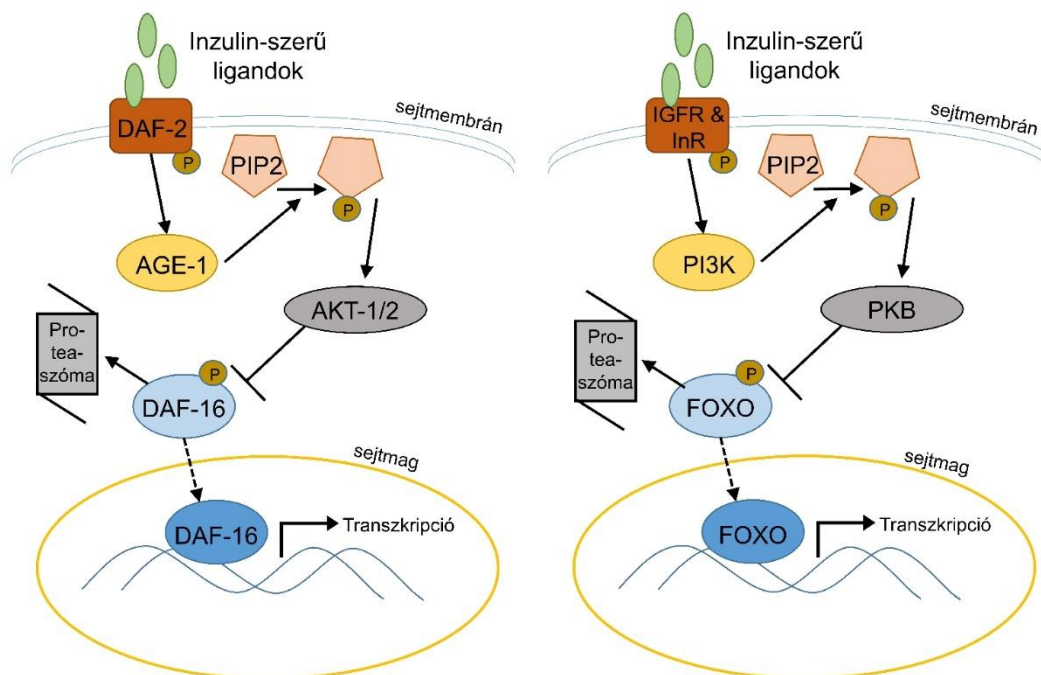
A Hsp90 ortológ HSP-90 (korábbi nevén DAF-21) szerepéről a *Caenorhabditis elegans* fonálféregben az elmúlt két évtized során kiderült, hogy szerepet játszik olyan folyamatokban, mint a kemoszenzoros érzékelés (38,39), lárvális fejlődés (40), a sejtciklus szabályozása (41), fehérje-degradáció (42), immunitás (43) és izom homeosztázis (44). Noha ezek a folyamatok meglehetősen széles területet fognak át, azonban mindezidáig nem ismert, milyen szerepet tölt be a HSP-90 az élettartam szabályozásában. A közelmúltban közzétett adatok szerint a HSP-90 egy funkciónyeréses mutációja élettartam-növekedést eredményezett *C. elegans*-ban – különösen alacsony hőmérsékleten (45), miközben 20°C-on mások éppen ezzel ellentétes eredményre jutottak (44). Mindemellett arra is van példa az irodalomban, hogy a *hsp-90* gén RNSi általi csendesítése rövidebb élettartamhoz vezetett hosszú életű *age-1* mutáns állatokban (46). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a HSP-90-nek valóban szerepe lehet az élettartam meghatározásában fonálférgekben.

3.4 DAF-16 és az élettartam szabályozása

A Forkhead transzkripciós faktorok régóta az öregedés kutatásának középpontjában állnak. Több organizmusban is kimutatták, hogy szerepet játszik az élettartam meghatározásában (47), mindamellett emberben is ismert, hogy génjének egyes genotípusai összefüggést mutatnak a hosszú élettartammal (48). Emlősökben 4 FOXO gén található: FOXO1 (FKHR), FOXO3 (FKHRL1), FOXO4 (AFX), és FOXO6, melyek jelentősen hasonlítanak egymáshoz mind szerkezetükben, mind pedig funkciójukban és szabályozásukban. A FOXO transzkripciós paktorok kulcsszerepet játszanak a sejt- és szervezet-szintű túlélésben, sejthalálban, osztódásban és anyagcserében (49–52). Emellett egyre megalapozottabb a szerepük a immunrendszer működésében is (53).

Korábban kimutatták, hogy az emlős FoxO transzkripciós faktor *C. elegans* megfelelője fontos szerepet játszik a fonálférgék élettartamának meghatározásában (54), valamint az immunválasz kialakításában is (43,55). Ez a transzkripciós faktor az inzulin-szerű jelátviteli útvonal (ILS) egyik fontos csomópontja, melynek aktivitását elsősorban a környezetben fellelhető táplálék érzékelése, valamint az egyes, az organizmust érő stresszhatások szabályoznak.

Táplálékban bőséges és stresszmentes körülmények között inzulin-szerű peptidek (ILP-k) kötődnek a hormon-receptor DAF-2/IGFR molekulához, mely ennek következményeként egy jelátviteli kaszkádot aktivál a *C. elegans* foszfoinozitol 3-kináz (PI3K) AGE-1-en, a szerin-treonin kináz PDK-1-en, AKT-1-en és AKT-2-n keresztül, melyek végül foszforilálják a DAF-16 transzkripciós faktort. Foszforilált állapotban a DAF-16 a citoplazmában lokalizálódik, s nem képes bejutni a sejtmagba – ezáltal gátlódik a transzkripciós aktivitása. Az inaktív fehérje így ubiquitinizálható, ami a proteaszóma általi lebontás felé irányítja (2. ábra).

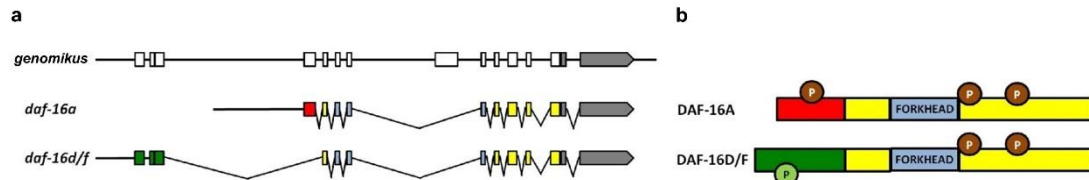


2. ábra: Az inzulin-szerű jelátviteli útvonal (ILS) sematikus ábrázolása *C. elegans* és emlős modellen. Látható, hogy a szignalizációs útvonal meglehetősen konzervált, mivel az ábrázolt főbb elemei egyértelműen megfeleltethetők egymásnak a két modellben.

Amennyiben az állat táplálékhiánnyal, illetve más belső, vagy külső eredetű stresszel, például oxidatív ágensekkel, vagy magas hőmérséklettel találkozik, az ILS útvonal inaktiválódik, így nem képes foszforilálni a DAF-16-ot, ami ennek következtében bejuthat a sejtmagba, s kifejtheti transzkripciós aktivitását. Az ILS mellett más módon is foszforilálódhat a DAF-16: például mind a JNK-1, mind pedig az AAK-2 (AMPK) képes aktiválni a DAF-16-ot foszforiláció által – ezzel egy összetett DAF-16 szabályozási hálózatra utalva. A DAF-16 igen széles célgén körrel rendelkezik, egyes gének expresszióját indukálja, míg másokét gátolja (56). Az általa indukált gének közül sokan olyan fehérjéket kódolnak, melyek a különféle típusú stresszek leküzdésében játszanak szerepet. Vannak köztük az antioxidáns védelemben részt vevő fehérjék, mint a szuperoxid diszmutáz SOD-3 (57) és a kataláz CTL-1 és 2 (58), a nehézfém-mérgezés elleni védelem fehérjéi, mint a metallothionein MTL-1 (59), és hősokkfehérjék is, köztük a kis molekulású HSP-16.2 és HSP-12.6 (60). Ezek mellett a DAF-16 kliensek közé tartoznak még olyan fehérjék is, melyek szerepet játszanak a hipertóniás stresszel szembeni ellenállásban (61), a mitokondriális stresszválaszban (62) és az antimikrobiális védelemben (63). A DAF-16 aktiváció széleskörű hatását mutatták ki a metabolizmusra a kettes fázisú detoxifikációban részt vevő gének expressziójának növelése által (64), miközben fontos szerepet játszik az autofágia szabályozásában is (65). Azon gének között, melyek expresszióját a DAF-16 csökkenti, megtalálhatók különféle, a növekedésben és fejlődésben (66), valamint a fehérjeszintézisben szerepet játszó faktorok (67). Feltételezések szerint mindezen génregulációs hatások együttesen felelősek az ILS mutáns állatokban megfigyelt hosszú életért.

Míg az emlősök több FoxO génnel rendelkeznek, melyek génduplikáció révén jöttek létre, addig a *C. elegans* mindössze egyetlen FoxO génnel bír. Kimutatták azonban, hogy ez az egyetlen *C. elegans* FoxO gén, a *daf-16* alternatív splicing révén több különböző géntermék termeléséért is felelős (68). További vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy az egyes DAF-16 izoformák eltérő mértékben járulnak hozzá a megfigyelt megnövekedett élettartamhoz: nevezetesen az *d/f* izoforma nagyobb mértékben járul hozzá a hosszú életű fenotípushoz, mint az *a* izoforma (69). Azonban egy közelmúltbeli tanulmány megkérdőjelezte ezt az eredményt, arra következtetve végül, hogy az *d/f* izoforma megfigyelt nagyobb szerepe az izoforma-specifikus törzsek esetén a *daf-16d/f* transzgen

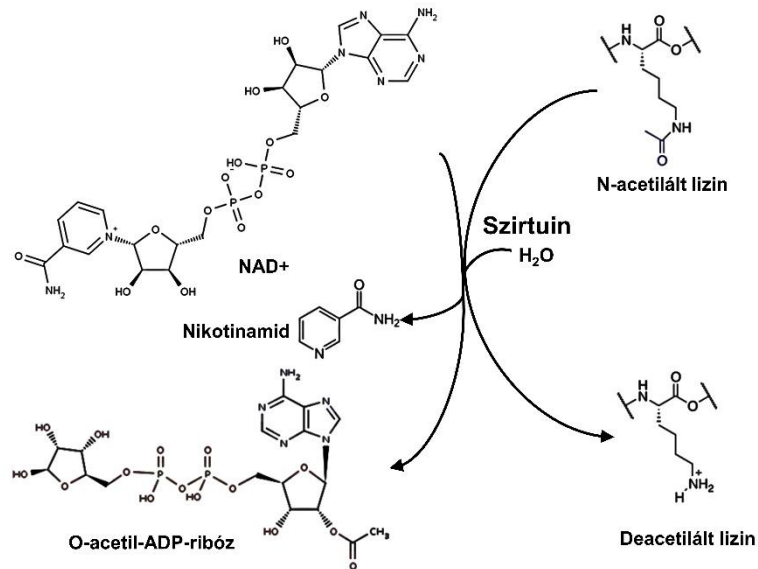
dózis-érzékenységének tudható be, valamint annak, hogy a *daf-16a* transzgen nem volt képes megfelelően helyettesíteni az endogén *daf-16a* izoformát *daf-16* mutáns háttéren (70). A tanulmányban kimutatják, hogy valójában a *daf-16a* és nem az *d/f* izoforma játszik nagyobb szerepet az élettartam szabályozásában.



3. ábra: A *daf-16a* és *daf-16d/f* izoformák mRNS átíratának (a) illetve fehérje szerkezetének (b) sematikus reprezentációja. A kódoló régiót színes téglalapokkal, a nemkódolóakat vonalakkal, míg a 3' nem kódoló régiókat szürke téglalapokkal jelöltem. A "P" feliratú körök foszforilációs helyeket jelölnek. Felhívom a figyelmet az eltérő N-terminális szekvenciákra, valamint az eltérő N-terminális konszenzus foszforilációs helyekre (eltérő színnel jelölve) (69,70).

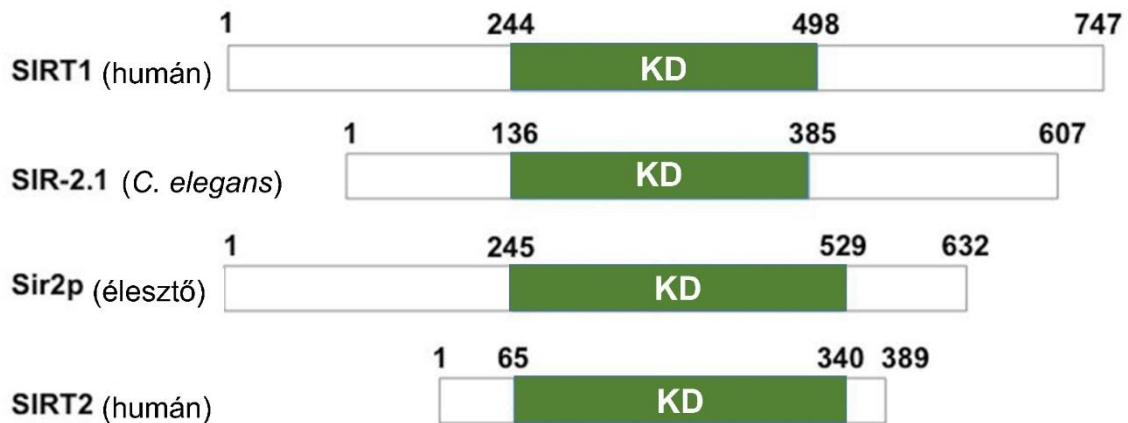
3.5 A szirtuinok

A szirtuinok (Silent information regulator) családjába úgynevezett NAD^+ függő fehérje deacetilázok tartoznak. A család első tagját, a Sir2 fehérjét élesztőben fedezték fel (71), ahol azt találták, hogy gének transzkripciójának gátlásában játszik szerepet – innen ered a család neve is. A szirtuinok működésének alapja, hogy acetil-csoportokat képesek eltávolítani fehérjék lizin aminosavairól NAD^+ jelenlétében. Az acetil csoportot a NAD^+ ADP-ribóz komponensére rakják, így O-acetil-ADP-ribózt hozva létre (4. ábra).



4. ábra: A lizin oldalláncok szirtuin általi deacetilációjának mechanizmusa.
(Chen és mtsi. 2015 alapján (72))

A különféle szirtuinokat kódoló gének meglehetősen konzerváltak az egyes élőlény-csoportok között (73). Emlősokban ezidáig 7 szirtuin gént azonosítottak (SIRT1-7), melyek közül hatnak van ortológja egészen az ecotysozoa (vedlő állatok) törzs rovarok osztályáig. A növények között általánosan két homológ, a Sirtuin 4 és Sirtuin 6 található meg a zárwatermőknél, míg például a mohák esetén további szirtuin ortológok is előfordulnak. A különböző élőlények szirtuin ortológjai leginkább a katalitikus doménjükben mutatnak hasonlóságot, miközben az N- és C-terminális régiók mind hosszukban, mint pedig szekvencájukban változatosabbak.



5. ábra: Az egyes SIRT1 ortológok és a SIRT2 homológiája. Látható, hogy míg a katalitikus domén (KD) jelentős hasonlóságot mutat, addig az N- és C-terminális régió nagyobb mértékben változik az egyes fehérjék között. A fehérje-szerkezetek illesztését Nguyen Minh Tu végezte (74).

Az egyes szirtuin fehérjék különböző sejten belüli régiókhoz és funkciókhoz köthetők. A leginkább kutatott SIRT1 legfőképpen a transzkripció szabályozásában vesz részt, és ennek megfelelően gyakorta a sejtmagban található meg, azonban a citoplazmában elhelyezkedve is szerepet játszik az anyagcsere és táplálék-érzékelés irányításában (75,76). A SIRT2 ezzel szemben elsősorban citoszolikus fordul elő, ahol a tubulin szabályozásán keresztül hat a sejtostódásra és differenciálódásra, míg a sejtmagban a H4 hiszton modulációját végzi (77,78). A SIRT3 előfordul a sejtmagban a celluláris stressz szenzoraként, valamint a mitokondrium egészségének és működésének szabályozójaként (76,79). A talán legkevésbé tanulmányozott szirtuin, a SIRT4 jelenlétét csupán a mitokondriumban mutatták ki, ahol az anyagcsere szabályozásában vesz részt azáltal, hogy deaktiválja a glutamát-dehidrogenázt, a citromsav-ciklus egyik kulcsenzimét (80). A SIRT5 kizárólag a mitokondriumban fordul elő, ahol a hűgysav ciklus szabályozásában van szerepe (81). A SIRT6 a sejtmag fehérjéje, mely a sejt szintű stresszválaszok kialakításában, a telomerek megőrzésében, valamint az NF- κ B gyulladás által indukált transzkripciójában vesz részt (82–84). Végül a SIRT7 a riboszómák kialakulását szabályozza az RNS polimeráz 1 aktiválásán keresztül a sejtmagvacskában (85).

A fentiekből is látszik, hogy a szirtuin fehérjék funkcióinak köre túlmutat a transzkripció hiszton-deacetiláció általi szabályozásán. Az általuk befolyásolt folyamatok

közé tartozik a cirkadián ritmus befolyásolása is a BMAL1 és egyéb fehérjék szabályozásán keresztül (86), valamint a sejtciklus szabályozása is többek között azáltal, hogy a SIRT2 a mitózis kezdetekor a H4 hiszton deacetilációja (77) révén valószínűsíthetően hozzájárul a kromoszómák kondenzációjához. Tekintettel arra, hogy a szirtuinok működése igényli a NAD⁺ jelenlétét, aminek mennyisége pedig a sejt metabolikus állapotának függvénye, nem meglepő, hogy a szirtuin aktivitás egyfajta energia-szenzorként is leírható. Mindazonáltal a szirtuinok maguk is befolyásolhatják a sejt anyagcseréjét, például azáltal, hogy a SIRT1 és SIRT3 fehérjék deacetiláció útján aktiválják az acetyl-coenzim A-szintázt (87), ami a béta oxidáció és glikolízis termékeit alakítja acetyl-coenzim A-vá (88). A SIRT3-ról kimutatták, hogy aktiválja az elektrontranszportlánc II-es komplexét (89). Az edzés, vagy fogyás hatására megemelkedő AMP-szintek által aktiválódik az AMPK, ami transzkripciósan indukálja a PGC-1 α expresszióját, ami végeredményben pedig megnöveli a mitokondriumok biogenezisét és ezáltal a sejt oxidáló kapacitását. Azonban kimutatták, hogy a PGC-1 α aktiválásához szükséges a fehérje SIRT1 általi deacetilációja (90). Más tanulmányok arra hívták fel a figyelmet, hogy a SIRT1 működése megvédi a szervezetet a magas zsírtartalmú táplálkozás által indukált anyagcsere károsodásoktól és a cukorbetegségtől (91).

A szirtuinoknak az élettartam meghatározásában betöltött szerepét élesztőgombában (*Saccharomyces cerevisiae*) (92) fedezték fel. Túltermelése itt hozzávetőlegesen 30%-kal növeli meg a sejtek replikatív élettartamát. Később más organizmusokban is hasonló hatást fedeztek fel, így például a *C. elegans* fonálféregben (93–95) és *Drosophila* muslicában (96) mutattak ki élettartam-növelő hatást szirtuin túltermelés esetén. Egérben a SIRT1 hipotalamusz-specifikus túltermelése megnövelte az állatok élettartamát, valamint pozitív hatással bírt olyan, az anyagcsere egészségét jellemző jegekre, mint az emelkedett fizikai aktivitás, vagy a javult mitokondriális működés a vázizomban (97). A SIRT1 csendesítése ezzel szemben a bőr öregedésével és csökkent élettartammal járt (98). Noha a SIRT1 teljes testbeli túltermelése nem volt képes reprodukálni a korábban tapasztalt élettartam-növekedést, azonban olyan anyagcsere változásokhoz vezetett, mint az emelkedett glükóz-tolerancia, vagy a toxin-indukált májsejt-károsodással szembeni javult ellenállás (99). Ezek alapján feltehető, hogy a szirtuinok élettartamra kifejtett

hatása elkülöníthető az anyagcsere egészségére kifejtett pozitív hatásaiktól. Emellett kimutatták, hogy a szirtuinok közül a SIRT1 és a SIRT2 is közvetve részt vesz a telomerek megőrzésében a H4 hiszton 16-os lizinjének deacetilációja révén. A SIRT6 szintén részt vesz ebben a folyamatban részben azáltal, hogy deacetiálja a H3 hiszton 9-es (79) és 56-os lizinjét (100). Az olyan stresszerek, mint az oxidatív ágensek által kiváltott károsodások szintén befolyásolják a sejtek élettartamát és egészségét. Mind a SIRT1 (101), mind pedig a SIRT6 (102) esetében kimutatták, hogy szerepet játszanak az efféle hatások által okozott DNS-károsodások kivédésében. Mindezek mellett a SIRT1 azáltal is befolyásolja az öregedés folyamatát, hogy oxidatív stressz hatására fehérje-komplexekeket képez, valamint deacetilálja a FOXO3 transzkripciós faktort, ezáltal meggátolva, hogy az sejthalált indukáljon (103,104).

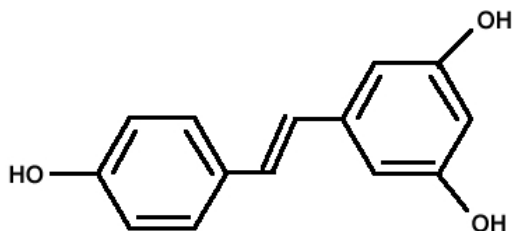
Az emlős szirtuinok közül a SIRT1, a SIRT4 és a SIRT6 rendelkezik *Caenorhabditis elegans* fonálféregben ortológgal. A négy *C. elegans* szirtuin gén közül a *sir-2.1* gén a SIRT1, a *sir-2.2* és *sir-2.3* a SIRT4, míg a *sir-2.4* a SIRT6 ortológja (105). A leginkább tanulmányozott, a *sir-2.1* gén, ami a IV. kromoszómán található egy operonban a glutation-S-transzferáz-jellegű R11A8.5 génnel, a humán SIRT1 ortológja. Zöld fluoreszcens fehérjével fuzionált expressziós markergénnel végzett vizsgálatok szerint elsősorban a neuronokban és faringeális sejtekben expresszálódik, de kimutatták a hipodermiszben is. Korábban nem mutatták ki azonban expresszióját a bélben és az ivarszervek sejteiben (106), azonban ez módosult a későbbiekben, amikor kimutatták éheztetés általi aktivációját a bél- és izomsejtekben is (107).

Éhezéskor, az alacsony energiabevitel hatására fokozódik expressziója. Emellett pozitívan regulálja expresszióját az *ftt-2* nevű chaperon is, mely a 14-3-3 fehérje család tagja. A *sir-2.1* negatívan regulálja többek között a *fat-7*, *sbp-1* és *eat-2* géneket, melyeknek a táplálék-felvételben és az anyagcserében van szerepük. Kimutatták, hogy a SIR-2.1 szabályozni képes az inzulin jelátviteli útvonal effektoraként ismert DAF-16 forkhead transzkripciós faktort (93).

A kalóriabevitel csökkentéséről már több organizmus esetében is kimutatták, hogy meghosszabbítja az élettartamot (108). Korábbi kutatások arra utaltak, hogy ez a hatás a Sir2p fehérje NAD⁺ általi aktivációján keresztül jelenik meg élesztőben (109), a SIR-2.1

ortológ révén *C. elegans*-ban (106) és a dSir2 ortológon át *Drosophila*-ban (96). Alátámasztja ezt az, hogy – amint fentebb olvasható – az általa regulált gének között előfordulnak olyanok is, melyek a táplálkozásban és a táplálék metabolizálásában vesznek részt.

Éppen ezért célozták meg többen, hogy a SIRT1-et farmakológiai úton aktiválják, ezáltal idézve elő az éhezés jótékony hatásait anélkül, hogy ténylegesen éhezni kellene (110). A kezdeti pozitív eredmények sora után azonban felmerültek kétségek is a SIRT1 és élesztő megfelelője, a Sir2 szerepét illetően az öregedésben (111). Egyes kísérletes eredményekből arra lehet következtetni, hogy a kalória csökkentés hatását nem feltétlenül (vagy nem elsősorban) a szirtuin fehérje közvetíti (112,113). Mindazonáltal a szirtuin, mint az élettartam szabályozásában fontos szerepet betöltő fehérje, továbbra is fokozott figyelmet igényel, mivel további tanulmányok mutatták ki egyes élettartam-befolyásoló hatások közvetítésében betöltött szerepét. Feltárták, hogy a *C. elegans* SIR-2.1 fehérje az inzulin-jelpálya érintettsége nélkül szükséges a feromonok által közvetített élettartam-növekedéshez (114), a teljes kalória-megvonás által kiváltott megnyúlt élettartamhoz NAD⁺-függő módon (105), valamint azt is, hogy több aminosav élettartam-növelő hatása is igényli a SIR-2.1 jelenlétét (115).



Resveratrol

6. ábra: A rezveratrol kémiai szerkezete.

A szirtuinok farmakológiás aktiválását megcélzó kutatások során fedezték fel a rezveratrol nevű polifenol fitoalexint (6. ábra), mely a szőlőfélék héjában fordul elő, és az adatok szerint élettartam hosszabbító hatását a SIRT1 ortológokon keresztül fejt ki (116,117). Idővel azonban a rezveratrollal kapcsolatban is felmerültek kétségek, melyeket alátámasztó vizsgálatok szerint megkérdőjelezzük a vegyület élethosszabbító hatása

(118–121). Mindazonáltal Lee és munkatársai a közelmúltban is igazolták a vegyület élettartam-növelő hatását, valamint annak SIR-2.1-függő jellegét (122).

4. Célkitűzések

Doktori munkám középpontjában a Hsp90 hősokkfehérje *Caenorhabditis elegans* ortológja, a HSP-90 szerepének vizsgálata volt a fonálférgék fejlődésében és élettartamuk meghatározásában.

1. A HSP-90 biológiai szerepének vizsgálata *C. elegans* fonálféregben.

- A *hsp-90* gén RNSi általi csendesítésének jellemzése a gén mRNS-szintjére, a termelődött fehérje mennyiségére, valamint a hősokkválaszra kifejtett hatásán keresztül.
- A csendesítés hatásának vizsgálata az állatok fejlődésére és szaporodására morfológiai jellemzés, valamint fertilitás tesztek által.

2. A HSP-90 szerepének vizsgálata az élettartam szabályozásában

- A *hsp-90* csendesítés hatásának vizsgálata a normál és a csökkent ILS által megnövelt élettartamra vad típusú illetve hosszú életű törzsek élettartamának mérése révén.
- Az ILS-re kifejtett hatás potenciális molekuláris mechanizmusának feltárása a lehetséges HSP-90 beavatkozási pontok vizsgálatán keresztül intracelluláris lokalizációt, valamint célgén-expressziót vizsgáló mérések segítségével.

3. A HSP-90 SIR-2.1 fehérje stabilitására kifejtett hatásának vizsgálata a fehérjék mennyiségében a HSP-90 csendesítésének hatására bekövetkező változások követése által.

5. Módszerek

5.1 Törzsek és anyagok

A kísérletekhez használt fonálféreg törzsek mind a Caenorhabditis Genetics Center-ből (University of Minnesota, cbs.umn.edu/cgc/home) származnak. Az állatokat inkubátorban 20°C hőmérsékleten tartottam fenn 60 mm-es Petri csészébe öntött NGM agaron (Nematode Growth Medium, 5 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 6.0, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaCl, 6 mM koleszterin, 2% agar, desztillált H₂O). A tenyésztőlemezeken az állatok számára a szükséges táplálékot az *Escherichia coli* baktérium OP50 variánsa biztosította, melynek egy éjen át 37°C-on növesztett folyadékkultúrájából 200 µl-t pipettáztam egy-egy lemezre, ami száradást követően vált alkalmassá az állatok fenntartására.

A kísérletekhez felhasznált *C. elegans* törzseket az alábbi táblázat tartalmazza:

1. táblázat: A tanulmány során használt *C. elegans* törzsek listája

NÉV	GENOTÍPUS	FŐ JELLEMZŐ
N2	Vad-típus	Vad-típus
VC199	<i>sir-2.1(ok434)</i>	<i>sir-2.1</i> funkcióvesztéses mutáns
SCS003	<i>pkIs1642[unc-119(+)</i> + <i>R11A8.5(+)</i> + <i>sir-2.1(+)</i>]	Alacsony kópiaszámú <i>sir-2.1</i> túltermelő törzs – 6-szorosan visszakeresztezve a háttértörzssel
SCS004	<i>pkIs1641[unc-119(+)]</i>	Az alacsony kópiaszámú <i>sir-2.1</i> túltermelő törzs kontrollja – 6-szorosan visszakeresztezve a háttértörzssel
CF1038	<i>daf-16(mu86)</i>	<i>daf-16</i> deléciós mutáns
CB1370	<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2</i> pontmutáns
e1370/mu86	<i>daf-16(mu86);daf-2(e1370)</i>	<i>daf-16/daf-2</i> kettős mutáns
TJ356	<i>daf-16p::daf-16a/b::GFP</i> + <i>rol-6</i>	DAF-16a/b::GFP fúziós fehérjét kifejező törzs
HT1888	<i>daf-16(mgDf50); unc-119(ed3);</i> <i>lpIs12 [daf-16a::RFP</i> + <i>unc-119(+)]</i>	DAF-16a::RFP-t kifejező, <i>daf-16</i> mutáns háttérű törzs

HT1889	<i>daf-16(mgDf50); unc-119(ed3); lpIs14 [daf-16f::GFP + unc-119(+)]</i>	DAF-16f::GFP-t kifejező, <i>daf-16</i> mutáns háttérű törzs
HT1881	<i>daf-16(mgDf50); daf-2(e1370); unc-119(ed3); lpIs12 [daf-16a::RFP + unc-119(+)]</i>	DAF-16a::RFP-t kifejező, <i>daf-16/daf-2</i> kettős mutáns törzs
HT1883	<i>daf-16(mgDf50); daf-2(e1370); unc-119(ed3); lpIs14 [daf-16f::GFP + unc-119(+)]</i>	DAF-16f::GFP-t kifejező, <i>daf-16/daf-2</i> kettős mutáns törzs
GR1307	<i>daf-16(mgDf50)</i>	<i>daf-16</i> deléciós-inszerciós mutáns
HT1890	<i>daf-16(mgDf50); daf-2(e1370)</i>	<i>daf-16/daf-2</i> kettős mutáns
CF1371	<i>[daf-16(mu86); daf-16aAM::GFP/bKO + rol-6(su1006)]</i>	konstitutívan nukleáris DAF-16aAM::GFP-t kifejező törzs
KB6	<i>rle-1(cxTi510)</i>	<i>rle-1</i> transzpozon inzerciós mutáns
DAF-16A/ rle-1	<i>daf-16(mgDf50); unc-119(ed3); lpIs12 [daf-16a::RFP + unc-119(+)]; rle-1(cxTi510)</i>	DAF-16a::RFP-t kifejező, <i>daf-16</i> és <i>rle-1</i> mutáns háttérű törzs
TU3335	<i>lin-15B(n744) X; uIs57 [unc-119p::YFP + unc-119p::sid-1 + mec-6p::mec-6]</i>	Neuronálisan is RNAi-érzékeny törzs.

5.2 A törzsek tisztán tartása

A táptalaj, a táplálékul szolgáló baktériumok és a *C. elegans* törzsek alkototta kísérleti modellkörnyezetet esetleg megzavaró hatások kizárása rendkívül fontos a kísérletezés során. Ezért különösen figyelni kell a törzsek tisztán tartására. A veszélyt elsősorban a bakteriális és gomba-jellegű szennyeződések okozzák. Amellett, hogy a megjelenő organizmusok kiszámíthatatlan hatásokat fejthetnek ki, jelenlétük gyakorlati szempontból is megnehezítheti a munkát. A szennyeződések eltávolítására kétféle módszert alkalmaztam:

5.2.1 Átpakolásos tisztítás

Ennek során a szennyezett lemezről platinatű, vagy spatula segítségével állatokat pakoltam át egy tiszta lemez egyik szélére. Ahogyan az állatok a lemez másik szélé felé másznak, a baktériumpázsit, amin áthaladnak, és ami táplálékul szolgál nekik, kívül és belül is lemossa róluk a szennyeződések, fertőzéseket. A folyamatot szükség esetén

többször is meg kell ismételni, míg biztosak nem lehetünk benne, hogy hátrahagyunk minden szennyező ágenst.

5.2.2 Eggprep

Ez a módszer a leginvaszívabb, de egyben leghatékonyabb tisztítási módszer. Első lépésben olyan állapotú lemezekre volt szükség, melyeken sok fiatal felnőtt, petékkel teli hermafrodita található. Ekkor frissen elkészítettem a szükséges reagenst, ami 5 N NaOH és 5%-os nátrium-hipoklorit 1:2 arányú keveréke. Az állatokat 1-2 ml steril vízzel mostam 15 ml-es Falcon csövekbe pipetázással. Az úrtartalmat 3,5 ml-re egészítettem ki. A reagens oldatunkból 1,5 ml-t adtam a csövekhez. Többszörös rázás mellett 10 percig hagytam az állatokat az oldatban, majd lecentrifugáltam a csöveket, a felülúszót leöntöttem és 5 ml-re egészítettem ki a térfogatot steril vízzel. Újabb rázást követően megismételtem a centrifugálási lépést, majd üvegpipetta használatával a leülepedett pelletet üres, tiszta, baktériumpázsittal rendelkező NGM lemezre pipetáztam. Az eljárás eredményeként mind a gravid állatok, mind pedig a bakteriális, vagy gomba fertőzések megsemmisülnek, míg a peték épen maradnak, s így tiszta populáció kelhet ki belőlük.

5.3 MG132 tartalmú lemezek

A proteaszóma-gátlót alkalmazó kísérleteimnél az RNS interferenciához szükséges IPTG-vel és Ampicillinnel kiegészített lemezekhez további anyagként végkoncentrációban 10 μ M MG132-t adtam DMSO-ban oldva (1% V/V), illetve kontrollként tiszta DMSO-t.

5.4 Keresztezések

5.4.1 A *daf-2* és *daf-16* kettős mutáns létrehozása

A *daf-2(e1370);daf-16(mu86)* kettős mutáns törzs létrehozása során kereszteztem a CB1370[*daf-2(e1370)*] és CF1038[*daf-16(mu86)*] mutáns törzseket. Ehhez 1 óra 35°C hőszokknak vettem alá késői L4-es lárvakorú hermafroditákat a *daf-16* mutáns törzsből, majd az ennek hatására az utódgenerációban keletkező hímek segítségével stabil, sok hímeket tartalmazó „keresztező” populációt hoztam létre és tartottam fenn. A kapott hímek által megtermékenyített *daf-2* mutáns hermafroditák utódai az F1 generációban mindkét génre nézve heterozigóták voltak. Az F1 állatok önmegtermékenyítés révén létrejött F2

utódai közül allélspecifikus PCR segítségével választottam ki azokat, melyek mind a két génre nézve homozigóta formában hordozták a mutáns allélt.

5.4.2 A *daf-16a::rfp* transzgenikus és *rle-1* mutáns törzsek összekeresztzése

A *DAF-16A::RFP;rle-1(cxTi510)* kettős mutánst a HT1888: *daf-16(mgDf50); unc-119(ed3)*; *lpIs12 [daf-16a::RFP + unc-119(+)]* és a KB6[*rle-1(cxTi510)*] törzsek keresztezésével hoztam létre. Az F2 generáció genotípusát allél-specifikus PCR-rel követtem, valamint fluoreszcens mikroszkópiával szelektáltam RFP-pozitív utódokra.

A PCR reakciókhoz használt primereket az alábbi táblázatban mutatom be:

2. táblázat: A tanulmány során a keresztezésekhez használt primerek listája

NÉV	SZEKVENCIA
<i>daf-2wt_FW</i>	5'-CCTCATCATTACTCAAACCAATATATGG-3'
<i>daf-2mt_RV</i>	5'-GTTACACTCGGTGCTCAGT-3'
<i>daf-16FW</i>	5'-ATTGTGTTTCATTTGCCCCGC-3'
<i>daf-16RV</i>	5'-GAAGGGAGCCCATCAATGCTC-3'
<i>rle-G5</i>	5'-CAGAATGGGATACTCGTCGGATGCTCC-3'
<i>rle-G3</i>	5'-GTTGTTACGTTGGAGTACACTGGGGTTTGTC-3'
<i>Tc5</i>	5'-GGATCATCTGTAACCTATCCTCTATCG-3'
<i>S510</i>	5'-CATGAGGATACCTCGATGC-3'

5.5 RNS interferencia

Caenorhabditis elegans fonálféregben az RNS interferencia általi géncsendesítés leggyakrabban alkalmazott módszere az úgynevezett “feeding” eljárás. Ennek során az állatok táplálékául használunk olyan baktériumot, ami termeli a megcélzott gén csendesítésére alkalmas kis kettős szálú RNS-eket. A HT115(DE3) jelölésű *E. coli* törzset használtuk erre a célra. Ez a baktériumtörzs tartalmazza az L4440 nevű plazmid vektort, amibe szükség szerint inzertálható a célnak megfelelő DNS-szakasz. Kísérleteim során a *hsp-90* és a *daf-2* gének csendesítésére használtam RNSi baktériumokat. A *sir-2.1(RNSi)* baktérium törzs az Ahringer RNAi könyvtárból származik, a *hsp-90(RNSi)* baktériumok (123) Eileen Devaney (University of Glasgow, Egyesült Királyság) laboratóriumából származnak. Ezek a *hsp-90* gén egy 74 bázispáros és egy 294bp-os szakaszát tartalmazták az L4440 vektorba illesztve. A *daf-2(RNSi)* baktériumot (124) a Vellai laboratóriumban

(Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország) hozták létre a *daf-2* gén 1204bp-os szakaszának L4440 vektorba történő klónozásával. A törzsek előállításánál során használt primereket az alábbi táblázat tartalmazza:

3. táblázat: A használt RNSi törzsek létrehozásához használt primerek listája

NÉV	SZEKVENCIA
<i>sir-2.1(RNSi)_FW</i>	5'- TGTTCTGCAGCTTTACATTTTCA-3'
<i>sir-2.1(RNSi)_RV</i>	5'- ATATGATGGGAATGAGATTCGTG-3'
<i>daf-2(RNSi)_FW</i>	5'- TTGGAAGCTCTCGGAACAACCAC-3'
<i>daf-2(RNSi)_RV</i>	5'- ATGAACGACGTTGAAGGAGAAGG-3'
<i>hsp-90(RNSi)75bp_FW</i>	5'- CTGCTGTTCCATCATCG-3'
<i>hsp-90(RNSi)75bp_RV</i>	5'- CTCCTCCATGCGGGAAG-3'
<i>hsp-90(RNSi)300bp_FW</i>	5'- ATCAACCCAGACCACGCTATCATGAAG-3'
<i>hsp-90(RNSi)300bp_RV</i>	5'- TTAGTCGACCTCCTCCATGCG-3'

Az RNSi kezelés a feeding eljárás hagyományos leírása alapján történt (125): az RNSi-t hordozó *E. coli* törzseket 100µg/ml ampicillint tartalmazó LB médiumban növesztettem egy éjszakán át. Az állatok olyan lemezekre nőttek, melyek az tenyésztőlemezek szokásos összetételén túl tartalmaztak 1 mM IPTG-t, 50 µg/ml ampicillint és 6,25 µg/ml tetraciklint. Ezekre a lemezekre cseppentettem 200 µl-t a szükséges RNSi baktériumkultúrából, illetve a kontrollként szolgáló, üres L4440 plazmidot tartalmazó HT115 törzsből. Petekortól történő kezelés esetén a száradást követően anyaállatokat helyeztem ki a lemezekre, majd 4 órányi peterakást követően eltávolítottam őket, s a lerakott petékből kikelt utódokkal végeztem a kísérleteimet. L4-es stádiumtól történő kezelés esetén az állatok csak a megfelelő lárvastádium elérését követően kerültek RNSi lemezre, majd 2 nap elteltével végeztem a méréseimet velük. A megfelelő RNSi dózis biztosítása érdekében azon kísérletek során, ahol kettős RNSi kezelést is alkalmaztam, az egyes RNSi kezeléseket esetén a csendesítő és a kontroll baktériumtörzs 1:1 arányú keverékét használtam.

5.6 Élettartam-mérések

Minden élettartam-mérést 20°C-on végeztem. Az állatok szinkronizált populációját azáltal hoztam létre, hogy felnőtt anyaállatokat helyeztem ki a szükséges RNAi, vagy

NGM lemezekre, majd 4 órán át tartó petézést követően eltávolítottam őket. Az így felnőtt utód-populáció azonos korú állatokból állt, melyek így a fiatal felnőttkor elérése után alkalmasak voltak a mérésre.

Átlagosan 35-35 állatot helyeztem ki a kísérlethez használt lemezekre, melyek a mérés által megkövetelt szükséges vegyszerek mellett 51 μM 5-fluoro-dezoxiuridint (FUDR, Sigma-Aldrich) is tartalmaztak annak érdekében, hogy megakadályozzuk az állatok szaporodását, ami jelentősen zavarta volna a mérés elvégzését. Kondícióként 3-3 lemezen történtek a mérések – így hozzávetőlegesen 100 állatot használva. Az állatok FUDR-os lemezekre történő kihelyezésének napját tekintetem nulladik napnak. A mérés hetedik napjától kezdve kétnaponta számoltam meg az élő és holt állatokat, melyek között a platinakaccsal történő érintésre adott válaszuk, vagy annak hiánya alapján tettem különbséget. Azon állatokat, melyek bemásztak az NGM agar belsejébe, vagy a lemez falára, illetve amelyek vulva repedés következtében haltak meg, cenzúrázottak vettem, s nem képezték a mérés részét. Minden élettartam-mérést három független alkalommal végeztem el.

5.7 Termotolerancia

20°C-on szinkronizált populációból 30-30 fiatal felnőtt állatot helyeztem ki 3-3 lemezre kondícióként. Az ehhez használt lemezeket előzetesen 35°C-ra melegítettem elő inkubátorban. Hat órányi hősokkot követően a lemezeket visszahelyeztem a 20°C-os inkubátorba, majd 5 óra után számoltam meg a túlélő és halott egyedeket az élettartam-méréseknél részletezett eljárás szerint. Ettől a ponttól kezdve naponta újra megszámláltam az állatokat – 24, 48 és 72 óra után. A termotolerancia méréseket három független alkalommal végeztem el. A statisztikai kiértékelés során a különböző kondíciókat hasonlítottam össze kétmintás t-próba segítségével, hogy meghatározhassam a mért különbségek szignifikancia-szintjét. Ilyen mérés csupán a 7./g ábrán látható.

5.8 Fluoreszcens mikroszkópia

A méréshez előkészületként elkészítettem a szükséges tárgylemezeket, melyekre 2%-os agarózt cseppenttem, majd 90°-os szögben egy másik tárgylemezt helyeztem rá, s dermedést követően szétválasztottam őket. A tárgylemezekre 15 μl M9 oldatot (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl , 1 ml 1 M MgSO_4 , desztillált víz 1 liter térfogathoz.

Autoklávozással történő sterilizálás) pipettáztam, ami tartalmazott 25 mM NaN₃-at az állatok immobilissá tétele érdekében. Az ábraleírásoknál részletezett kezeléseket követően kondícióként legalább 50 állatot helyeztem a cseppekbe. A képeket Leica DMI6000B epifluoreszcens mikroszkóp és DFC480 kamera vagy Nikon Eclipse E400 mikroszkóp és Diagnostic Instruments SPOT model 1.5.0 kamera segítségével készítettem GFP vagy RFP fluoreszcens filterek használatával. Az epifluoreszcens képek reprezentatívak három független kísérletre.

A DAF-16 fluoreszcens törzsek esetén az állatokat három diszkrét kategóriába soroltam: a ‘sejtmagi’ jelző arra utal, hogy a lefényképezett állatok esetében kifejezetten nukleárisan lokalizálódott a fehérje, a ‘köztes’ jelző olyan állatokat jelöl, melyekben egyaránt megfigyelhető volt a fluoreszcens jel nukleárisan és citoszolikusán, végül pedig a ‘citoszolikus’ azt jelenti, hogy az állatokban nem figyelhető meg nukleárisan lokalizálódó fluoreszcencia (126,127).

5.9 mRNS expresszió analízis

Jóltáplált, szinkronizált, fiatal felnőtt korú fonálféreg populációból izoláltam mRNS-t a GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) használatával. Az így kapott mRNS-t RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) segítségével írtam át cDNS-sé. A génexpressziós vizsgálatokat ABI 7300 Real-time PCR készülékkel, Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) használatával végeztem. A relatív mRNS mennyiségeket a kapott, aktinra normalizált Ct értékek összehasonlításával értékeltem ki. Mindegyik kísérlet három független alkalommal lett elvégezve. Az így kapott ddCt értékeket a normalizálás érdekében kettes alapú logaritmusukra transzformáltam és ANOVA-val hasonlítottam össze. Az egyes génekhez használt primerek szekvenciáit az alábbi táblázat tartalmazza:

4. táblázat: A tanulmány során a qRT-PCR mérésekhez használt primerek listája

NÉV	SZEKVENCIA
<i>actin_FW</i>	5'-ATCACCGCTCTTGCCCCATC-3'
<i>actin_RV</i>	5'-GGCCGGACTCGTCGTATTCTTG-3'
<i>hsp-90_FW</i>	5'-TCAGTTCGGAGTCGGATTCT-3'

<i>hsp-90_RV</i>	5'-CGACCTCTCCCTCCTTCTTC-3'
<i>sod-3_FW</i>	5'-CAAAGCTTGTTCAACCGGTTGC-3'
<i>sod-3_RV</i>	5'-CCTCGTGAAGTTTCTCCTCGATCTG-3'
<i>old-1_FW</i>	5'-TTCGCTGAGAAGAATTCCACGATC-3'
<i>old-1RV</i>	5'-GATCTGTTTGCCCGGAGTTCTC-3'
<i>scl-1_FW</i>	5'-CAATCAAGCATTGTGGATGC-3'
<i>scl-1_RV</i>	5'-GGAATCCACGACCATTTTCC-3'
<i>scl-20_FW</i>	5'-GTTCGCTGGATAAATATGCC-3'
<i>scl-20_RV</i>	5'-ACTCTTGGTTCTTCCATCCG-3'
<i>lea-1_FW</i>	5'-ATGTAGAGAACAAAGCAGCAG-3'
<i>lea-1_RV</i>	5'-CCTTGTCCCTTGGTCTTGTC-3'
<i>gst-20_FW</i>	5'-TTCTAGACAGCTCTTCGCC-3'
<i>gst-20_RV</i>	5'-TTTGGAGTCCCGAACTGAG-3'
<i>col-183_FW</i>	5'-CCTGGAAACGATGGACAACC-3'
<i>col-183_RV</i>	5'-GTCCTCCAGCAGATCCACTT-3'
<i>R05D8.7_FW</i>	5'-TGATGTTTTGGTGAACAATG-3'
<i>R05D8.7_RV</i>	5'-TTACGATCCGCCAGGAATAG-3'

5.10 Fehérjeszint meghatározás

10 cm-es IPTG-t tartalmazó NGM lemezen szinkronizált populációkat növesztettem üres vektort, vagy *hsp-90(RNSi)*-t tartalmazó baktériumot használva táplálékul. Az állatokat M9 oldattal Eppendorf csövekbe mostam, majd három további mosási lépést követően lefagyasztottam a mintákat -80°C-on. Felengedés után 200 µl lízis puffert adtam hozzájuk (50 mM Tris-HCl, 0.25% SDS, 1% Igepal, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2x Complete (Roche) desztillált vízben pH 7,4). A proteaszóma-gátlót (MG132) alkalmazó mérések esetén 6 M urea is részét képezte a lízis puffernek a potenciális aggregátumok feloldása érdekében. Három fagyasztás-olvasztás ciklust követően a mintákat szonikáltam, majd 10 perc 10000 g-s centrifugálás után a felülúszót új Eppendorf csövekbe helyeztem át és BCA fehérje-koncentráció meghatározást követően felhasználásig -20°C-on tároltam. A mintákat 12%-os poli-akrilamid gélen futtattam meg, majd nitrocellulóz membránra transzferáltam. A blokkolás 5% tejport tartalmazó TBS-T-ben történt 1 órán át szobahőmérsékleten. A használt elsődleges antitestek a SIR-2.1

(nyúlban termelt poliklonális Anti-SIR-2.1, 1:1000 TBS-T-ben 5% BSA-val) (128) és a HSP-90 (129) (nyúlban termelt poliklonális Anti-HSP-90, 1:2000 TBS-T-ben 5% BSA-val) voltak. Másodlagos antitestként torna-peroxidázzal jelölt anti-nyúl (1:2000) ellenanyagot (Dako) használtam. A membránokat ECL reagenssel (GE Healthcare) inkubáltam 1 percig, majd a fehérjék jelét röntgenfilm segítségével hívtam elő. A felvitt fehérje-mennyiségek normalása érdekében Ponceau festést alkalmaztam a membránokon.

5.11 Dauer-fenotípus vizsgálat

Kondícióként és törzsenként 10-10 felnőtt állatot petézni hagytam NGM lemezeken 4 órán át. Az anyák eltávolítása után a lemezeket 25°C-os inkubátorba helyeztem és az utódokat növekedni hagytam a kikeléstől számított harmadik napig. Ekkor történt az utód-populációból a dauer fenotípust mutató és nem mutató állatok megszámlálása.

5.12 Morfológiai jellemzés

10 felnőtt állatot 1 órán át hagytam petézni üres vektort (EV) illetve hsp-90(RNSi)-t tartalmazó baktériummal oltott lemezekre annak érdekében, hogy erősen szinkronizált populációt nyerjünk. A lemezeket 20°C-on inkubáltam, majd három nap után figyeltem meg a fenotipikus különbségeket. A képeket Nikon Eclipse E400 mikroszkóppal készítettem Diagnostic Instruments SPOT model 1.5.0 kamera használatával.

5.13 Fertilitás vizsgálat

Kondícióként és törzsenként 10 L4 hermafroditát helyeztem külön lemezekre egyesével. A lemezeket 20°C-on inkubáltam. Az állatokat új lemezre pakoltam át 24 óránként. Az utódokat 48 óra elteltével azokon a lemezeken számoltam le, melyekről az anyákat átpakoltam új lemezekre. A mérést addig folytattam, míg az utolsó állat is felhagyott a peterakással.

5.14 Statisztikai analízis

A élettartam mérések statisztikai kiértékelését SPSS 15.0 szoftverrel (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) végeztem. A túlélési görbéket Kaplan-Meyer eljárással, log-rank teszt segítségével hasonlítottam össze. A génexpressziós, valamint az intracelluláris lokalizációs adatokat ANOVA segítségével hasonlítottam össze Fisher Least Significant

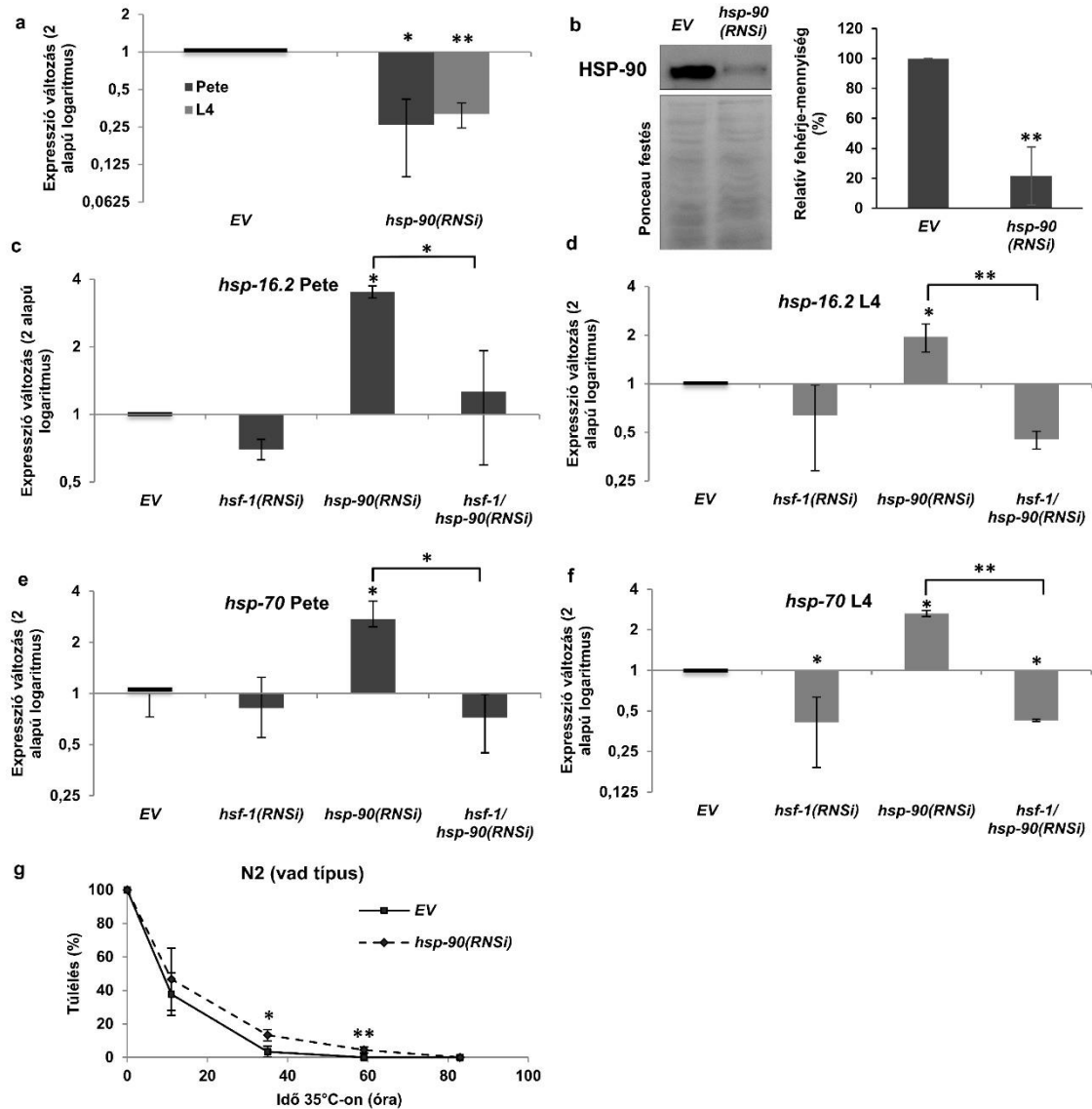
Difference (LSD) módszerét használva. A változókat az átlagérték és szórás révén fejeztem ki. Az eredményül kapott szignifikancia határértékeket a következőképpen határoztam meg: *:p<0,05, **:p<0,01 és ***:p<0,001.

6. Eredmények

6.1 A HSP-90-csendesítés hatásának jellemzése

6.1.1 A *hsp-90* csendesítése csökkenti a HSP-90 fehérje-expressziót, valamint indukálja a hősokk-választ

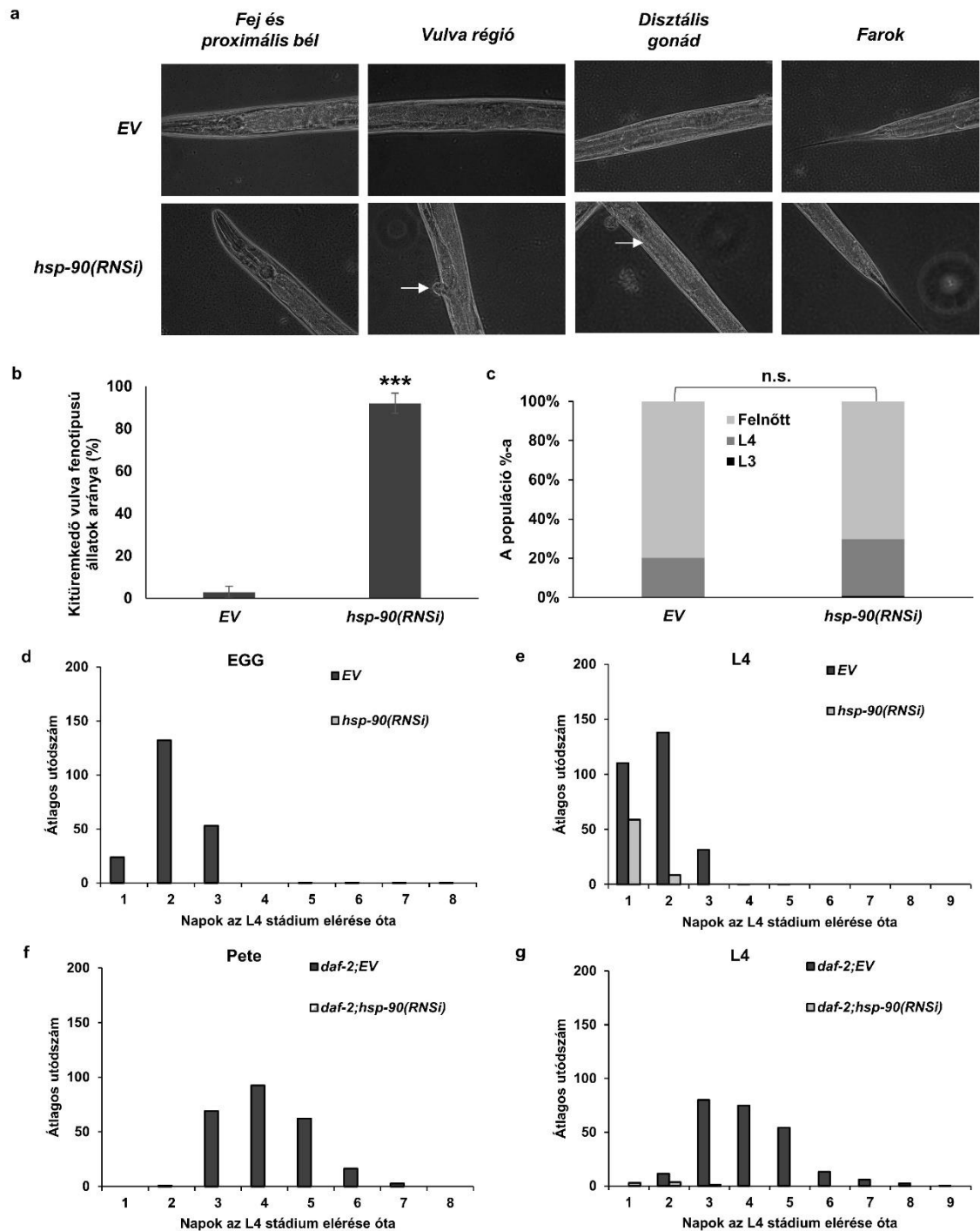
Ismert irodalmi adatokra támaszkodva felvettem, hogy a HSP-90 fehérje funkcionalitásának akadályozása csökkent HSP-90 kapacitáshoz vezet, mely révén vizsgálhatóvá válik az élőlény életében betöltött szerepe, s ami a hősokk-választ indukcióját okozza (130,131). Annak érdekében, hogy megvizsgálhassam a csökkent HSP-90 kapacitás hatását az élettartamra, egy korábban leírt *hsp-90(RNSi)* konstruktot alkalmaztam (123). A HSP-90 sejtosztódásban és fejlődésben betöltött központi szerepének megfelelően (28) a szülői F0 generáció *hsp-90(RNSi)*-vel történt kezelése embrionális és korai lárvális letalitást vált ki az F1 generációban egy tanulmány (41) szerint, míg steril, fejlődési rendellenességeket mutató F1 állatokhoz vezetett egy másik tanulmány szerint (123). A HSP-90 lárvális fejlődésre kifejtett hatását vizsgálandó, már a kikeléstől fogva alkalmaztam a *hsp-90* csendesítését. A *hsp-90(RNSi)* hatékonyan csökkentette a *hsp-90* mRNS és fehérje mennyiségét fiatal felnőttekben az üres vektorhoz (EV) viszonyítva (7./a és b ábra). A vulva-fejlődésben és izomműködésben betöltött ismert szerepével egyetértésben (123,132), a *hsp-90(RNSi)*-vel táplált állatok ~90%-a kitüremkedő vulva fenotípust mutatott, valamint enyhe hipomotilitást is, azonban más egyéb fejlődési rendellenességet nem (8./a ábra). Hasonlóképp, a *hsp-90* kikeléstől történő csendesítése nem akasztotta meg a lárvális fejlődést, és jelentős lassulásához sem vezetett (8./c). Ezen megfigyelések jelzik, hogy a *hsp-90* kikeléstől történő csendesítése nem okoz lárvális letalitást, vagy fejlődésbeli abnormalitásokat (41), eltekintve természetesen a vulva-fejlődés megzavarásától az L4-es lárvastádium során (133).



7. ábra: A HSP-90 csendesítése csökkenti a *hsp-90* mRNS és fehérje expressziót és indukálja a hőszokk-választ. A *hsp-90(RNSi)* hatására csökken a *hsp-90* mRNS (a) és fehérje (b) szintje. Fiatal felnőtt állatokból készült lizátumok Western Blotja. A statisztikai adatok megtalálhatóak a 6. táblázatban. A *hsp-90(RNSi)*-t kikeléstől (c, e) vagy az L4 stádium elérésétől (d, f) alkalmazva a *hsp-16.2* (c-d) és *hsp-70* (*C12C8.1*) (e-f) mRNS szintjei indukálódtak nem hőszokkolt körülmények között is *hsf-1*-függő módon, valamint megnövelte a hőszokkot követő túlélést is (g). A termotolerancia adatok megtalálhatóak a 7. táblázatban. Az mRNS expressziót qRT-PCR-rel mértem és β -actin mRNS-re normalizáltam. Az oszlopdiagramok a kettes alapú logaritmusra transzformált átlagos expresszió változást mutatják sztandard

hibával a megfelelő EV kontrollhoz viszonyítva, melyet 1-nek vettem. Megjegyzem, hogy a hibasávok asszimmetrikus jellege a logaritmusos skála következménye. Az itt bemutatott adatok három független kísérletből származnak. A qRT-PCR statisztikát ANOVA segítségével analizáltam és az értékek megtalálhatók a 8. táblázatban. A túlélési adatokat Student t-tesztel hasonlítottam össze. EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001.

Annak érdekében, hogy elkülöníthessük a lárvális fejlődés, valamint a felnőttkor alatti HSP-90 hatást, az állatokat oly módon is kezeltem *hsp-90(RNSi)*-vel, hogy csupán az L4-es lárvastádium elérése után kerültek az RNSi lemezekre. Mint várható volt, a kitüremkedő vulva fenotípus ezúttal nem jelent meg. A petesejt-termelésben, valamint az embrionális fejlődésben betöltött fontos szerepének megfelelően a *hsp-90* petekortól való csendesítése sterilitást okozott, melyhez a gonád-régióban petesejt-hiány is társult, azonban L4-es kortól kezelve csupán csökkent utódszámot okozott olykor embrionális letalitással (8./d-e ábra). A fertilitás-vizsgálatok független replikációját Gecse Eszer kollégám végezte. Az általa végzett kísérleteket a Függlék statisztikai adatokra vonatkozó részében is jelölöm. A *hsp-90* petekortól, vagy L4-es kortól való csendesítése egyaránt *hsf-1*-függő *hsp-16.2* és *hsp-70* mRNS expresszió növekedést váltott ki fiatal felnőttekben (7./c-f ábra), egyetértésben a hősokkválasz kompenzáló aktivációjával a csökkent HSP-90 fehérjeszint hatására (130). Emellett megfigyeltem egy kis mértékű, de szignifikáns emelkedést a fiatal felnőtt állatok hősokk alatti túlélésében is, amennyiben azok pete koruktól *hsp-90(RNSi)*-vel voltak kezelve (7./g ábra), ami megnövekedett stressz-rezisztenciát tükröz, melyet összefüggésbe hoztak a hosszú élettel és az egészséges öregkorral is (46).



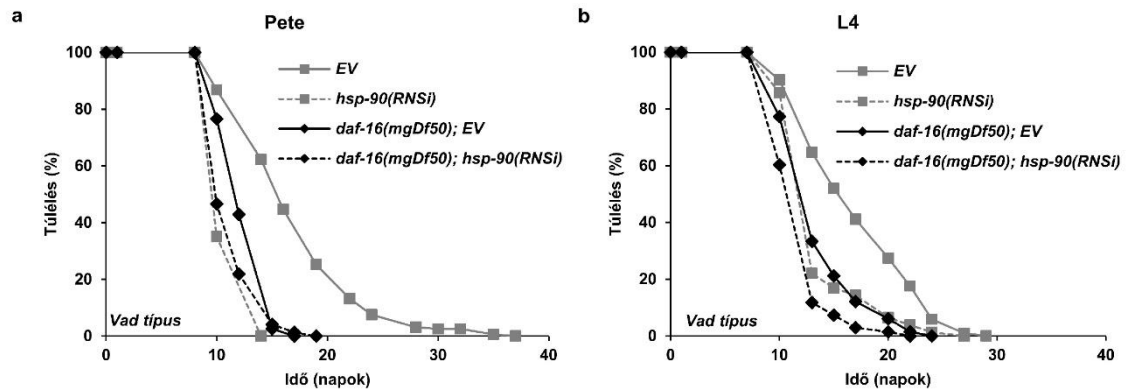
8. ábra: A HSP-90 csendesítésének hatása a vad típus fejlődésére, valamint a vad és *daf-2* mutáns állatok fertilitására. A *hsp-90(RNSi)* kitüremkedő vulva fenotípust okoz (a, fehér nyíl és b, $p < 0,001$), valamint gátolja a petesejt termelést (a, fehér nyíl), azonban egyéb morfológiai rendellenesség nem volt megfigyelhető (a és c, $p = 0,123$). A fenotípusos adatokat Student t-teszt alkalmazásával kasonlítottam össze SPSS 15.0 szoftverben. Az oszlopok a

fenotípus átlagos gyakoriságát mutatják, míg a hibasávok az átlag sztandard hibáját fejezik ki. Kikeléstől alkalmazva a *hsp-90(RNSi)* sterilitáshoz vezet (d és f; Pete), míg az L4-es stádium elérésétől (e és g; L4) csökkenti az utódszámot a vad típusú N2 (d és e) és *daf-2(e1370)* (e és f) mutánsban egyaránt. A termékenységi adatokat a 10. táblázat tartalmazza.

Ezek alapján a *hsp-90(RNSi)*, alkalmazzuk akár a lárvális fejlődés során, vagy azt követően, biztonságos módszernek bizonyult a HSP-90 kapacitás csökkentésére anélkül, hogy veszélyeztetnénk az állatok fejlődését, illetve egészségét.

6.1.2 A HSP-90 kapacitás csökkenése korlátozza a normális élettartamot

Ezután azt a kérdést vizsgáltam meg, vajon a HSP-90 kapacitásának csökkenése petekortól, vagy a lárvális fejlődés végétől alkalmazva miként befolyásolja a vad típusú állatok természetes élettartamát. Elsőként megmértem a vad típusú N2 férgek élettartamát üres vektort, illetve *hsp-90(RNSi)*-t tartalmazó baktériumon tartva az egész életük folyamán. Eredményeim alapján a *hsp-90(RNSi)* ~27%-kal csökkentette az állatok élettartamát az EV-hoz képest (9./a ábra). A *hsp-90(RNSi)* kisebb mértékben ugyan, de továbbra is szignifikáns élettartam-csökkenéshez vezetett akkor is, ha a kezelést csak az L4-es stádiumtól végeztem az állatok felnőttkorán át (9./b ábra). A *hsp-90(p673)* funkciónyeréses allél az irodalmi adatok alapján leginkább azon keresztül csökkenti az élettartamot, hogy az állatokat úgynevezett „bagging” fenotípusúvá teszi, ahol a halál peterakási defektusból ered, melynek következtében az anyaállaton belül kelnek ki az utódok – ezzel a halálát okozva (44). Nem figyeltem meg „bagging” fenotípust és ebből fakadó idő előtti elhalálozást *hsp-90*-csendesített populációban. Az a tény, hogy a *hsp-90* csendesítés a fejlődés során és után alkalmazva egyaránt hasonló mértékű élettartam-csökkenéshez vezet arra utal, hogy a *hsp-90* a peterakástól és a fertilitástól függetlenül befolyásolja a túlélést (8./d-e ábra). Az, hogy az állatok élettartama csökkent, noha indukálódott bennük a hősokk-válasz, mely előre jelzi és előidézi a hosszú élettartamot (134,135) annak a következménye lehet, hogy optimális HSP-90 kapacitás hiányában több különböző, a túlélést elősegítő mechanizmus is kárt szenvedhet egyidejűleg.

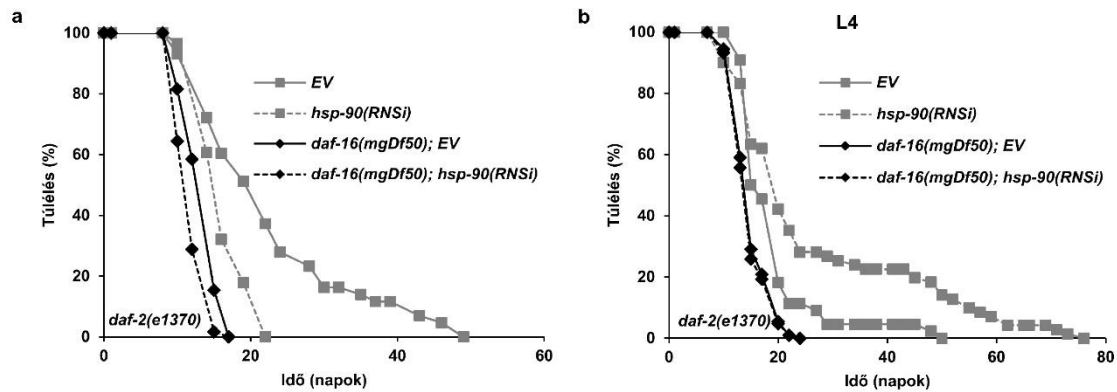


9. ábra: A HSP-90 szükséges a normál élettartamhoz. A kikeléstől (a) vagy L4-es kortól (b) alkalmazott *hsp-90(RNSi)* a *daf-16(mgDf50)* mutáns szintjére csökkenti le a vad típus élettartamát ($p < 0,001$ és $p < 0,001$). Az élettartam méréseket háromszor végeztem el. A túlélési görbéket Kaplan-Meyer log rank teszttel hasonlítottam össze. Az élettartam értékek megtalálhatóak az 5. táblázatban. EV: üres vektor RNSi.

6.2 A HSP-90 hatása a csökkent ILS által indukált élettartam szabályozására

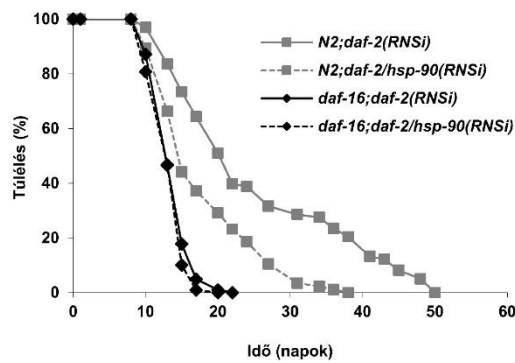
6.2.1 A *hsp-90* a lárvális fejlődés során szükséges a csökkent ILS által kiváltott megnövekedett élettartamhoz

Az inzulin jelátviteli útvonal aktivitásának csökkentése az egyik leghatékonyabb és több modellrendszerben is igazolt élettartam-növelő hatás (54). Ennek okán hasonlítottam össze a *daf-2(e1370)* és *daf-2(e1370);daf-16(mgDf50)* egyszeres és kétszeres mutáns állatokat üres vektort, vagy *hsp-90(RNSi)*-t tartalmazó baktériumon növesztve. Az irodalmi adatoknak megfelelően a *daf-2* mutációja jelentős mértékű növekedést okozott az élettartamban a vad típushoz viszonyítva, melyet a *daf-16* elvesztése teljesen visszacsökkentett (10./a ábra) (69,106,136). A *hsp-90(RNSi)* kezelés petekortól történő alkalmazása mellett lecsökkent a *daf-2(e1370)* mutáns férgek élettartama, arra utalva, hogy a HSP-90 szükséges a csökkent ILS által kiváltott megnyúlt élettartam teljes megjelenéséhez.



10. ábra: A HSP-90 szükséges a csökkent ILS által kiváltott hosszú élettartamhoz is. A *daf-2(e1370)* allél szignifikánsan megnöveli a vad típusú *daf-16* génnel rendelkező férgek élettartamát ($p < 0,001$), de nem tesz így a *daf-16(mgDf50)* mutánsok esetén ($p = 0,958$). A kikeléstől alkalmazott *hsp-90(RNSi)* (a) csökkenti, azonban az L4-es kortól alkalmazott (b) nem változtatja meg szignifikánsan a *daf-2(e1370)* mutánsok élettartamát ($p = 0,001$ vs. $p = 0,076$). Hasonlóképpen, a *hsp-90(RNSi)* kezelés kikeléstől csökkenti, de L4-es kortól alkalmazva nem befolyásolja a *daf-2(e1370); daf-16(mgDf50)* kettős mutánsok élettartamát ($p < 0,001$ és $p = 0,435$ az a és b paneleken). Az élettartam méréseket háromszor végeztem el. A túlélési görbéket Kaplan-Meyer log rank teszttel hasonlítottam össze. Az élettartam értékek megtalálhatóak az 5. táblázatban. EV: üres vektor RNSi.

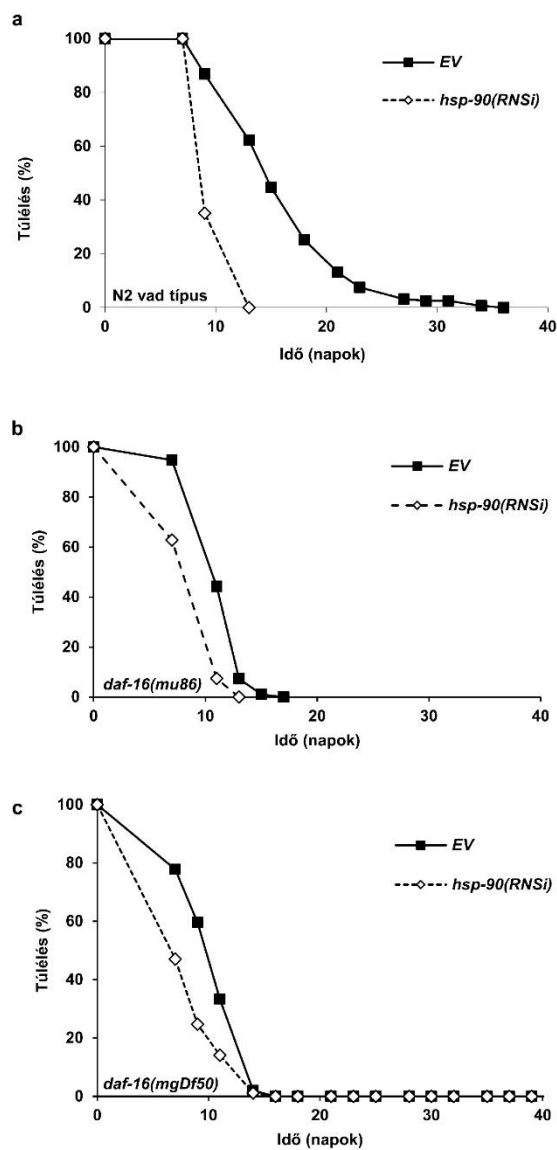
Lehetséges, hogy a *hsp-90(RNSi)* részleges hatása annak tudható be, hogy a dupla szálú RNS nem képes bejutni a neuronokba, melyekből hiányzik az ehhez szükséges SID-1 fehérje (137). Ennek a lehetőségnek a megvizsgálása érdekében RNS interferenciát alkalmaztam a *daf-2* gén csendesítésére is a *hsp-90*-nel kombinált formában. A vad típusú állatok élettartama ~100%-kal nőtt a *daf-2(RNAi)/EV* kezelés hatására ahhoz képest, ha csupán üres vektort tartalmazó baktériummal tápláltam őket (11. ábra) – ez a hatás teljesen hiányzott *daf-16(mu86)* mutáns háttéren. Ismét 20-50%-os részleges csökkenést tapasztaltam a *daf-2*-csendesített állatok élettartamában, amennyiben a *hsp-90*-et is csendesítettem bennük, ami hasonló mértékű, mint amit a *daf-2* mutáns fonálférgek esetén láttunk. Mindez a HSP-90 élettartamot támogató hatására utal a nem-neurális szövetekben.



11. ábra: A HSP-90 kapacitás csökkentése limitálja a *daf-2(RNSi)* által indukált hosszú élettartamot. A *hsp-90(RNSi)* csökkenti a *daf-2(RNSi)*-vel kezelt vad típusú, N2 férgek megnyúlt élettartamát ($p < 0,001$), de nem befolyásolja a szintén *daf-2(RNSi)*-t tartalmazó baktériummal etetett *daf-16(mu86)* mutáns túlélését ($p = 0,521$). Az RNSi kezeléseket a kikeléstől alkalmaztam, és a baktériumokat 1:1 arányban kevertem össze, beleértve az EV törzset a szimpla RNSi kontrollok esetében. Az élettartam méréseket háromszor végeztem el. A túlélési görbéket Kaplan-Meier log rank teszttel hasonlítottam össze. Az élettartam értékek megtalálhatóak az 5. táblázatban. EV: üres vektor RNSi.

Következő lépésként meghatároztam a *hsp-90(RNSi)* hatását az élettartamra akkor, ha csak az L4-es stádium elérése után alkalmaztam *daf-2* mutánsokban. A *hsp-90(RNSi)* kezelés mind a négy elvégzett mérés esetén tovább növelte a *daf-2(e1370)* állatok túlélését, azonban a mérések felében a hatás nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét (10./b ábra). Ezek a megfigyelések abba az irányba mutatnak, hogy a HSP-90 élettartamot támogató hatása elsősorban a fejlődés során, mintsem utána érvényesül mind a vad típusú, mind pedig a *daf-2* mutáns fonálférgek esetén. Az élettartam-mérések független replikációját Gecse Eszer kollégám végezte. Az általa végzett kísérleteket a Függelék statisztikai adatokra vonatkozó részében is jelölöm. Felmerült, vajon hogyan befolyásolja a *hsp-90* a *daf-2* mutánsok fertilitását. Korábbi megfigyelésekkel egyetértésben (138) a *daf-2* mutáció kitolódott kezdetű szaporodáshoz vezetett, melyet hasonló mértékben csökkentett a *hsp-90(RNSi)*, akár petekortól, akár L4-es kortól alkalmaztuk (8./f-g ábra). Ezek alapján a *hsp-90(RNSi)* kezdési időpont-függően eltérő hatása a *daf-2* élettartamra függetlennek bizonyult a fertilitástól.

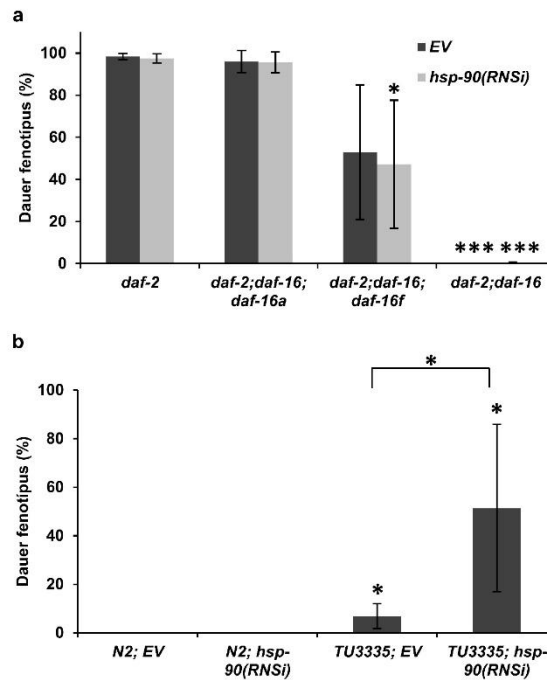
Az elvégzett kísérletek nagy részében a *hsp-90(RNSi)* tovább csökkentette a *daf-16* és *daf-2;daf-16* mutánsok élettartamát, azonban szignifikánsan kisebb mértékben tette ezt, mint azon törzsek esetén, melyek vad típusú *daf-16* génnel rendelkeznek (9. ábra, 10. ábra, 11. és 12. ábra). Mindemellett a *daf-16* mutációja megszüntette a *hsp-90(RNSi)* korai felnőttkortól alkalmazva jelentkező élettartam-növelő tendenciáját *daf-2* mutánsokban (10./b ábra). Összességében elmondható, hogy a HSP-90 élettartam-szabályozásban betöltött szerepének egyaránt lehetnek *daf-16*-függő, és attól független komponensei mind a vad típusú, mind pedig a csökken ILS-sel rendelkező férgek esetében.



12. ábra: A HSP-90 csendesítése *daf-16*-független módon is rövidíti az élettartamot. A kikeléstől alkalmazott *hsp-90(RNSi)* szignifikánsan csökkent a vad típusú (a) ($p < 0,001$ az EV-hoz képest) és kevésbé, de szintén szignifikánsan a *daf-16(mu86)* (b) ($p < 0,001$ 6-ból 3 kísérletben) és *daf-16(mgDf50)* (c) ($p < 0,001$) mutánsok élettartamát. Az élettartam méréseket háromszor végeztem el. A túlélési görbéket Kaplan-Meyer log rank teszttel hasonlítottam össze. Az élettartam értékek megtalálhatóak az 5. táblázatban. EV: üres vektor RNSi.

6.2.2 A *hsp-90* neurális csendesítése dauer fenotípus megjelenéséhez vezet vad típusban, perifériás csendesítése azonban nem befolyásolja a *daf-2* mutánsok dauer fejlődését.

Azon fonálférgek, melyekben csökkent az ILS aktivitása, nagy valószínűséggel térnek át egy alternatív fejlődési útvonalra és képeznek kitartó, „dauer” lárvákat, amennyiben valamilyen stressz éri őket. Hasonlóképp a *hsp-90(p673)* pontmutáció szintén dauer képződéshez vezet *C. elegans*-ban azáltal, hogy gátolja a DAF-11 guanil-cikláz kemoszenzoros neuronokban (39). Ennek okán vizsgáltam meg, miként lép kölcsönhatásba a *daf-2* és a *hsp-90* a dauer fejlődés során. Mint korábban leírták (139), a *daf-2(e1370)* mutánsok 25°C-on növesztve szinte kivétel nélkül dauer lárvákká fejlődtek, míg egy másodlagos mutáció megléte a *daf-16* génben megszüntette ezt a jelenséget (13./a ábra). Korábbi vizsgálatokkal egyetértésben (69,70) úgy tűnik, hogy a *daf-16a* izoforma önmagában is elegendő a „dauer program” megjelenéséhez, míg ha csupán a *daf-16d/f* izoforma volt jelen, az állatoknak kisebb része vált dauer lárvává. A csökkent ILS által kiváltott dauer lárvává való alakulásról az L1-es stádium során születik meg a döntés és szükséges hozzá elsősorban a neuronális *daf-2* és *daf-16* (138,140). Ezzel egyetértésben a *hsp-90* kikeléstől való csendesítése nem neurális szövetekben nem befolyásolta egyik vizsgált törzs dauer-képzését sem (13./a ábra). Emiatt úgy határoztam, felhasználok a TU3335 jelzésű törzset is, mely minden sejtjében kifejezi az RNSi működéséhez szükséges SID-1 fehérjét – így az idegsejtekben is (141) – aminek révén megerősítettem a korábban leírtakat a megfelelő neuronális HSP-90 funkció szükségességéről a dauer forma kivédéséhez (38,39) (13./b ábra).



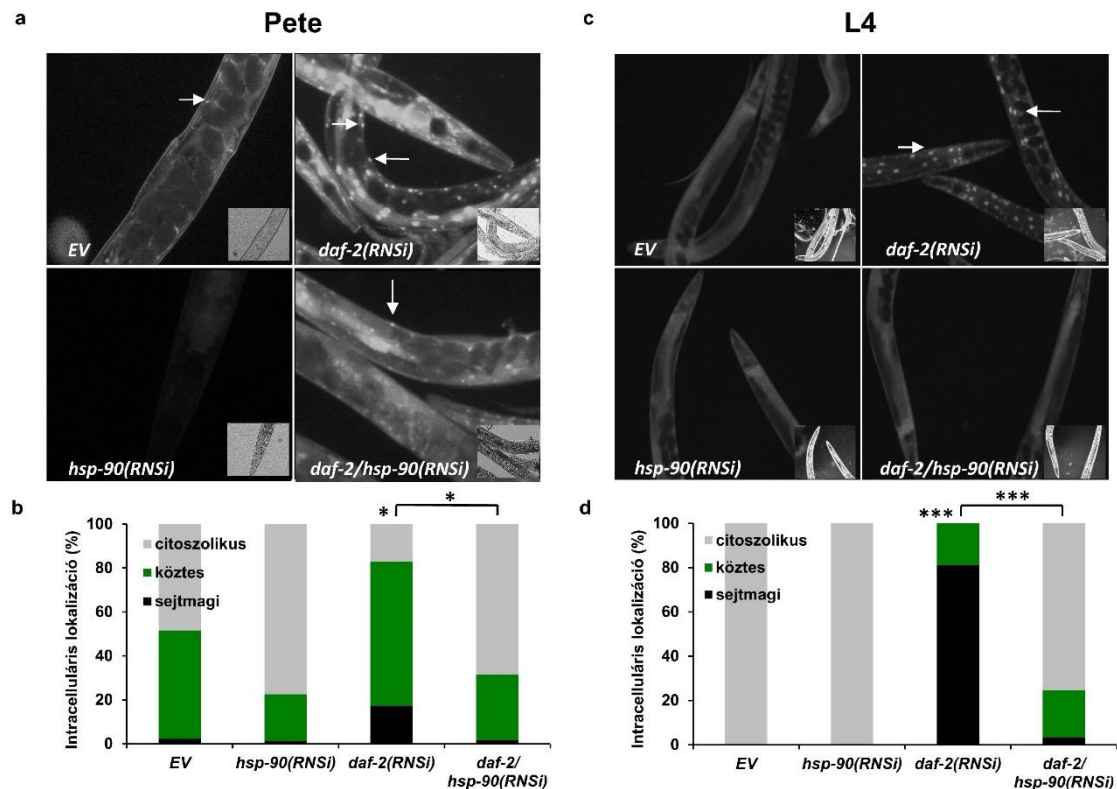
13. ábra: A HSP-90 csendesítése nem neuronális sejtekben nem befolyásolja a dauer-lárva képződést vad típusú és *daf-2* mutáns fonálférgekben. (a) Dauer képződés a *daf-2*(*e1370*) állatokban 25°C-on. A *daf-16a* izoforma elégséges a dauer képződés közvetítéséhez, míg a *daf-16d/f* törzs ($p=0,081$ EV-on és $p=0,037$ *hsp-90(RNSi)*-n) csökkent dauer képződést mutat. A *hsp-90(RNSi)* nem befolyásolta a dauer képződést az üres vektorhoz viszonyítva. (b) Dauer képződés a vad típusú N2 és a minden sejtjében RNSi-érzékeny TU3335 törzsben 25°C-on. A *hsp-90(RNSi)* csak a TU3335 állatokban indukálja a dauer képződést ($p<0,05$), míg a vad típusra nincs hatással. Minden kísérletet háromszor végeztem el, és az átlag és annak sztandard hibájaként fejeztem ki az oszlopdiaagrammokon. A statisztikát ANOVA segítségével analizáltam és az adatok megtalálhatóak a 11. táblázatban. EV: üres vektor RNSi. *: $p<0,05$; ***: $p<0,001$.

A DAF-11 általi „dauer-döntés” szintén az L1-es stádiumban történik meg (142), amiből az következik, hogy a *hsp-90* csendesítés már a (kései) L1-es stádiumban fellép. A neuronális *hsp-90(RNSi)* által kiváltott dauer képződés, valamint az embrionálisan hiányzó HSP-90 miatt fellépő embrionális/korai lárvális letalitás (39,41) megakadályozta, hogy megvizsgáljam a hatását a *daf-2* által kiváltott dauer fenotípusra. Mindazonáltal az eredményeim az élettartam adatokkal együtt arra utalnak, hogy a HSP-

90 a perifériás szövetekben befolyásolja a vad típusú és *daf-2* mutáns élettartamot, azonban ez a hatás időben és térben is elkülönül a fejlődésre kifejtett hatásától.

6.2.3 A HSP-90 elősegíti a DAF-16A transzlokációját a sejtmagba

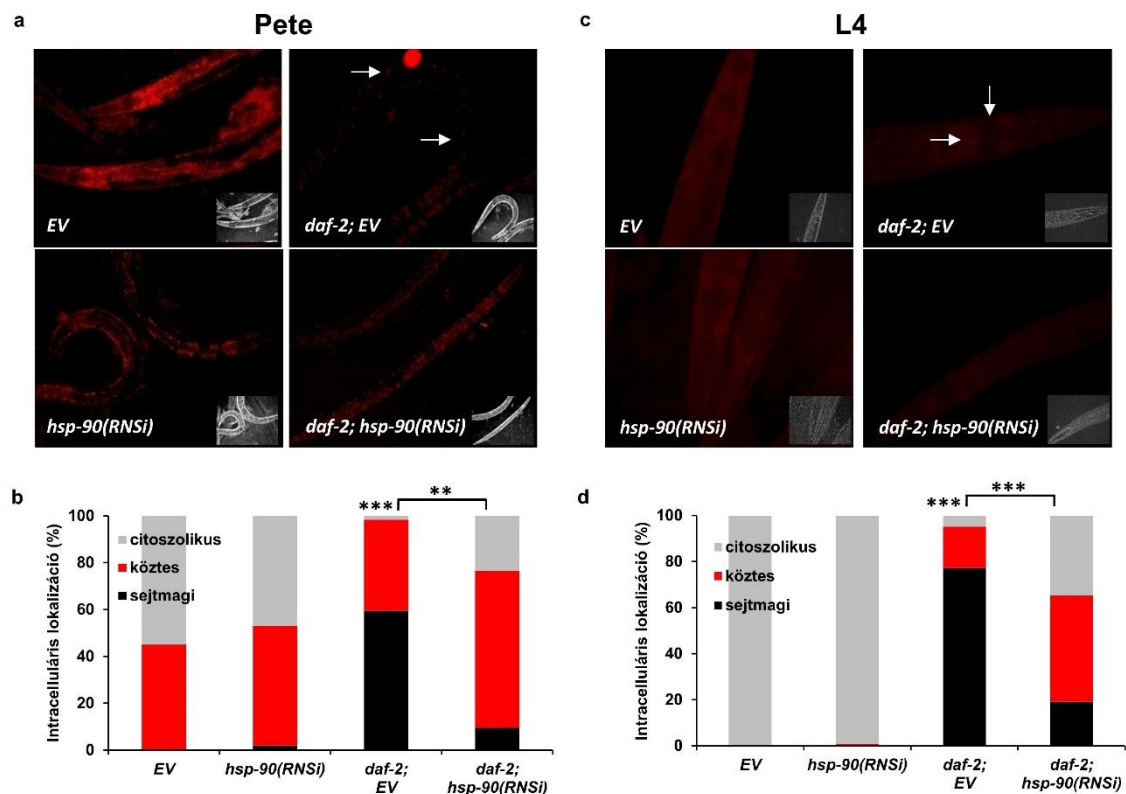
Az a tény, hogy a HSP-90 a *daf-2* mutáns élettartamára kifejtett hatása függ a DAF-16 meglététől arra utal, hogy funkcionális kapcsolat állhat fenn a két fehérje között. Feltettem hát a kérdést, miként hat a *hsp-90* csendesítése a DAF-16 funkcióképességére. A DAF-16 aktiválódásának fontos lépése mind a csökkent ILS, mind pedig hő sokk hatására bekövetkező áthelyeződése a sejtmagba (143). Először is az vizsgáltam meg, miként változik a DAF-16 sejten belüli eloszlása a *daf-16a/b::GFP* transzgént hordozó TJ356 törzsben petekortól történő *daf-2* illetve *hsp-90* csendesítés hatására. A hasonló RNSi dózisokat biztosítandó az állatokat üres vektort (EV), *daf-2(RNSi)/EV*-t, *daf-21(RNSi)/EV*-t and *daf-2(RNSi)/daf-21(RNSi)*-t tartalmazó baktériumokkal etettem, a különböző RNSi törzseket 1:1 arányban vegyítve. A *daf-2* csendesített fonálférgekben a DAF-16A/B nagy része a sejtmagban koncentrált mind az intesztinális mind pedig az izom sejtekben. Megfigyeléseim szerint a *hsp-90* csendesítése részlegesen gátolta a DAF-16A/B::GFP *daf-2*-csendesítés által kiváltott transzlokációját (14./a és b ábra). Ez az eredmény azt sugallja, hogy a HSP-90 elősegíti a DAF-16 áthelyeződését válaszul a csökkent ILS-re. Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, ez a jelenség vajon egy, a fejlődés során befolyásolt folyamat eredménye-e, vagy felnőttkorban is jelentkezik, megismételtem a méréseket úgy is, hogy L4-es stádiumú állatokat helyeztem az RNSi lemezekre. A korábban megfigyelt, *daf-2(RNSi)* által kiváltott nukleáris lokalizáció ezúttal is megfigyelhető volt, csakúgy mint ennek az áthelyeződésnek a *hsp-90(RNSi)* általi gátlása (14./c és d ábra).



14. ábra: A HSP-90 szükséges a *daf-2* által indukált DAF-16A/B sejtmagi transzlokációjához. Reprezentatív epifluoreszcens mikroszkópos képek, melyek a DAF-16A/B::GFP *daf-2(RNSi)* által indukált sejtmagi áthelyeződésének *hsp-90(RNSi)* kezelés általi gátlását mutatják a kikeléstől (a), illetve az L4-es stádium elérésétől (c) alkalmazva. Fehér nyilak mutatják a sejtmagi lokalizációjú GFP-t. A DAF-16A/B::GFP lokalizációjának három külön mérésből eredő adatainak számszerűsítése (átlag ± az átlag sztandard hibája), ahol mindegyik kísérlet 30 állatot vizsgált kondícióként (b és d). A „citoszolikus” jelző olyan állatokat jelöl, melyekben a GFP-jel a sejtplazmában mutatkozott, a „köztes” jelzővel olyan állatokat illetem, melyeknél a sejtplazma mellett a sejtmagban is megfigyelhető volt a GFP, míg a „sejtmagi” olyan állatokat takar, melyek esetén a GFP-jel a sejtmagokban koncentrált. A mikroszkópos képek három független kísérlet reprezentatív képei. A statisztikai analízist ANOVA használatával végeztem és az adatok a 9. táblázatban találhatóak meg. EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; ***:p<0,001

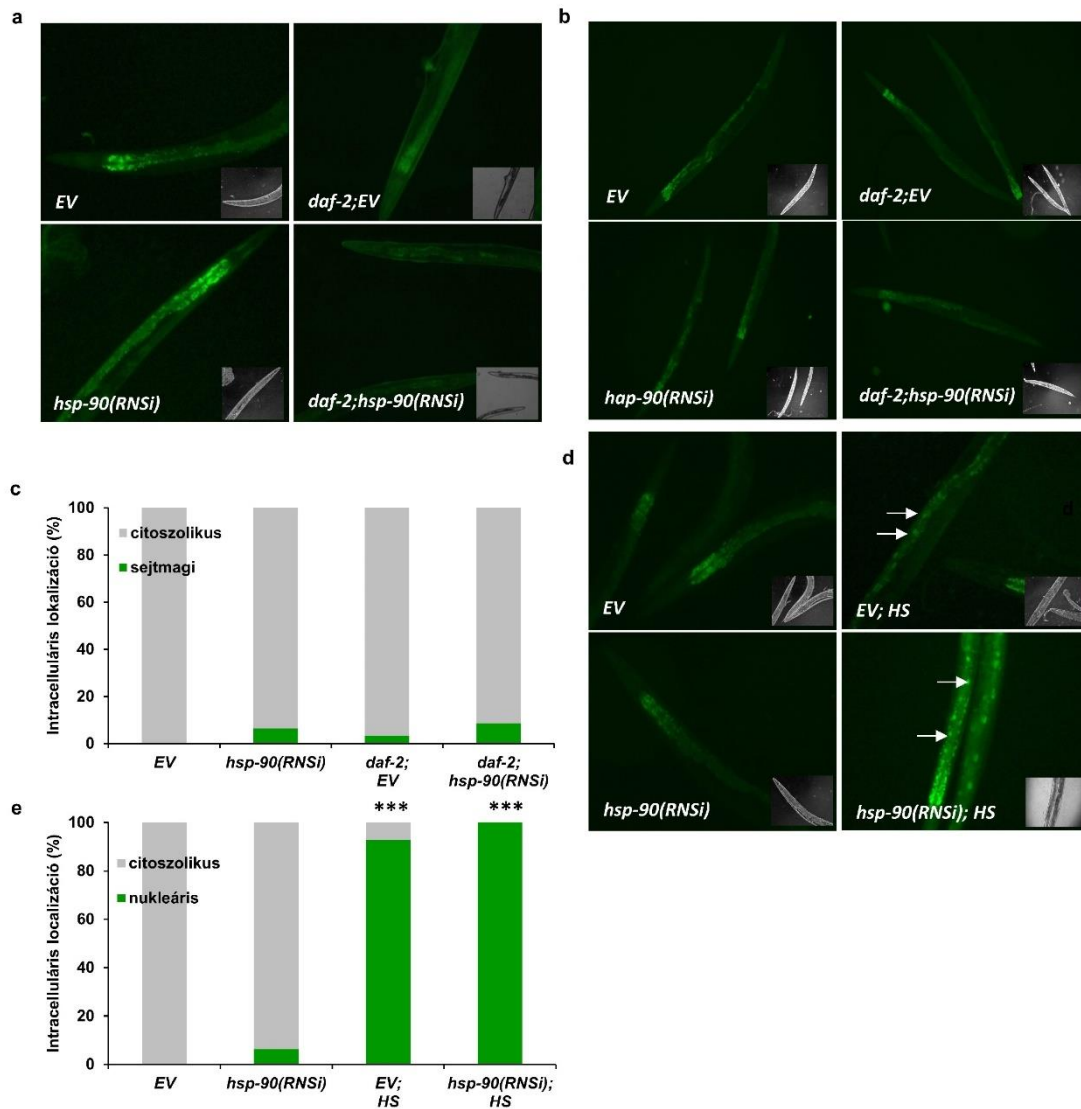
Ezután azt a kérdést tettem fel, vajon a HSP-90 hatása a DAF-16 transzlokációjára különbözik-e az egyes DAF-16 izoformákat tekintve. Az ismert három DAF-16

izoforma-csoport közül kettő, az A és D/F/H izoformák az élettartam meghatározásában betöltött szerepét az ILS szabályozza (68–70,144,145). Ennek okán két-két olyan törzset alkalmaztam, melyek különböző, fluoreszcensen jelölt formában fejeznek ki egyes DAF-16 izoformákat *daf-16(mgDf50)* nullmutáns háttéren: *daf-16a::rfp* és *daf-16d/f::gfp* valamint ezek *daf-2(e1370)* mutáns variánsai (69). Az RNSi kezelést kikeléstől kezdve alkalmaztam, a DAF-16 sejten belüli eloszlását pedig a felnőttkor első napján olvastam le.



15. ábra: A HSP-90 szelektíven szabályozza a DAF-16A sejtmagi transzlokációját. Reprezentatív epifluoreszcens mikroszkópos képek, melyek a *daf-2(e1370)* mutáció által indukált DAF-16A::RFP sejtmagi transzlokációjának *hsp-90(RNSi)* általi gátlását mutatják akár kikeléstől (a), akár az L4-es stádium elérésétől (c) kezelt az állatokat. Fehér nyilak mutatják a sejtmagi elhelyezkedésű RFP-t. A DAF-16A::RFP lokalizációjának három független mérésből eredő adatainak számszerűsítése (átlag ± az átlag sztandard hibája), ahol minden kísérlet esetén kondícióként 30 állatot vizsgáltam (b és d). A „citoszolikus” jelző olyan állatokat jelöl, melyekben a RFP-jel a sejtplazmában mutatkozott, a „köztes” jelzővel olyan állatokat illetem, melyeknél a sejtplazma

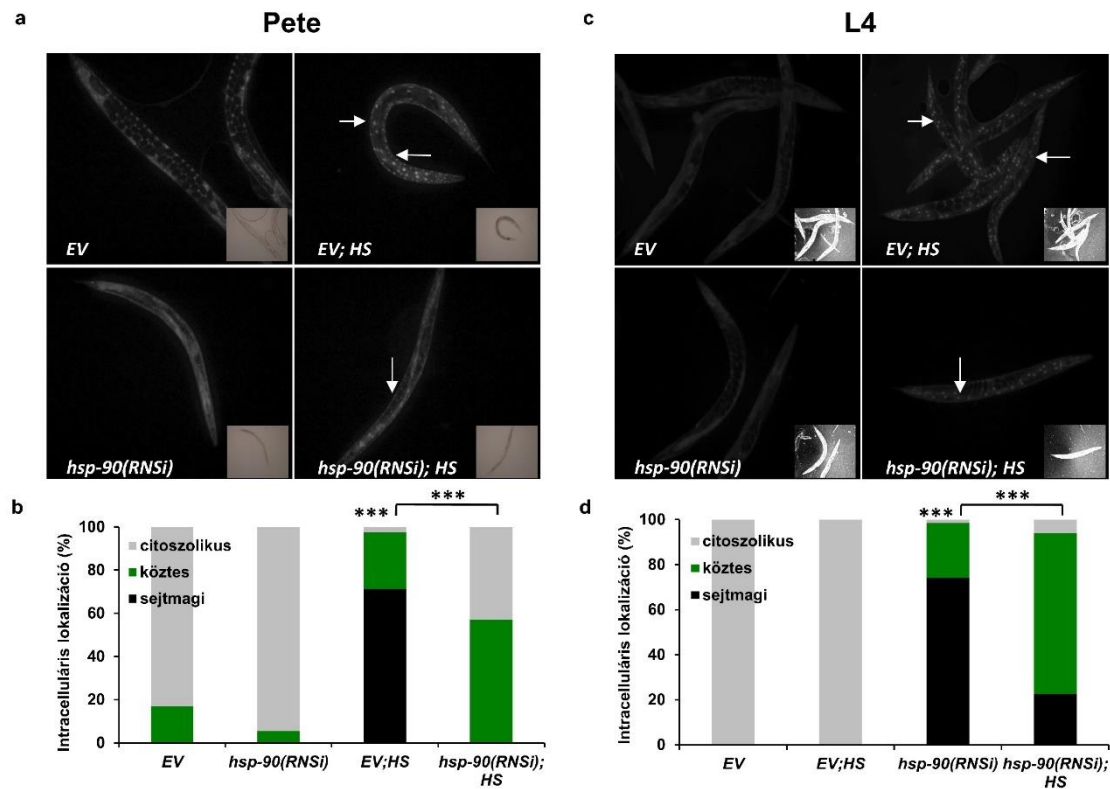
mellett a sejtmagban is megfigyelhető volt a RFP, míg a „sejtmagi” olyan állatokat takar, melyek esetén a RFP jel a sejtmagokban koncentrált. A mikroszkópos képek három független kísérlet reprezentatív képei. A statisztikai analízist ANOVA használatával végeztem és az adatok a 9. táblázatban találhatóak meg. EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001



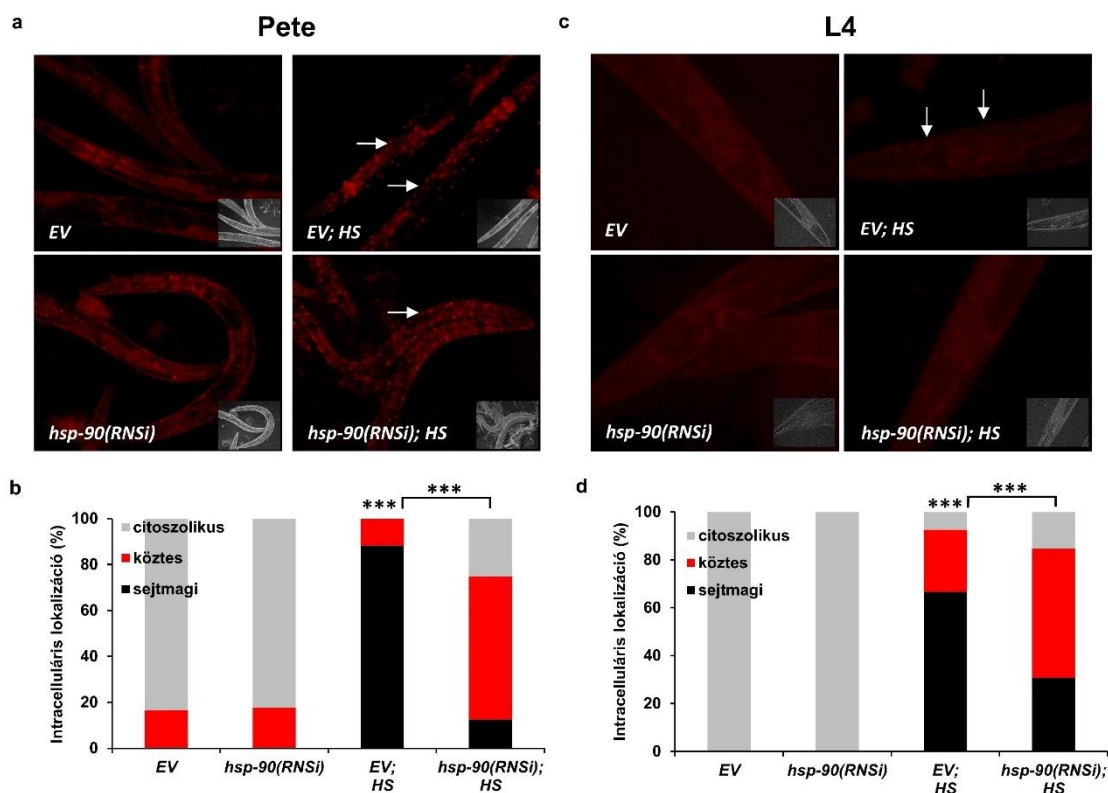
16. ábra: A *hsp-90* csendesítése nem befolyásolja a DAF-16D/F::GFP sejtmagi átlehelyeződését. A *daf-2(e1370)* mutáns allél nem indukálja a DAF-16D/F::GFP áthelyeződését a sejtmagba sem 20°C-on (a), sem pedig 25°C-on (b). (d) A DAF-16D/F::GFP hő sokk által indukált sejtmagi transzlokációjára nincs hatással a *hsp-90(RNSi)*. Fehér nyilak mutatják a sejtmagi elhelyezkedésű GFP-t. Felhívom a figyelmet a minden mintában megmutatkozó háttér

autofluoreszcenciára. A DAF-16D/F::GFP lokalizációjának három független mérésből eredő adatainak számszerűsítése (átlag \pm az átlag sztandard hibája), ahol minden kísérlet esetén kondícióként 30 állatot vizsgáltam (c és e). A „citoszolikus” jelző olyan állatokat jelöl, melyekben a GFP-jel a sejtplazmában mutatkozott, míg a „sejtmagi” olyan állatokat takar, melyek esetén a GFP jel a sejtmagokban koncentráldott. A mikroszkópos képek három független kísérlet reprezentatív képei. A statisztikai analízist ANOVA használatával végeztem és az adatok a 9. táblázatban találhatóak meg. EV: üres vektor RNSi. ***: $p < 0,001$

Korábbi tanulmányoknak megfelelően a DAF-16A::RFP transzgen kifejezett sejtmagi lokalizációt mutatott a bél- és izomsejtekben egyaránt, míg a DAF-16D/F::GFP a sejtplazmában maradt a *daf-2(e1370)* mutánsban a sértetlen *daf-2* alléllal rendelkező törzsekhez képest (15./c és d, ill. 16./a-c ábrák) (69,143) függetlenül a növesztési hőmérséklettől. A *hsp-90* csendesítés – hasonlóan a DAF-16A/B::GFP-re kifejtett hatásához – gátolta a DAF-16A::RFP áthelyeződését, miközben nem befolyásolta a DAF-16D/F::GFP elhelyezkedését (14./a és b, 15./c és d, ill. 16./a-c ábrák). Annak érdekében, hogy független betekintést nyerhessek a a DAF-16 izoformák transzlokációjába, hősokkot is alkalmaztam, aminek hatására az irodalom alapján mindkét izoforma a sejtmagba helyeződik át (69,143).



17. ábra: A HSP-90 szükséges a DAF-16A/B hőszokk-indukálta sejtmagi transzlokációjához. Reprezentatív epifluoreszcens mikroszkópos képek, melyek a DAF-16A/B::GFP hőszokk (1 óra 35°C) által indukált sejtmagi áthelyeződésének *hsp-90(RNSi)* kezelés általi gátlását mutatják a kieléstől (a), illetve az L4-es stádium elérésétől (c) alkalmazva. Fehér nyilak mutatják a sejtmagi lokalizációjú GFP-t. A DAF-16A/B::GFP lokalizációjának három külön mérésből eredő adatainak számszerűsítése (átlag ± az átlag sztandard hibája), ahol mindegyik kísérlet 30 állatot vizsgált kondícióként (b és d). A „citoszolikus” jelző olyan állatokat jelöl, melyekben a GFP-jel a sejtplazmában mutatkozott, a „köztes” jelzővel olyan állatokat illetem, melyeknél a sejtplazma mellett a sejtmagban is megfigyelhető volt a GFP, míg a „sejtmagi” olyan állatokat takar, melyek esetén a GFP-jel a sejtmagokban koncentrálnak. A mikroszkópos képek három független kísérlet reprezentatív képei. A statisztikai analízist ANOVA használatával végeztem és az adatok a 9. táblázatban találhatóak meg. HS: hőszokk, EV: üres vektor RNSi. ***: $p < 0,001$.



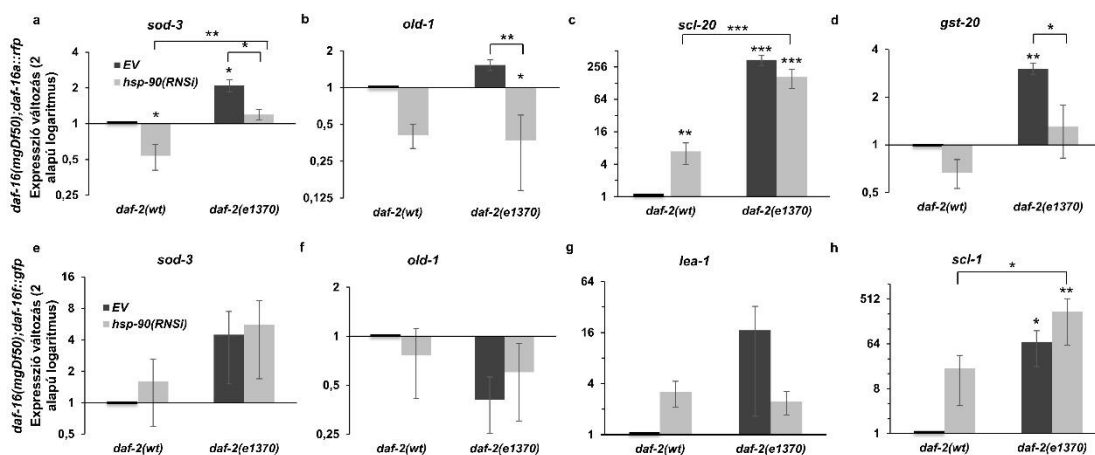
18. ábra: A DAF-16A izoforma igényli a HSP-90-et a hőssokk-indukálta sejtmagi transzlokációjához. Reprezentatív epifluoreszcens mikroszkópos képek, melyek a DAF-16A::RFP hőssokk által indukált sejtmagi transzlokációjának *hsp-90(RNSi)* általi gátlását mutatják akár kieléstől (a), akár az L4-es stádium elérésétől (c) kezelt az állatokat. Fehér nyilak mutatják a sejtmagi elhelyezkedésű RFP-t. A DAF-16A::RFP lokalizációjának három független mérésből eredő adatainak számszerűsítése (átlag \pm az átlag sztandard hibája), ahol minden kísérlet esetén kondícióként 30 állatot vizsgáltam (b és d). A „citoszolikus” jelző olyan állatokat jelöl, melyekben a RFP-jel a sejtplazmában mutatkozott, a „köztes” jelzővel olyan állatokat illetem, melyeknél a sejtplazma mellett a sejtmagban is megfigyelhető volt a RFP, míg a „sejtmagi” olyan állatokat takar, melyek esetén a RFP jel a sejtmagokban koncentrált. A mikroszkópos képek három független kísérlet reprezentatív képei. A statisztikai analízist ANOVA használatával végeztem és az adatok a 9. táblázatban találhatóak meg. HS: hőssokk, EV: üres vektor RNSi. ***: $p < 0,001$

Valóban, méréseim alapján a hőssokk kifejezett sejtmagi lokalizációt indukált a DAF-16A/B::GFP, DAF-16A::RFP és DAF-16D/F::GFP esetén is (16./d és e, 17./a és b, ill.

18./a és b ábrák). Mindazonáltal a *hsp-90(RNSi)* hatására a DAF-16D/F::GFP továbbra is sejtmagi maradt, míg a DAF-16A/B::GFP és DAF-16A::RFP hősokk-indukciója gátlódott (16./d és e, 17./a és b, ill. 18./a és b ábrák). Hasonló eredményre jutottam az L4-es stádiumtól alkalmazott RNSi kezelés esetén is, vagyis a *hsp-90* csendesítése gátolta mind a hősokk, mind pedig a *daf-2* mutáció által kiváltott DAF-16A sejtmagi transzlokációt (15./e és f, ill. 18./c és d ábrák). Ezek az eredmények – amellet, hogy rávilágítanak a DAF-16A és D/F izoformák eltérő szabályozására – erősen támogatják a HSP-90 szükségességét a DAF-16A áthelyeződéséhez alacsony tápanyag elérhetőség és hősokk körülmények esetén is.

6.2.4 A HSP-90 szükséges a DAF-16A-függő transzkripcionális funkcióhoz

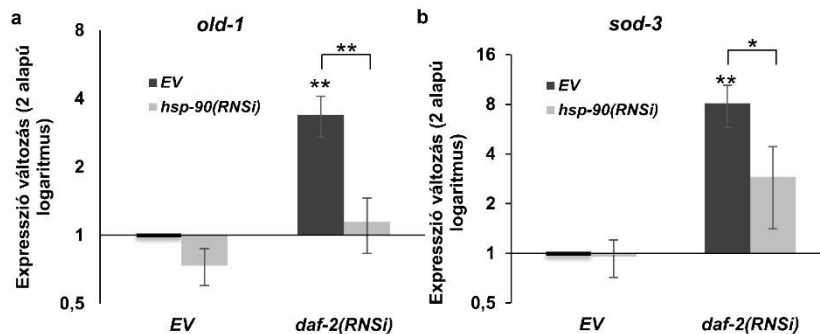
Következő lépésben azt tanulmányoztam a *hsp-90* csendesítés miként hat különböző DAF-16 célgének kifejeződésére. Megvizsgáltam olyan géneket, melyekről úgy tartja az irodalom, hogy mindkét izoforma szabályozása alatt állnak (*sod-3* and *old-1*), olyanokat, melyekről leírták, hogy elsősorban a DAF-16A által szabályozódnak (*scl-20* and *gst-20*) és olyanokat is, melyekről ismert, hogy DAF-16D/F izoforma célgénjei (*lea-1*, *scl-1*, *col-183*, *R05D8.7*). Az első kísérlet-sorozatban annak érdekében, hogy elkülöníthessük az egyes izoformákat, valamint elkerülhessük a szükségtelen „kereszt-beszélgetéseket” a többi DAF-16A izoformával, a fentebb ismertetett *daf-16a::rfp* és *daf-16d/f::gfp* törzseket használtam.



19. ábra: A HSP-90 szelektíven szabályozza a *daf-16*-függő célgén expressziót DAF-16A izoforma transzgén háttéren. (a-d) A *hsp-90(RNSi)* hatása a *sod-3* (a), *old-1* (b), valamint a DAF-16A-specifikus *scl-20* (c) és *gst-*

20 (d) mRNS szintekre *daf-16(mgDf50);daf-16a::rfp* genotípusú állatokban, illetve azok *daf-2(e1370)* változatában. (e-h) A *hsp-90(RNSi)* hatása a *sod-3* (e), *old-1* (f), valamint a DAF-16D/F-specifikus *lea-1* (g) és *scl-1* (h) mRNS szintekre *daf-16(mgDf50);daf-16d/f::gfp* állatokban, illetve azok *daf-2(e1370)* változatában. A fonálférgeket üres vektort, illetve *hsp-90(RNSi)*-t kifejező baktériumokkal ettem kikeléstől. Az mRNS expressziót qRT-PCR használatával vizsgáltam, β -actin mRNS-re normalizáltam, majd a kettes alapú logaritmusukra transzformált expresszió változás értékeket fejeztem ki (átlag \pm az átlag sztandard hibája) az üres vektorhoz viszonyítva, melynek értékét 1-nek vettem. Az itt bemutatott adatok három független kísérletből származnak. A qRT-PCR statisztikát ANOVA használatával analizáltam, az adatok megtalálhatóak a 8. táblázatban. EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001.

A *sod-3* és *old-1* mRNS expresszióját – melyet a *daf-2(e1370)* mutáció váltott ki – mindkét esetben gátolta a *hsp-90(RNSi)* a *daf-16a::rfp* törzsben (19./a és b ábra), míg nem befolyásolta őket a *daf-16d/f::GFP* törzsben (19./e és f ábra). A *sod-3* és *old-1* indukció *hsp-90*-függő jellege megerősítést nyert a *daf-2(RNSi)* használatával vad típusú állatokon is (20. ábra).

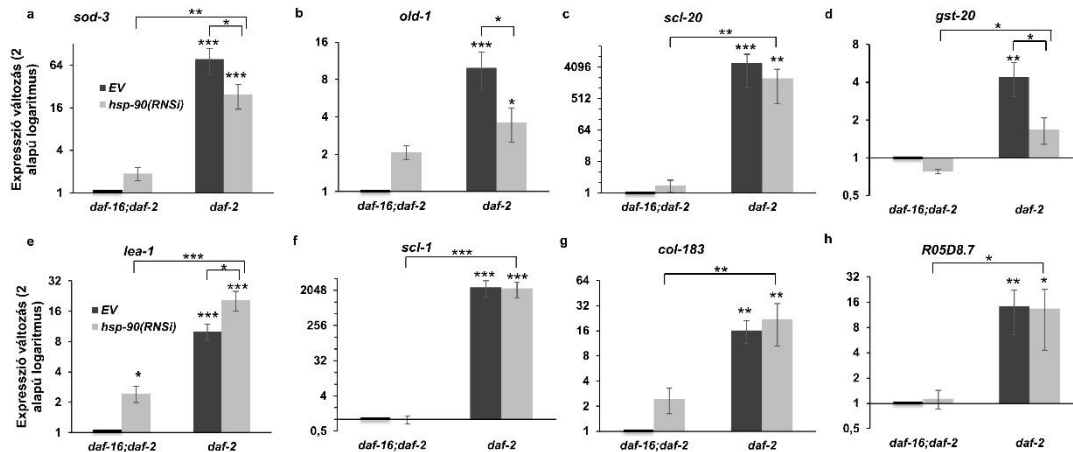


20. ábra: A HSP-90 szükséges a *daf-2(RNSi)* által indukált *old-1* és *sod-3* mRNS expresszióhoz. A *hsp-90(RNSi)* és/vagy *daf-2(RNSi)* kezelések hatása az *old-1* (a) és a *sod-3* (b) mRNS szintjeire. Az RNSi kezeléseket kikeléstől végeztem. Az mRNS expressziót qRT-PCR használatával vizsgáltam, β -actin mRNS-re normalizáltam, majd a kettes alapú logaritmusukra transzformált expresszió változás értékeket fejeztem ki (átlag \pm az átlag sztandard hibája) az üres vektorhoz viszonyítva, melynek értékét 1-nek vettem. Az itt bemutatott adatok három

független kísérletből származnak. A qRT-PCR statisztikát ANOVA használatával analizáltam, az adatok megtalálhatóak a 8. táblázatban. EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; **:p<0,01.

Ezen kívül az *old-1* gén expressziója csupán a *daf-16a::rfp* törzs *daf-2(e1370)* mutáns változatában emelkedett meg (19./b és f ábra). Ezek az eredmények alátámasztanak korábbi adatokat a *sod-3*-ra vonatkozóan (70), valamint felvetik, hogy az *old-1* gén preferenciális DAF-16A célgén lehet. Szintén kiválasztottam az *scl-20* és *gst-20* géneket, melyeket specifikus DAF-16A célgénekként azonosítottak (70). Az *scl-20* egy vélt p53 célgén, mely mind az élettartam, mind pedig a tumorsejt proliferáció szabályozásában szerepet játszik (146). A *gst-20* az emberi hematopoetikus prosztoglandin D szintáz *C. elegans* ortológja és részt vesz a felnőtt élettartam *daf-2* indukálta, étrend-függő megnyújtásában (70). Kísérleteim megerősítették mindkét gén indukcióját a *daf-2(e1370)* allél által a *daf-16a::rfp* törzsben, valamint a *gst-20* expressziójának hatékony gátlását mutatták *hsp-90(RNSi)* által (19./c és d ábra). A DAF-21-nek a DAF-16D/F izoforma transzkripció aktivitására kifejtett hatásának vizsgálatához a *lea-1* és *scl-1* géneket választottam, mint szelektív célgéneket (69,70). A *lea-1* egy olyan fehérjét kódol, melyről feltételezik, hogy hidrofíli, hőstabil, valamint szerepet játszik az anhidrobiózisban (147), míg az *scl-1* egy prediktált szekréciós fehérjét kódol, mely tagja a ciszteinben gazdag szekréciós fehérje (CRISP) családnak (63). A DAF-16A célgénekkkel ellentétben ennek a két transzkripció célgénnek nem gátlódott az expressziója *daf-16d/f::GFP* transzgen háttéren *hsp-90(RNSi)* hatására (19./g és h ábra).

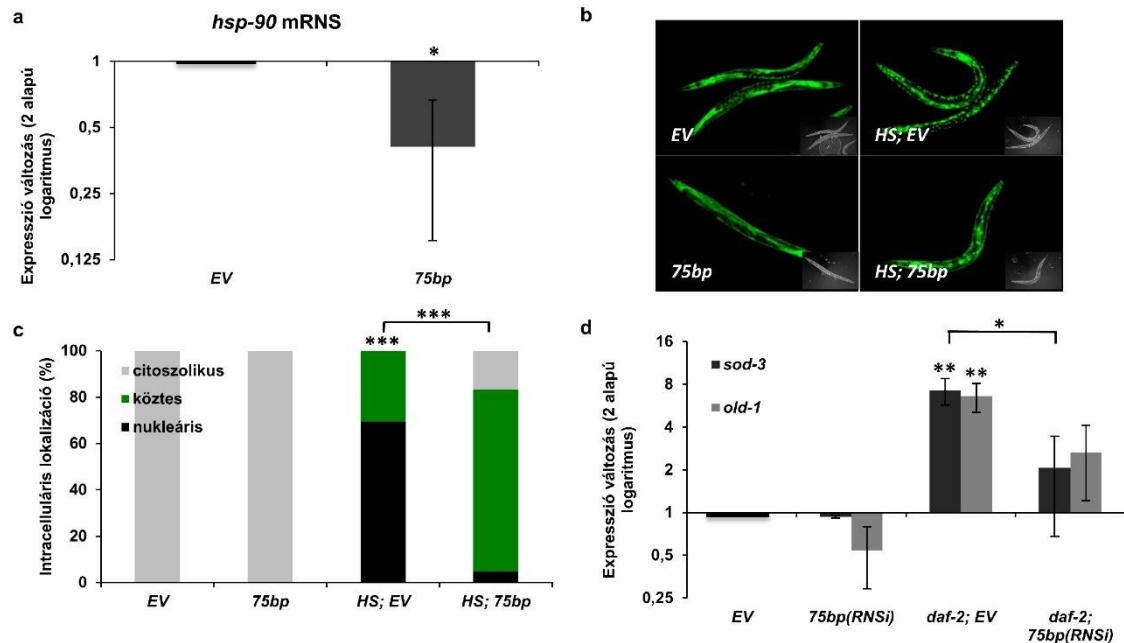
A potenciális izoform-specifikus szabályozás további vizsgálata érdekében megmértem a DAF-16A és DAF-16D/F izoforma specifikus célgén expressziójának értékét vad típusú és mutáns *daf-16* háttéren az L4-es kortól történő *hsp-90* csendesítés hatására.



21. ábra: A HSP-90 specifikusan szükséges a DAF-16A-függő célgénnek expressziójához vad típusú *daf-16* háttéren. (a-d) A *hsp-90(RNSi)* hatása a *sod-3* (a), *old-1* (b), valamint a DAF-16A-specifikus *gst-20* (c) és *scl-20* (d) mRNS szintjére. (e-h) A *hsp-90(RNSi)* hatása a DAF-16D/F-specifikus *lea-1* (e), *scl-1* (f), *col-183* (g) és *R05D8.7* (h) mRNS szintjére. *daf-2(e1370)* és *daf-2(e1370);daf-16(mgDf50)* kettős mutáns férgeket etettem üres vektort, illetve *hsp-90(RNSi)*-t kifejező baktériumokkal az L4-stádiumtól. Az mRNS expressziót qRT-PCR használatával vizsgáltam, β -*actin* mRNS-re normalizáltam, majd a kettes alapú logaritmusukra transzformált expresszió változás értékeket fejeztem ki (átlag \pm az átlag sztandard hibája) az üres vektorhoz viszonyítva, melynek értékét 1-nek vettem. Az itt bemutatott adatok három független kísérletből származnak. A qRT-PCR statisztikát ANOVA használatával analizáltam, az adatok megtalálhatóak a 8. táblázatban. EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001.

Az mRNS expresszió összehasonlítása *daf-2(e1370)* és *daf-16(mgDf50);daf-2(e1370)* mutáns törzsekben megmutatta, hogy a DAF-16A specifikus *sod-3*, *old-1*, *gst-20* és *scl-20* gének indukálódtak a *daf-2* mutáció hatására *daf-16*-függő módon és az expressziójuk gátlódott a *hsp-90(RNSi)* hatására – az *scl-20* kivételével (21./a-d ábra). A DAF-16D/F célgéneket két további, DAF-16D/F specifikus célgénnel egészítettem ki: *col-183*, a kutikula egy prediktált összetevője (148) valamint *R05D8.7*, az emberi hidroxiszteroid 17-béta dehidrogenáz 14 *C. elegans* ortológja, mely az embrionális fejlődésben játszik szerepet (149). Úgy találtam, hogy mindegyik mRNS mennyisége jelentősen emelkedett a *daf-2(e1370)* mutánsban, de ez az indukció nem gátlódott *hsp-90(RNSi)* által (21./e-h

ábra). Ezen megállapítások egy részét egy független *hsp-90(RNSi)* szekvencia használatával is megerősítettem (123) (22. ábra). Ezáltal eredményeink meggyőző bizonyítékokkal szolgálnak arra, hogy a HSP-90 specifikusan szabályozza a DAF-16A transzkripcionális aktivitását.



22. ábra: A DAF-16A aktiváció gátlása egy független *hsp-90(RNSi)*

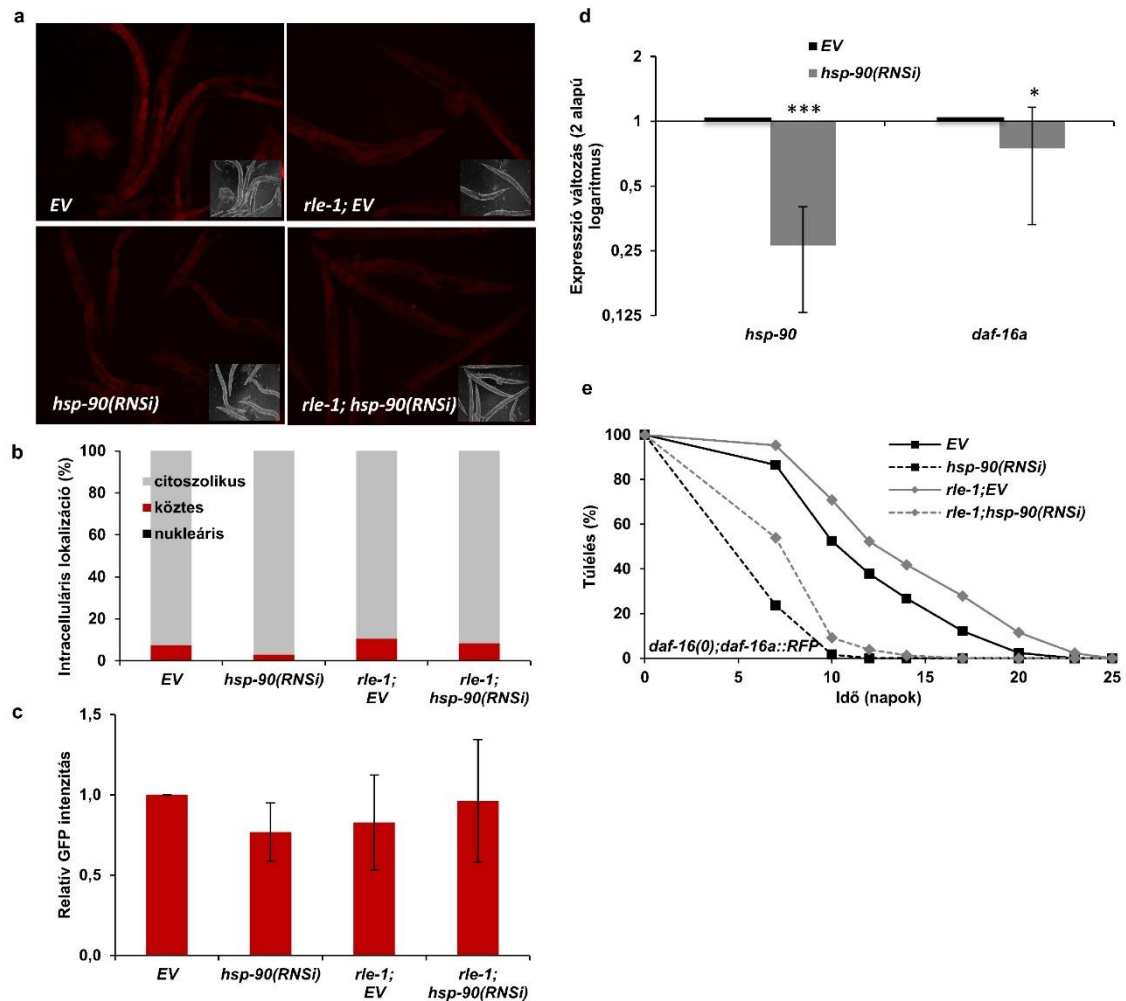
konstrukt segítségével. (a) A 75bp-os RNSi a HSP-90 ellen sikeresen csökkenti a *hsp-90* mRNS szintjét. (b) Reprezentatív epifluoreszcens mikroszkópos képek, melyek a DAF-16A/B::GFP hősokek (1 óra 35°C) által indukált sejtmagi áthelyeződésének a 75bp-os *hsp-90(RNSi)* kezelés általi gátlását mutatják. A DAF-16A/B::GFP lokalizációjának három külön mérésből eredő adatainak számszerűsítése (átlag ± az átlag sztandard hibája), ahol mindegyik kísérlet 30 állatot vizsgált kondícióként (c). A „citoszolikus” jelző olyan állatokat jelöl, melyekben a GFP-jel a sejt plazmában mutatkozik, a „köztes” jelzővel olyan állatokat illettem, melyeknél a sejt plazma mellett a sejt magban is megfigyelhető volt a GFP, míg a „sejtmagi” olyan állatokat takar, melyek esetén a GFP-jel a sejt magokban koncentrált. A statisztikai analízist ANOVA használatával végeztem és az adatok a 9. táblázatban találhatóak meg. (d) A 75bp-os *hsp-90(RNSi)* gátolja a *daf-2* mutáció által indukált *sod-3* és *old-1* mRNS expresszió növekedést a *daf-16a::rfp* transzgen törzsben. Az egyetlen izoformát kifejező *daf-16(mgDf50);daf-16a::rfp* transzgen állatokat, valamint azok *daf-2(e1370)*

változatát üres vektort, illetve a 75bp-os *hsp-90(RNSi)*-t kifejező baktériumokkal tápláltam kikeléstől. Az mRNA expressziót qRT-PCR használatával vizsgáltam, *β-actin* mRNA-re normalizáltam, majd a kettes alapú logaritmusokra transzformált expresszió változás értékeket fejeztem ki (átlag ± az átlag sztandard hibája) az üres vektorhoz viszonyítva, melynek értékét 1-nek vettem. Az itt bemutatott adatok három független kísérletből származnak. A qRT-PCR statisztikát ANOVA használatával analizáltam, az adatok megtalálhatóak a 8. táblázatban. HS: hősokk, EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001.

6.2.5 A HSP-90 nem szükséges a DAF-16A stabilitásához, és a sejtmagi importjától upstream fejt ki hatását

Az emlős HSP-90 egy specifikus dajkafehérje, ami kliensfehérjék nagy számának stabilizálja konformációját, köztük számos transzkripció faktorét is (28). Ha sérül a HSP-90 funkcionalitása, a kliensfehérjék poliubikvitinilálódnak ubikvitin kunjugáló enzimkomplexek által, majd ezt követően lebontásra kerülnek a proeaszómában (150). Több E3 ubikvitin ligáz irányítja az emlős FOXO transzkripció faktorokat a lebontás felé (151). *C. elegans*-ban az E3 ubikvitin ligáz RLE-1-ről kimutatták, hogy mutációja a DAF-16 fehérje stabilizálásához, valamint DAF-16-függő élettartam-növekedéshez vezet (152). Érvelésem szerint, ha a HSP-90 stabilizálja a DAF-15 konformációját, akkor a csökkent HSP-90 kapacitásnak a DAF-16 aggregációjához, s az *rle-1* mutánsok megnövekedett élettartamának csökkenéséhez kell vezetnie. Noha nem észleltem jelentős mértékű emelkedést a DAF-16A::RFP jelében *rle-1* mutáns háttéren, a *hsp-90(RNSi)* nem zavarta meg a DAF-16 eloszlását, és nem okozott DAF-16 aggregációt (23./a-c ábra). Ennek oka lehet más, eddig még nem azonosított ubikvitin ligáz(ok) működésének hatása. Mindazonáltal a HSP-90 nem befolyásolta a DAF-16 fehérje turnover-ét: nem figyeltem meg csökkenést a fluoreszcensen jelölt DAF-16A fehérje mennyiségében (14., 15., 17., 18. és 23. ábrák), s nem tapasztaltam kompenzáló mRNA-szint növekedést sem a *daf-16a* gén esetén (26./d ábra) *hsp-90* csendesítés hatására. Hasonlóképp, az *rle-1* által indukált élettartam-növekedés a pusztán DAF-16A::RFP-t kifejező törzsben szintén fennmaradt a HSP-90 hiányában is (23./e), ezzel azt sugallva, hogy a funkcióképes DAF-16 fehérje stabilizálása nem igényli a HSP-90-et – noha természetesen az *rle-1* mutáció DAF-16-

független, élettartamra kifejtett hatása sem zárható ki. A DAF-16 konformációs stabilitását támogatja az is, hogy ellentétben a HSP-90 kliensekkel, a proteotoxikus stresszek, mint például a hősök, nem károsítják (13,19), hanem inkább aktiválják a DAF-16-ot (143,153)(jelen munka). Így valószínűtlennek tűnik, hogy a DAF-16 a HSP-90 kliensfehérjéi közé tartozna.

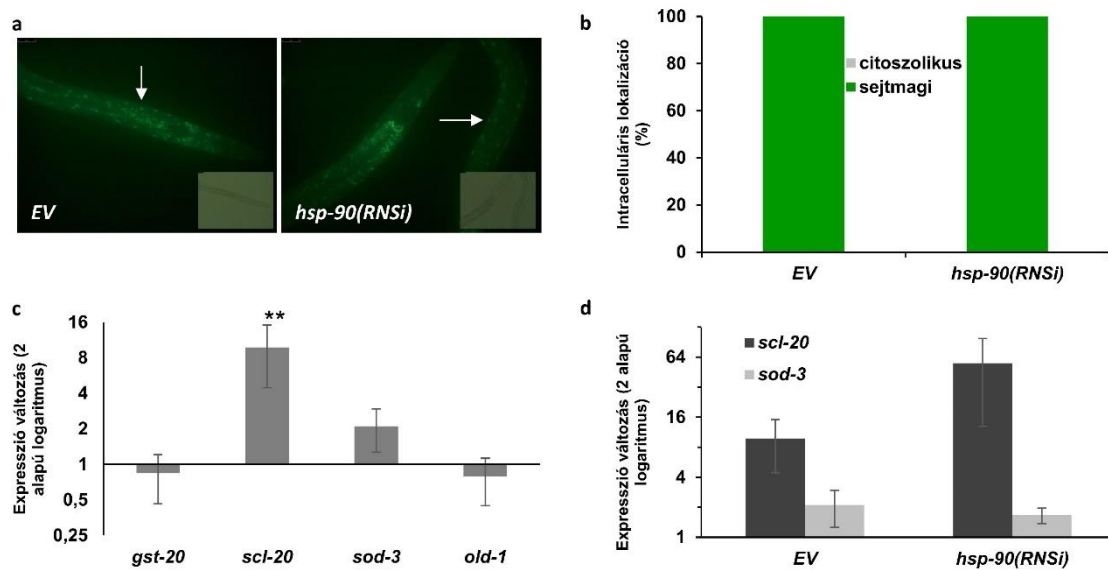


23. ábra: A HSP-90 csendesítése nem destabilizálja a DAF-16A::RFP-t, valamint az *rle-1* ubikvitin ligáz mutáns élettartam-növekedését sem gátolja. (a-c) A *hsp-90(RNSi)* nem befolyásolja sem a DAF-16A::RFP szintjét, sem pedig annak aggregációját az *rle-1* mutánsban. (a) Reprezentatív epifluoreszcens mikroszkópos képek, melyek a DAF-16A::RFP jelet mutatják vad típusú és *rle-1* mutáns háttéren. A DAF-16A::RFP lokalizációjának (b) és fehérje szintjének (c) számszerűsítése az (a) panelről, három független kísérlet adatait használva, melyek mindegyikében 30 állatot használtam kondícióként.

A „citoszolikus” jelző olyan állatokat jelöl, melyekben a RFP-jel a sejtplazmában mutatkozott, a „köztes” jelzővel olyan állatokat illetem, melyeknél a sejtplazma mellett a sejtmagban is megfigyelhető volt a RFP, míg a „sejtmagi” olyan állatokat takar, melyek esetén a RFP jel a sejtmagokban koncentrált. A statisztikai analízist ANOVA használatával végeztem és az adatok a 9. táblázatban találhatóak meg. (d) A *hsp-90(RNSi)* hatása a *hsp-90* és *daf-16a* mRNS szintekre. Az mRNS expressziót qRT-PCR használatával vizsgáltam, β -actin mRNS-re normalizáltam, majd a kettes alapú logaritmusokra transzformált expresszió változás értékeket fejeztem ki (átlag \pm az átlag sztandard hibája) az üres vektorhoz viszonyítva, melynek értékét 1-nek vettem. Az itt bemutatott adatok három független kísérletből származnak. A qRT-PCR statisztikát ANOVA használatával analizáltam, az adatok megtalálhatóak a 8. táblázatban. HS: hősokk, EV: üres vektor RNSi. *:p<0,05; ***:p<0,001. (e) A *daf-16a::rfp* állatok megnövekedett élettartama *rle-1(cxTi510)* háttéren (p<0,01 3-ból 2 kísérletben a *daf-16a::rfp;EV*-hoz viszonyítva) továbbra is fennmarad *hsp-90(RNSi)* kezelés mellett (p<0,01 3-ból 2 kísérletben a *daf-16a::rfp;daf-21(RNAi)*-hoz viszonyítva). Az élettartam méréseket háromszor végeztem el. A túlélési görbéket Kaplan-Meyer log rank teszt használatával hasonlítottam össze. A túlélési adatok megtalálhatóak az 5. táblázatban. EV: üres vektor RNSi.

Az emlős sejtekhez hasonlóan, amikor az ILS jelpálya aktív, az AKT-1 és AKT-2 kinázok foszforilálják a DAF-16/FOXO fehérjét, ami megakadályozza, hogy a sejtmagban halmozódjon fel azáltal, hogy hatására a DAF-16a citoplazmában található 14-3-3 állványfehérjékhez kötődik (143). Csökkent ILS hatására a DAF-16 áthelyeződik a sejtmagba. Annak érdekében, hogy kiderítsem, a HSP-90 a DAF-16 sejtmagi forgalmának szintjén, vagy ahhoz képest upstream fejt ki hatását, alkalmaztam egy törzset, mely a *daf-16a^{AM}::gfp* (AM: “AKT site mutant”) transzgént tartalmazza, amiben az AKT foszforilációs helyeken található szerin és treonin aminosavakat alaninokra cserélték (143). Korábbi adatokkal egyező módon (143), a DAF-16A^{AM}::GFP sejtmagi lokalizációt mutatott vad típusú *daf-2*-vel rendelkező állatokban (24./a és b ábra). Amennyiben a HSP-90 szükséges ahhoz, hogy a DAF-16A elérje a natív, funkcióképes konformációját, akkor a csökkent HSP-90 kapacitás instabil DAF-16A^{AM}::GFP-t

eredményezne, ami – mivel képtelen bejutni a sejtmagba – lebontásra kerülne. Nem ez az eset áll fenn, mivel sem a DAF-16A^{AM}::GFP mennyisége, sem annak lokalizációja nem változott meg *hsp-90(RNSi)* hatására (24./a és b ábra), ami újabb bizonyítékként szolgál arra, hogy a DAF-16 konformációs stabilitása független a HSP-90-től, valamint jelzi, hogy a nem foszforilált DAF-16A sejtmagi transzlokációja nem igényli a HSP-90-et. Emellett ezek az eredmények valószínűtlenné teszik a DAF-16A nukleáris exportjának HSP-90-függő gátlását is. Ehelyett úgy tűnik, a HSP-90 a DAF-16A sejtmagi forgalmától upstream helyen fejt ki hatását. Ezt a következtetést támasztja alá a DAF-16A-specifikus célgének expressziójának vizsgálata a DAF-16A^{AM} törzsben. A korábban vizsgált négy specifikus DAF-16A célgének közül csupán az *scl-20* és *sod-3* indukálódott a DAF-16A^{AM} törzsben a *daf-16(mu86)* mutánshoz hasonlítva (24./c ábra), bár csupán *scl-20* érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Mindazonáltal ezen gének expressziója nem változott meg a *hsp-90(RNSi)* hatására, ami arra utal, hogy a sejtmagi DAF-16 képes részlegesen transzkripciós aktivitást kifejteni függetlenül a HSP-90-től (24./d ábra).



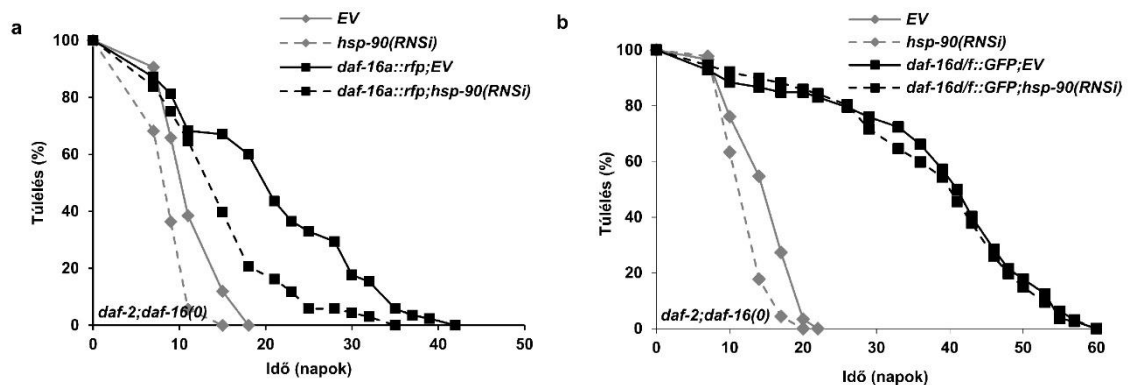
24. ábra: A HSP-90 sem a DAF-16A^{AM} sejtmagi áthelyeződéséhez, sem annak transzkripciós aktivitásához nem szükséges. (a) A DAF-16A^{AM}::GFP sejtmagi lokalizációja L4-es korú állatokban üres vektoron, vagy *hsp-90(RNSi)*-n növesztve. Fehér nyilak mutatják a sejtmagi elhelyezkedésű GFP-t. Az epifluoreszcens mikroszkópos képek három független mérést reprezentálnak. (b) A DAF-16A^{AM}::GFP intracelluláris lokalizációjának számszerűsítése az (a) panel alapján. (c) A DAF-16A-specifikus célgének expressziója DAF-

16A^{AM}::GFP állatokban. A négy vizsgált mRNS közül csupán az *scl-20* (p=0,006) mutatott szignifikáns emelkedést a *daf-16(mu86)* háttértörzshöz viszonyítva, míg a *sod-3* expressziója is némiképp emelkedett (p=0,351). (d) A *hsp-90(RNSi)* nem csökkentette sem az *scl-20*, sem pedig a *sod-3* mRNS mennyiségét (p=0,374 és p=0,853). Az RNSi kezeléseket kikeléstől kezdve végeztem. Az mRNS expressziót qRT-PCR használatával vizsgáltam, *β-actin* mRNS-re normalizáltam, majd a kettes alapú logaritmusokra transzformált expresszió változás értékeket fejeztem ki (átlag ± az átlag sztandard hibája) az üres vektorhoz viszonyítva, melynek értékét 1-nek vettem. Az itt bemutatott adatok három független kísérletből származnak. A qRT-PCR statisztikát ANOVA használatával analizáltam, az adatok megtalálhatóak a 8. táblázatban. EV: üres vektor RNSi. **:p<0,01.

Ezek a megfigyelések alátámasztják a feltevést, miszerint a HSP-90 a DAF-16A sejtmagi transzlokációjától upstream fejt ki hatását.

6.2.6 A HSP-90 biztosítja a *daf-16a*-függő élettartam növekedést

Megfigyeléseim a HSP-90-et a DAF-16 aktivitásának izoforma-specifikus regulátoraként azonosították. Megfigyeltem továbbá, hogy a HSP-90 kapacitás csökkenése a lárvális fejlődés során korlátozza a *daf-2* mutáció által indukált megnövekedett élettartamot. Mindezekből fakadóan megvizsgáltam, miként hat a *hsp-90(RNSi)* kikeléstől alkalmazva az egyedi DAF-16A és D/F izoformák élettartamára a csökkent ILS kontextusában. Ehhez az izoforma-specifikus törzseket használtam *daf-2(e1370);daf-16(mgDf50)* mutáns háttéren.



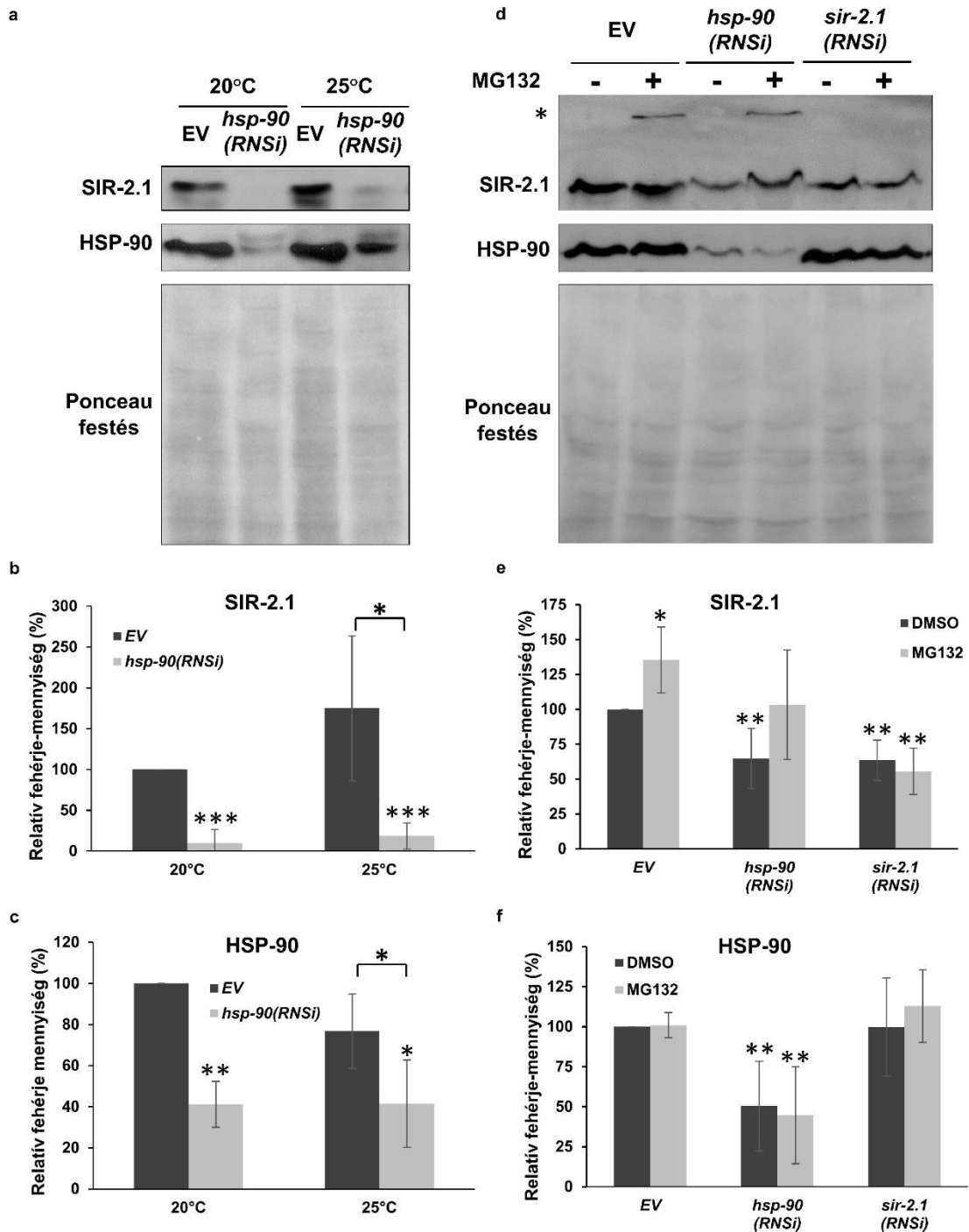
25. ábra: A HSP-90 szükséges a DAF-16A, de elhanyagolható a DAF-16D/F által közvetített élettartam-növekedéshez. (a) A *daf-2(e1370)* allél megnöveli a túlélést a *daf-16(mgDf50);daf-16a::rfp* férgekben ($p < 0,001$). A *hsp-90(RNSi)* csökkenti a *daf-2* mutáció által indukált élettartam-növekedést ($p < 0,001$ a *daf-2;EV*-hoz viszonyítva). (b) A HSP-90 nem szükséges a *daf-2(e1370)* mutáció által kiváltott élettartam növekedéshez a *daf-16(mgDf50);daf-16d/f::gfp* törzs esetén ($p = 0,633$). Az élettartam méréseket háromszor végeztem el. A túlélési görbéket Kaplan-Meier log rank teszt használatával hasonlítottam össze. Az élettartam értékek megtalálhatóak az 5. táblázatban. EV: üres vektor RNSi.

Korábban közzétett adatoknak megfelelően (69,70) mind a *daf-16a::rfp*, mind pedig a *daf-16d/f::gfp* transzgen hosszabb élettartamhoz vezetett, ha a *daf-2(e1370);daf-16(mgDf50)* háttértörzshöz hasonlítottam (25./a és b ábra) ami mindkét izoforma szerepvállalását támasztja alá a *daf-2* mutáció által indukált élettartam-növekedésben. A *hsp-90(RNSi)* tovább csökkentette a *daf-2(e1370);daf-16(mgDf50)* kettős mutáns élettartamát, ami azt sugallja, a HSP-90-nek lehetnek más, szintén élettartamot befolyásoló partnerei is a DAF-16-on kívül. Fontos, hogy a *hsp-90* csendesítése

konzisztensen csökkentette a DAF-16A::RFP-t kifejező törzs élettartamát mind a négy ismétlés során, miközben a négyből két mérés esetén nem volt képes megváltoztatni a DAF-16D/F::GFP transzgen állatok túlélését (25./a és b ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HSP-90 optimális kapacitása a lárvális fejlődés során szerepet játszik az élettartam kialakításában a DAF-16A funkcionálisának szelektív biztosítása révén.

6.3 A HSP-90 hiánya a SIR-2.1 proteasomális lebontásához vezet

Munkatársam, Nguyen Minh Tu emlős sejteken kimutatta, hogy a SIRT1 stabilizációjához specifikusan igényli a Hsp90-et, hiányában a fehérje proteasóma általi lebontásra kerül (ld. Nguyen és mtsi. 2018 1. és 2. ábra (74)). Tekintettel mindkét fehérje evolúciósan konzervált jellegére, megvizsgáltam, vajon chaperon-kliens interakció áll-e fenn a két fehérje között fonálférgekben is. Ennek eldöntése érdekében megmértem a SIR-2.1 fehérje szintjének változását *hsp-90(RNSi)* hatására 20 és 25°C-on. A kétféle hőmérséklet oka, hogy láthassam, magasabb hőmérsékleten, ahol a HSP-90 készlet nagyobb mértékben terhelődik le a kitekeredett fehérjék nagyobb száma miatt, érzékenyebbé válik-e a SIR-2.1 mennyisége a HSP-90 hiányára, s így jobban megfigyelhető-e egy esetleges változás a dajkafehérje mennyiségének csökkentése miatt.



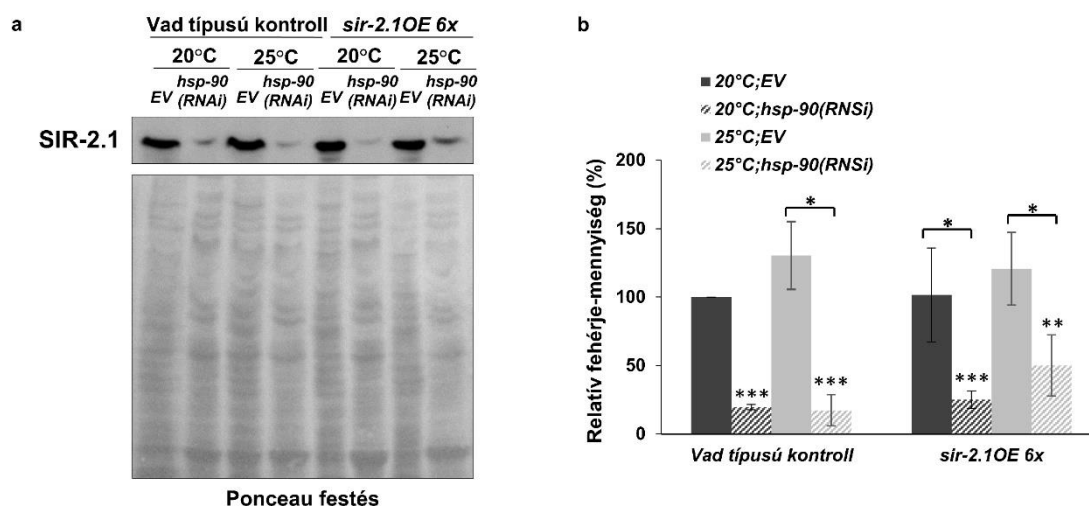
26. ábra: A *hsp-90* csendesítése csökkenti a SIR-2.1 szintjét, és proteaszomális lebomlását váltja ki. (a) A *hsp-90*(RNSi) hatása a SIR-2.1 és HSP-90 fehérje szintekre. Fiatal felnőtt, *hsp-90*(RNSi)-vel, vagy üres vektorral (EV) kieléstől kezelt állatokból készült lizátumok Western Blotja. Az állatokat 20 illetve 25°C-on tartottam. A képek reprezentatívak három kísérletre. (b) és (c) Az (a) panelben

bemutatott kísérletek SIR-2.1 és HSP-90 fehérje szintjeinek számszerűsítése. Minden kísérletet háromszor végeztem el, és a fehérje szinteket átlagként és annak sztandard hibájaként fejeztem ki az oszlopdiaagrammokon, valamint a saját kezeletlen kontrollhoz viszonyítottam párosítatlan T-próba segítségével. A statisztikai adatok megtalálhatóak a 6. táblázatban. *:p<0,05, ***:p<0,001 (d) Az MG132 kezelés hatása a SIR-2.1 fehérje szintekre. Fiatal felnőtt, kikeléstől *hsp-90(RNSi)*-vel, vagy üres vektorral (EV) kezelt, majd az L2-es lárvastádium elérését követően 10µM, DMSO-ban oldott MG132-t, vagy DMSO kontrollt tartalmazó lemezekre áthelyezett állatokból készült lizátumok Western Blotja. A képek négy kísérletet reprezentálnak. A csillag (*) jelöli a SIR-2.1 antitesttel reakcióba lépő aggregátumokat, melyek a gél tetején gyűltek össze az MG132-kezelt EV és *hsp-90(RNSi)* mintákban, de nem láthatóak a *sir-2.1(RNSi)* minták esetén. (e) és (f) A (d) panelben bemutatott kísérletek SIR-2.1 és HSP-90 fehérje szintjeinek számszerűsítése. Minden kísérletet négyszer végeztem el, és a fehérje szinteket átlagként és annak sztandard hibájaként fejeztem ki az oszlopdiaagrammokon, valamint az EV kezeletlen kontrollhoz viszonyítottam párosítatlan T-próba segítségével. A statisztikai adatok megtalálhatóak a 6. táblázatban. *:p<0,05, **:p<0,01.

Eredményeimből látható, hogy a *hsp-90* gén csendesítése hatékonyan csökkenti a HSP-90 fehérje szintjét (26./a és c ábra), valamint ezzel együtt csökkent SIR-2.1 fehérjeszinthez is vezet (26./a és b ábra). Ez megfigyelhető mind 20, mind pedig 25°C-on, noha ez utóbbinál egy kb. 50%-os, nem szignifikáns fehérje-szint emelkedés is jelentkezik. Tekintettel arra, hogy a HSP-90 kliensek a dajkafehérje hiányában gyakorta a proteaszómában kerülnek lebontásra, ennek a folyamatnak a gátlása lehetővé teszi, hogy megvizsgáljam, a *hsp-90* csendesítése vajon a SIR-2.1 proteaszóma általi lebontásához vezet-e – ami alátámasztaná a két fehérje közötti chaperon-kliens kapcsolatot. A proteaszómális lebontás gátlását az MG132 proteaszóma-gátlószer 10 µM-ban való, L2-es lárvakortól történő alkalmazásával értem el. A minta folyékony frakciójából kicsapódott fehérjék feloldása érdekében a lizispufferhez 6 M ureát adtam. Negatív kontrollként *sir-2.1(RNSi)* kezelést is alkalmaztam, ami a fehérje termelődését hivatott csökkenteni. Ezekben a kísérletekben a *hsp-90(RNSi)* 40% körüli SIR-2.1 fehérjeszint

csökkenést okozott, a *sir-2.1(RNSi)*-hez hasonlóan – a korábbi méréstől való eltérés potenciális oka a DMSO jelenléte lehet. Az MG132 kezelés növelte a SIR-2.1 fehérje szintjét EV-on tartott állatokban. Emellett az MG132 kezelés az EV kontroll szintjére állította vissza a SIR-2.1 szintet *hsp-90(RNSi)*-vel kombinációban alkalmazva, de nem tett így a *sir-2.1(RNSi)* esetében, ami a *sir-2.1* mRNS mennyiségét csökkenti (26./d és f). Egyes kísérletekben továbbá a SIR-2.1 fehérje egy kisebb része nem volt képes futni az elválasztó gélben és annak tetején gyűlt össze proteaszóma-gátlás hatására, de ez csupán az EV- és *hsp-90(RNSi)*-kezelt minták esetén volt megfigyelhető, a *sir-2.1(RNSi)* esetén nem. Ezek a megfigyelések a SIR-2.1 proteaszóma által közvetített forgalmára és lebomlására engednek következtetni, aminek mértéke tovább emelkedik a HSP-90 hiányának hatására. Mindezek alapján azt feltételezem, a HSP-90-kapacitás már normál, fiziológiás körülmények között is korlátozza a SIR-2.1 foldingját és működését.

Annak érdekében, hogy a megfigyelt interakciót kellőképpen alátámasszuk, hasznosnak tűnt megvizsgálni a jelenséget egy másik genetikai háttéren is. Ennek érdekében elvégeztem a 26. ábra a és b paneljén látható mérést egy alacsony kópiaszámú SIR-2.1 túltermelő törzs, valamint annak vad típusú kontrollja használatával (27. ábra).



27. ábra A HSP-90 csendesítése csökkenti a SIR-2.1 fehérje szintjét az alacsony kópiaszámú szirtuin túltermelő törzsben. (a) A *hsp-90(RNSi)* csökkenti a SIR-2.1 fehérje szintjét az alacsony kópiaszámú transzgén *sir-2.1* túltermelő törzsben és annak vad típusú kontroll törzsében egyaránt. Fiatal felnőtt, kikeléstől *hsp-90(RNSi)*-vel, vagy üres vektorral (EV) kezelt vad típusú kontroll, illetve szirtuin

túltermelő állatokból készült lizátumok Western Blotja. Az állatokat 20 vagy 25°C-on tartottam. A képek három kísérletet reprezentálnak. (b) A (a) panelben bemutatott kísérletek fehérje szintjeinek számszerűsítése. A kísérletet háromszor végeztem el, és a fehérje szinteket az átlagként és annak szórásaként fejeztem ki az oszlopdiagrammokon, valamint a saját, és a vad típusú kezeletlen kontrollhoz viszonyítottam párosítatlan T-próba segítségével. A statisztikai adatok megtalálhatóak a 6. táblázatban. *:p<0,05, **:p<0,01, ***:p<0,001

A méréseim munkatársam emlős SIRT1 fehérjével kapcsolatos eredményeivel együtt megerősítik hipotézisemet, miszerint a SIR-2.1 fehérje működése valóban függ a HSP-90 chaperon jelenlététől, a két protein között dajkafehérje-kliens kölcsönhatás áll fenn. Ez az eredmény rámutat a szirtuin működésének egyik fontos szabályozási mechanizmusára.

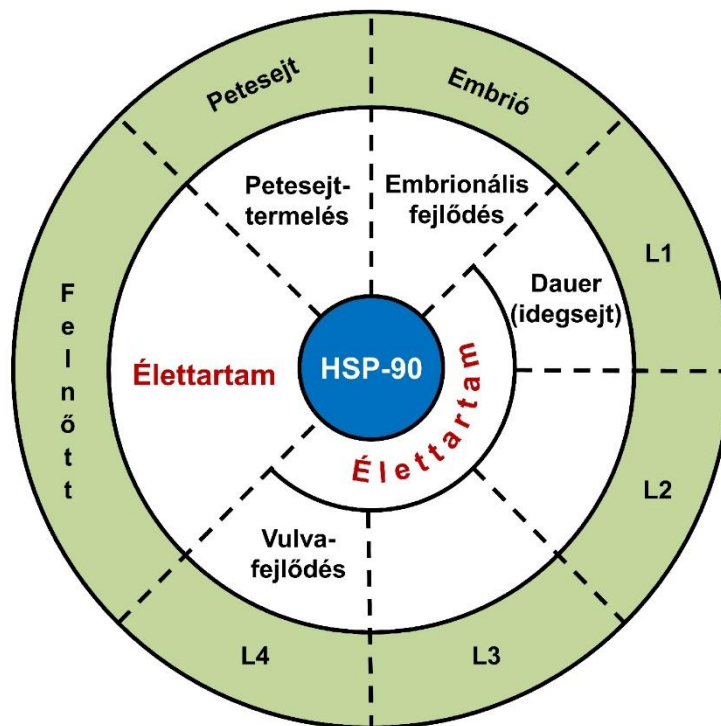
7. Megbeszélés

7.1 Következtetések a HSP-90 szerepéről az élettartam szabályozásában

Kimutattam, hogy a HSP-90 kapacitás RNS interferencia általi csökkentése nem-neuronális szövetekben a lárvális fejlődés kezdetétől alkalmazva csökkenti a vad típusú, valamint az alacsony ILS aktivitás miatt megnyúlt élettartamú állatok túlélését. Ez a hatás akkor is megmaradt a vad típusú állatokban, ha az RNSi kezelést az L4-es lárvastádiumtól kezdve alkalmaztam. Ennek a hatásnak mind *daf-16*-függő, mind pedig attól független komponensei is vannak. Ez az élettartam-csökkenés minden szembeötlő fejlődésbeli eltérés nélkül következik be – az emelkedett hőtűrés és alacsony fertilitás ellenére. Eredményeim tehát a HSP-90 közvetlen szerepére világítanak rá, mint az élettartam szabályozója. Megfigyeléseim összhangban állnak a korábban a funkciónyeréses *p673* mutáns esetén leírt megnőtt élettartammal (45), valamint a hosszúéletű *age-1* mutánsnál *hsp-90(RNSi)* hatására megfigyelt csökkent élettartammal is (46). Előbbi esetén leginkább alacsony hőmérsékleten volt kifejezettebb a megnyúlt élettartam, de magasabb hőmérsékleten is jelentkezett, míg utóbbinál a vad típusú állatokban nem figyeltek meg élettartam-csökkenést a *hsp-90* csendesítésének hatására. Mivel élettartam méréseimet 20°C-on végeztem, ahol funkciónyeréses mutáns is hosszú életű, ezért a *hsp-90(RNSi)* élettartam-csökkentő hatása összhangban van ezzel. További vizsgálatok során érdemes lehet megvizsgálni, hasonlóan hőmérséklet függő-e a hatás a csendesítés esetén is. Az *age-1* mutáns túlélését vizsgáló tanulmányban az élettartam-méréseket 25°C-on végezték, ahol a másik tanulmány tanúsága szerint a funkciónyeréses mutáns élettartama is a legkevésbé megnyúlt. Ez alapján felvetem annak lehetőségét, hogy a vad típus esetén elmaradt élettartam-csökkentő hatás *hsp-90(RNSi)*-n az eltérő vizsgálati körülmények, nevezetesen a magasabb hőmérséklet rovására írható. Feltevésem szerint magasabb hőmérsékleten a HSP-90 kapacitást nagyobb mértékben terheli le a sejt fehérjekészletére általánosabban jellemző instabilitás, ami mellett az RNSi általi csökkentés hatása kisebb mértékben érvényesül.

A nem idegi sejtekben történő *hsp-90* csendesítés élettartamra kifejtett hatása mellett kimutattam, hogy a dauer képződés ezzel szemben a *hsp-90* idegsejtekben történő csendesítését igényli. Végül megfigyeltem, hogy a *hsp-90* csendesítése megzavarja a petesejt-termelést, valamint az F1 generáció embrionális fejlődését. Ezek alapján idő és

térbeli specificitás kormányozza a HSP-90 pleiotropikus hatásait a fertilitás, a lárvális fejlődés, valamint az élettartam szabályozásában (28. ábra). Az efféle idő és térbeli funkció-eloszlás már szabályozó mechanizmusoknak is jellemzője. Példaként az ILS a fejlődés korai szakaszában elsősorban a dauer fenotípusra fejt ki hatását, míg a felnőttkor során az élettartamot szabályozza (138). Ennek megfelelően a neuronális *daf-16* szabályozza a lárvák dauerré való fejlődését, míg a béltraktusban a *daf-16* a korai felnőttkorban tölt be szerepet az élettartam-szabályozásban (140).



28. ábra: A HSP-90 szabályozó szerepei a *C. elegans* élete során. Idő- és térbeli meghatározottságot mutató HSP-90 hatások a fonálféreg életciklusában.

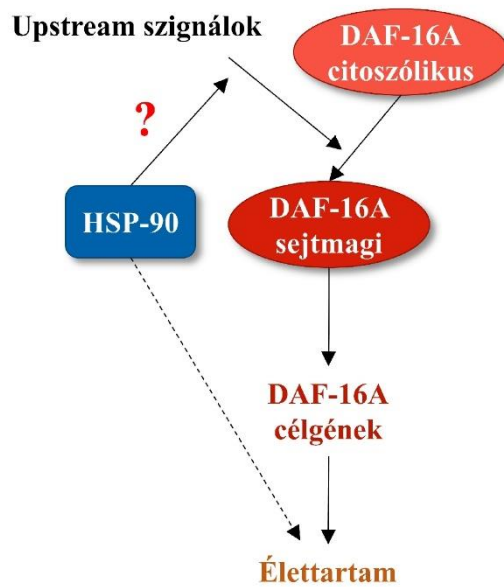
Megfigyeléseim emellett azt is sugallják, hogy a HSP-90 újonnan azonosított, élettartam-növelő szerepe a fejlődésre kifejtett hatásaitól elkülönülve léphet fel, noha már működésbe lép a lárvális fejlődés során. Noha a pontos mechanizmusok beazonosítása további vizsgálatokat igényel, a potenciális jelöltek közé tartozik a fehérje-fehérje, és jelátviteli hálózatok kevésbé rendezett szerveződése (28), valamint a proteosztázis gyorsabb hanyatlása (154) különös tekintettel az izomszövetre, ahol a HSP-90 hiánya a filamentális struktúra integritásának megromlásához vezet, ami a vad típushoz mérten rosszabb motilitást eredményez (44). Ezekhez hasonlóan fontos, az öregedéssel

összefüggésben álló jelenség az immunrendszer hanyatlása is, mely bakteriális fertőzésekhez vezet, ami kifejezettebb a *hsf-1*, *daf-16*, *skn-1* és szintúgy a *hsp-90* mutáns állatokban (43,155–157).

7.2 A HSP-90 az ILS által szabályozott folyamatokra kifejtett hatásával kapcsolatos következtetések

Mind a proteosztázis védelme, a szöveti integritás, mind pedig az immunválasz is erősebb a *daf-2* mutánsokban (60,155), melyeknél megfigyeltem, hogy a *hsp-90* csendesítése felnőttkorban nemcsak nem csökkentette, de kismértékben növelte is az élettartamot. Úgy gondolom, hogy a HSP-90 csökkenése a korai felnőttkor során, melyhez a *daf-2* mutáció, mint enyhe metabolikus stresszor társul, aktivál egy élettartam-növelő választ, ami ellensúlyozza a *hsp-90* csendesítés általi élettartam-csökkentő hatást. A lehetséges mechanizmusok közé tartozhat a HSF-1-függő hő sokkválasz (60,130), az egyes DAF-16 izoformák eltérő szabályozása (69,70)(jelen munka) vagy egy, a *hsp-90*-tól független útvonal. Mindazonáltal a felmerült ötletek igazolása, vagy a pontos, valódi mechanizmus, illetve mechanizmusok azonosítása további kutatásra vár.

Eredményeim bizonyítékkul szolgálnak arra, hogy a HSP-90 a DAF-16A funkciójának specifikus biztosításán keresztül járul hozzá a hosszú élettartamhoz, melyet a HSP-90 a DAF-16A sejtmagi áthelyeződéséhez, transzkripciós működéséhez, valamint a DAF-16A, mint egyedüli izoforma élettartam-mövelő hatásához való szükségessége is tükröz (29. ábra). Fontos, hogy a HSP-90 szükséges volt négyből három DAF-16 célgén indukciójához, melyek mindegyike élettartam-növelő hatással bír: *sod-3* (158), *old-1* (159), *scl-20* (146) és *gst-20* (70), az utóbbi kettőt DAF-16A-specifikus célgénként azonosították (70) (22./a-d ábra). A *sod-3*-at már korábban DAF-A és DAF-16D/F közös célgénként írták le (69,70), eredményeim továbbá felvetik az *old-1*-et is, mint DAF-16A preferenciális célgén. Ezzel ellentétben a DAF-16D/F működését nem érintette a *hsp-90* csendesítés. Noha természetesen nem zárható ki, hogy a DAF-16B izoformát is befolyásolja a HSP-90, a megfigyelt HSP-90-függő hatásokban igen valószínűtlen, hogy szerepet játszana, ugyanis nem vesz részt az élettartam szabályozásában, mindamellert pedig legfőképp az idegsejtekben és a garatban fejeződik ki, ahol az *RNSi* nem képes kifejteni hatását (69,143,145,160).



29. ábra: A HSP-90 DAF-16A aktivációra és élettartamra kifejtett hatásának modellje. Upstream jelek hatására (mint a csökkent ILS és a hősokek) a HSP-90 elősegíti a DAF-16A sejtmagba történő áthelyeződését és transzkripció működését, ami élettartam növekedéshez vezet. Ezt a közvetett hatást más jelpályák komponensei is közvetíthetik. A HSP-90 a DAF-16-től független hatással is bír az élettartamra (szaggatott vonallal jelölve). Az egyszerűség kedvéért nem foglaltam bele a modellbe a DAF-16D/F HSP-90-független aktivációját.

Tanulmányom megerősíti mind a DAF-16A, mind pedig a DAF-16D/F izoformák szerepét az élettartam szabályozásában csökkent ILS mellett (69,70). Kísérleteim, melyekhez a Kwon és munkatársai (69) által készített transzgén törzseket használtam, nem teszik lehetővé egyértelmű következtetések levonását az egyes izoformák fontosságát illetően. Egy közelmúltbeli kitűnő tanulmányban, mely az egyes izoformák mutánsait használta kimutatták, hogy a DAF-16D/F csupán akkor szükséges az élettartam-növekedéshez, ha DAF-16A nem expresszálódik, valamint azt is, hogy a DAF-16A lényegesen széleskörűbb génexpressziós mintázatokat irányít a DAF-16D/F-hez képest (93% a 30%-kal szemben a DAF-16 által szabályozott mRNS-ek közül) (70). Erre alapozva az alábbi modellt javaslom: a HSP-90 DAF-16A által szabályozott génekre kifejtett hatása szükséges a *daf-2* mutáció által indukált, *daf-16* mediált hosszú élettartamhoz. Ha a HSP-90 kapacitás csökken és így a DAF-16A aktivitás sérül, a DAF-16D/F izoforma még képes kompenzáló választ kiváltani, ami megnyúlt élettartamot

eredményez. Talán ez magyarázhatja a megfigyelt élettartam-növekedést, illetve részleges csökkenést *daf-2* mutánsokban, melyet felnőttkortól, vagy kikeléstől alkalmazott *hsp-90(RNSi)* kezelés hatására figyeltem meg. Egyéb élettartam-növelő jelek, melyek szelektíven a DAF-16D/F izoformát aktiválják, a HSP-90 elérhetőségétől függetlenül tevékenykedhetnek.

Mi lehet a HSP-90 és DAF-16A közötti funkcionális interakció molekuláris mechanizmusa? A tény, miszerint mind a HSP-90, mind pedig a DAF-16A és DAF-16D/F széleskörűen kifejeződnek szinte minden szövetben, kizárja a szövet-specifikus interakció lehetőségét (44,69,154). Megfigyeltem a DAF-16A HSP-90-függő sejtmagi transzlokációját az izomban, hipodermiszben, valamint a bélben. Korábbi tanulmányok azonosították az intesztinális, de nem a neuronális, vagy izom-specifikus DAF-16 expressziót, mint felelőst a csökkent ILS által kiváltott megnyúlt élettartamért (140). Mindemellett az izom- és bél-specifikus DAF-16 egyaránt szemben hat a reprodukzív öregedéssel (161). Erre alapozva úgy gondolom, hogy a túlélést támogató HSP-90-DAF-16A interakció minden valószínűség szerint leginkább az izom és bélszövetben jelenik meg.

A szöveti expresszió megoszlásán túl a HSP-90-DAF-16A interakció izoforma-specifikus jellege fakadhat a DAF-16A és D/F izoformák szekvenciája közötti különbségekből is. Kijelenthető, hogy a két izoforma osztozik a legtöbb 3' exonjukon, beleértve a DNS-kötésért felelős Forkhead domént is, azonban az 5' régióban, ami a fehérje termék N-terminális részének felel meg, eltérnek egymástól (69,162) (3. ábra). Egy lehetséges forgatókönyv, hogy hasonlóan egyéb transzkripciós faktorokhoz, a DAF-16A rendelkezik egyfajta belső instabilitással, ami igényli a HSP-90 dajkafehérje funkcióját (13,28). Mindazonáltal a DAF-16 nem tűnik HSP-90 által stabilizáltnak, mivel RNSi révén történő csendesítése nem vezetett sem a DAF-16A fehérje aggregálódásához, sem pedig fehérje, ill. mRNS szintjének, vagy biológiai funkciójának megváltozásához az *rle-1* nullmutánsban. Az *rle-1* egy E3 ubikvitin ligáz, ami felelős a DAF-16 poli-ubikvitinilációjáért (152). Mindamellett, a *hsp-90* csendesítése nem gátolta sem a sejtmagi importját, sem pedig transzkripciós aktivitását a konstitutívan sejtmagi, AKT-foszforyláció mutáns DAF-16A^{AM}::GFP-nek (143), ami a DAF-16A megfelelő foldingjára utal. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a HSP-90 a DAF-16A sejtmagi forgalmától upstreamebb ponton avatkozik be annak aktivációjába. A DAF-16A

és D/F izoformák közötti promóter-csere igazolta, hogy a DAF-16A N-terminális szegmense felelős a DAF-16 hatékony sejtmagba történő bejutásáért (69). Fontos megjegyezni, hogy három konszenzus AKT foszforilációs RxRxxS/T motívum, konzervált az emberi FOXO génekben, valamint a DAF-16A és B izoformákban, azonban a DAF-16D/F N-terminális régiójában kicserélődött egy másik, QxRxxS szekvenciára, ami minden bizonnyal magyarázza a két izoforma asszimmetrikus szabályozását az AKT-1 és AKT-2 (69) által. Úgy vélem, hogy a DAF-21 általi differenciált interakció mechanizmusa a DAF-16 izoformák elsődleges szekvenciájában rejlik, mely különböző szabályozó módosítások tárgyát képezi. Egy ilyenfajta izoform-specifikus behatást le is írtak: a TORC1 gátlása megnyújtotta az élettartamot a DAF-16D/F sejtmagi áthelyeződésének indukálása révén, miközben nem befolyásolta a DAF-16A-t (163). Az általuk és általunk tett megfigyelések alátámasztják a különféle szabályozó hatások DAF-16/FOXO általi izoforma-specifikus integrációját az élettartam meghatározásába. Ezen behatások biokémiai természete, valamint a pontos hatásmechanizmusok feltárása kihívást jelent további kutatások számára.

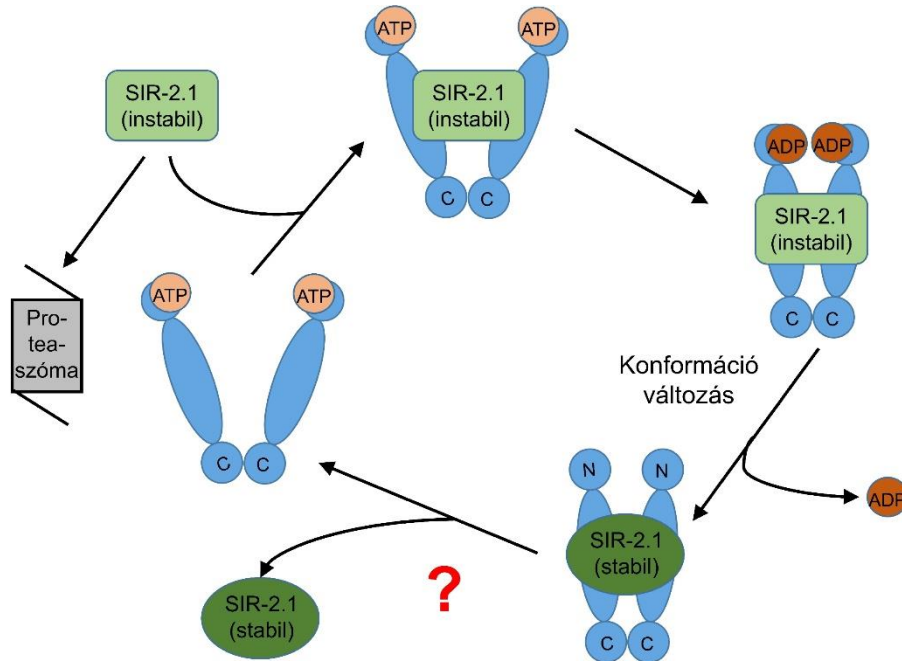
A HSP-90 nem az egyetlen hő sokkfehérje, ami befolyásolja a DAF-16 sejtmagi forgalmát. A HSF-1 és a konstitutív HSP70 izoforma HSP-1 szükségesek a DAF-16A/B sejtmagi exportjához a *daf-16a/b::gfp* túltermelő TJ356 törzsből, ami pedig megóvjaa a sejtet a DAF-16 túlaktivációjának immunkárosító hatásaitól (43). Az SKN-1/Nrf túlzott aktivitása szintén károsította az immunválaszt *C. elegans*-ban (156), ami jelzi a stressz-indukált szabályozó faktorok optimalizált aktivitásának jelentőségét. Hasonlóképp, a különböző mester-regulátorok aktivitásának összehangolása kulcsfontosságú a szervezet szintű válaszokhoz, mint amilyen a HSF-1 és a DAF-16 együttműködése a csökkent ILS aktivitású mutánsok élettartamának megnyújtásában (60). Figyelemre méltó, hogy a HSP-90 a proteosztázis elsődleges szenzora, ami a jelátviteli hálózatokat is stabilizálja (19,28) valamint szabályozza a stresszválaszok transzkripciós faktorait: gátolja a HSF-1-et (44,130,154), míg támogatja a DAF-16A aktivációját (jelen munka). Ily módon a DAF-16 és HSF-1 koordinált aktivitásának HSP-90 általi fordított szabályozása biztosíthatja a szervezet egységes válaszát azáltal, hogy egyaránt érzékeli a fehérjekészlet állapotát, valamint a tápanyagok elérhetőségét, ami pedig a megfelelő önfenntartási folyamatok, hosszú távon pedig a hosszú élettartam irányába hat.

7.3 Következtetések a HSP-90 SIR-2.1 stabilizálásában betöltött szerepével kapcsolatban

A SIR-2.1 deacetiláz szerepe az élettartam meghatározásában régóta ismert (93–95) és vitatott (111,164). Mindazonáltal az irodalomban túlsúlyt képeznek azok a bizonyítékok, melyek azt támasztják alá, hogy a szirtuinok több modellrendszerben is elősegítik a hosszú élettartamot (105,114,115,165–167). Az élettartam növelésében szerepet játszó szirtuinok szabályozásának kutatása érthető módon szintén hosszú múltra tekint vissza. A SIR-2.1 emlős ortológja, a Sirt1 fehérje szerepet játszik az embrionális őssejtek fenntartásában (168), melyek emelkedettebb hiszton acetilációt mutatnak differenciáltabb társaiknál (169). Tekintettel arra, hogy az öregedésen túl a daganat-képződés is kapcsolatban áll az őssejtekkel, nem meglepő, hogy a szirtuinok szabályozása igen intenzíven kutatott, hiszen az általuk szabályozott folyamatokba való hatékony beavatkozás ígéretes módszernek tűnik több gyakori kóros állapot kezelése, illetve gyógyítása céljából (170).

Saját méréseim során fehérje-szint vizsgálatok révén kimutattam, hogy a SIR-2.1 és a 90 kDa molekulatömegű hőszokkfehérje között chaperon-kliens kölcsönhatás áll fenn *C. elegans*-ban, vagyis a HSP-90 megléte szükséges a szirtuin szerkezetének fenntartásához, és hiányában a deacetiláz proteaszomális lebontásra kerül. A HSP-90 ismert klienseinek jelentős része szabályozódik ilyen módon (150) (30. ábra). Eredményeimből nem derül ki, a SIR-2.1 vajon folyamatos komplexet képez-e a HSP-90-nel, vagy a megfelelő konformáció elérését követően ledisszociál és önmagában látja el feladatát. Mindazonáltal nem zárható ki egyik lehetőség sem, hiszen a citoplazmában mindkét fehérje jelen van, s a sejtmagban is leírták a Hsp90 jelenlétét emlősök esetén (23). Ismert, hogy a SIR-2.1 a 14-3-3 fehérjékkel kölcsönhatva aktiválja a DAF-16 transzkripciós faktort (106,171). Emellett azt is kimutatták, hogy a *C. elegans* egy másik szirtuin ortológja, a SIR-2.4, ami az emlős Sirt6/7 fonálféreg megfelelője, szintén pozitívan hat a DAF-16 stressz által kiváltott transzlokációjára (172). Felmerül annak a lehetősége, hogy mivel a SIR-2.1 HSP-90 kliensnek bizonyult, ez igaz lehet erre a másik *C. elegans* szirtuinra is. Ezek az adatok a *C. elegans* szirtuinokat a HSP-90 DAF-16 transzlokációra kifejlesztett hatásának potenciális közvetítőjeként jelölik ki, ami izgalmas további kutatási irányt jelenthet. Ezek a lehetőségek mindamellettt felhívják a figyelmet arra a korábban is

ismert megfigyelésre, miszerint a különféle stresszválaszok kulcsfehérjéi gyakorta kölcsönhatnak egymással annak érdekében, hogy együttes hatásuk eredőjeként az organizmus a körülményeknek leginkább megfelelő választ tudja adni a külső és belső környezet kihívásaira.



30. ábra: A SIR-2.1 HSP-90 általi szabályozásának modellje. Az egyszerűség kedvéért a potenciális kofaktoroktól eltekintettem az ábrán. Kérdéses, hogy vajon a SIR-2.1 folyamatosan igényli-e a HSP-90 általi stabilizálást, vagy a megfelelő folding elérése után leválik a komplexről stabil/aktív formában.

Összességében, munkám során felfedtem a HSP-90 korábban nem felismert szerepét a *C. elegans* élettartamának szabályozásában, ami felveti a proteosztázis és a tápanyag-érzékelés jelátvitel közötti keresztbeszélgetés lehetőségét a DAF-16 aktivitás izoforma-specifikus szabályozása, valamint a SIR-2.1 stabilizálása révén. Figyelembe véve a DAF-16/FOXO (151,173), a SIR-2.1/Sirt1, valamint a HSP-90/Hsp90 (28) fehérjék jelentős mértékű szerkezeti és funkcionális konzerváltságát feltehető, hogy hasonló szabályozó mechanizmus működhet emlősökben is.

Az emlős FOXO3 azon ritka gének közé tartozik, melyet in vivo modellekben összefüggésbe hoztak a hosszú élettartammal (113). Emberben is kimutatták, hogy több polimorfizmusa is konzisztensen együtt jelentkezik kivételes élettartammal kaukázusi és ázsiai populációkban (48). Emellett ismert, hogy az ún. Laron-szindrómás törpeség,

melyet az IGF-1 növekedési hormon receptorának génjében bekövetkezett mutáció vagy delécio okoz, szintén együtt jár egyébek mellett megnövekedett élettartammal, s ennek a száz évet megélteknél találtakhoz hasonló expressziós változások állhatnak a háttérben (174).

A Sirt1 emlős gén szintén számos sejtéletteni folyamatban vesz részt. Hiánya rendellenességekhez vezet az egér retina és a szív fejlődésében (175), valamint sterilitást okoz (176), míg túltermelésének az anyagcserére és az oxidatív stresszválaszra kifejtett pozitív hatásait számos alkalommal kimutatták (177,178).

A Hsp90 hősokkfehérjéről *C. elegans*-ban igazoltam, hogy a fejlődés, fertilitás és az élettartam szabályozásában is szerepet játszik - ez utóbbi a közelmúltban független megerősítést is nyert (179). Ezzel egybehangzóan egérben kimutatták, hogy míg a Hsp90a a spermatogenezishez (180), addig a Hsp90b a zigóta első mitotikus osztódásához (181) és normális embrionális fejlődéséhez (182) is szükséges, mivel hiányában az embrió nem képes placentát kialakítani (így letális).

Ezekből jól látható, hogy a modellállatokban leírt élettartam-szabályozó mechanizmusok - elsősorban konzerváltságuknak köszönhetően - klinikai jelentőséggel is bírhatnak. Az általam vizsgált fehérjék - figyelembe véve a szirtuin ortológok és a FOXO gének között feltárt, korábban említett összefüggéseket - egy olyan szabályozási háló részét képezhetik, aminek jobb megismerése révén nem csupán a fenti jelenségek mélyebb megértése válhat lehetővé, de célzott beavatkozásokkal elérhetővé válhat az öregedés folyamatának modulálása is.

Fontos leszögezni azonban, hogy míg a Hsp90 és a SIRT1 közötti kölcsönhatást egyaránt sikerült kimutatni fonálféreg és emlős modellben is, addig a FOXO és a Hsp90 kapcsolata egyelőre nincs igazolva *C. elegans*-on kívül. Így - a jelentős konzerváltság ellenére - nem jelenthető ki, hogy a Hsp90 emlősben ezeken az effektorokon keresztül szerepet játszik az élettartam szabályozásában. Kérdéseket vet fel például az a közelmúltbeli tanulmány, ami egér és emberi sejt vonalakon a Hsp90 gátlószerek öregedés-ellenes hatását mutatta ki, melynek háttérben állhat például a Hsf1 transzkripciós faktor gátlás alóli felszabadulása (183).

Mindezek alapján látszik, hogy a 90 kDa-os hősokkfehérje kiterjedt interakciós hálózatából fakadóan igen komplex szerepet tölt be a sejt és a szervezet életében. Az,

hogy az említett és más Hsp90-függő jelátviteli utak összhatása milyen jelentőséggel bír emlős modellben, további szisztematikus vizsgálatokat igényel.

8. Következtetések

Munkám során az emberben is fontos szerepet betöltő Hsp90 chaperon *C. elegans* ortológjának, a HSP-90-nek a szerepét vizsgáltam a fejlődés és az élettartam szabályozásában.

Doktori munkám legfontosabb új eredményei a következők:

1. Kimutattam, hogy a HSP-90 idő- és hely-specifikus módon szükséges a *C. elegans* megfelelő fejlődéséhez és fertilitásához.
2. Kimutattam, hogy a HSP-90 csendesítése megrövidíti a vad típusú és csökkent ILS mutáns vagy RNAi csendesített fonálférgek élettartamát.
3. Lehetséges mechanizmusként feltártam, hogy a HSP-90 szelektíven, és a sejtmagi áthelyeződés előtt szükséges a DAF-16 transzkripciós faktor A izoformájának transzlokációjához, valamint transzkripciós aktivitásához.
4. Bebizonyítottam, hogy a *C. elegans* SIR-2.1 kliensfehérjeként igényli a HSP-90 jelenlétét.

9. Összefoglalás

A Hsp90 chaperon az eukarióta sejt esszenciális fehérjéje. Fő funkciója az emlős sejtekben többszáz, termodinamikailag instabil, ún. kliensfehérje szerkezetének stabilizálása. Ennek révén szerepet játszik a jelátvitelben, a sejtproliferációban és a daganatképződésben, azonban az öregedésben játszott szerepe nem tisztázott. Doktori munkám során a Hsp90 kevésbé kutatott *C. elegans* ortológ HSP-90 szerepét vizsgáltam a fejlődésben, valamint az élettartam meghatározásában.

Kimutattam, hogy amellett, hogy a HSP-90 korfüggő módon szükséges a normál fertilitáshoz és hiánya az idegrendszerben dauer fenotípushoz vezet, lényeges szerepet tölt be az állatok normál, valamint csökkent ILS hatására jelentkező megnyúlt élettartamának szabályozásában.

A HSP-90 élettartam-szabályozásra kifejtett hatásának vizsgálata során fényt derítettem arra, hogy a DAF-16A izoformára specifikus módon szükséges a csökkent ILS által kiváltott hosszú élettartamhoz, a transzkripciós faktor sejtmagi áthelyeződéséhez – csökkent ILS és hőshatás hatására egyaránt – valamint az izoformára specifikus célgének indukciójához.

A SIR-2.1 fehérje szintjének követése révén kimutattam, hogy *hsp-90* csendesítés hatására a deacetiláz enzim mennyisége csökken, azonban a proteaszóma gátlása megszünteti ezt a hatást. Ez alátámasztja, hogy a SIR-2.1 kliensfehérjéje a HSP-90 chaperonnak *C. elegans*-ban, aminek jelentőségét növeli az ebben a modellrendszerben eddig ismert kliensfehérjék kis száma.

Összességében munkám a HSP-90 chaperont a *C. elegans* fejlődésének és élettartam-meghatározásának fontos szabályozójaként azonosítja. A vizsgálataim középpontjában álló fehérjék evolúciósan konzervált jellege felveti a lehetőségét annak, hogy a Hsp90 emlősökben is hasonló szerepet tölthet be.

10. Summary

The Hsp90 chaperone is an essential protein of eucaryotic cells. Its main function in mammalian cells is to stabilize the structure of many hundreds of thermodynamically unstable proteins, called clients. By doing so it plays a role in signal transduction, cell proliferation and tumor formation, but its role in ageing is not clear. During my doctoral work I investigated the role of the less studied *C.elegans* Hsp90 ortholog HSP-90 in development and the determination of lifespan.

I demonstrated that besides being required for normal fertility in an age-dependent manner, and that lack of it in the neurons leads to dauer formation, HSP-90 also plays a substantial role in the regulation of the animals' normal and extended lifespan induced by reduced ILS.

By examining the effect of HSP-90 on lifespan-regulation I demonstrated that it is required in a DAF-16A isoform specific manner for the extended lifespan triggered by reduced ILS, the nuclear translocation of the transcription factor – in response to either reduced ILS or heat-shock – as well as for the induction of target genes specific for the isoform.

By following the changes in the levels of the SIR-2.1 protein I demonstrated that in response to *hsp-90* silencing the protein level of this deacetylase enzyme decreases, but this effect is abrogated by proteasome inhibition. This corroborates that SIR-2.1 is a client protein of the HSP-90 chaperon in *C. elegans*-ban, which is increased in its significance by the small number of client proteins known in this model-system.

Taken together my work identifies HSP-90 as an important regulator of development and lifespan-determination in *C. elegans*. The evolutionarily conserved nature of the proteins in the center of my research offers the possibility of Hsp90 playing a similar role in mammals.

11. Irodalomjegyzék

1. Sulston JE, Horvitz HR. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 56: 110–156
2. Shaye DD, Greenwald I. (2011) Ortholist: A compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One*, 6: e20085
3. Dong X, Milholland B, Vijg J. (2016) Evidence for a limit to human lifespan. *Nature*, 538: 257–259
4. López-Otín C, Blasco M, Partridge L. (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, 153: 1194–1217
5. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, Sierra F. (2014) Geroscience: Linking aging to chronic disease. *Cell*, 159: 709–713
6. Hartl FU. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381: 571–580
7. Sőti C, Pál C, Papp B, Csermely P. (2005) Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 210–5
8. Frydman J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: The Role of Molecular Chaperones. *Annu Rev Biochem*, 603–647
9. Kleizen B, Braakman I. (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 343–349
10. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 781–791
11. Csermely P, Schnaider T, Csaba S, Prohászka Z, Nardai G. (1998) The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacol Ther*, 79: 129–168

12. Csermely P. (1997) Proteins, RNAs and chaperones in enzyme evolution - a folding perspective. *TIBS* 22, 147–149
13. Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, Lindquist S. (2012) Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*, 150: 987–1001
14. Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. (2017) The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 345–360
15. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 10832–7
16. Pratt WB. (1997) The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 297–326
17. Nadeau K, Das A, Walsh CT. (1993) Hsp90 Chaperonins Possess ATPase Activity and Bind Heat Shock Transcription Factors and Peptidyl Prolyl Isomerases. *J Biol Chem*, 268: 256
18. Minet EY, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C. (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Lett*, 460: 251–256
19. Nguyen MT, Csermely P, Söti C. (2013) Hsp90 chaperones PPAR γ and regulates differentiation and survival of 3T3-L1 adipocytes. *Cell Death Differ*, 20: 1654–63
20. Minami Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I. (1993) The calmodulin-binding domain of the mouse 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem*, 268: 9604–9610
21. Iannotti AM, Rabideau DA, Dougherty JJ. (1988) Characterization of purified avian 90,000-Da heat shock protein. *Arch Biochem Biophys*, 264: 54–60
22. Yonehara M, Minami Y, Kawata Y, Nagai J, Yahara I. (1996) Heat-induced chaperone activity of HSP90. *J Biol Chem*, 271: 2641–2645

23. Gasc JM, Renoir JM, Faber LE, Delahaye F, Baulieu EE. (1990) Nuclear localization of two steroid receptor-associated proteins, hsp90 and p59. *Exp Cell Res*, 186: 362–367
24. Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR. (2012) TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochim Biophys Acta*, 1823: 767–773
25. Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC. (2007) Regulation of Tumor Cell Mitochondrial Homeostasis by an Organelle-Specific Hsp90 Chaperone Network. *Cell*, 131: 257–270
26. Moore SK, Kozak C, Robinson EA, Ullrich SJ, Appella E. (1989) Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origins. *J Biol Chem*, 264: 5343–5351
27. Krone PH, Sass JB. (1994) HSP 90 α and HSP 90 β genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 204: 746–752
28. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 515–28
29. Frydman J, Höhfeld J. (1997) Chaperones get in touch: The Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci*, 22: 87–92
30. Hutchison KA, Stancato LF, Owens-Grillo JK, Johnson JL, Krishna P, Toft DO, Pratt WB. (1995) The 23-kDa acidic protein in reticulocyte lysate is the weakly bound component of the hsp foldosome that is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90. *J Biol Chem*, 270: 18841–18847
31. Pratt WB. (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 268: 21455–21458
32. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. (1997)

- Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90: 65–75
33. Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM. (2000) The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J Biol Chem*, 275: 37181–37186
 34. Garnier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, Barbier P, Leclerc-Devin J, Millot JM, Briand C, Makarov AA, Catelli MG, Peyrot V. (2002) Binding of ATP to heat shock protein 90: Evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *J Biol Chem*, 277: 12208–12214
 35. Söti C, Rácz A, Csermely P. (2002) A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *J Biol Chem*, 277: 7066–7075
 36. Shrestha L, Bolaender A, Patel HJ, Taldone T. (2016) Heat Shock Protein (HSP) Drug Discovery and Development: Targeting Heat Shock Proteins in Disease. *Curr Top Med Chem*, 16: 2753–2764
 37. Schulte TW, An WG, Neckers LM. (1997) Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 239: 655–659
 38. Vowels JJ, Thomas JH. (1994) Multiple chemosensory defects in daf-11 and daf-21 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 138: 303–316
 39. Birnby D, Link E, Vowels J. (2000) A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 155: 85–104.
 40. Murakami M, Koga M, Ohshima Y. (2001) DAF-7/TGF-beta expression required for the normal larval development in *C. elegans* is controlled by a presumed guanylyl cyclase DAF-11. *Mech Dev*, 109: 27–35

41. Inoue T, Hirata K, Kuwana Y, Fujita M, Miwa J, Roy R, Yamaguchi Y. (2006) Cell cycle control by daf-21 / Hsp90 at the first meiotic prophase / metaphase boundary during oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ*, 48: 25–32
42. Minami M, Shinozaki F, Suzuki M, Yoshimatsu K, Ichikawa Y, Minami Y. (2006) The proteasome activator PA28 functions in collaboration with Hsp90 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 344: 1315–1319
43. Singh V, Aballay A. (2009) Regulation of DAF-16-mediated Innate Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 284: 35580–7
44. Gaiser AM, Kaiser CJO, Haslbeck V, Richter K. (2011) Downregulation of the Hsp90 system causes defects in muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 6: e25485
45. Horikawa M, Sural S, Hsu A-L, Antebi A. (2015) Co-chaperone p23 Regulates *C. elegans* Lifespan in Response to Temperature. *PLoS Genet*, 11: e1005023
46. Morley JF, Morimoto RI. (2004) Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones. *Mol Biol Cell*, 15: 657–664
47. Sun X, Chen WD, Wang YD. (2017) DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. *Front Pharmacol*, 8: 1–8
48. Willcox BJ, Donlon T a, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD. (2008) FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13987–13992
49. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. (2003) The Many Forks in FOXO's Road. *Sci Signal*, 2003: re5-re5
50. Accili D, Arden KC. (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117: 421–426
51. Lam EW-F, Francis RE, Petkovic M. (2006) FOXO transcription factors: key

- regulators of cell fate. *Biochem Soc Trans*, 34: 722–726
52. Wijchers PJEC, Burbach JPH, Smidt MP. (2006) In control of biology: of mice, men and Foxes. *Biochem J*, 397: 233–246
 53. Peng SL. (2007) Immune regulation by Foxo transcription factors. *Autoimmunity*, 40: 462–469
 54. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner a, Tabtiang R. (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366: 461–464
 55. Kawli T, Tan M-W. (2008) Neuroendocrine signals modulate the innate immunity of *Caenorhabditis elegans* through insulin signaling. *Nat Immunol*, 9: 1415–24
 56. Murphy CT. (2006) The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: Approaches and discoveries. *Exp Gerontol*, 41: 910–921
 57. Honda Y, Honda S. (1999) The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 13: 1385–1393
 58. Yanase S, Yasuda K, Ishii N. (2002) Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (*age-1*, *mev-1* and *daf-16*) that affect life span. *Mech Ageing Dev*, 123: 1579–1587
 59. Barsyte D, Lovejoy D, Lithgow G. (2001) Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 15: 627–634
 60. Hsu A-L, Murphy CT, Kenyon C. (2003) Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, 300: 1142–5
 61. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424: 277–83

62. Arkblad EL, Tuck S, Pestov NB, Dmitriev RI, Kostina MB, Stenvall J, Tranberg M, Rydström J. (2005) A *Caenorhabditis elegans* mutant lacking functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 38: 1518–1525
63. Ookuma S, Fukuda M, Nishida E. (2003) Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, *scl-1*, that regulates longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 13: 427–431
64. McElwee J, Bubb K, Thomas JH. (2003) Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell*, 2: 111–21
65. Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen E-L, Hall DH, Levine B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 301: 1387–91
66. Tepper RG, Ashraf J, Kaletsky R, Kleemann G, Murphy CT, Bussemaker HJ. (2013) PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell*, 154: 676–690
67. Depuydt G, Xie F, Petyuk V a, Shanmugam N, Smolders A, Dhondt I, Brewer HM, Camp DG, Smith RD, Braeckman BP. (2013) Reduced insulin/insulin-like growth factor-1 signaling and dietary restriction inhibit translation but preserve muscle mass in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Proteomics*, 12: 3624–39
68. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum H a, Ruvkun G. (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*, 389: 994–999
69. Kwon E-S, Narasimhan SD, Yen K, Tissenbaum H a. (2010) A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature*, 466: 498–502
70. Chen ATY, Guo C, Itani OA, Budaitis BG, Williams TW, Hopkins CE, McEachin RC, Pande M, Grant AR, Yoshina S, Mitani S, Hu PJ. (2015) Longevity genes revealed by integrative analysis of isoform-specific *daf-16*/FoxO mutants of *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 201: 613–629

71. Shore D, Squire M, Nasmyth KA, Smith CJD, Limited IRLP. (1984) Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes The mating type of haploid yeast (a or a) is determined by information present at the MA Tlocus . Identical copies of a and a information are present at . *EMBO J*, 3: 2817–2823
72. Chen B, Zang W, Wang J, Huang Y, He Y, Yan L, Liu J, Zheng W. (2015) The chemical biology of sirtuins. *Chem Soc Rev*, 44: 5246–5264
73. Greiss S, Gartner A. (2009) Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol Cells*, 28: 407–415
74. Nguyen M, Somogyvári M, Sóti C. (2018) Hsp90 Stabilizes SIRT1 Orthologs in Mammalian Cells and *C. elegans*. *Int J Mol Sci*, 19: 3661
75. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460: 587–591
76. Schwer B, Verdin E. (2008) Conserved Metabolic Regulatory Functions of Sirtuins. *Cell Metab*, 7: 104–112
77. Vaquero A, Scher MB, Dong HL, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D. (2006) SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev*, 20: 1256–1261
78. Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Yamada H, Kishimoto I, Yamaguchi S, Nakano S, Katoh M, Ito H, Oshimura M. (2007) SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*, 26: 945–957
79. Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TLA, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, 452: 492–496
80. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy

- AJJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L. (2006) SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells. *Cell*, 126: 941–954
81. Nakagawa T, Guarente L. (2009) Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, SIRT5. *Aging (Albany NY)*, 1: 578–581
82. Kawahara TL a, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, McCord R a, Ongaigui KCL, Boxer LD, Chang HY, Chua KF. (2009) SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*, 136: 62–74
83. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R et al. (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124: 315–329
84. Lombard DB, Schwer B, Alt FW, Mostoslavsky R. (2008) SIRT6 in DNA repair, metabolism and ageing. *J Intern Med*, 263: 128–141
85. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. (2006) Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*, 20: 1075–1080
86. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. (2009) Circadian Control of the NAD⁺ Salvage Pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* (80-), 324: 654–657
87. Hallows WC, Lee S, Denu JM. (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci*, 103: 10230–10235
88. Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K, Yamamoto TT. (2001) Acetyl-CoA Synthetase 2, a Mitochondrial Matrix Enzyme Involved in the Oxidation of Acetate. *J Biol Chem*, 276: 11420–11426

89. Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry*, 49: 304–311
90. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*, 434: 113–118
91. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH. (2008) Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci*, 105: 9793–9798
92. Kaeberlein M, Mcvey M, Guarente L. (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev*, 13: 2570–2580
93. Tissenbaum H a, Guarente L. (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 410: 227–30
94. Viswanathan, M.; Kim, S. K.; Berdichevsky, A.; Guarente L. (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C-elegans* life span. *Dev Cell*, 9: 605–615.
95. Berdichevsky A, Guarente L. (2006) A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14-3-3 proteins. *Cell Cycle*, 5: 2588–91
96. Rogina B, Helfand SL. (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 15998–6003
97. Satoh A, Brace CS, Rensing N, Cliften P, Wozniak DF, Herzog ED, Yamada KA, Imai SI. (2013) Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab*, 18: 416–430
98. Sommer M, Poliak N, Upadhyay S, Ratovitski E, Nelkin BD, Donehower LA, Sidransky D. (2006) Δ Np63 α overexpression induces downregulation of Sirt1

- and an accelerated aging phenotype in the mouse. *Cell Cycle*, 5: 2005–2011
99. Herranz D, Muñoz-Martin M, Cañamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M. (2010) Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun*, 1: 1–8
 100. Yang B, Zwaans BMM, Eckersdorff M, Lombard DB. (2009) The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. *Cell Cycle*, 8: 2662–2663
 101. Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y, Chilton B, Jia R, Zheng ZM, Appella E, Wang XW, Ried T, Deng CX. (2008) Impaired DNA Damage Response, Genome Instability, and Tumorigenesis in SIRT1 Mutant Mice. *Cancer Cell*, 14: 312–323
 102. Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C, Jackson SP. (2010) Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science*, 329: 1348–1353
 103. Giannakou ME, Partridge L. (2004) The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol*, 14: 408–412
 104. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng H-LL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME, Mostoslavsky R, Cohen HY et al. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303: 2011–2015
 105. Moroz N, Carmona JJ, Anderson E, Hart AC, Sinclair DA, Blackwell TK. (2014) Dietary restriction involves NAD⁺-dependent mechanisms and a shift toward oxidative metabolism. *Aging Cell*, 13: 1075–1085
 106. Wang Y, Oh SW, Deplancke B, Luo J, Walhout AJM, Tissenbaum HA. (2006) *C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev*, 127: 741–747
 107. Bamps S, Wirtz J, Savory FR, Lake D, Hope I a. (2009) The *Caenorhabditis*

- C. elegans* sirtuin gene, sir-2.1, is widely expressed and induced upon caloric restriction. *Mech Ageing Dev*, 130: 762–70
108. Mair W, Dillin A. (2008) Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem*, 77: 727–54
 109. Lin SJ, Defossez P a, Guarente L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289: 2126–2128
 110. Haigis MC, Sinclair D a. (2010) Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu Rev Pathol*, 5: 253–295
 111. Garber K. (2008) A mid-life crisis for aging theory. *Nat Biotechnol*, 26: 371–4
 112. Kaerberlein M. (2010) Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*, 464: 513–519
 113. Kenyon CJ. (2010) The genetics of ageing. *Nature*, 464: 504–12
 114. Ludewig AH, Izrayelita Y, Park D, Malika RU, Zimmermann A, Mahanti P, Fox BW, Bethkea A, Doering F, Riddle DL, Schroeder FC. (2013) Pheromone sensing regulates *Caenorhabditis elegans* lifespan and stress resistance via the deacetylase SIR-2.1. *PNAS*, 110: 5522–5527
 115. Edwards C, Canfield J, Copes N, Brito A, Rehan M, Lipps D, Brunquell J, Westerheide SD, Bradshaw PC. (2015) Mechanisms of amino acid-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genet*, 16: 1–24
 116. Howitz K, Bitterman J, Cohen H. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425: 191–196
 117. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch A V, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W et al. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Small*, 450: 712–716

118. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK. (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem*, 280: 17038–17045
119. Borra MT, Smith BC, Denu JM. (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*, 280: 17187–17195
120. Beher D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L, Wang M. (2009) Resveratrol is not a direct activator of sirt1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des*, 74: 619–624
121. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K. (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem*, 285: 8340–51
122. Lee J, Kwon G, Park J, Kim J-K, Lim Y-H. (2016) SIR-2.1-dependent lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* by oxyresveratrol and resveratrol. *Exp Biol Med*, 241: 1757–1763
123. Gillan V, Maitland K, McCormack G, Him NAIN, Devaney E. (2009) Functional genomics of hsp-90 in parasitic and free-living nematodes. *Int J Parasitol*, 39: 1071–81
124. Tóth ML, Sigmond T, Borsos É, Barna J, Erdélyi P, Takács-vellai K, Orosz L, Kovács L, Csikós G, Sass M, Vellai T. (2008) Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Cell*, 4: 1–9
125. Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, 2: RESEARCH0002
126. Horikawa M, Sakamoto K. (2010) Polyunsaturated fatty acids are involved in regulatory mechanism of fatty acid homeostasis via daf-2/insulin signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Endocrinol*, 323: 183–92

127. Kim N, Dempsey CM, Kuan C-J, Zoval J V, O'Rourke E, Ruvkun G, Madou MJ, Sze JY. (2007) Gravity force transduced by the MEC-4/MEC-10 DEG/ENaC channel modulates DAF-16/FoxO activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 177: 835–45
128. Greiss S, Hall J, Ahmed S, Gartner A. (2008) *C. elegans* SIR-2.1 translocation is linked to a proapoptotic pathway parallel to *cep-1/p53* during DNA damage-induced apoptosis. *Genes Dev*, 22: 2831–2842
129. Devaney E, O'neill K, Harnett W, Whitesell L, Kinnaird JH. (2005) Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Int J Parasitol*, 35: 627–36
130. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94: 471–80
131. Voellmy R, Boellmann F. (2007) Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol*, 594: 89–99
132. Gaiser AM, Brandt F, Richter K. (2009) The non-canonical Hop protein from *Caenorhabditis elegans* exerts essential functions and forms binary complexes with either Hsc70 or Hsp90. *J Mol Biol*, 391: 621–34
133. Bettinger JC, Euling S, Rougvie a E. (1997) The terminal differentiation factor LIN-29 is required for proper vulval morphogenesis and egg laying in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 124: 4333–42
134. Rea SL, Wu D, Cypser JR, Vaupel JW, Johnson TE. (2005) A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet*, 37: 894–8
135. Walker G a, Lithgow GJ. (2003) Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell*, 2: 131–139
136. Apfeld J, Kenyon C. (1999) Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 402: 804–9

137. Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. (2002) Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295: 2456–2459
138. Dillin A, Crawford DK, Kenyon C. (2002) Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. *Science*, 298: 830–4
139. Gems D, Sutton AJ, Sundermeyer ML, Albert PS, King K V., Edgley ML, Larsen PL, Riddle DL. (1998) Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 150: 129–155
140. Libina N, Berman JR, Kenyon C. (2003) Tissue-Specific Activities of *C. elegans* DAF-16 in the Regulation of Lifespan. *Cell*, 115: 489–502
141. Calixto A, Chelur D, Topalidou I, Chen X. (2011) Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat Methods*, 7: 554–559
142. Swanson MM, Riddle DL. (1981) Critical periods in the development of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *Dev Biol*, 84: 27–40
143. Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet*, 28: 139–45
144. Lin K, Dorman J, Rodan A, Kenyon C. (1997) *daf-16*: An HNF-3/forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 278: 1319–1322
145. Lee RYN, Hench J, Ruvkun G. (2001) Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the *daf-2* insulin-like signaling pathway. *Curr Biol*, 11: 1950–1957
146. Pinkston-Gosse J, Kenyon C. (2007) DAF-16/FOXO targets genes that regulate tumor growth in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet*, 39: 1403–1409
147. Gal TZ, Glazer I, Koltai H. (2004) An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Lett*, 577: 21–26

148. Wang D, Ruvkun G. (2004) Regulation of *Caenorhabditis elegans* RNA interference by the *daf-2* insulin stress and longevity signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 69: 429–431
149. Sönnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume A-M, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E, Hewitson M, Holz C, Khan M, Lazik S, Martin C, Nitzsche B, Ruer M, Stamford J, Winzi M et al. (2005) Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 434: 462–469
150. Theodoraki M a, Caplan AJ. (2012) Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1823: 683–688
151. Webb AE, Brunet A. (2014) FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*, 39: 159–169
152. Li W, Gao B, Lee S-M, Bennett K, Fang D. (2007) RLE-1, an E3 ubiquitin ligase, regulates *C. elegans* aging by catalyzing DAF-16 polyubiquitination. *Dev Cell*, 12: 235–46
153. Henderson ST, Johnson TE. (2001) *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 11: 1975–1980
154. van Oosten-Hawle P, Porter RS, Morimoto RI. (2013) Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. *Cell*, 153: 1366–78
155. Garigan D, Hsu A-L, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C. (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*, 161: 1101–12
156. Papp D, Csermely P, Söti C. (2012) A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog*, 8: e1002673
157. JebaMercy G, Durai S, Prithika U, Marudhupandiyam S, Dasauni P, Kundu S, Balamurugan K. (2016) Role of DAF-21 protein in *Caenorhabditis elegans*

- immunity against *Proteus mirabilis* infection. *J Proteomics*, 145: 81–90.
158. Oh SW, Mukhopadhyay A, Dixit BL, Raha T, Green MR, Tissenbaum HA. (2006) Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *NatGenet*, 38: 251–257
 159. Murakami S, Johnson TE TE. (2001) OLD-1 positive regulator of longevity and stress resistance is under DAF-16 regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 11: 1517–1523
 160. Christensen R, de la Torre-Ubieta L, Bonni A, Colón-Ramos DA. (2011) A conserved PTEN/FOXO pathway regulates neuronal morphology during *C. elegans* development. *Development*, 138: 5257–67
 161. Luo S, Kleemann GA, Ashraf JM, Shaw WM, Murphy CT. (2010) TGF- β and Insulin Signaling Regulate Reproductive Aging via Oocyte and Germline Quality Maintenance. *Cell*, 143: 299–312
 162. Murphy C, Hu T. (2013) Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook*, 1–43
 163. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, Sabatini DM, Blackwell TK, Stacey Robida-Stubbs, Kira Glover-Cutter, Dudley W. Lamming, Masaki Mizunuma, Sri Devi Narasimhan, Elke Neumann-Haefelin, David M. Sabatini TKB, Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, Sabatini DM, Blackwell TK. (2012) TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab*, 15: 713–724
 164. Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvári M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila A-M, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A et al. (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature*, 477: 482–485

165. Wood JG, Schwer B, Wickremesinghe PC, Hartnett DA, Burhenn L, Garcia M, Li M, Verdin E, Helfand SL. (2018) Sirt4 is a mitochondrial regulator of metabolism and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci*, 115: 1564–1569
166. Wang T, Geng SL, Guan YM, Xu WH. (2018) Deacetylation of metabolic enzymes by Sirt2 modulates pyruvate homeostasis to extend insect lifespan. *Aging (Albany NY)*, 10: 1053–1072
167. Pan H, Finkel T. (2017) Key proteins and pathways that regulate lifespan. *J Biol Chem*, 292: 6452–6460
168. Saunders LR, Sharma AD, Tawney J, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S, Willenbring H, Verdin E. (2010) miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging (Albany NY)*, 2: 415–431
169. Efroni S, Duttagupta R, Cheng J, Dehghani H, Hoepfner DJ, Dash C, Bazett-Jones DP, Le Grice S, McKay RDG, Buetow KH, Gingeras TR, Misteli T, Meshorer E. (2008) Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2: 437–447
170. O’Callaghan C, Vassilopoulos A. (2017) Sirtuins at the crossroads of stemness, aging, and cancer. *Aging Cell*, 16: 1208–1218
171. Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L. (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*, 125: 1165–77
172. Chiang W-C, Tishkoff DX, Yang B, Wilson-Grady J, Yu X, Mazer T, Eckersdorff M, Gygi SP, Lombard DB, Hsu A-L. (2012) *C. elegans* SIRT6/7 homolog SIR-2.4 promotes DAF-16 relocalization and function during stress. *PLoS Genet*, 8: e1002948
173. Martins R, Lithgow GJ, Link W. (2016) Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell*, 15: 196–207

174. Laron Z, Kauli R, Lapkina L, Werner H. (2016) IGF-I deficiency, longevity and cancer protection of patients with Laron syndrome. *Mutat Res Mutat Res*, 123–133 doi:10.1016/j.mrrev.2016.08.002
175. Cheng H-L, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*, 100: 10794–10799
176. McBurney M, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb J, Lansdorp P, Lemieux M. (2003) The Mammalian SIR2 α Protein Has a Role in Embryogenesis and Gametogenesis. *Mol Cell Biol*, 23: 38–54
177. Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, Van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L. (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*, 6: 759–767
178. Yao H, Sundar IK, Ahmad T, Lerner C, Gerloff J, Friedman AE, Phipps RP, Sime PJ, McBurney MW, Guarente L, Rahman I. (2014) SIRT1 protects against cigarette smoke-induced lung oxidative stress via a FOXO3-dependent mechanism. *AJP Lung Cell Mol Physiol*, 306: L816–L828
179. Fuentealba M, Dönertaş H, Williams R, Labbadia J, Thornton J, Partridge L. (2019) Using the drug-protein interactome to identify anti-ageing compounds for humans. *Comput Biol*, 15: 1–17
180. Kajiwara C, Kondo S, Uda S, Dai L, Ichianagi T, Chiba T, Ishido S, Koji T, Udono H. (2012) Spermatogenesis arrest caused by conditional deletion of Hsp90 α in adult mice. *Biol Open*, 1: 977–982
181. Audouard C, le Masson F, Charry C, Li Z, Christians ES. (2011) Oocyte-Targeted deletion reveals that Hsp90b1 is needed for the completion of first mitosis in mouse zygotes. *PLoS One*, 6:
182. Voss AK, Thomas T, Gruss P. (2000) Mice lacking HSP90 β fail to develop a placental labyrinth. *Development*, 127: 1–11

183. Fuhrmann-Stroissnigg H, Ling YY, Zhao J, McGowan SJ, Zhu Y, Brooks RW, Grassi D, Gregg SQ, Stripay JL, Dorransoro A, Corbo L, Tang P, Bukata C, Ring N, Giacca M, Li X, Tchkonja T, Kirkland JL, Niedernhofer LJ et al. (2017) Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun*, 8:

12. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

Somogyvári M, Gecse E, Sőti C. (2018) DAF-21/Hsp90 is required for *C. elegans* longevity by ensuring DAF-16/FOXO isoform A function. *Sci Rep*, 8: 12048. IF: 4,122

Nguyen MT, **Somogyvári M**, Sőti C. (2018) Hsp90 Stabilizes SIRT1 Orthologs in Mammalian Cells and *C. elegans*. *Int J Mol Sci*, 19: 3661. IF: 3,687

A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk:

Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, **Somogyvári M**, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A, Kaeberlein M, Soti C, Partridge L, Gems D. (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature*, 477: 482–485 IF: 36,280

Spiró Z, Arslan MA, **Somogyvári M**, Nguyen MT, Smolders A, Dancsó B, Németh N, Elek Z, Braeckman BP, Csermely P, Sőti C. (2012) RNA interference links oxidative stress to the inhibition of heat stress adaptation. *Antioxid Redox Signal*, 17: 890-901 IF: 7,189

Szcientometria

Külföldi szakcikkek száma: 4

Kumulatív IF: 51,278

Idézettség (összes/független): 415/395

13. Köszönetnyilvánítás

Először is köszönöm témavezetőmnek, Dr. Sőti Csabának, hogy szakmai útmutatásával, megértő támogatásával, belém vetett bizalmával, valamint a szükséges munkakörülmények megteremtésével támogatta doktori munkámat, illetve szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom Mandl József professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola vezetőjének, illetve az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet volt igazgatójának, valamint Bánhegyi Gábor professzor úrnak, az intézet jelenlegi igazgatójának, amiért a doktori iskolában, illetve az intézet falai közt végezhettem munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá Tóth Mártonnak, laborunk korábbi tagjának, valamint David Gemsnek a londoni *C. elegans* Ageing Laboratory (UCL) vezetőjének, amiért hozzáértésük és támogatásuk révén számos kísérleti technikát sajátíthattam el, és így jelentős mértékben hozzájárultak szakmai fejlődésemmhez.

A Stresszcsoport jelenlegi tagjai közül köszönettel tartozom Gilányi Beatrixnak, munkám háttérének megteremtéséhez nyújtott segítségéért, Gecse Eszternek a közösen végzett kísérletekért, Nguyen Minh Tunak és Hajdú Gábornak, akik szakmai és morális támogatást nyújtottak a munka éveim alatt. Továbbá csoportunk korábbi tagjai közül Szalay Kristófnak, Gyurkó Dávidnak, Papp Diának, Taisz Istvánnak, Mehmet Alper Arslannak, Dancsó Balázsnak és Spiró Zoltánnak, akik szakdolgozói, majd PhD hallgatói éveim alatt együttműködésükkel és hozzáértő támogatásukkal segítettek munkámat.

Köszönöm a Richter Gedeon Zrt. Centenárium Alapítványnak, valamint a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolának a munkához nyújtott pályázati támogatást, valamint Tímár József professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem Doktori Tanácsa elnökének elhúzódt doktori munkám során tanúsított türelmét.

Végül, de semmiképp sem utolsó sorban szeretném megköszönni páromnak, családomnak és barátaimnak a belém vetett bizalmat, a sokszor embert próbáló erőfeszítéseket igénylő türelmet és kitartást. Hálásan köszönöm szüleimnek, nagyszüleimnek, valamint bátyámnak, hogy töretlen támogatásukról biztosítottak az ide

vezető út minden egyes állomásán. Páromnak, Somogyváriné Simon Andreának örök hálával tartozom bátorító szavaiért, amik nélkül bizonyosan nem jutottam volna el idáig, továbbá a szellemi és lelki partnerségért, a sok inspiráló beszélgetésért, a felmerülő nehézségekkel való közös szembenézésért, melyek révén úgy érzem, a jelen értekezés közös munkánk gyümölcse is egyben.

14. Függelék

A Gecse Eszter kollégám által végzett méréseket „(G.E.)” jelzéssel láttam el.

5. táblázat: Különböző fonálféreg törzsek túlélése

N2 vad típus; 9., 11. és 12./a ábra			N Összes (Halott)	Átlag	EV ± %	Medián	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	1	EV	79 (77)	19,5		19,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	73 (70)	13,2	-32,1	12,0	-36,8	<0,001
	2	EV	166 (159)	18,0		16,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	57 (57)	11,4	-36,8	10,0	-37,5	<0,001
	3	EV	73 (73)	15,7		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	76 (75)	13,7	-12,8	13,0	-13,3	0,003
L4-es kortól kezelve	1 (G.E.)	EV	104 (98)	18,1		17,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	97 (91)	14,1	-22,1	13,0	-23,5	<0,001
	2	EV	110 (102)	17,6		17,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	101 (77)	15,4	-12,4	13,0	-23,5	0,001
daf-2(e1370); 10. ábra			N Összes (Halott)	Átlag	EV ± %	Medián	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	1	EV	44 (38)	27,3		26,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	53 (50)	21,1	-22,5	19,0	-26,9	0,002
	2	EV	43 (43)	23,0		22,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	28 (28)	16,6	-27,9	16,0	-27,3	0,001
	3	EV	93 (92)	23,7		24,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	82 (61)	20,6	-13,0	19,0	-20,8	0,007
L4-es kortól kezelve	1 (G.E.)	EV	89 (74)	26,4		24,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	52 (46)	29,3	+11,0	17,0	-29,2	0,355
	2	EV	90 (76)	24,7		24,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	116 (100)	41,2	+67,0	38,0	58,3	<0,001
	3	EV	53 (44)	21,2		20,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	73 (71)	27,5	+29,4	20,0	0,0	0,076
	4 (G.E.)	EV	46 (46)	17,1		13,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	71 (67)	27,6	+61,4	22,0	69,2	<0,001
daf-16(mgDf50); 9., 11. és 12./c ábra			N Összes (Halott)	Átlag	EV ± %	Medián	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	1	EV	99 (99)	14,0		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	43 (43)	10,5	-25,2	8,0	-46,7	<0,001
	2	EV	74 (72)	12,9		12,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	56 (44)	12,3	-4,6	12,0	0,0	0,237
	3	EV	119 (113)	15,3		16,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	55 (54)	12,6	-17,7	12,0	-25,0	<0,001
	4	EV	132 (132)	17,1		18,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	128 (128)	15,8	-7,5	15,0	-16,7	<0,001
	5	EV	69 (65)	13,0		14,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	78 (78)	12,5	-3,5	11,0	-21,4	0,054

	6	<i>EV</i>	78 (77)	12,9		12,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	73 (73)	11,7	-9,5	10,0	-16,7	0,002
L4-es kortól kezelve	1 (G.E.)	<i>EV</i>	82 (74)	14,0		13,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	80 (72)	12,7	-9,8	13,0	0,0	<0,001
	2	<i>EV</i>	102 (66)	15,5		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	84 (68)	13,3	-14,7	13,0	-13,3	<0,001
daf-2(e1370);daf-16(mgDf50); 10. és 25. ábra			N Összes (Halott)	Átlag	EV ± %	Medián	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	1	<i>EV</i>	83 (83)	14,9		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	77 (77)	11,8	-20,8	12,0	-20,0	<0,001
	2	<i>EV</i>	56 (56)	15,2		14,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	30 (30)	12,4	-18,4	12,0	-14,3	<0,001
	3	<i>EV</i>	107 (106)	13,6		12,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	60 (60)	11,4	-16,2	12,0	0,0	<0,001
	4	<i>EV</i>	113 (113)	16,8		18,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	88 (88)	14,3	-14,9	15,0	-16,7	<0,001
	5	<i>EV</i>	83 (75)	14,7		14,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	86 (86)	12,1	-17,9	11,0	-21,4	<0,001
	6	<i>EV</i>	68 (65)	13,8		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	59 (59)	12,2	-11,8	12,0	-20,0	<0,001
	7	<i>EV</i>	84 (81)	12,8		12,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	62 (60)	12,0	-6,8	10,0	-16,7	0,253
L4-es kortól kezelve	1 (G.E.)	<i>EV</i>	67 (64)	13,2		13,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	43 (41)	12,2	-7,2	13,0	0,0	0,020
	2	<i>EV</i>	82 (66)	13,3		13,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	55 (42)	13,2	-0,4	13,0	0,0	0,890
	3 (G.E.)	<i>EV</i>	95 (88)	14,6		13,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	100 (97)	13,9	-4,4	13,0	0,0	0,178
	4	<i>EV</i>	113 (110)	15,5		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	105 (104)	15,2	-2,2	15,0	0,0	0,435
daf-2(e1370);daf-16(mgDf50);daf- 16a::rfp; 25.f.a ábra			N Összes (Halott)	Átlag	EV ± %	Medián	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	1	<i>EV</i>	60 (57)	18,5		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	53 (53)	12,1	-34,7	10,0	-33,3	<0,001
	2	<i>EV</i>	99 (79)	19,3		16,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	76 (70)	14,2	-26,2	14,0	-12,5	<0,001
	3	<i>EV</i>	77 (74)	24,4		24,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	62 (57)	19,0	-22,4	19,0	-20,8	<0,001
	4	<i>EV</i>	85 (81)	23,7		24,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	78 (72)	18,5	-21,8	17,0	-29,2	<0,001
daf-2(e1370);daf-16(mgDf50);daf- 16d/f::gfp; 25.l.b ábra			N Összes (Halott)	Átlag	EV ± %	Medián	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	1	<i>EV</i>	105 (104)	41,8		44,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	126 (120)	41,0	-2,0	42,0	-4,5	0,633
	2	<i>EV</i>	102 (102)	41,9		44,0		

		<i>hsp-90(RNSi)</i>	93 (92)	26,2	-37,5	25,0	-43,2	<0,001
	3	<i>EV</i>	60 (60)	33,6		33,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	49 (41)	28,4	-15,6	29,0	-12,1	0,004
	4	<i>EV</i>	84 (78)	27,4		26,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	114 (101)	25,6	-6,7	24,0	-7,7	0,430

RNSi kezeléssel élettartamok; 11. és 12.b ábra			N Összes (Halott)	Átlag	<i>EV/daf-2(RNSi)</i> ± %	Medián	<i>EV</i> ± %	p vs. <i>EV/daf-2(RNSi)</i>
1	N2	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	88 (67)	28,2		27,0		
		<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	86 (83)	22,7	-19,3	20,0	+25,9	<0,001
	<i>daf-16 (mu86)</i>	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	86 (80)	14,6		15,0		
		<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	83 (81)	14,4	-1,4	15,0	0,0	0,510
2	N2	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	110 (98)	26,7		22,0		
		<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	87 (86)	18,3	-31,4	15,0	-31,8	<0,001
	<i>daf-16 (mu86)</i>	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	101 (101)	14,1		13,0		
		<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	115 (109)	13,8	-2,1	13,0	0,0	0,521
3	N2	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	104 (90)	33,7		33,0		
		<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	100 (98)	16,0	-52,5	16,0	-51,5	<0,001
	<i>daf-16 (mu86)</i>	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	107 (107)	13,0		12,0		
		<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	64 (64)	12,8	-1,5	12,0	0,0	<0,001

<i>daf-16(mgDf50);daf-16a::rfp;</i> 23.le ábra			N Összes (Halott)	Átlag	Ktrl ± %	Medián	Ktrl ± %	p vs. Ktrl
Kikeléstől kezelve	1	<i>EV</i>	79 (77)	14,6		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	75 (75)	10,8	-25,9	10,0	-33,3	<0,001
		<i>rle-1(cxTi510);EV</i>	94 (93)	17,8	+21,9	17,0	+13,3	<0,001
		<i>rle-1(cxTi510);hsp-90(RNSi)</i>	69 (69)	11,7	+7,9	12,0	20,0	0,220
	2	<i>EV</i>	82 (82)	13,6		13,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	59 (59)	8,7	-35,9	8,0	-38,5	<0,001
		<i>rle-1(cxTi510);EV</i>	87 (86)	15,9	+16,7	15,0	+15,4	0,001
		<i>rle-1(cxTi510);hsp-90(RNSi)</i>	76 (76)	9,9	+13,4	11,0	+37,5	<0,001
	3	<i>EV</i>	84 (84)	17,0		15,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	70 (70)	12,0	-29,4	10,0	-33,3	<0,001
		<i>rle-1(cxTi510);EV</i>	94 (94)	18,6	+9,0	17,0	+13,3	0,072
		<i>rle-1(cxTi510);hsp-90(RNSi)</i>	86 (85)	14,3	+19,0	12,0	+20,0	0,003

6. táblázat: A fehérje-szint mérések statisztikai analízise (Western Blot)

N2 vad típus; 7.b ábra HSP-90 fehérje szintek		Átlag	Szórás	p vs. EV	
<i>EV</i>		100,0	0,0		
<i>hsp-90(RNSi)</i>		21,6	19,3	0,001	
N2 vad típus; 26.b ábra SIR-2.1 fehérje szintek		Átlag	Szórás	p vs. EV	p vs. 20°C;EV
20°C	<i>EV</i>	100,0	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	9,7	16,8	<0,001	<0,001

25°C	EV	175,1	88,6		0,108	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	18,4	16,2	0,020	<0,001	
N2 vad típus; 26./c ábra HSP-90 fehérje szintek		Átlag	Szórás	p vs. EV	p vs. 20°C;EV	
20°C	EV	100,0	0,0			
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	41,1	11,1	<0,001	<0,001	
25°C	EV	76,7	18,0		0,045	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	41,4	21,3	0,047	0,004	
N2 vad típus; 26./e ábra SIR-2.1 fehérje szintek		Átlag	Szórás	p vs. DMSO	p vs. EV;DMSO	
EV	DMSO	100,0	0,0			
	MG132 (10µM in DMSO)	91,0	5,5	0,073	0,073	
<i>hsp-90(RNSi)</i>	DMSO	33,7	4,9		0,001	
	MG132 (10µM in DMSO)	50,6	0,3	0,020	<0,001	
<i>sir-2.1(RNSi)</i>	DMSO	31,5	25,0		0,030	
	MG132 (10µM in DMSO)	27,6	25,9	0,446	0,029	
N2 vad típus; 26./f ábra HSP-90 fehérje szintek		Átlag	Szórás	p vs. DMSO	p vs. EV;DMSO	
EV	DMSO	100,0	0,0			
	MG132 (10µM in DMSO)	100,9	7,8	0,412	0,412	
<i>hsp-90(RNSi)</i>	DMSO	50,5	28,0		0,006	
	MG132 (10µM in DMSO)	44,7	30,4	0,394	0,005	
<i>sir-2.1(RNSi)</i>	DMSO	99,8	30,7		0,496	
	MG132 (10µM in DMSO)	112,8	22,6	0,260	0,150	
Alacsony kópiaszámú (pkls1642); 27./b ábra SIR-2.1 fehérje szintek		Átlag	Szórás	p vs. DMSO	p vs. EV;DMSO	
Vad típus	20°C	EV	100,0	0,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	19,4	1,9	<0,001	<0,001
	25°C	EV	130,4	34,2		0,099
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	17,1	6,3	0,002	<0,001
<i>sir-2.1OE</i>	20°C	EV	101,5	24,8		0,461
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	25,1	11,4	0,004	<0,001
	25°C	EV	120,7	26,6		0,124
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	50,0	22,2	0,012	0,009

7. táblázat: A termotolerancia mérések statisztikai analízise (t-tesztel való összevetések)

N2 vad típus; 7./g ábra		Átlag	EV ± %	Medián	EV ± %	p vs. EV	
Kikeléstől kezelve	1	EV	44,9	35,0			
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	55,8	+24,4	59,0	+68,6	<0,001
	2	EV	20,9		11,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	26,5	+26,8	11,0	0,0	0,026
	3	EV	37,4		35,0		
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	40,1	+7,1	35,0	0,0	0,520

8. táblázat: qRT-PCR mérések expressziós adatai

N2 vad típus. <i>hsp-90</i> mRNS szintek; 7./a ábra		Átlag	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	EV	1,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,3	-70,0	0,036
L4-es kortól kezelve	EV	1,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,3	-70,0	0,001

N2 vad típus; 7./c-f ábra		<i>hsp-70</i> mRNS szint	p vs. EV	p vs. <i>hsp-90</i> (RNSi)	<i>hsp-16,2</i> mRNS szint	p vs. EV	p vs. <i>hsp-90</i> (RNSi)
Kikeléstől kezelve	EV	1,0			1,0		
	EV/ <i>hsf-1</i> (RNSi)	0,8	0,499		0,7	0,276	
	EV/ <i>hsp-90</i> (RNSi)	2,7	0,049		3,5	0,011	
	<i>hsf-1/hsp-90</i> (RNSi)	0,7	0,367	0,020	1,3	0,608	0,018
L4-es kortól kezelve	EV	1,0			1,0		
	EV/ <i>hsf-1</i> (RNSi)	0,4	0,027		0,6	0,162	
	EV/ <i>hsp-90</i> (RNSi)	2,6	0,027		2,0	0,010	
	<i>hsf-1/hsp-90</i> (RNSi)	0,4	0,040	0,003	0,5	0,062	0,009

<i>daf-16</i> (<i>mgDf50</i>). Kikeléstől kezelve; 19./a-d ábra			Átlag mRNS szint	p vs. EV	p vs, <i>daf-2</i> (<i>e1370</i>)
<i>daf-16a::rfp</i>	<i>sod-3</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	0,5	0,017	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	2,1	0,014	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>); <i>hsp-90</i> (RNSi)	1,2	0,492	0,043
	<i>old-1</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	0,4	0,070	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	1,5	0,387	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>); <i>hsp-90</i> (RNSi)	0,4	0,018	0,005
	<i>scl-20</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	7,0	0,003	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	345,4	<0,001	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>); <i>hsp-90</i> (RNSi)	166,2	<0,001	0,084
	<i>gst-20</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	0,7	0,209	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	3,0	0,009	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>); <i>hsp-90</i> (RNSi)	1,3	0,739	0,015
<i>daf-16</i> (<i>mgDf50</i>). Kikeléstől kezelve; 19./e-h ábra			Átlag mRNS szint	p vs. EV	p vs, <i>daf-2</i> (<i>e1370</i>)
<i>daf-16d/f::gfp</i>	<i>sod-3</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	1,6	0,943	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	4,5	0,272	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>); <i>hsp-90</i> (RNSi)	5,6	0,216	0,873
	<i>old-1</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	0,8	0,453	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	0,4	0,186	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>); <i>hsp-90</i> (RNSi)	0,6	0,296	0,752
	<i>scl-1</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	20,6	0,104	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	70,0	0,016	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>); <i>hsp-90</i> (RNSi)	289,2	0,003	0,290
	<i>lea-1</i>	EV	1,0		
		<i>hsp-90</i> (RNSi)	3,2	0,340	
		<i>daf-2</i> (<i>e1370</i>);EV	17,1	0,150	

		<i>daf-2(e1370);hsp-90(RNSi)</i>	2,5	0,449	0,449
--	--	----------------------------------	-----	-------	-------

daf-2(e1370). L4-es kortól kezelve; 21./a-d ábra		Átlag mRNS szint	p vs, daf-2; daf-16;EV	p vs, daf-2;EV
sod-3	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	1,9	0,226	
	<i>EV</i>	78,7	<0,001	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	24,9	<0,004	0,037
old-1	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	2,1	0,088	
	<i>EV</i>	9,9	<0,001	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	3,6	0,012	0,028
scl-20	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	1,7	0,761	
	<i>EV</i>	5317,1	<0,001	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	1949,7	0,001	0,390
gst-20	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	0,8	0,422	
	<i>EV</i>	4,4	0,002	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	1,7	0,177	0,015
daf-2(e1370). L4-es kortól kezelve; 21./e-h ábra		Átlag mRNS szint	p vs, daf-2; daf-16;EV	p vs, daf-2;EV
scl-1	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	1,0	0,925	
	<i>EV</i>	2453,4	<0,001	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	2305,2	<0,001	0,938
lea-1	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	2,4	0,010	
	<i>EV</i>	10,1	<0,001	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	20,6	<0,001	0,027
col-183	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	2,4	0,198	
	<i>EV</i>	16,2	0,001	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	22,1	0,001	0,860
R05D8,7	<i>daf-16(mgDf50);EV</i>	1,0		
	<i>daf-16(mgDf50);hsp-90(RNSi)</i>	1,1	0,913	
	<i>EV</i>	14,4	0,006	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	13,5	0,013	0,638

N2 vad típus. Kikeléstől kezelve; 20. ábra		Átlag mRNS szint	p vs. EV	p vs. daf-2 (RNSi)
old-1	<i>EV</i>	1,0		
	<i>EV/hsp-90(RNSi)</i>	0,7	0,242	
	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	3,4	0,002	
	<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	1,1	0,815	0,003
sod-3	<i>EV</i>	1,0		
	<i>EV/hsp-90(RNSi)</i>	1,0	0,852	
	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	8,1	0,005	
	<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	2,9	0,213	0,038

N2 vad típus; 22./a ábra		<i>hsp-90</i> mRNS szint	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	EV	1,0		
	75bp(RNSi)	0,3	-65,3	0,017

Kikeléstől kezelve; 22./d ábra		Átlag mRNS szint	EV ± %	p vs. EV	p vs, daf-2;EV
<i>sod-3</i> mRNS szint	N2;EV	1,0			
	N2;75bp(RNSi)	0,9	-6,5	0,868	
	daf-2(e1370); EV	7,3	+625,2	0,007	
	daf-2(e1370);75bp(RNSi)	2,1	-71,6	0,191	0,022
<i>old-1</i> mRNS szint	N2;EV	1,0			
	N;75bp(RNSi)	0,5	-45,9	0,162	
	daf-2(e1370); EV	6,6	+559,7	0,009	
	daf-2(e1370);75bp(RNSi)	2,7	-59,7	0,084	0,067

N2 vad típus. Kikeléstől kezelve; 23./d ábra		Átlag	EV ± %	p vs. EV
<i>hsp-90</i> mRNS szint	EV	1,0		
	<i>hsp-90</i> (RNSi)	0,3	-73,5	<0,001
<i>daf-16a</i> mRNS szint	EV	1,0		
	<i>hsp-90</i> (RNSi)	0,7	-25,2	0,045

L4-es kortól kezelve; 24./c ábra		Átlag mRNS szint	p vs. <i>daf-16</i> (<i>mu86</i>)
<i>daf-16(mu86)</i>		1,0	
<i>daf-16(mu86). daf-16a^{AM}::gfp</i>	<i>gst-20</i>	0,8	0,551
	<i>scl-20</i>	9,8	0,006
	<i>sod-3</i>	2,1	0,351
	<i>old-1</i>	0,8	0,461
L4-es kortól kezelve; 24./d ábra		Átlag mRNS szint	p vs. <i>daf-16</i> (<i>mu86</i>)
<i>scl-20</i>	<i>daf-16(mu86). daf-16a^{AM}::gfp</i>	EV	9,8
		EV/ <i>hsp-90</i> (RNSi)	55,7
<i>sod-3</i>	<i>daf-16(mu86). daf-16a^{AM}::gfp</i>	EV	2,1
		EV/ <i>hsp-90</i> (RNSi)	1,7

9. táblázat: Fluoreszcens mikroszkópia mérések statisztikai analízise

<i>daf-16ab::gfp</i> ; 14./a és b ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. EV/ <i>daf-2</i> (RNSi)
Kikeléstől kezelve	EV	2,3		
	EV/ <i>hsp-90</i> (RNSi)	1,3	1,000	
	EV/ <i>daf-2</i> (RNSi)	17,3	0,048	
	<i>daf-2/hsp-90</i> (RNSi)	1,7	1,000	0,042
<i>daf-16ab::gfp</i> ; 14./4c és d ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. EV/ <i>daf-2</i> (RNSi)
L4-es kortól kezelve	EV	0,0		
	EV/ <i>hsp-90</i> (RNSi)	0,0	1,000	

	<i>EV/daf-2(RNSi)</i>	81,2	<0,001	
	<i>daf-2/hsp-90(RNSi)</i>	3,4	1,000	<0,001

<i>daf-16ab::gfp;</i> 17.1a és b ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. HS;EV
Kikeléstől kezelve	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	1,000	
	<i>HS;EV</i>	71,3	<0,001	
	<i>HS;hsp-90(RNSi)</i>	0,0	1,000	<0,001
<i>daf-16ab::gfp.</i> 17.1c és d ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. HS;EV
L4-es kortól kezelve	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	1,000	
	<i>HS;EV</i>	74,1	<0,001	
	<i>HS;hsp-90(RNSi)</i>	22,7	0,161	0,002

<i>daf-16a::rfp;</i> 15.1c és d ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. daf-2;EV
Kikeléstől kezelve	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	2,0	1,000	
	<i>daf-2(e1370);EV</i>	59,5	<0,001	
	<i>daf-2(e1370);hsp-90(RNSi)</i>	9,6	1,000	0,002
<i>daf-16a::rfp;</i> 15.1e és f ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. daf-2;EV
L4-es kortól kezelve	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	1,000	
	<i>daf-2(e1370);EV</i>	16,1	<0,001	
	<i>daf-2(e1370);hsp-90(RNSi)</i>	8,0	0,065	<0,001

<i>daf-16a::rfp;</i> 18.1a és b ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. HS;EV
Kikeléstől kezelve	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	1,000	
	<i>HS;EV</i>	88,3	<0,001	
	<i>HS;hsp-90(RNSi)</i>	12,5	0,834	<0,001
<i>daf-16a::rfp;</i> 18.1c és d ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. HS;EV
L4-es kortól kezelve	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	1,000	
	<i>HS;EV</i>	66,7	<0,001	
	<i>HS;hsp-90(RNSi)</i>	30,8	<0,001	<0,001

<i>daf-16d/f::gfp;</i> 16.1a és c ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. daf-2;EV
Kikeléstől kezelve	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	6,4	0,595	
	<i>daf-2(e1370);EV</i>	3,3	1,000	
	<i>daf-2(e1370);hsp-90(RNSi)</i>	8,6	0,218	0,983

daf-16d/f::gfp; 16./d és e ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	p vs. EV	p vs. HS;EV
Kikeléstől kezelve	EV	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	6,4	1,000	
	HS;EV	92,8	<0,001	
	HS; <i>hsp-90(RNSi)</i>	100,0	<0,001	1,000

daf-16a::rfp; 22./b és c ábra		Sejtmagi lokalizáció (%)	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	EV	0,0		
	<i>75bp(RNSi)</i>	0,0	-	1,000
	HS;EV	69,4	-	<0,001
	HS; <i>75bp(RNSi)</i>	4,8	-93,1	<0,001

daf-16a::rfp; 23./a és b ábra		Köztes lokalizáció (%)	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	EV	7,4		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	3,0	-59,0	1,000
	<i>rle-1(cxTi510);EV</i>	10,4	40,6	1,000
	<i>rle-1(cxTi510);hsp-90(RNSi)</i>	8,3	-20,0	1,000
daf-16a::rfp; 23./a és c ábra		Relatív GFP fluoreszcencia (%)	EV ± %	p vs. EV
Kikeléstől kezelve	EV	1,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,8	-23,2	1,000
	<i>rle-1(cxTi510);EV</i>	0,8	-17,3	1,000
	<i>rle-1(cxTi510);hsp-90(RNSi)</i>	1,0	16,4	1,000

10. táblázat: Termékenységi vizsgálatok statisztikai analízise

Kikeléstől kezelve; 8./d és f ábra			Átlagos utódszám	EV ± %
1 (G.E.)	N2	EV	188,7	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	-100,0
	<i>daf-2(e1370)</i>	EV	146,0	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	-100,0
2	N2	EV	209,6	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	-100,0
	<i>daf-2(e1370)</i>	EV	243,7	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	-100,0
3	N2	EV	264,7	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	-100,0
	<i>daf-2(e1370)</i>	EV	164,0	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0	-100,0
L4-es kortól kezelve; 8./e és g ábra			Átlagos utódszám	EV ± %
1 (G.E.)	N2	EV	269,8	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	79,4	-70,6
	<i>daf-2(e1370)</i>	EV	261,8	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	2,0	-99,2
2	N2	EV	280,0	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	67,4	-75,9
	<i>daf-2(e1370)</i>	EV	174,8	

		<i>hsp-90(RNSi)</i>	6,9	-96,1
3	N2	<i>EV</i>	228,5	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	64,4	-71,8
	<i>daf-2(e1370)</i>	<i>EV</i>	236,4	
		<i>hsp-90(RNSi)</i>	26,1	-89,0

11. táblázat: Dauer-képződés méréseinek statisztikai analízise

Kikeléstől kezelve; 13./a ábra		Dauer képződés (%)	p vs. <i>EV</i>	p vs. <i>daf-2(e1370)</i>
<i>daf-16a::rfp</i> ; <i>daf-2(e1370)</i>	<i>EV</i>	96,0		1,000
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	95,6	1,000	1,000
<i>daf-16d/f::gfp</i> ; <i>daf-2(e1370)</i>	<i>EV</i>	53,0		0,081
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	47,2	1,000	0,037
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>EV</i>	98,4		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	97,5	1,000	
<i>daf-2(e1370)</i> ; <i>daf-16(mgDf50)</i>	<i>EV</i>	0,0		<0,001
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,3	1,000	<0,001

Kikeléstől kezelve; 13./b ábra		Dauer képződés (%)	p vs. <i>N2;EV</i>	p vs. <i>EV</i>
N2 vad típus	<i>EV</i>	0,0		
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	0,0		1,000
TU3335 (<i>unc-119p::sid-1</i>)	<i>EV</i>	6,8	0,019	
	<i>hsp-90(RNSi)</i>	51,4	0,012	0,021

15. Ábrák és táblázatok jegyzéke

15.1 Ábrák

1. ábra: A Hsp90 chaperon működése és konzerváltsága az élővilágban.	10
2. ábra: Az inzulin-szerű jelátviteli útvonal (ILS) sematikus ábrázolása <i>C. elegans</i> és emlős modellen.	12
3. ábra: A <i>daf-16a</i> és <i>daf-16d/f</i> izoformák mRNS átíratának (a) illetve fehérje szerkezetének (b) sematikus reprezentációja.	14
4. ábra: A lizin oldalláncok szirtuin általi deacetilációjának mechanizmusa.	15
5. ábra: Az egyes SIRT1 ortológok és a SIRT2 homológiája.	16
6. ábra: A rezveratrol kémiai szerkezete.	19
7. ábra: A HSP-90 csendesítése csökkenti a <i>hsp-90</i> mRNS és fehérje expressziót és indukálja a hősokk-választ.	33
8. ábra: A HSP-90 csendesítésének hatása a vad típus fejlődésére, valamint a vad és <i>daf-2</i> mutáns állatok fertilitására.	35
9. ábra: A HSP-90 szükséges a normál élettartamhoz.	37
10. ábra: A HSP-90 szükséges a csökkent ILS által kiváltott hosszú élettartamhoz is.	38
11. ábra: A HSP-90 kapacitás csökkentése limitálja a <i>daf-2(RNSi)</i> által indukált hosszú élettartamot.	39
12. ábra: A HSP-90 csendesítése <i>daf-16</i> -független módon is rövidíti az élettartamot.	41
13. ábra: A HSP-90 csendesítése nem neuronális sejtekben nem befolyásolja a dauer-lárva képződést vad típusú és <i>daf-2</i> mutáns fonálférgekben.	42
14. ábra: A HSP-90 szükséges a <i>daf-2</i> által indukált DAF-16A/B sejtmagi transzlokációjához.	44
15. ábra: A HSP-90 szelektíven szabályozza a DAF-16A sejtmagi transzlokációját.	45
16. ábra: A <i>hsp-90</i> csendesítése nem befolyásolja a DAF-16D/F::GFP sejtmagi átlehelyeződését.	46
17. ábra: A HSP-90 szükséges a DAF-16A/B hősokk-indukálta sejtmagi transzlokációjához.	48
18. ábra: A DAF-16A izoforma igényli a HSP-90-et a hőssokk-indukálta sejtmagi transzlokációjához.	49
19. ábra: A HSP-90 szelektíven szabályozza a <i>daf-16</i> -függő célgén expressziót	50

DAF-16A izoforma transzgén háttéren.	
20. ábra: A HSP-90 szükséges a <i>daf-2(RNSi)</i> által indukált <i>old-1</i> és <i>sod-3</i> mRNS expresszióhoz.	51
21. ábra: A HSP-90 specifikusan szükséges a DAF-16A-függő célgének expressziójához vad típusú <i>daf-16</i> háttéren.	53
22. ábra: A DAF-16A aktiváció gátlása egy független <i>hsp-90(RNSi)</i> konstrukt segítségével.	54
23. ábra: A HSP-90 csendesítése nem destabilizálja a DAF-16A::RFP-t, valamint az <i>rle-1</i> ubikvitin ligáz mutáns élettartam-növekedését sem gátolja.	56
24. ábra: A HSP-90 sem a DAF-16AAM sejtmagi áthelyeződéséhez, sem annak transzkripció aktivitásához nem szükséges.	58
25. ábra: A HSP-90 szükséges a DAF-16A, de elhanyagolható a DAF-16D/F által közvetített élettartam-növekedéshez.	60
26. ábra: A <i>hsp-90</i> csendesítése csökkenti a SIR-2.1 szintjét, és proteaszomális lebomlását váltja ki.	62
27. ábra A HSP-90 csendesítése csökkenti a SIR-2.1 fehérje szintjét az alacsony kópiaszámú szirtuin túltermelő törzsbén.	64
28. ábra: A HSP-90 szabályozó szerepei a <i>C. elegans</i> élete során.	67
29. ábra: A HSP-90 DAF-16A aktivációra és élettartamra kifejtett hatásának modellje.	69
30. ábra: A SIR-2.1 HSP-90 általi szabályozásának modellje.	73

15.2 Táblázatok

1. táblázat: A tanulmány során használt <i>C. elegans</i> törzsek listája	23
2. táblázat: A tanulmány során keresztezésekhez használt primerek listája	25
3. táblázat: A használt RNSi törzsek létrehozásához használt primerek listája	26
4. táblázat: A tanulmány során a qRT-PCR mérésekhez használt primerek listája	29
5. táblázat: Különböző fonálféreg törzsek túlélése	102
6. táblázat: A fehérje-szint mérések statisztikai analízise (Western Blot)	104
7. táblázat: A termotolerancia mérések statisztikai analízise (t-teszttel való összevetések)	105
8. táblázat: qRT-PCR mérések expressziós adatai	105

9. táblázat: Fluoreszcens mikroszkópia mérések statisztikai analízise	108
10. táblázat: Termékenységi vizsgálatok statisztikai analízise	110
11. táblázat: Dauer-képződés méréseinek statisztikai analízise	111