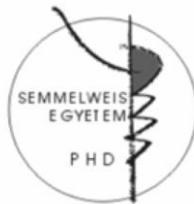


A HSP-90 chaperon biológiai szerepének vizsgálata *C. elegans*-ban

Doktori értekezés

Somogyvári Milán

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sőti 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

tagjai: Dr. Sirokmány Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Barna János, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest
2019

1. BEVEZETÉS

Az orvostudomány sikerei révén megkétszereződött születéskor várható élettartam nemkívánatos következményekkel is járt. A szervezet homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlenek a különféle károsodások kijavításában szerepet játszó mechanizmusok megfelelő szabályozása. Az életkor előrehaladtával ezek a folyamatok veszíthetnek válaszképességükből, olyan krónikus elváltozásokhoz vezetve, mint különféle anyagcsere zavarok, daganatos, illetve degeneratív megbetegedések.

A fehérje homeosztázis fenntartásának egyik központi szabályozója a 90kDa-os hősokk-fehérje, vagy Hsp90, ami nem natív szerkezetű, úgynevezett kliens-fehérjéinek stabilizálása révén fejt ki hatását. Míg a Hsp90 számos, különféle jelátviteli útvonalakban szereppel bíró kliensét azonosították már, az öregedés szabályozásában potenciálisan betöltött szerepe jórészt feltáratlan.

A genetika és fejlődéstan kedvelt modellállata a *Caenorhabditis elegans* fonálféreg, hiszen genomja magas ortológiai mutatót mutat az emberi génekkel. *C. elegans*-ban a Hsp90 család egyetlen ismert tagja a HSP-90, mely részt vesz számos folyamatban a lárvális fejlődéstől az immunitásig.

A szervezet védekező képességének fontos szabályozóiról régóta ismert, hogy az öregedés folyamatát és az élettartamot is befolyásolják. Az egyik ilyen kulcsfontosságú szabályozó az Insulin-szerű növekedési faktor útvonal, vagy IIS, melynek csökkent működése gerinctelen és emlős modellekben is növelte az élettartamot. Ilyen emellett a szirtuin 1 (SIRT1) fehérje-deacetiláz, melynek aktiválása szintén élettartam növekedéshez vezetett.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során a Hsp90 hősokkfehérje *Caenorhabditis elegans* ortológja, a HSP-90 szerepét vizsgáltam az alábbiak szerint:

1. A HSP-90 biológiai hatásának vizsgálata
 - A *hsp-90* gén RNSi általi csendesítésének jellemzése
 - A csendesítés hatása az állatok fejlődésére és szaporodására
2. A HSP-90 szerepének vizsgálata az élettartam szabályozásában
 - A *hsp-90* hiányának hatása a normál és a csökkent ILS által megnövelt élettartamra
 - A potenciális molekuláris mechanizmus azonosítása
3. A HSP-90 SIR-2.1 fehérje stabilitására kifejtett hatásának vizsgálata

3. MÓDSZEREK

3.1 Törzsek és anyagok

A kísérletekhez használt fonálféreg törzsek a Caenorhabditis Genetics Center-ből származnak. Az állatokat 20°C hőmérsékleten tartottam fenn 60 mm-es Petri csészébe öntött NGM agaron (Nematode Growth Medium). A tenyésztőlemezekon a szükséges táplálékot az *E. coli* baktérium OP50 variánsa biztosította.

3.2 MG132 tartalmú lemezek

A proteaszóma-gátlót alkalmazó kísérleteimnél végkoncentrációban 10 µM MG132-t adtam DMSO-ban oldva (1% V/V), kontrollként pedig tiszta DMSO-t.

3.3 Keresztezések

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

Vizsgálataimhoz kereszteztem a CB1370[*daf-2(e1370)*] és CF1038[*daf-16(mu86)*] mutáns törzseket. 1 óra 35°C hőszokknak vettem alá L4-es lárvakorú *daf-16* mutáns hermafroditákat. Az utódgenerációban keletkező hímek által megtermékenyített *daf-2* mutáns hermafroditák utódai mindkét génre nézve heterozigóták voltak. Ezek önmegtermékenyítés révén létrejött F2 utódait allélspecifikus PCR segítségével genotipizáltam.

3.3.2 A *daf-16a::rfp* transzgenikus és *rle-1* mutáns törzsek összekeresztezése

A *DAF-16A::RFP;rle-1(cxTi510)* kettős mutánst a *daf-16(mgDf50);unc-119(ed3);lpIs12[daf-16a::RFP + unc-119(+)]* és az [*rle-1(cxTi510)*] törzsek keresztezésével hoztam létre. A homozigóta kettős mutáns F2-ket allélspecifikus PCR-rel, valamint fluoreszcens mikroszkópiával detektáltam.

3.4 RNS interferencia

A géncsendesítés során az ún. “etetéses” protokoll szerint jártam el. Az állatok táplálékkául olyan baktériumot használunk, ami termeli a megcélzott gén csendesítésére alkalmas kis kettős szálú RNS-eket. Kísérleteim során a *hsp-90*, a *sir-2.1* és a *daf-2* gének csendesítésére használtam RNSi baktériumokat. Az RNSi-t hordozó *E. coli* törzseket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB médiumban növesztettem egy éjszakán át. A tenyésztőlemezek a szokásos összetételen túl tartalmaztak 1 mM IPTG-t és 50 µg/ml ampicillint. Ezekre a lemezekre cseppentettem a szükséges RNSi baktérium-kultúrából, illetve a kontrollként szolgáló, üres plazmidot tartalmazó törzsből. Petekortól történő kezeléskor anyaállatokat helyeztem ki a lemezekre 4 órára, s a lerakott petékből kikelt utódokkal kísérleteztem. L4-es stádiumtól történő kezelés esetén az állatok csak később kerültek RNSi lemezre, majd 2 nap után végeztem méréseket velük. A megfelelő RNSi dózis érdekében a kettős RNSi kezeléseknél az egyes RNSi kezelések esetén a csendesítő és a kontroll baktériumtörzs 1:1 arányú keverékét használtam.

3.5 Élettartam mérések

Minden élettartam-mérést 20°C-on végeztem. Az állatok szinkronizált populációját az anyák 4 órán át tartó petéztetéssel hoztam létre. Az utódpopuláció így azonos korú állatokból állt, melyek a fiatal felnőttkor elérése után alkalmasak voltak a mérésre. Kb. 35-35 állatot helyeztem ki lemezenként, melyek a szükséges vegyszerek mellett 51 µM 5-fluorodezoxiuridint is tartalmaztak azért, hogy megakadályozzuk az állatok szaporodását. Kondícióként 3-3 lemezen történtek a mérések. Az állatok FUDR-os lemezekre történő kihelyezését tekintetem nulladik napnak. A

mérés hetedik napjától kezdve kétnaponta számoltam meg az élő és holt állatokat. Minden élettartam-mérést három független alkalommal végeztem el.

3.6 Termotolerancia

Szinkronizált populációból 30-30 fiatal felnőtt állatot helyeztem ki 3-3 lemezre kondícióként. Hat órányi hő sokkot követően a lemezeket visszatettem 20°C-ra, majd 5 óra után számoltam meg a túlélő és halott egyedeket. Ettől kezdve naponta újra megszámláltam az állatokat – 24, 48 és 72 óra után. A termotolerancia méréseket három független alkalommal végeztem el.

3.7 Fluoreszcens mikroszkópia

A méréshez előkészületként elkészítettem a szükséges, agarral borított tárgylemezeket. Ezekre 15 µl M9 oldatot pipettáztam 25 mM NaN₃-dal az állatok immobilissá tétele miatt. 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 a megfelelő filterek használatával.

A DAF-16 fluoreszcencia esetén az állatokat három kategóriába soroltam: a 'sejtmagi' jelző arra utal, hogy kifejezetten nukleárisan lokalizálódott a fehérje, az 'köztes' jelző olyan állatokat jelöl, melyekben egyaránt megfigyelhető volt nukleáris és citoszolikus jel is, végül pedig a 'citoszolikus' azt jelenti, hogy nem figyelhető meg nukleárisan lokalizálódó fluoreszcencia.

3.8 mRNS expresszió analízis

Fiatal felnőtt korú populációból izoláltam mRNS-t GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) használatával. A kapott mRNS-t RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) segítségével

írtam át cDNS-sé. Az expressziós 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.

3.9 Fehérjeszint meghatározás

IPTG-t tartalmazó NGM lemezen szinkronizált populációkat növesztettem üres vektort, vagy RNSi-t tartalmazó baktériumot használva táplálékul. Az állatokat M9 oldattal Eppendorf csövekbe mostam, majd mosási lépéseket követően lefagyasztottam őket -80°C-on. 200 µl lízis puffert adtam hozzájuk (50 mM This-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 méréseknél 6 M urea is volt a pufferben. 3 fagyasztás-olvasztás ciklus után a mintákat szonikáltam, majd 10 perc 10000g-s centrifugálás után a felülúszót használtam fel. A mintákat poli-akrilamid gélen futtattam meg, majd nitrocellulóz membránra transzferáltam. A fehérje-mennyiségek kontrolljaként a membránokat Ponceau festékkel inkubáltam, s az erről készült felvételeket használtam a denzitometriához normálásra. A blokkolás 5% tejport tartalmazó TBS-T-ben történt 1 órán át szobahőmérsékleten. A használt elsődleges antitestek a poliklonális SIR-2.1 és a szintén poliklonális HSP-90 voltak. Másodlagos antitestként torma-peroxidázzal jelölt anti-nyúl ellenanyagot használtam. A membránokat ECL reagenssel inkubáltam 1 percig, majd a fehérjék jelét röntgenfilm segítségével hívtam elő.

3.10 Dauer fenotípus vizsgálat

10-10 felnőtt állatot petézni hagytam NGM lemezeken 4 órán át. Eltávolításuk után a lemezeket 25°C-os inkubátorba helyeztem és az utódokat növekedni

hagytam a kikeléstől számított harmadik napig. Ekkor számoltam le a dauer fenotípust mutató és nem mutató utódokat.

3.11 Morfológiai jellemzés

10 felnőtt állatot 1 órán át hagytam petézni üres vektort (EV) illetve *hsp-90(RNSi)*-t tartalmazó baktériummal oltott lemezekre. A 20°C-on felnövő utódokon három nap után Nikon Eclipse E400 mikroszkóp használatával figyeltem meg a fenotipikus különbségeket.

3.12 Fertilitás vizsgálat

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

3.13 Statisztikai analízis

A élettartam mérések statisztikai kiértékelését SPSS 15.0 szoftverrel végeztem. A túlélési görbéket Kaplan-Meyer eljárással, log-rank teszt segítségével hasonlítottam össze. A génexpressziós, valamint az intracelluláris lokalizációs adatokat ANOVA segítségével hasonlítottam össze. A változókat az átlagérték és szórás révén fejeztem ki. A szignifikanciák jelölései: *:p<0,05, **:p<0,01 és ***:p<0,001.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A HSP-90-csendesítés hatásának jellemzése

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

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassam a csökkent HSP-90 kapacitás hatását az élettartamra, *hsp-90(RNSi)*-t alkalmaztam. 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 viszonyítva. Az irodalmi adatokkal egyetértésben, a *hsp-90(RNSi)*-vel táplált állatok ~90%-a kitüremkedő vulva fenotípust mutatott, valamint enyhe hipomotilitást is, azonban más egyéb fejlődési rendellenességet nem. Hasonlóképpen nem akasztotta meg a lárvális fejlődést, és jelentős lassulásához sem vezetett.

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. A kitüremkedő vulva fenotípus ezúttal nem jelent meg.

A *hsp-90* petekortól való csendesítése sterilitást okozott, melyhez petesejt-hiány is társult, azonban L4-es kortól kezelve csak csökkent utódszámot okozott. A *hsp-90* petekortól, vagy L4-es kortól való csendesítése is *hsf-1*-függő *hsp-16.2* és *hsp-70* mRNS expresszió növekedést váltott ki fiatal felnőttekben, egyetértésben a hősokkválasz várt kompenzáló aktivációjával.

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

Első kísérletként megmértem a vad típusú N2 férgek élettartamát üres vektort, illetve *hsp-90(RNSi)*-t tartalmazó baktériumon tartva.. Eredményeim alapján a *hsp-90(RNSi)* csökkentette az állatok élettartamát a kontrollhoz képest. A *hsp-90(RNSi)* kisebb mértékben ugyan, de továbbra is szignifikáns élettartam-csökkenéshez vezetett akkor is, ha a kezelést az L4-es stádiumtól végeztem az állatok felnőttkorán át. 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. Az állatok csökkent élettartama – noha indukálódott bennük a hősokk-válasz, mely előre jelzi a hosszú élettartamot – annak a következménye lehet, hogy több különböző, a túlélést elősegítő mechanizmus is kárt szenvedhetett egyidejűleg.

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 ismert élettartam-növelő hatás. Összehasonlítottam a *daf-2* és *daf-2;daf-16* egyszeres és kétszeres mutáns állatokat üres vektort, vagy *hsp-90(RNSi)*-t tartalmazó baktériumon. A *daf-2* mutációja jelentős mértékű növekedést okozott az élettartamban a vad típushoz viszonyítva, melyet a *daf-16* hiánya teljes mértékben meggátolt. A *hsp-90(RNSi)* kezelés petekortól

történő alkalmazásától lecsökkent a *daf-2* mutáns férgek élettartama, arra utalva, hogy a HSP-90 szükséges a csökkent ILS által kiváltott megnyúlt élettartam teljes megjelenéséhez.

Meghatároztam a *hsp-90(RNSi)* hatását az élettartamra akkor is, 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* mutáns állatok túlélését, azonban a mérések felében a hatás nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Ezek a megfigyelések abba az irányba mutatnak, hogy a HSP-90 élettartamot támogató hatása a *daf-2* csökkent működése esetén elsősorban a fejlődés során, mintsem utána érvényesül.

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 csökkent ILS-sel rendelkező férgek esetében.

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.

Stressz és csökkent ILS határása a fonálférgek nagy valószínűséggel térnek át egy alternatív fejlődési útvonalra és ún. „dauer” lárvákat képeznek. Megvizsgáltam, miként lép kölcsönhatásba a *daf-2* és a *hsp-90* a dauer fejlődés során. Mint korábban leírták, a *daf-2* mutánsok 25°C-on növesztve szinte kivétel nélkül dauer lárvákká fejlődtek, míg egy másodlagos mutáció megléte a *daf-16* génben megszüntette ezt. A *hsp-90* kikeléstől való csendesítése nem neurális szövetekben nem befolyásolta egyik vizsgált törzs dauer-képzését sem. Úgy határoztam, felhasználok egy törzset, mely minden

sejtjében kifejezi az RNSi működéséhez szükséges fehérjét, aminek révén megerősítettem a korábban leírtakat a megfelelő neuronális HSP-90 funkció szükségességéről a dauer forma kivédéséhez.

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

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. A DAF-16 aktiválódásának fontos lépése mind a csökkent ILS, mind pedig hő sokk hatására bekövetkező áthelyeződése a sejtmagba. Először megvizsgáltam, miként változik a DAF-16 sejten belüli eloszlása a *daf-16a/b::GFP* transzgén hordozó törzsből petekortól történő *daf-2* illetve *hsp-90* csendesítés hatására. A *daf-2* csendesített fonálférgekben a DAF-16A/B nagy része a sejtmagban koncentrált. Megfigyeléseim szerint a *hsp-90* csendesítése részlegesen gátolta ezt a transzlokációt. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a HSP-90 elősegíti a DAF-16 áthelyeződését válaszul a csökkent ILS-re. Megismételtem a méréseket úgy is, hogy L4-es stádiumú állatokat helyeztem az RNSi lemezekre, s hasonló eredményekre jutottam.

Az ismert három DAF-16 izoforma-csoport közül kettő, az A és D/F/H izoformák az élettartam meghatározásában betöltött szerepét az ILS szabályozza. Ezért két-két olyan törzset alkalmaztam, melyek különböző, fluoreszcensen jelölt formában fejeznek ki egyes DAF-16 izoformákat *daf-16* nullmutáns háttéren: *daf-16a::rfp* és *daf-16d/f::gfp* valamint ezek *daf-2*

mutáns variánsait. Az RNSi kezelést kikeléstől kezdve alkalmaztam, a DAF-16 sejten belüli eloszlását pedig a felnőttkor első napján olvastam le.

A DAF-16A::RFP transzgén kifejezett sejtmagi lokalizációt mutatott, míg a DAF-16D/F::GFP a sejtplazmában maradt a *daf-2* mutánsban a sértetlen *daf-2* alléllal rendelkező törzsekhez képest. 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-t. Az izoformák transzlokációjába való független betekintés érdekében hősokkot is alkalmaztam – az áthelyeződést indukálendő.

Méréseim alapján a hősokk kifejezett sejtmagi lokalizációt indukált a DAF-16A/B::GFP, DAF-16A::RFP és DAF-16D/F::GFP esetén is. 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. Hasonló eredményre jutottam az L4-es stádiumtól alkalmazott RNSi kezelés esetén is. Ezek az eredmények támogatják a HSP-90 szükségességét a DAF-16A áthelyeződéséhez.

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

Következőként a *hsp-90* csendesítés hatását vizsgáltam különböző DAF-16 célgének kifejeződésére. Az első kísérlet-sorozatban annak érdekében, hogy elkülöníthessük az egyes izoformákat, valamint elkerülhessük a szükségtelen „kereszt-beszélgetések” a többi DAF-16A izoformával, a fentebb ismertetett *daf-16a::rfp* és *daf-16d/f::gfp* törzseket használtam.

A *sod-3* és *old-1* mRNS expresszióját – melyet a *daf-2* mutáció váltott ki – gátolta a *hsp-90(RNSi)* a *daf-16a::rfp* törzsben, de nem befolyásolta őket a *daf-16d/f::GFP* törzsben. Kiválasztottam az *scl-20* és *gst-20* géneket,

melyeket specifikus DAF-16A célgénekként azonosítottak. Kísérleteim megerősítették mindkét gén indukcióját a *daf-2* mutáns allél által a *daf-16a::rfp* törzsben, valamint a *gst-20* expressziójának hatékony gátlását mutatták *hsp-90(RNSi)* által. DAF-16D/F specifikus célgénekként a *lea-1* és *scl-1* géneket választottam ki. A DAF-16A célgénnel ellentétben ennek a két transzkripciós célgénnek nem gátlódott az expressziója *daf-16d/f::GFP* transzgén háttéren *hsp-90(RNSi)* hatására.

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

Az mRNS expresszió összehasonlítása *daf-2* és *daf-16;daf-2* 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. A DAF-16D/F célgéneket két további, DAF-16D/F specifikus célgénnel egészítettem ki: *col-183* és *R05D8.7*. Úgy találtam, hogy mindegyik mRNS mennyisége jelentősen emelkedett a *daf-2* mutánsban, de ez az indukció nem gátlódott *hsp-90(RNSi)* által. Eredményeim meggyőző bizonyítékokkal szolgálnak arra, hogy a HSP-90 specifikusan szabályozza a DAF-16A transzkripciós aktivitását.

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

C. elegans-ban az E3 ubikvitin ligáz RLE-1-ről kimutatták, hogy mutációja a DAF-16 fehérje stabilizálódásához, valamint DAF-16-függő élettartam-

növekedéshez vezet. Ha a HSP-90 stabilizálja a DAF-16 konformációját, akkor a csökkent HSP-90 kapacitásnak a DAF-16 aggregációjához, s az *rle-1* mutánsok megnövekedett élettartamának csökkenéséhez kell vezetnie. A *hsp-90(RNSi)* nem zavarta meg a DAF-16 eloszlását, és nem okozott DAF-16 aggregációt, emellett nem befolyásolta a DAF-16 fehérje turnover-ét sem: nem figyeltem meg csökkenést a fluoreszcensen jelölt DAF-16A fehérje mennyiségében, s nem tapasztaltam kompenzáló mRNS-szint növekedést sem a *daf-16a* gén esetén a kezelés hatására. Hasonlóképp, az *rle-1* által indukált élettartam-növekedés a pusztán DAF-16A::RFP-t kifejező törzsben szintén fennmaradt a HSP-90 hiányában is, ezzel azt sugallva, hogy a funkcióképes DAF-16 fehérje stabilizálása nem igényli a HSP-90-et. Így valószínűtlennek tűnik, hogy a DAF-16 a HSP-90 kliensfehérjéi közé tartozna.

Amikor az ILS jelpálya aktív, az AKT-1 és AKT-2 foszforilálják a DAF-16/FOXO fehérjét, ami megakadályozza, hogy a sejtmagban halmozódjon fel a citoplazmatikus 14-3-3 állványfehérjékhez való “pányvázása” révén. Annak érdekében, hogy kiderítsem, a HSP-90 a DAF-16 sejtmagi forgalmának szintjén, vagy ahhoz képest upstream fejt ki hatását, alkalmaztam a *daf-16aAM::gfp* (AM: “AKT site mutant”) transzgén törzset, amiben az AKT foszforilációs helyeket elmutálták. A DAF-16A^{AM}::GFP sejtmagi lokalizációt mutatott vad típusú állatokban is. 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 így lebontásra kerülne. Sem a DAF-16A^{AM}::GFP mennyisége, sem annak lokalizációja nem változott meg *hsp-90(RNSi)* hatására, 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. Úgy tűnik, a HSP-90 a DAF-16A sejtmagi forgalmát megelőző lépésben hat.

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

Eredményeimre alapozva 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;daf-16* mutáns háttéren.

Mind a *daf-16a::rfp*, mind pedig a *daf-16d/f::gfp* transzgén hosszabb élettartamhoz vezetett, ha a *daf-2;daf-16* háttértörzshöz hasonlítottam. 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 transzgén állatok túlélését. 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 specifikusan igényli a Hsp90-et stabilizációjához, hiányában a fehérje proteasóma általi lebontásra kerül. PhD munkám során megvizsgáltam chaperon-kliens interakció áll-e fenn a két fehérje között fonálférgekben is. Megmértem a SIR-2.1 fehérje szintjének változását *hsp-90(RNSi)* hatására 20 és 25°C-on. Eredményeim alapján a *hsp-90* gén csendesítése hatékonyan

csökkenti a HSP-90 fehérje szintjét, valamint ezzel együtt csökkent SIR-2.1 fehérje-szinthez is vezet. Ez megfigyelhető mind 20, mind pedig 25°C-on. Tekintettel arra, hogy a HSP-90 kliensek a dajkafehérje hiányában gyakorta a proteaszómában kerülnek lebontásra, ennek gátlása lehetővé teszi, hogy megvizsgáljam, ez esetben is így van-e. A proteaszómális lebontás gátlását az MG132 proteaszóma-gátlószer alkalmazásával értem el. Negatív kontrollként *sir-2.1(RNSi)* kezelést is alkalmaztam. Ezekben a kísérletekben a *hsp-90(RNSi)* 40% körüli SIR-2.1 fehérje-szint csökkenést okozott, a *sir-2.1(RNSi)*-hez hasonlóan. 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. Egyes kísérletekben továbbá a SIR-2.1 fehérje egy része nem volt képes futni az elválasztó gélben és annak tetején gyűlt össze proteaszóma-gátlás hatására az EV- és *hsp-90(RNSi)*-kezelt minták esetén. Ezek a megfigyelések a SIR-2.1 proteaszóma által közvetített forgalmára és lebomlására engednek következtetni, aminek mértéke tovább emelkedik a HSP-90 hiányának hatására.

A méréseim munkatársam emlős SIRT1 fehérjével kapcsolatos eredményeivel együtt megerősítik a hipotézist, miszerint a SIR-2.1 fehérje működése valóban függ a HSP-90 chaperon jelenlététől, a két protein között dajkafehérje-kliens kölcsönhatás áll fenn.

5. 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 szövet-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.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

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

A disszertáció témájához közvetlenül 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, Sóti 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 szakcikkék száma: 4

Kumulatív IF: 51,278

Idézettség (összes/független): 415/395