

Citoprotektív stresszválaszok szerepe a tanult szisztémás védekezésben *Caenorhabditis elegans* fonálféregben

Doktori értekezés

Gecse Eszter, MSc

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. Sóti Csaba, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Ella Krisztina, egyetemi adjunktus
Dr. Farkas Zsolt, tudományos segédmunkatárs

Komplex vizsga

elnöke: Dr. Enyedi Péter, egyetemi tanár

tagjai: Dr. Törőcsik Beáta, egyetemi docens
Dr. Barna János, tudományos munkatárs

Budapest
2021

Bevezetés

A tanulás és a memória lehetővé teszi az állatok és az ember számára, hogy eligazodjanak, táplálékot találjanak és ezáltal életben maradjanak a változó környezetben. Az asszociatív tanulás olyan folyamat, amelynek során asszociáció alakul ki két vagy több különböző inger között, és segíti az erőforrásokhoz való hozzáférést vagy a veszélyek elleni hatékony védekezést. Ezen kívül a túléléshez az intracelluláris molekuláris védekező mechanizmusok és a viselkedéses válaszok megfelelő, összehangolt kölcsönhatása is szükséges. Az asszociatív tanulás gyors és hatékony alkalmazkodást biztosít az újból megjelenő, de már előzőleg megtapasztalt, ismert körülményekhez. A releváns múltbeli tapasztalatokhoz kapcsolódó szenzoros jelek újbóli megjelenése előhívják a tárolt emléket és olyan viselkedésmintákat váltanak ki, amelyek megfelelnek az adott múltbeli eseménynek. Az asszociatív emlékek lehetnek rövid-, közép- és hosszú távú emlékek. Egy sajátos tanulási folyamat zajlik az élet korai szakaszában egy meghatározott időablakban, amit kritikus (vagy érzékeny) periódusnak neveznek. Ez az asszociatív tanulás korai életkorban történő speciális formája a bevésődés (imprinting), ami különösen tartós emlékeket alakít ki és maradandó viselkedésmintákat hoz létre. A bevésődést elsőként madarakban mutatták ki, miszerint a frissen kikelt libák az első mozgó tárggyal alakítanak ki szoros kötődést. A vizuális emlékek mellett számos gerinces fajban leírták a felnőttkori viselkedést befolyásoló korai életkorban rögzült szaglási emlékek szerepét is. A kritikus periódusban a szenzoros ingerek és a különböző környezeti hatások együtt vésődnek be és adaptív viselkedéses válaszokat alakítanak ki. Felnőttkorban a szenzoros ingerrel való újbóli találkozás önmagában is képes kiváltani a jellegzetes viselkedésmintát. A bevésődés az egyén és/vagy a faj túléléséhez nélkülözhetetlen, alapvető szükségletekhez való biztos és tartós ragaszkodás biológiai alapjaként szolgál. Ezen túlmenően, a bevésített emlékek élethosszig tartó hatását számos tanulmány alátámasztja, igazolva azt is, hogy a kritikus időszakban tapasztalt hátrányok különböző kognitív és érzelmi rendellenességek kialakulásához vezetnek és az agy szerkezeti, endokrin és epigenetikai változásaival járnak felnőttkorban.

Kísérleteinket a *Caenorhabditis elegans* fonálféreg modellen végeztük, amely egyszerű idegrendszere ellenére meglepően összetett viselkedésre képes, és a korábbi tapasztalatok alapján a tanulás különféle formáit mutatja. A túléléshez szükséges minőségek bevésődése *C. elegans* esetében is megfigyelhető, valamint újabb tanulmányok arról számoltak be, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* PA14 fertőzés és az ascr # 3 feromon korai expozíciója bevésített elkerülő viselkedést eredményez felnőtt férgekben. Azonban a kórokozók és a tápanyaghiány

csak néhány olyan hátrány, amelyek az elkerülő viselkedés mellett aktív védelmi stratégiákat igényelnek, különösen akkor, ha a szervezet integritása sérül. Különböző stresszekre védekező reakcióként a *C. elegans* evolúciósan konzervált, specifikus sejtes stresszválaszok egész sorát indukálja. Emellett *C. elegans*-ban számos kísérleti bizonyíték alátámasztja a sejtes stresszválaszok és az idegi hálózatok kapcsolatát. Azok a megállapítások, amelyek szerint a neuronális jelek elősegítik a citoprotektív válaszokat, jelzik a szomatikus sejtek és az idegsejtek közötti kommunikációt és a különböző sejtek kölcsönös szabályozását, felkészülve a várható veszélyre.

Ezek az eredmények számos kérdést felvetnek. Az élet korai szakaszában tapasztalt stressz kivált averzív viselkedést és citoprotektív válaszokat? Vajon a bevésett elkerülő viselkedés a korai stresszek általános következménye? Ha a korai citoprotektív transzkripciós stresszválaszok kialakulnak, úgy felnőttkorban indukálhatják-e ezeket a stresszhez kapcsolódó szenzoros jelek? A különböző stresszekre adott intracelluláris védelmi válaszok befolyásolhatják a viselkedéses döntéseket és a tanult viselkedésmintákat?

Célkitűzés

Doktori munkám során a toxikus stressz által kiváltott citoprotektív és viselkedéses válaszok közötti összefüggéseket, valamint az asszociatív tanulást vizsgáltam a korai fejlődés során és felnőttkorban *Caenorhabditis elegans* fonálféreg modellen.

1. Korai stressz által létrehozott korai és bevésett védelmi válaszok vizsgálata.
 - a. A korai stresszek által kiváltott viselkedéses és citoprotektív válaszok jellemzése.
 - b. Az averzív viselkedés bevésődésének vizsgálata.
 - c. A citoprotektív stresszválaszok bevészhetőségének meghatározása.

2. A felnőttkori citoprotektív stresszválaszok tanult viselkedéses döntésekre gyakorolt hatásának vizsgálata.

Módszerek

Reagensek

Az antimycin A, paraquat, benzaldehid és diacetil valamint az összes reagens a Sigma-Aldrich cégtől származik. A *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* NRS 231 (ATCC® 6633™) és *Pseudomonas fluorescens* NCTC 10038 (ATCC® 13525™) baktérium törzseket az Országos Epidemiológiai Központból szereztük be.

C. elegans törzsek, fenntartás

A kísérletekben használt fonálféreg törzsek a Caenorhabditis Genetics Centerből (University of Minnesota, cbs.umn.edu/cgc/home) származnak. A *C. elegans* törzsek fenntartására standard módszereket alkalmaztam. Az állatokat inkubátorban 20°C hőmérsékleten tartottam fenn 9 cm-es Petri csészébe öntött NGM agaron. A tenyésztőlemezekben az állatok számára a szükséges táplálékot az *Escherichia coli* baktérium OP50 variánsa biztosította. Kísérleteimben a következő *C. elegans* törzseket használtam: N2 vad típus, SJ4100 zcIs13 [hsp-6::GFP], MJCU017 kIs17 [gst-4::GFP, pDP#MM016B]X.

Imprinting kezelés

Az állatok szinkronizált populációját úgy hoztam létre, hogy 15-20 felnőtt hermafroditát 3 cm átmérőjű, 50 µl OP50 baktériummal cseppentett NGM lemezre helyeztem, majd 4 órán át tartó petézést követően eltávolítottam a felnőtt férgeket. A szinkronizálást megelőzően a tesztlemezekben található OP50 baktériumfoltra 20 µl toxint vagy a megfelelő oldószer kontrollt (etanol vagy desztillált víz) cseppentettem és a folyadékot 10-15 perc alatt hagytam megszáradni. Kísérleteimben az antimycin A (AM) és paraquat (PQ) toxinokat használtam 50 µg/ml illetve 40 mg/ml koncentrációban. A hermafroditák eltávolítását követően a lemezeket 20°C-on inkubáltam 24 órán keresztül az L1 lárvastádium ideje alatt. (A kikelést követő első 24 órában a *C. elegans* lárvákat L1 lárváknak nevezzük). L2 lárvastádiumú állatok kezelésénél a férgek *Bacillus subtilis* táplálék baktériumot tartalmazó lemezen keltek ki, majd 24 óra elteltével AM-t vagy PQ-ot tartalmazó OP50 baktériummal ellátott lemezen tartottam őket további 24 órán keresztül.

Toxin által indukált L1 kori táplálék elhagyás

Közvetlenül az imprinting kezelést követően az elkerülő viselkedést a táplálékfoltot elhagyó és a táplálékfolton maradó lárvák számolásával határoztam meg, melyet az averziós index fejez ki ($N_{\text{off}}/N_{\text{total}}$). A számolás után az állatokat M9 oldattal mostam, majd a férgeket *Bacillus subtilis*

vagy *Pseudomonas fluorescens* baktériummal ellátott, 9 cm átmérőjű NGM lemezeken növesztettem fel. A táplálékelhagyás-táplálékválasztást vizsgáló kísérletek esetében a táplálékot (és ezzel együtt a toxint) elhagyó és a táplálékon maradó férgeket szétválasztottam, majd a kétféle populációt különválasztva mostam és növesztettem fel *Bacillus subtilis* baktériumon.

Olfaktoros táplálékválasztás teszt

A felnőttkori táplálék preferencia vizsgálatához 9 cm átmérőjű NGM lemezeket használtam, melyeket a teszt előtt 30-30 µl OD600=1 koncentrációjú baktériumszuszpenzióval cseppentettem, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. A vizsgálathoz a 4 napos naiv illetve L1 lárvakorban kezelt felnőtt állatokat M9 oldattal lemostam a tenyésztőlemezekről, majd a mosási lépést háromszor megismételtem. Ezt követően 80-100 állatot a két ellenkező oldalon OP50-et és *Bacillus subtilis* vagy *Pseudomonas fluorescens* baktériumot egyaránt tartalmazó tesztlemez közepére helyeztem. A férgek lemezen való eloszlását 1 óra múltán számoltam. Ebben a kísérletben a viszonylag rövid inkubációs idő miatt az állatok túlnyomórészt szaglási ingerek alapján választottak a kétféle táplálék között.

Táplálékelhagyás-táplálékválasztás teszt

A felnőttkori táplálékelhagyás-táplálékválasztás vizsgálatához 9 cm átmérőjű NGM lemezeket használtam, melyeket a teszt előtt 700-700 µl OD600=1 koncentrációjú baktériumszuszpenzióval cseppentettem, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. A toxin-indukálta averziós teszt során az L1 lárvakorban különválasztott lemászó és nem lemászó 4 napos felnőtt állatokat M9 oldattal lemostam a tenyésztőlemezekről, majd a mosási lépést háromszor megismételtem. Ezt követően a két ellenkező oldalon OP50-et és *Bacillus subtilis* baktériumot egyaránt tartalmazó tesztlemez OP50 táplálékfoltjára helyeztem lemezenként 60-80 állatot. A férgek lemezen való eloszlását 20 óra múltán számoltam. Ebben a kísérletben a viszonylag hosszú inkubációs idő lehetővé tette, hogy az állatok a szaglási ingerek mellett íz alapján válasszanak a táplálékbaktériumok között.

Toxikus illékony anyag által indukált toxikus stressz előkezelés

A felnőtt férgek előkezelését táplálékbaktérium jelenlétében függő csepp módszerrel végeztem, ami megakadályozta az éhezést illetve a koncentrált illékony anyagok közvetlen érintkezését a férgekkel. 1 µl és 4 µl csepp koncentrált benzaldehidet (ccBA), vagy diacetilt (ccDA) helyeztem az OP50 táplálékbaktériummal ellátott 6 cm átmérőjű NGM lemezek fedeleire, amelyek

lemezenként 200-300 fiatal felnőtt szinkron populációját tartalmazták. Ezt követően a lemezt parafilmrel lezártam, biztosítva az illékony anyag állandó koncentrációját a lemeztérben. Az előkezelés ideje 3 óra volt.

Kemotaxis kísérlet és illat preferencia teszt

A fiatal felnőtt állatok szinkron populációját kétszer mostam M9 pufferrel, majd lemezeként 80-100 férget helyeztem 10 cm átmérőjű CTX tesztlemezek közepére. A teszt során a férgek a lemez egyik oldalán lévő 1 µl 1%-os BA vagy 1 µl 1%-os DA illatanyag és a másik oldalon található 1 µl oldószeres kontroll (96%-os etanol) anyagok között választhattak. A kísérlet eredményét 1 óra múltán értékeltem kemotaxis index számításával. [Kemotaxis index = (férgek száma az illatanyagon) – (férgek száma a kontroll anyagon) / (férgek száma a lemezen)].

Az illat preferencia tesztet a kemotaxis kísérlethez hasonló módon végeztem azzal a változtatással, hogy a férgek 1%-os BA és 1%-os DA illatanyagok között választhattak. Mindkét típusú kísérletben mellőztem az anesztetikumok használatát a tényleges döntések nyomán követése érdekében. A férgek lemezen való eloszlását ebben az esetben is 1 óra múltán számoltam.

Táplálékfelhagyás teszt

A szükséges tesztlemezek előkészítése során 6 cm átmérőjű NGM lemezek közepén található kör alakú OP50 baktériumfoltra egy-egy 3x3 mm nagyságú parafilm darabot tettem. A fiatal felnőtt férgek szinkron populációját kétszer mostam M9 oldattal, majd 50-80 állatot az OP50 baktériumfoltra helyeztem. Ezt követően a parafilmre 1 µl 1%-os BA vagy 1 µl 1%-os DA oldatot cseppentettem. A baktériumfolton és az üres agarfelületen található állatokat 50 perc leteltével számoltam, a táplálékfelhagyási indexet ($N_{\text{off}}/N_{\text{total}}$) a táplálékfoltot elhagyó és az összes állat hányadosával határoztam meg. Az agarfelületen kívül, a lemez oldalán található férgeket cenzúráztam a kísérletből.

GFP riporter expresszió vizsgálata

A fluoreszcens mikroszkópos mérések előkészületeként a tárgylemezekre mikrohullámú sütőben felmelegített 2%-os agarózt cseppenttem, majd a cseppe egy másik tárgylemezt helyeztem. Az agaróz megdermedése után (15-20 másodperc) a lemezeket szétválasztottam. A tárgylemezekre 7 µl M9 oldatot pipettáztam, ami tartalmazott 25mM Na-azidot is az állatok immobilissá tételére. A kezeléseket követően fiatalkori mérés esetén kondícióként 25-30 L1 lárvát, felnőttkori mérés esetén 25-30 felnőtt állatot helyeztem a cseppekbe. A képeket Nikon Eclipse E400 epifluoreszcens mikroszkóp és Diagnostic Instruments SPOT model 1.5.0 kamera

segítségével készítettem GFP fluoreszcens filter használatával. A képeket 20X illetve 10X objektívek használatával készítettem. A GFP expressziós szinteket ImageJ szoftver segítségével értékeltem ki.

Statisztika

Az L1 lárvakori elkerülő viselkedés vizsgálatának eredményeit egytényezős ANOVA teszt segítségével hasonlítottam össze a Tukey HSD post-hoc módszert alkalmazva. A GFP riporterek expressziójának elemzéséhez nem parametrikus tesztek használtam. Az L1 lárvák esetében a páronkénti összehasonlításához a Kolgomorov-Smirnov tesztet, a felnőtt férgek expressziójának többszörös összehasonlításához pedig a Kruskal-Wallis tesztet használtam. A felnőttkori olfaktoros táplálékválasztást és a táplálékelhagyás-táplálékválasztást vizsgáló kísérletek valamint az illatpreferencia teszt eredmények többszörös összehasonlítását kéttényezős ANOVA-val és Fisher LSD post-hoc teszttel elemeztem. A felnőttkori táplálékelhagyást és kemotaxist vizsgáló kísérletek eredményeit egytényezős ANOVA teszt segítségével elemeztem Fisher LSD post-hoc módszert alkalmazva. Az egytényezős ANOVA teszteket az IBM SPSS Statistics program segítségével elemeztem, míg az összes többi elemzést a STATISTICA programmal végeztem. A felnőttkori táplálékelhagyás, kemotaxis és illatpreferencia tesztek esetén az adatokat átlag \pm standard hiba (SEM) értékeként fejeztem ki. A normál eloszlást mutató L1 kori és felnőttkori olfaktoros táplálékválasztást és a felnőttkori táplálékelhagyás-táplálékválasztást vizsgáló tesztek esetében az adatokat átlag \pm szórás (SD) formájában fejeztem ki. A reporter expressziót vizsgáló kísérletek eredményei nem normál eloszlást mutattak, ahol az adatok ábrázolásához dobozos ábrát alkalmaztam. Az ábrák a mediánt, az első és harmadik kvartilisokat illetve a tizedik és kilencvenedik percentiliseket jelentő bajuszvonalakat mutatják. Az eredményül kapott szignifikancia határértékeket a következőképp határoztam meg: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,01$.

Eredmények

Korai stressz által létrehozott korai és bevészt citoprotektív és viselkedéses stresszválaszok vizsgálata

A korai toxikus stressz táplálékfelhagyó viselkedést indukál

A *C. elegans* felnőttkorban elkerülő viselkedést mutat azokra a patogén baktérium eredetű szenzoros jelekre, amelyekkel élete során már korábban találkozott felnőttkorban vagy L1 lárvakorban. Hasonlóképpen, a már korábban megtapasztalt, ismert patogén eredetű szenzoros jelekkel való újbóli találkozás hatására mind a felnőtt állatok, mind az L3-L4 korú lárvák felfüggesztik a táplálkozást és elhagyják a toxin tartalmú baktériumpázsitot. Munkánk első céljaként megvizsgáltuk, hogy az L1 lárvák képesek-e toxikus stressz hatására elkerülő viselkedést kialakítani, ha OP50 táplálékforrásra antimycin A (AM) vagy paraquat (PQ) toxint rétegeztünk. Az AM egy bakteriális eredetű toxin, amely a mitokondriális elektron transzport lánc III-as komplexét gátolja, míg a PQ egy szintetikus, reaktív oxigéngyök (ROS) képző herbicid. A korai viselkedést étel felhagyásos teszttel vizsgáltuk, amelynek során a férgeket kikelésüktől fogva *Escherichia coli* OP50 táplálék baktériumon tartottuk úgy, hogy a baktériumfoltra a megfelelő toxinokat rétegeztünk. A kritikus periódus leteltével, amely *C. elegans* esetében az első 24 óra, a toxikus hatás következtében kialakuló averzív viselkedést vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a korai toxin expozíció elkerülő viselkedést vált ki az AM és a PQ esetében is, a lárvák inkább az éhezést választva elhagyták a toxint és ezzel együtt a táplálékfoltot. Ezzel szemben a naiv, kezeletlen állatok a baktériumpázsiton maradtak. Tehát a férgek már L1 lárvakorban képesek érzékelni a toxicitást, viselkedési döntést hozni és elkerülni az egyébként tápláló baktériumpázsitot.

A korai toxikus stresszek specifikus citoprotektív válaszokat váltanak ki

A különböző toxikus stresszhatások az élőlényekben evolúciósan konzervált specifikus molekuláris stresszválaszokat váltanak ki, melyek segítik a szervezet túlélését. Ezért a toxikus stressz hatására indukálódó transzkripciós programok aktiválódásának ellenőrzésére több GFP riportert is teszteltem. Megvizsgáltuk, hogy AM és PQ kezelés esetében a korai életkorban milyen citoprotektív stresszválaszok jönnek létre. A mitokondriumok nem megfelelő működése esetén a homeosztázis megőrzése illetve helyreállítása érdekében a sejtek védekező válasza a mitokondriális UPR (unfolded protein response) aktiválódása, aminek következtében a HSP-6 mitokondriális hősokk fehérje indukálódik. Kísérleteinkben mind az AM, mind a PQ toxin

expozíció fokozta a mitokondriális stresszmarker *hsp-6::GFP* transzgenikus L1 lárvák fluoreszcencia szintjét. A különböző stresszhatások szabályozhatják a sejtekben indukálódó detoxifikációs válaszokat, amelyek semlegesítik a mérgező anyagokat illetve segítik azok kiválasztását. A glutation metabolizmus két enzimének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy csak a PQ (az AM nem) indukálta a *gst-4::GFP*-t, azaz a glutation-S-transzferázt, ami a biotranszformáció második, konjugációs fázisában résztvevő enzime. Továbbá egyik toxin expozíciója sem befolyásolta a glutamát-cisztein-ligáz *gcs-1::GFP* expresszióját. Tehát AM és PQ kezelés esetén különböző és átfedő molekuláris válaszok jönnek létre a korai életkorban.

A korai toxikus stressz nem hoz létre bevésített averzív viselkedést

Munkánk során a következő kérdésünk az volt, hogy vajon a korai életkorban megtapasztalt toxikus ágensekkel asszociált táplálék eredetű bakteriális szenzoros jelek képesek-e előhívni az elkerülő viselkedést felnőttkorban. Ennek vizsgálatára a férgeket kikelésüktől fogva 24 órán át OP50 táplálékbaktérium jelenlétében AM-nel illetve PQ-tal kezeltük. Ezt követően az állatokat az OP50-től eltérő illatú, szintén nem patogén *Bacillus subtilis* baktériumon növesztettük fel, majd felnőttkorban klasszikus táplálékválasztásos tesztben vizsgáltuk a felnőtt férgek táplálékpreferenciáját. A teszt során a férgeket a két ellenkező oldalon OP50 és *Bacillus subtilis* foltot tartalmazó lemez közepére helyeztük és egy óra múltán számoltuk az elhelyezkedésüket. Ebben a kísérletben az inkubációs idő rövidege miatt az állatok olfaktoros ingerek alapján választanak a két táplálék között. A kezelt férgek preferenciája nem mutatott szignifikáns eltérést a korai életkorban toxinnal nem kezelt kontroll állatok preferenciájához képest. Korai életkorban OP50 táplálékbaktérium jelenlétében történő AM és PQ kezelés nem befolyásolta a felnőttkori táplálékpreferenciát.

Ezek után szeretnénk volna megbizonyosodni arról, hogy a felnőttkori táplálék preferencia különbség hiánya a kezelt és kontroll csoportok között nem az alkalmazott metodika miatt van. Feltételezve, hogy a fiatalkorban elkerülő populáció tagjai felnőttkorban is nagyobb valószínűséggel mutatnak elkerülést, egy új kísérleti elrendezésben szétválasztottuk a korai életkorban elkerülést mutató populációt a nem-elkerülő populációtól. Valamint törekedtünk a korai érzékszervi tapasztalatok megszerzése során kialakított körülmények jobb utánzására, kiküszöbölve az éhség táplálékválasztásra gyakorolt esetleges negatív hatását a teszt során. Ezért a felnőttkori táplálékpreferenciát egy általam kidolgozott módszerrel táplálékkelhagyás-táplálékválasztásos hibrid kísérletben is megvizsgáltuk. Az első 24 órában a férgeket OP50 táplálékbaktérium jelenlétében AM-nel vagy PQ-tal kezeltük, majd a lemászó és nem lemászó

populációkat különválasztva, a fenti kísérleti elrendezéshez hasonlóan az állatokat *Bacillus subtilis* baktériumon növesztettük fel. A felnőtt férgeket ebben az esetben is OP50 és *Bacillus subtilis* baktériumfoltot egyaránt tartalmazó lemezre helyeztük azzal a különbséggel, hogy ebben a kísérletben az OP50 baktériumfoltra tettük az állatokat. A férgek OP50-re helyezését követően 20 óra elteltével számoltuk az OP50 baktériumfolton maradó, az OP50 baktériumfoltot elhagyó és a *Bacillus subtilis* baktériumra átmászó állatokat. A hosszabb, 20 órás inkubációs idő miatt ebben a kísérletben az állatok nem csak olfaktoros, hanem gusztatoros ingerek alapján is döntenek arról, hogy melyik táplálékot választják a korai toxin-indukálta táplálék elkerülési teszthez hasonlóan. Eredményeink azt mutatják, hogy a kritikus periódusban AM-nel vagy PQ-tal kezelt OP50 táplálékon tartott férgek függetlenül attól, hogy korai életkorban a lemászó vagy nem lemászó állatok közé tartoztak, felnőttkorban nem hagyták el az OP50 baktériumfoltot, azaz nem mutattak asszociatív elkerülő viselkedés.

A korai toxikus stressz bevésített olfaktoros transzkripciós citoprotektív memóriát indukál

A táplálék preferenciát érintő viselkedéses válasz bevésődése mellett tanulmányoztuk, hogy a toxin-indukálta citoprotektív válaszok bevésődnek-e. Ezért megvizsgáltuk a kontroll és toxin-kezelt állatok felnőttkori *hsp-6::GFP* és *gst-4::GFP* riporter expresszióját OP50 baktériummal való újbóli találkozás után. A kísérlet során az első 24 órás toxinkezelést követően a férgeket a fent említett módon *Bacillus subtilis* baktériumon növesztettük fel, majd a felnőtt állatokat OP50-et vagy újabb, *Bacillus subtilis*-t tartalmazó lemezre helyeztük. A riporter expressziókat 24 óra elteltével vizsgáltuk. Kísérleteinkben a *hsp-6::GFP* fluoreszcenciáját tekintve az expresszió mértéke hasonló volt a *Bacillus subtilis*-en tartott naiv és AM kezelt férgekben, valamint az OP50-en tarott naiv férgekben, ami azt mutatja, hogy a felnőttek riporter kifejeződését nem befolyásolta sem a korábbi AM expozíció, sem az újbóli OP50 expozíció. Azonban a fiatal lárvakorban AM-nel kezelt férgek esetében felnőttkorban az OP50 illatával való újbóli találkozás a toxinhatás nélkül is képes volt indukálni a *hsp-6* riporter expresszióját, ami ebben az esetben a farki régióban volt kifejezett. Bár a *hsp-6::GFP* fluoreszcencia magasabb maradt a *Bacillus subtilis* baktériumon tartott PQ-tal kezelt férgekben, az OP50 szenzoros jelei ebben az esetben is szignifikánsan nagyobb mértékben stimulálták a *hsp-6::GFP* indukcióját az egész testben. Hasonlóképpen, a korai életkori OP50 jelenlétében történő PQ expozíció hatására felnőttkorban az OP50-nel való újbóli találkozás szignifikánsan növelte a *gst-4::GFP* expressziót, különösen a proximális fej-garat régióban.

A bevésődés kritériumai, hogy az emlékek a kritikus periódusban vésődnek be és életre szóló emléknymot alakítanak ki. Ezért következő lépésben megvizsgáltuk és kimutattuk, hogy az L2 lárvakorban történő AM és PQ kezelés esetén felnőttkorban az OP50-nel való újbóli találkozás nem okozott *hsp-6::GFP* és *gst-4::GFP* expresszió emelkedést. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy csak a kritikus periódusban történő toxin expozíció során megtapasztalt szenzoros jelzések képesek felnőttkorban újra indukálni a stressz-specifikus citoprotektív molekuláris válaszokat.

Végül megvizsgáltuk, hogy a stresszhez kapcsolódó szaglási jelek, azaz a baktériumok illata önmagában elegendő-e a bevésített citoprotektív válaszok indukációjához. Ezért a kikelést követő első 24 órás AM kezelést követően, *Bacillus subtilis* baktériumon való felnevesztés után, a férgeket a memória visszahívás során csak az OP50 illatával exponáltuk. A korai életkorban OP50 jelenlétében AM-nel kezelt férgeknél felnőttkorban az OP50 illatexpozíció önmagában is indukálta a *hsp-6::GFP* expresszióját. Ez azt mutatja, hogy a citoprotektív válaszok indukálása nem igényli a *C. elegans* közvetlen érintkezését a potenciálisan nem neuronális metabolikus hatást kiváltó baktériumokkal, sem a tapintási vagy ízlelési jelek bevonását az idegi memória kialakulásába. A szaglási jelek elegendők a memória kialakulásához. Tehát a korai életkorban az olfaktoros ingerekkel asszociált toxikus stressz az idegrendszer által közvetített sejtvédelmi memória bevésődését eredményezi, amely felnőttkorban a szaglási jelekkel visszahívható.

A felnőttkori citoprotektív stresszválaszok tanult viselkedéses döntésekre gyakorolt hatásának vizsgálata

A hatékony és deficiens citoprotektív stresszválaszok meghatározzák a stressz-asszociált olfaktoros ingerek által kiváltott tanult viselkedést

A citoprotektív válaszok bevésődésben való részvétele mellett felnőtt férgekben is megvizsgáltuk a molekuláris stresszválaszok szerepét a tanult viselkedéses válaszok kialakításában. A *C. elegans* az elkerülő tanulásnak nevezett folyamat révén a kezdetben vonzó patogén vagy mérgező baktériumokra elkerülő viselkedéssel válaszol, a stressz belső tapasztalata és a stresszel együtt előforduló érzékszervi jelek közötti asszociációk alapján. A tömény koncentrációban alkalmazott benzaldehid (ccBA) és diacetil (ccDA) illatanyagok mérgező hatásúak és elkerülést okoznak felnőtt férgekben. Ezzel szemben *C. elegans* számára az 1%-os BA és DA illatanyagok vonzóak, mivel alacsony koncentrációban mindkét anyag táplálékot jelez. Ez a kettős tulajdonság ezeket az illatanyagokat megfelelő eszközzé teszi a citoprotektív stresszválaszok és a viselkedéses válaszok közötti kapcsolat tanulmányozásához.

Kollégám Hajdú Gábor kísérleteiben megállapította, hogy a ccBA és a ccDA expozíció dózis- és időfüggő módon paralizist és halált okoz. Megfigyelte, hogy a ccBA-del végzett előzetes kondicionálás specifikus citoprotektív válaszokat váltott ki. Ezek a citoprotektív válaszok csökkentették az averziót egy következő tömény illatexpozíció alkalmával, valamint ezek gátlása visszaállította az averziót. Ezzel szemben a DA esetében a hatékony sejtvédelem nem alakult ki és a ccDA-lal történő előzetes kondicionálás fokozta az averziót egy későbbi ccDA expozíció során. Ennek megfelelően ezek az eredmények arra utalnak, hogy a sejtszintű védekező mechanizmusok hatékonysága meghatározza a toxikus hatásra adott viselkedéses válaszreakciót.

Ezen eredmények alapján kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az illat-toxicitás és a fiziológiai védelem eltérő hatékonyságának korábbi tapasztalatai hogyan befolyásolják a fonálférgeket a döntéshozatalban, amikor újra találkoznak a korábban toxikus stresszel asszociált illatokkal. Ehhez a férgek viselkedését három különböző viselkedéses vizsgálattal (kemotaxis, étel averzió és illatválasztás) tanulmányoztuk vonzó, 1%-os BA- és DA illatkoncentrációk felé ccBA-del és ccDA-lal történő előkezelést követően. Kísérleteinkben a ccDA-lal kondicionált férgek szignifikánsan kisebb mértékű kemotaxist mutattak az egyébként vonzó 1% DA felé, valamint több mint a férgek fele 1% DA jelenlétében a táplálékforrást is elkerülte. Az illatválasztást vizsgáló kísérletekben a férgek preferenciája az 1% BA felé tolódott, megerősítve az 1% DA averzívá válását. Ezzel ellentétben a ccBA előkezelést követően a férgek 1% BA-re mutatott preferenciája nem változott az előkezelés hatására, valamint a táplálékforrást sem hagyták el 1% BA jelenlétében. Ugyanakkor, az illatválasztás tesztben, ahol az állatok 1% DA és 1% BA között választhattak a férgek fokozottabb preferenciát mutattak az 1% DA irányába. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a férgek szelektív elkerülést mutatnak a toxikus stressz során tapasztalt illatanyagokra, bizonyítva a tanult elkerülő viselkedés kialakulását az adott illatra. Ezek az eredmények összhangban vannak az elkerülő vagy toleráns tanult viselkedéses válaszok kialakulásával, amelyek a korábbi belső stressz tapasztalatától függenek, melyeket pedig a hatékony vagy deficiens citoprotektív stresszválaszok határoznak meg.

Következtetések

Doktori munkám legfontosabb új eredményei a következők:

1. Megállapítottam, hogy a toxikus stresszre az L1 lárvák egyaránt reagálnak a fiziológiai stresszválaszok és a viselkedéses védekezés szintjén.
2. Az olfaktoros bevésődés egy eddig ismeretlen formáját azonosítottuk a bevéssett citoprotektív válasz igazolásával, amelyet „bevéssett védelmi sejtmemória”-nak neveztünk el. Ezek az emlékek szelektíven a kritikus periódusban képződnek és a stressz-asszociált olfaktoros ingerekkel felnőttkorban előhívhatók.
3. Nem figyeltünk meg korai stressz-indukált averzív memóriát felnőttkorban, ami arra utal, hogy *C. elegans* esetében a korai stresszhatások nem feltétlenül okoznak bevéssett asszociatív averzív viselkedést.
4. Kimutattuk, hogy felnőtt *C. elegans*-ban a toxikus stressz hatására kialakuló hatékony vagy hiányos sejtvédelem szabályozza a tanult viselkedéses döntéseket a stressz-asszociált illatokkal való újbóli találkozás során.

Saját publikációk jegyzéke

A doktori disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

Gecse, E., Gilányi, B., Csaba, M., Hajdú, G., & Sóti, C. "A cellular defense memory imprinted by early life toxic stress." *Scientific Reports* 9.1 (2019): 1-9. IF: 3,998

Hajdú, G., **Gecse, E.**, Taisz, I., Móra, I., & Sóti, C. "Toxic stress-specific cytoprotective responses regulate learned behavioral decisions in *C. elegans*." *BMC Biol.* 19 (2021): 1-20.
IF: 6,765

A doktori disszertáció témájához nem közvetlenül kapcsolódó publikáció

Somogyvári, M., **Gecse, E.**, & Sóti, C. "DAF-21/Hsp90 is required for *C. elegans* longevity by ensuring DAF-16/FOXO isoform A function." *Scientific Reports* 8.1 (2018): 1-15. IF: 4,011

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Sóti Csabának, hogy támogatta doktori munkámat. Hálás vagyok a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Molekuláris Biológiai Tanszék volt és jelenlegi vezetőinek illetve tagjainak, hogy biztosították a háttérrel munkavégzésemhez, különös tekintettel Mandl József, Bánhegyi† Gábor, Keszler Gergely volt igazgatóknak, valamint Csala Miklós jelenlegi igazgatónak, továbbá Gránicz Máriának és Bombicz Gyöngyinek.

Köszönöm Gilányi Beatrixnak, Hajdú Gábornak, Somogyvári Milánnak, Csaba Mártonnak, Gyurkó Dávidnak, Taisz Istvánnak és a Stressz Csoport minden tagjának a segítséget és a munkámmal kapcsolatos értékes visszajelzéseket.

Köszönöm Veres Dánielnek (Semmelweis Egyetem, Biofizikai Tanszék), Gyöngyösi Norbertnek (Semmelweis Egyetem, Orvosi Kémia Tanszék) és Christian Griñan Ferré-nek (Barcelonai Egyetem, Spanyolország) a statisztikában nyújtott segítséget.

Végül, de nem utolsósorban nagyon hálás vagyok a családomnak és barátaimnak a folyamatos támogatásukért.

Ezt a munkát a következő programok és támogatások finanszírozták: a Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola PhD programja, az Országos Kutatási Alapprogram (OTKA K 116525) a Semmelweis Egyetemen (STIA_18_M / 6800313263) és az Európai Bizottság (GENiE, COST BM1408).