MTA Doktori Pályázat Doktori értekezés

Jelátviteli kapcsolatok feltárása *Caenorhabditis elegans*-ban

Vellai Tibor

Eötvös Loránd Tudományegyetem Genetikai Tanszék



Budapest 2010

| TARTALOMJEGYZÉK |
|--|
| 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE |
| 2. ELŐSZÓ ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS |
| 3. IRODALMI HÁTTÉR 3.1. Jalátvitali vondszavak |
| 3.1.1 Jelátviteli renuszerek 3.1.1 Jelátviteli útvonalak ás szoronük az omodfoilődásbon |
| 3.1.2. Főbb jelátviteli rendszerek |
| 3.1.3. Jelátviteli rendszerek genetikai logikája |
| 3.1.4. Jelátviteli interakciók |
| 3.2. Jelátviteli kutatások <i>C. elegans</i> -ban |
| 3.2.1. C. elegans, mint genetikai és fejlődésbiológiai modell |
| 3.2.2. Aktuális jelátviteli kérdéskörök a C. elegans fejlődésbiológiában |
| 3.3. Jelátviteli paradigmák <i>C. elegans</i> -ban |
| 3.3.1. Paradigma I: Autofágia |
| 3.3.1.1. Fiziológa és patológia |
| 3.3.1.2. Molekularis mechanizmus es szabalyozas |
| 3.3.2 Paradiama II: A vulva failődás szabálvozása |
| 3 4 3 1 Mintázatkénződés |
| 3.4.3.2. Genetikai útvonalak |
| |
| 4. KÉRDÉSFELVETÉSEK |
| 4.1. A <i>C. elegans</i> TOR kináz: jelátviteli kapcsolatok és új funkciók |
| 4.2. Autofág gének és fehérjék <i>C. elegans</i> -ban |
| 4.3. <i>C. elegans</i> autofág gének funkciói |
| 4.4. A C. elegans vulvaszövet kifejlődését szabályozó jelátviteli |
| rendszerek integracioja 45 A TDA 1/CLL/C: tuonarkuinsiás faktor sálgárisi |
| 4.5. A TRA-1/GLI/CI transzkripcios faktor ceigenjei |
| 5 EREDMÉNVEK ÉS INTERPRETÁLÁSUK |
| 5.1. A TOR kináz szabályozza a <i>C. elegans</i> élethosszát |
| 5.2. Az autofágia jellemzése <i>C. elegans</i> -ban |
| 5.2.1. Autofág gének meghatározása C. elegans-ban |
| 5.2.2. Autofág gének expressziós analízise |
| 5.2.3. Az autofágia szerepe az öregedési folyamat szabályozásában |
| 5.2.4. Autofág fehérjék szerepe a sejtnövekedés szabályozásában |
| 5.2.5. Autofág fehérjék szerepe a neurodegenerációban |
| 5.2.6. Az autofágia és az apoptózis kapcsolata |
| 5.2.7. Addendum I: Az autotágia szerene az egyedteilődésben és |
| Soitaugetuláskan |

5.3. A LIN-39 HOX fehérje szerepe a *C. elegans* vulva fejlődésében 5.3.1 A Notch jelátviteli útvonal transzkrinciós kontrollia

| 5.3.1. A Notch jelátviteli útvonal transzkripciós kontrollja | 73 |
|--|----|
| 5.3.2. A LIN-39/HOX szex-specifikus szabályozása | 81 |
| 5.3.3. Addendum II: A C. elegans HOX fehérjék redundáns működése | 89 |
| 5.4. <i>tra-1</i> funkciók feltárása | 91 |
| 5.4.1. A tra-1 egy synMuv B gén | 91 |

| 5.4.2. A TRA-1A szükséges a sejtfúzióhoz | 95 |
|--|-----|
| 5.4.3. A TRA-1A dóziskompenzációs szerepe | 96 |
| 6. FONTOSABB EREDMÉNYEK DISZKUSSZIÓJA | 101 |
| 6.1. Autofágia és öregedés | 101 |
| 6.2. A <i>lin-39/Hox</i> promóter, mint jelátviteli integrátor | 103 |
| 6.3. Dóziskompenzációs enigma | 104 |
| 7. IRODALOMJEGYZÉK | 107 |
| 8. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA | 120 |
| 8.1. A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények listája | 120 |
| 8.2. Egyéb közlemények | 122 |
| 9. FÜGGELÉKEK | 123 |
| 9.1. Módszertan | 123 |
| 9.1.1. C. elegans <i>törzsek</i> | 123 |
| 9.1.2. Élethossz mérések, öregedési ráta vizsgálatok | 124 |
| 9.1.3. RNS interferencia | 125 |
| 9.1.4. Transzgénikus törzsek létrehozása | 126 |
| 9.1.5. DNS-fehérje kötési vizsgálatok | 127 |
| 9.1.6. Koimmunoprecipitáció (Co-IP) | 128 |
| 9.1.7. Chromatin-immunoprecipitáció (ChIP) | 128 |
| 9.1.8. Sejthalál vizsgálatok (TUNEL festés és Nomarski mikroszkópia) | 129 |
| 9.1.9. Elektronmikroszkópia | 129 |
| 9.2. Táblázatok | 129 |

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| AC | Anchor sejt (Anchor cell) |
|-----------|---|
| ADP | adenozin-difoszfát |
| Atg | autofágia faktor (gén vagy protein) |
| ATP | adenozin-trifoszfát |
| bp | bázispár |
| Ĉ. | Caenorhabditis |
| cDNS | kiegészítő (complementary) DNS |
| CGC | Caenorhabditis Genomic Center |
| ChIP | kromatin immunoprecipitáció |
| Ci | Cubitus interruptus fehérje |
| CMA | chaperone-közvetített autofágia (chaperone-mediated autophagy) |
| CoIP | koimmunoprecipitáció |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DIC | differential interference contrast |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| Dpp | decapentaplegic |
| dsRNS | duplaszálú ribonukleinsav |
| eIF-4E | eukarióta iniciációs faktor-4E |
| ELTE | Eötvös Loránd Tudományegyetem |
| EM | elektronmikroszkóp (transzmissziós) |
| EMS | etilmetán szulfonát |
| eve | even-skipped |
| FGF | fibroblaszt növekedési faktor (<i>fibroblast growth factor</i>) |
| FUDR | 5-fluoro-2'-deoxyuridine |
| gf | funkciónyeréses (gain-of-function) mutáció |
| G-fehérje | GTP-kötő fehérje |
| GDP | guanozin-difoszfát |
| GFP | zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein) |
| GLI | Glioma-kapcsolt fehérje |
| GTP | guanozin-trifoszfát |
| Hh | Hedgehog |
| Hox | homeobox tartalmú gén |
| hyp | hipodermális sejt |
| HSN | hermafrodita-specifikus neuron |
| IGF | inzulin-szerű növekedési faktor |
| IPTG | isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside |
| JAK/STAT | Janus kináz/transzkripciós jel aktivátor és átvivő |
| Kbp | kilobázispár |
| lf | funkcióvesztéses (loss-of-function) mutáció |
| МАРК | mitogén-aktivált protein kináz |
| Mb | megabázis |
| μm | mikrométer |
| mRNS | hírvivő RNS |
| MTA | Magyar Tudományos Akadémia |
| NGM | nematode growth medium |
| nm | nanométer |
| 6-OHDA | 6-hydroxidopamine |
| ORF | nyitott leolvasási keret |
| | - |

| PCR | polimeráz láncreakció |
|--------|---|
| Ph.D. | doktori fokozat (Doctor of Philosophy) |
| PI3-K | foszfatidil-inozitol 3-kináz |
| PTEN | foszfatáz és tenzin homológ |
| rf | funkció csökkenéses (reduction-of-function) vagy hipomorf mutáció |
| RNS | ribonukleinsav |
| RNSi | RNS interferencia |
| RTK | receptor tirozin kináz |
| S6K | S6 kináz |
| synMuv | szintetikus Multivulva |
| TOR | a rapamycin kináz célpontja (kinase target of rapamycin) |
| TGF-β | transforming growth factor-beta |
| UTR | nem-transzlálódó régió |
| VNC | hasi idegdúc (ventral nerve cord) |
| VPC | vulva prekurzor sejt |
| Wnt | Wingless |
| YFP | sárga fluoreszcens fehérje (yellow fluorescent protein) |
| | |

" ... C. elegans preserves that wonderful feature ... that with a few toothpicks, some petri dishes and a microscope, you can open the door to all of biology."

Sydney Brenner (1996)

[,, ... a C. elegans (mint genetikai és fejlődésbiológiai modell) megőrizte azt a csodálatos tulajdonságát ... , hogy néhány fogpiszkáló és műanyag petri lemez segítségével, valamint egy mikroszkóppal a biológia (szinte) bármely kérdésköre vizsgálható. "]



Sydney Brenner "I would like to tame a small metazoan…" (1963)



Caenorhabditis elegans

2. ELŐSZÓ ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Pályám során a biológiai tudományok többféle területén végeztem kutatásokat. Közöltem cikkeket és közreműködtem Ph.D. munkák irányításában az evolúcióbiológia, a mikrobiális genetika és a bioinformatika területein. Tudományos munkásságom gerincét azonban a fonalféreg *Caenorhabditis elegans* modellrendszeren végzett fejlődésbiológiai kutatások alkotják. Az MTA doktori fokozat elnyerése céljából írt értekezésemben a *C. elegans*-on végzett kutatásaim egy koherens részét, a jelátviteli kapcsolatok feltárására vonatkozó eredményeket foglalom össze. A vizsgált paradigmák – érthető okok miatt – széles spektrumot fednek le. Egyrészt ennek a mikroszkopikus méretű soksejtű élőlénynek a vizsgálatában kivételes multidiszciplináris lehetőségek rejlenek (erre utal a *C. elegans* kutatásokat iniciáló Sydney Brenner fentebb olvasható idézete is). Másrészt a vizsgálataim fókuszában álló jelátviteli útvonalak sokféle egyedfejlődési folyamatot és sejtes funkciót szabályoznak. Mindezek eredőjeként olvashatunk az értekezésben sejtnövekedésről, sejtfúzióról, sejtpusztulásról, sejtsors meghatározásról, mintázatképződésről, jelátviteli integrációról, dóziskompenzációról és öregedésről. Az alaptéma azonban mindvégig közös

marad: jelátviteli tengelyek közötti szabályozó kapcsolatok (*signalling crosstalk*) vizsgálata és meghatározása. Meg kell említenem, hogy néhány olyan eredményt is bevettem az értekezésbe egy rövid *addendum* erejéig, amelyek ez ideig nem kerültek teljes értékű publikálásra, de fontosnak vélek a munkásságom egészét tekintve.

Milyen egyedfejlődési program mentén alakul ki egy soksejtű élőlény testének 3dimenziós szerkezete? Hogyan képes viszonylag limitált számú (néhány tucat) konzervált jelátviteli rendszer - ezek a molekuláris gépezetek biztosítják a belső rendet a sejt-sejt kommunikáció és a genetikai szabályozás kaotikus kémiai világában – meglepően nagyszámú (akár több ezer féle) sejttípust meghatározni? Ezek a problémák a biológia kutatások legambiciózusabb aktuális kérdéskörei közé tartoznak, és minden bizonnyal az elkövetkező évtizedek kutatási trendjeit is meghatározzák. A felvetett kérdésekre, legalábbis részben, csak a jelátviteli rendszerek komplex működésének megértése után lehet érdemben válaszolni. Az egyedi jelátviteli pályák között ható interakciók feltárása tehát kiemelt jelentőségű kutatási program. Mindezek tükrében nem meglepő, hogy gyakran ma már nem egyedi jelátviteli utakat, hanem jelátviteli hálózatokat vizsgálnak egy adott fejlődésbiológiai vagy sejttani folyamat tanulmányozása során. A témakör vizsgálatába közel 10 éve, a Ph.D. fokozat megszerzését követően vágtam bele. Ezen idő alatt sikerült kiépíteni egy C. elegans-ra épülő fejlődésgenetikai laboratóriumot az ELTE Genetikai Tanszékén, amely a nemzetközi C. elegans kutatóközösség (C. elegans research community) regisztrált tagjává vált. Ebben az önálló műhelyben már elsősorban diákokkal dolgoztam együtt. Értekezésem ennek az időszaknak a C. elegans vonatkozású munkáit öleli fel.

Pályámra visszatekintve elmondhatom, hogy sok szempontból szerencsés korszakban kezdődött.¹ Már a 90-es évek elejétől (akkor még nem volt internet), az akkor átalakuló pályázati rendszerek támogatásának köszönhetően, számos nemzetközi konferencián vettem részt. Így ismerhettem meg a *C. elegans* kutatások aktuális frontvonalait és találkozhattam a szakma "öregjeivel", vezető kutatóival. Ennek eredményeként olyan *C. elegans*-on dolgozó kutatókkal is kapcsolatba kerültem, akik a 2000-es években a legrangosabb tudományos elismerésben részesültek. Támogatásuk nagymértékben befolyásolta szakmai fejlődésemet. Ugyancsak erre az időszakra esett a genetika számos területén végbement forradalmi fejlődés. Ilyen volt például a genomika megszületése és kibontakozása; a teljes genom szekvenciák feltárása kozmikusra tágította a biológiai megismerés terét és ambícióját. Itt hadd idézzem

¹ Ph.D. képzésem 1993-ban kezdődött az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola Klasszikus, Molekuláris és Evolúciógenetika Doktori Programjában. Ez az év volt az akkreditált doktori iskolák első évfolyama.

újra Brennert: "*The sequence is not the end of the day, it s the beginning of the day.*" ["*Egy genom teljes szekvenciája nem a kutatási program végét, hanem annak (érdemi) kezdetét jelenti.*"] A genetika és a molekuláris biológia vizsgálati módszerei szintén drámai módon alakultak át ebben az időszakban. A PCR technika, a *microchip*-alapú megközelítés, az expressziós riporter rendszerek (pl. a *gfp* gén), a robosztus szekvenálási eljárások és az RNS interferencia-közvetített gén-inaktiválás (géncsendesítés) térhódítása lehetőséget adott a komplex biológiai problémák hatékony analízisére. Végül a 90-es évekre esett az autofágia – az eukarióta sejtek szabályozott önemésztő folyamata – genetikai és molekuláris módszerekkel történő vizsgálatának kezdete.

A tézisben bemutatott eredmények számos ember közreműködésének köszönhetőek. Mindenekelőtt családomnak szeretnék köszönetet mondani. Feleségem, Dr. Takács Krisztina és a gyerekek, Tibor és Orsolya támasza és inspirációja nélkül nem élvezhettem volna a kutatás örömét. Hálás vagyok megértésükért, amellyel tolerálták, hogy sokszor éjjel is a gép előtt dolgoztam és számos hétvégét a laboratóriumban töltöttem. Ennek az életmódnak a megváltoztatására sajnos egyre kevesebb a remény. Köszönöm szüleimnek, Vellai Tibornak és Kocsis Teréziának az egész életen át kitartó támogatást és bátorítást, valamint azt, hogy gyermekkoromban izgalmas intellektuális légkörben fejlődhettem. Az elért eredmények elérésében köszönetemet fejezem ki a velem dolgozó diákoknak, akiket tanítottam, és ezen keresztül egyre pontosabban érthettem meg a felvetett kérdéseket. Érkezésük időrendi sorrendjében említem meg szakdolgozatos és diákkörös hallgatóimat: Michael Hëbeisen, Francesca Botta, Simon Tímea, Tóth L. Márton, Bicsák Bertalan, Aladzsity István, Simon Péter, Tánczos Balázs, Barna János, Ehsan Purkirami, Erdélyi Péter, Neda Masoudi, Regős Ágnes, Kutnyánszky Veronika, Korcsmáros Tamás, Billes Viktor, Rovó Petra, Pásti Gabriella, Szlávik Attila, Géresi Adrienn, Kovács Tibor és Hotzi Bernadette; valamint Ph.D. hallgatóimat²: Ortutay Csaba, Jáger Edit, Szabó Emese, Tóth L. Márton, Tihanyi Borbála, Sigmond Tímea, Hargitai Balázs, Borsos Éva, Korcsmáros Tamás, Barna János, Regős Ágnes, Kutnyánszky Veronika, Billes Viktor és Erdélyi Péter. A végzett Ph.D. hallgatók közül ketten - Sigmond Tímea és Hargitai Balázs - azóta a Genetikai Tanszék munkatársai, míg Tóth L. Márton a Semmelweis Egyetemen kapott kutatói állást, ahol részt vett egy új hazai C. elegans műhely alapjainak megteremtésében (Dr. Sőti Csaba laboratóriumában). Távlatosan ezek a tehetséges fiatal kutatók biztosíthatják azt, hogy a honi C. elegans fejlődésbiológiát több intézet is reprezentálja.

² Akik szakdolgozati témájukat folyatatták a Ph.D. képzés keretében, azok nevét ismétlem.

Szakmai identitásom szempontjából vitathatatlan Dr. Fodor András szerepe, aki megismertetett a C. elegans kutatás alapjaival és lehetővé tette, hogy diákként részt vehessek nemzetközi konferenciákon. Elnyűhetetlen munkabírása és kitartása még ma is csodálattal tölt el. Remélhetően okozok számára némi örömöt azzal, hogy az általa Magyarországon létrehozott diszciplínát sikerült tovább vinnem. Hálával tartozom Vida Gábor professzornak, a Genetikai Tanszék korábbi vezetőjének, aki lehetőséget biztosított arra, hogy önálló kutatócsoportot hozzak létre a Tanszéken. Integráló, tudományterületek határait átjáró szemlélete nagy hatással volt rám. Tematikai függetlenségemet megtarthattam későbbi munkahelyi vezetőim, Fritz Müller (University of Fribourg, Switzerland) és Orosz László professzorok irányítása alatt is. A Müller laboratóriumban eltöltött svájci posztdoktori évek óriási lökést adtak a precíziós, részletekre kiterjedő kutatási szemlélet kialakításához, amellyel azóta is hatékonyan gyötröm hallgatóimat. Ki kell emelnem továbbá Dr. Kovács L. Attila (ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék) szerepét, akivel együtt határoztuk el a 2000-es évek elején, hogy a C. elegans rendszert használva belevágunk az autofágia molekuláris és genetikai kutatásába. Döntésünk ambícióját jól érzékeltette az a tény, miszerint 2003-ig nem létezett autofágia deficiens soksejtű szervezetet leíró közlemény.³ Új terület meghódítására indultunk tehát. Együttműködésünkben Attila adta az autofágia klasszikus ultrastruktúrális – alapjait, én hoztam a kísérletes rendszert és a genetikai megközelítést. Törekvésünk helyességét az idő igazolta: sikerült nemzetközi figyelmet kivívnunk. Ezen a területen később gyümölcsöző együttműködést alakítottam ki Sass Miklós professzorral (ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék) és munkacsoportjával. Az utóbbi években ígéretes kollaborációt indítottunk Dr. Vértessy Beátával (MTA Enzimológiai Intézet), Dr. Sőti Csabával (SOTE Vegytani Intézet), Dr. Málnási-Csizmadia Andrással (ELTE Biokémiai Tanszék), Dr. Erdélyi Miklóssal (SZBK Genetikai Intézet) és Dr. László Jánossal (MTA Matematikai Intézet). A külföldi együttműködő partnerek közül az alábbi neveket kell megemlítenem: Csankovszki Györgyi (University of Michigan, USA), Daniel J. Klionsky (University of Michigan, USA), Hilde Nilsen, (University of Oslo, Norway), Ian A. Hope (University of Leeds, UK), David Gems (London College, UK), Michael J. Stern (Yale University, USA) és Fritz Müller (University of Fribourg, Switzerland).

³ Tudománytörténeti szempontból érdemes megemlíteni, hogy a szakirodalomban az első autofágia defektív (valójában dsRNS-kezelt) soksejtű rendszert az Eötvös Loránd Tudományegyetemen írták le (Juhász G, Csikós G, Sinka R, Erdélyi M, Sass M, *FEBS Lett.* 543: 154–158, 2003). Az érintett tanszéken – Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, korábbi nevén Állatszervezettani Tanszék – a témában jelenleg dolgozó laboratóriumok közül nemzetközi viszonylatban is a legrégebben, közel 46 éve foglalkoznak az autofágia kutatásával.

3. IRODALMI HÁTTÉR

Ebben a fejezetben bemutatom az egyedfejlődést, illetve a sejtnövekedést, proliferációt, sejtsors meghatározást, sejtpusztulást és a sejtek homeosztázisát szabályozó molekuláris rendszerek, a jelátviteli útvonalak főbb jellemzőit. Részletesebben írok a jelátviteli rendszerek elemzésének genetikai logikájáról, valamint interakcióik szerepéről a génexpresszió szabályozásában és a sejt-sejt kommunikációban. Felvázolom a jelátviteli kutatások néhány aktuális problémáját a *C. elegans* modellrendszerben. Végül ismertetem az értekezésben bemutatott eredmények szempontjából releváns *C. elegans* jelátviteli paradigmákat.

3.1. Jelátviteli rendszerek

3.1.1. Jelátviteli útvonalak és szerepük az egyedfejlődésben

Hogyan fejlődik ki az emberi test egy megtermékenyített petesejtből, a zigótából? Mi mondja meg sejtjeinknek, hogy mikor osztódjanak és meddig éljenek? Hogyan tudják újonnan keletkező sejtjeink, hogy az egyedfejlődés egy adott pillanatában és a test egy meghatározott pontján milyen sejttípussá kell differenciálódniuk? Milyen molekuláris mechanizmusok biztosítják sejtjeink homeosztázisát (stabil működését) az állandóan változó körülmények között? E mechanizmusok hibás működése hogyan vezet patológiás folyamatokhoz? A felvetett kérdések biológiai megismerésünk frontvonalába tartoznak, orvosbiológiai vonatkozásuk jelentős. A fenti kérdésekre adandó válaszok, legalábbis részben, a differenciált génexpresszióban (génaktivitásban) keresendőek. Sejtjeink ugyanis azonos génkészlettel rendelkeznek, de sejttípustól és fiziológiai állapottól függően ebből a készletből csak bizonyos géneket működtetnek. A génexpresszió szabályozása tehát az egyedfejlődés egyik kulcsfontosságú molekuláris színtere. Ha meg tudnánk határozni az egyedfejlődés során keletkező egyedi sejtekben, hogy mely gének és pontosan milyen mértékben fejeződnek ki, elviekben leírható lenne az egyedfejlődés genetikai programja. Ma még nem vagyunk erre technikailag képesek, és kétséges, hogy valaha egyáltalán képesek leszünk. Amit ma ismerünk azonban, az sem kevés: a génexpressziót specifikus transzkripciós faktorok szabályozzák, amelyek viszont meghatározott jelátviteli útvonalak hatására aktiválódnak.

A jelátviteli útvonalak központi szerepet játszanak az egyedfejlődés szabályozásában (1-3). Lehetővé teszik a sejtsors meghatározást, a szöveti mintázatképződést és a szervek, testtájak elrendeződését. Olyan egyedfejlődés szempontból kulcsfontosságú – ún. "mester" –

10

gének, mint pl. a *Hox* gének⁴ is jelátviteli pályák hatására expresszálódnak és hatásuk gyakran jelátviteli komponensek transzkripciós szabályozásában nyilvánul meg. A jelátviteli rendszereknek alapvető szerepük van továbbá a sejtek működésének szabályozásában. Aktivitásuk befolyásolja a makromolekulák *turnover*ét (pl. a fehérjék szintézisét és lebontását), és ezen keresztül a sejtek növekedését, osztódását és túlélését (**1. ábra**). A jelátviteli útvonalak abnormális működése emberben súlyos fejlődési rendellenességek, valamint számos patológiás elváltozás (pl. különböző ráktípusok, neurodegeneratív folyamatok, intracelluláris patogének által okozott fertőzések, diabétesz stb.) kialakulásával kapcsolható össze (*5, 6*).



1. Ábra. Jelátviteli rendszerek állati sejtekre gyakorolt hatása. A sejtek felszínén lévő specifikus receptorok (nincsenek ábrázolva) teszik lehetővé, hogy a sejtek válaszolni tudjanak a külvilágból érkező (extracelluláris) jelekre. Ezek hatására túlélnek, osztódnak, differenciálódnak vagy elpusztulnak. A szabályozott – genetikailag programozott – sejtpusztulást apoptózisnak nevezik.

A jelátviteli rendszerek – eltérően a biokémiai útvonalaktól, amelyekben a szubsztrát konverzió valamilyen biológiai termék közvetlen előállítását eredményezi; ilyen pl. a triptofán szintézisben résztvevő enzimek biokémiai útvonala – alapvetően egy adott biológiai információt processzálnak (**2. ábra**). Az üzenet (jel) továbbítása fehérjék aktiválásán (*on* állapot) vagy gátlásán (*off* állapot) keresztül valósul meg (**3. ábra**). A jelátvitel végső hatása gyakran differenciált génexpressziós változást eredményez. Ezért is nevezik a jelátviteli rendszereket, pontosabban a rendszerek komponenseit kódoló gének hierarchikus láncolatát,

⁴ A *Hox* gének olyan homeodomén tartalmú transzkripciós faktorokat kódoló gének, amelyek egy közös (primordiális) génből származnak tandem génduplikációk révén és ezért genomi lokalizációjuk szoros kapcsoltságot mutat (ún. genomi *cluster*ekben találhatók).

másképpen genetikai útvonalaknak. (A biokémiai és genetikai útvonalak között megfigyelhető alapvető szabályozási különbségeket a 3.1.3. fejezetben tárgyalom).



2. Ábra. Egy intracelluláris jelátviteli rendszer modellje. Az útvonal egy ligandum (sárga) révén aktiválódik, amely a fogadó sejt felszínén található receptorhoz (lila) specifikusan képes kötődni. A ligandumreceptor kötődés hatására а receptor aktiválódik. Az így keletkezett biológiai üzenet intracelluláris jelátvivő fehériék (zöld) kaszkádján keresztül jut el a célfehérjékhez (kék), amelyek végül módosítják a sejt viselkedését. A génexpresszió megváltozása teszi lehetővé az egyedfejlődéshez szükséges seites differenciációt (seitsors meghatározást). Az egyszerűség kedvéért az útvonal csak aktiválási kölcsönhatásokat – nyilak tartalmaz.



3. Ábra. Biológiai jel keletkezése és továbbítása egy jelátviteli kaszkádban. Jelen példában a sejtmembránba ágyazott inaktív receptor (*lila*) a ligandum (*sárga*) kötődés hatására dimerizálódik, majd citoplazmatikus doménje foszforilálódik (P). Az így aktiválódott receptor komplex aztán képes aktiválni egy citoplazmatikus jeltovábbítót (zöld): receptor а foszforilálja az inaktív jeltovábbító molekulát. A folyamatban az ATP szolgáltatja a foszfát csoportot és az energiát. Így működnek pl. a receptor tirozin kinázok (RTK), amelyek adott célfehérjék tirozin oldalláncait képesek foszforilálni. Ligandumaik között növekedési faktorokat (growth factors) találunk.

A génexpressziós változást végső soron transzkripciós faktorok közvetítik. Egyedfejlődési szempontból azok a transzkripciós faktorok jelentősek, amelyek jelátviteli kaszkádok hatására

aktiválódnak. Biológiai funkciójuk lenyűgözően változatos, az egyedfejlődés különböző lépéseit (sejtsors meghatározás, sejtosztódás, az osztódás sík irányának meghatározása, sejtpusztulás, szöveti mintázatképződés, stb.) kontrollálják. Természetesen ezek a funkciók a transzkripciós faktorok által szabályozott célgének működésén keresztül valósulnak meg.

3.1.2. Főbb jelátviteli rendszerek

A jelátvitel (szignál transzdukció) biológiai jelentése: információs anyagcsere (*information metabolism*), pontosabban az információ anyagcseréje. Azt a molekuláris eseménysort jelenti, amely során a sejt érzékeli és processzálja a környezetből érkező információt. A jelátviteli rendszereket sokféleképpen osztályozzák. Egyrészt lehet a környezetből érkező jel minősége alapján csoportosítani; ez alapján megkülönböztetünk *juxtacrine*, *paracrine* és *endocrine* jelátviteli rendszereket. A *juxtacrine* rendszerben a ligandumot kibocsátó és a receptort tartalmazó sejtek közvetlenül érintkeznek egymással. Ebben az esetben tehát a ligandum is a sejtmembránban van kihorgonyozva. Ilyen rendszer pl. a Notch jelátviteli útvonal (**4. ábra**) (*1, 6, 7*).



4. Ábra. *Juxtacrine, paracrine* és *endocrine* jelátviteli rendszerek. Bal oldali panel: *juxtacrine* jelátviteli rendszer – Notch útvonal. Delta: ligandum; Notch: receptor; CLS: transzkripciós faktor. A receptor-ligandum kötődés hatására a receptor citoplazmás doménje hasítódik, majd a magba jut, ahol egy transzkripciós faktort aktivál. Középső panel: *paracrine* jelátvitel – RTK/Ras útvonal. Ras: (monomerikus) GTP-kötő (G) fehérje; GNRP: *guanine nucleotide releasing factor*; GAP: GTP-áz aktiváló fehérje; GTP: guanozin-trifoszfát; GDP: guanozin-difoszfát. Jobb oldali panel: *endocrine* jelátviteli rendszer – egy nukleáris receptor modellje.

A *paracrine* jelátviteli rendszerben a jelkibocsátó sejt az extracelluláris térbe szekretálja a ligandumot. A ligandum egy koncentráció grádiens mentén aktiválja a közelben elhelyezkedő kompetens, tehát a ligandumra specifikus receptorral rendelkező jelfogadó sejteket. Tipikus *paracrine* rendszer az RTK/Ras jelátviteli útvonal (**4. ábra**). Az *endocrine* jelátviteli rendszerben az endokrin sejtek által termelt ligandum – hormon – a véráramon keresztül jut el a test távolabbi pontjaira, ahol a megfelelő receptorral rendelkező célsejteket aktiválja. Ide tartoznak a nukleáris hormon receptor útvonalak (**4. ábra**). A hidrofób molekulák (pl. szteroid és thiroid hormonok, retinoidok, D vitamin) átjutnak a sejtmembránon, majd hozzákötődnek intracelluláris receptoraikhoz. Az így aktivált receptorok aztán specifikus DNS szekvenciákhoz kötődve szabályozzák a célgének expresszióját.

Egy másik csoportosítási szempont a sejtfelszíni receptorok funkcióját veszi alapul. E megközelítés alapján a jelátviteli rendszerek osztályozását az **1. táblázat** mutatja (8). (Az 5. fejezetben tárgyalt útvonalakat, tehát amelyekkel kutatásaim során foglalkoztam, kövér betűk-

| 1. Táblázat. Jelátviteli útvonalak |
|--|
| Korai egyedfejlődés és később |
| 1. Wnt útvonal |
| 2. TGF-β (szerin/threonin kináz; <i>transforming growth factor-beta</i>) útvonal |
| 3. Hh (Hedgehog) útvonal |
| 4. RTK/Ras (kis – monomerikus – G fehérje) útvonal |
| 5. Notch útvonal |
| Egyedfejlődés középső szakasza és később |
| 6. Citokin receptor (citoplazmikus tirozin kináz) útvonal |
| 7. IL1/Toll NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) |
| útvonal |
| 8. Nukleáris hormon receptor útvonal |
| 9. Apoptotikus útvonal |
| 10. Receptor foszfotirozin foszfatáz útvonal |
| Lárvális és késői egyedfejlődés |
| 11. Receptor guanilát cikláz útvonal |
| 12. Nitrátoxid receptor útvonal |
| 13. G fehérje-kötött receptor (nagy – trimerikus – G fehérjék) útvonal |
| 14. Integrin útvonal |
| 15. Cadherin útvonal |
| 16. Gap junction útvonal |
| 17. Ligand-kötött kation csatorna útvonal |

kel emeltem ki. Az útvonalak részletesebb jellemzését terjedelmi okok miatt nem tárgyalom.) Ezeknek a jelátviteli rendszereknek az egyedfejlődési és fiziológiai jelentőségét mutatja többek között a következő tény: a *C. elegans* genomban található gének (~19.700) mintegy 11%-a (~2200) jelátviteli komponenst kódol (9).

3.1.3. Jelátviteli rendszerek genetikai logikája

Az egyedi jelátviteli rendszerek komponensei funkcionálisan lineáris "útvonalakba" rendeződnek. Hogy egy adott útvonalban melyik komponens található elöl (*upstream*) és melyik hátul (*downstream*), azaz ki szabályoz és kit szabályoznak, episztázis (kettős mutáns) elemzéssel lehet hatékonyan feltárni. A jelátviteli rendszerek genetikai logikájának bemutatása előtt – ellenpéldaként – a biokémiai útvonalak szabályozási logikáját tekintem át.

Egy biokémiai útvonalban a komponensek adott szubsztrátok átalakítását végzik. Olyan ez, mint egy autó összeszerelő üzem, ahol a futószalagon készülő termékhez minden munkás (enzim) hozzátesz valamit. Vegyünk egy hipotetikus biokémiai útvonalat, amelyben 2 enzim ("A" és "B") végzi a szubsztrátok (X és Y) átalakítását (**5. ábra**). Az "A" enzim katalizálja az X-ből Y-ba, a "B" enzim az Y-ból Z-be történő konverziót. A végtermék Z, amely egy festékanyagot, tehát egy színt (fekete) határoz meg. Az X szubsztrát piros, az Y szubsztrát barna színt határoz meg. Az "A" enzimet kódoló *a* gén funkcióvesztéses (lf) mutációja felfüggeszti az X konverzióját: a homozigóta *a* mutáns egyedek (a^-/a^-) piros színűek lesznek (csak X színanyag lesz a sejtekben). A "B" enzimet kódoló *b* gén lf mutációja meggátolja az Y konverzióját Z-vé. A homozigóta *b* mutánsok (b^-/b^-) barna színűek lesznek (zömében Y lesz a sejtekben). Az *ab* kettős mutánsokban (a^-/a^- ; b^-/b^-) sem az Y-ból Z-be, sem



5. Ábra. Egy biokémiai útvonalban az *upstream* komponens hat episztatikusan. A, Egy hipotetikus vad típusú rendszer, amelyben a végtermék (Z) határozza meg a fenotípust (fekete szín). "A" és "B" az útvonal két komponense. B, *a* egyszeres mutáns (*a*-) fenotípusa piros. Hiába van "B", nincs szubsztrát (Y), amit átalakítson. C, *b* egyszeres mutáns (*b*-) fenotípusa barna. D, *ab* kettős mutáns fenotípusa piros. A fekete nyilak működő, a szürke nyilak nem működő folyamatokat jelölnek.

az X-ből Y-ba történő konverzió nem megy végbe. Mivel a folyamat az útvonal elején akad el, a sejtekben csak kiindulási X szubsztrát lesz. Ezért a kettős mutánsok fenotípusa piros, vagyis megegyezik az a egyszeres mutánsok fenotípusával. *Egy biokémiai útvonalban tehát az* upstream *komponens mutáns fenotípusa nyilvánul meg (episztatikus) a kettős mutánsban*.

Egy jelátviteli – genetikai – útvonalban nincs termékkészítés (hacsak a differenciált génexpressziót nem tekintjük terméknek), "csupán" információ (jel) továbbítás történik. Az útvonal komponensei között kétféle kölcsönhatás létezhet: aktiválás vagy gátlás. Gátlás esetén a két egyszeres mutáns fenotípusa eltérő, legyen pl. *X* és *Y*. A fenotípusokat kialakító géneket nevezzük *a*-nak és *b*-nek, az általuk kódolt fehérjéket "A"-nak és "B"-nek. Az *a*⁻ egyszeres mutáns fenotípusa *X*, a *b*⁻ egyszeres mutáns fenotípusa *Y*. Ha az *a*⁻*b*⁻ kettős mutáns fenotípusa *X*, a *k* és "B" fehérjék egy útvonalban hatnak, és "B" gátolja az "A"-t. Más szavakkal, "A" episztatikus "B" felett, "közelebb" van a kivitelezéshez, vagyis a génszabályozáshoz. *Egy jelátviteli útvonalban a* downstream *komponens mutáns fenotípusa nyilvánul meg (episztatikus) a kettős mutánsban*. Miért is írható fel egy ilyen összefüggés? Vegyünk egy hipotetikus jelátviteli rendszert, amelyben két gén terméke ilyen relációt mutat, azaz a "B" fehérje gátolja az "A" fehérje működését (**6. ábra**). Vad típusú rendszerekben



6. Ábra. Egy jelátviteli útvonalban a *downstream* komponens hat episztatikusan. A, Vad típusú rendszerben a "B" gátolja az "A" aktivitását, de nem teljesen ("kicsi A"). B, *b*⁻ mutánsban nincs "B" fehérje (pont jelzi), így a gátlás hiányában az "A" hiperaktiválódik ("nagy A"). Hiperaktív "A" *Y* fenotípusban nyilvánul meg. C, *a*⁻ mutánsban nincs "A" fehérje (pont jelzi), ez *X* fenotípusban nyilvánul meg. Az "A" és "B" és nincs "A" (két pont jelzi). Az "A" hiánya megint *X* fenotípusban nyilvánul meg. Az "A" és "B" fehérjék egy jelátviteli útvonal két tetszőleges komponense, "B" *upstream*, "A" *downstream* helyezkedik el az útvonalban. Az útvonal aktivitását "A" aktivitása határozza meg. A fekete nyilak és talpas nyilak működő, a szürke nyilak és talpas nyilak redukáltan működő folyamatokat jelölnek. A kétszer áthúzott talpas nyilak nem működő folyamatokat jelölnek.

gyakori, hogy mindkét fehérje bazális aktivitást mutat (ezért létezhet két egyszeres mutáns fenotípus!). "B" aktivitása tehát gátolja az "A"-ét, de a gátlás nem teljes. (Egy ellenpélda az *inzulin/IGF-1* útvonal, amelynek *upstream* komponensei teljesen represszálják az útvonal "végén" elhelyezkedő *forkhead* FoxO transzkripciós faktort, ezért a *FoxO* lf mutánsok vad fenotípusúak.) *b*⁻ egyszeres mutánsokban nem érvényesül a "B" fehérje gátló funkciója, ezért "A" hiperaktiválódik. Valójában ez nyilvánul meg az *Y* mutáns fenotípusban. *a*⁻ egyszeres mutánsokban "B" működik, és gátolná az "A"-t, de nincs mit gátolnia az *a*⁻ mutáció miatt (nincs "A" fehérje). Ebben az esetben "A" funkciója *teljesen* eltűnik, így alakul ki az *X* mutáns fenotípus. Az *Y* fenotípust tehát "A" hiperaktiválódása, az *X* fenotípust "A" hiánya okozza. Az *a*⁻*b*⁻ kettős mutánsokban nincs meg a "B" gátló funkciója, de nincs ami hiperaktiválódjon, mert az "A" funkció is hiányzik. Mivel nincs "A", ezért a fenotípus továbbra is *X* (**6. ábra**).

Összefoglalva, ha *a*⁻ egyszeres mutáns fenotípusa *X*, *b*⁻ egyszeres mutáns fenotípusa *Y*, és *a*⁻*b*⁻ kettős mutáns fenotípusa *X*, akkor az "A" és "B" fehérjék egy útvonalban hatnak, melyben "B" gátolja az "A" aktivitását. "B" az útvonal *upstream* (gátló), "A" az útvonal *downstream* (gátolt) komponense. A *b*⁻ mutáns fenotípus (*Y*) kifejeződése tehát az "A" funkciójának függvénye: *a* és *b* gének genetikai interakciót mutatnak. Ez az elemzési logika az 5. ("EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK") fejezet majd minden oldalán felbukkan, ezért tárgyaltam ilyen részletesen.

Aktiválási reláció esetén a két egyszeres mutáns fenotípusa megegyezik; b^- egyszeres mutáns és a^- egyszeres mutáns legyen pl. egyaránt X fenotípusú (a két fehérje funkciója egy irányba hat). Ebben az esetben nem lehet lf mutánsokkal (gén)sorrendet meghatározni. Helyette a kettős mutánsokban az egyik gén lf mutáns alléljét kombináljuk a másik gén funkciónyeréses (gf) alléljével (vagy más módon hiperaktivált, pl. túlexpresszált formájával) és *vica versa*. E kombinációkban is a megnyilvánuló (episztatikus) egyszeres mutáns (lf vagy gf) fenotípus határozza meg, melyik jelátviteli komponens van *downstream* az útvonalban.

3.1.4. Jelátviteli kapcsolatok

Az egyedi fő jelátviteli útvonalak száma viszonylag limitált (1. táblázat). Az általuk meghatározott sejttípusok azonban figyelemreméltó sokféleséget mutatnak. A *C. elegans* hermafrodita állat kifejlett testét például 959 különböző szomatikus sejt alkotja (*10*). Ezek mindegyike egyedi, külön elnevezéssel illetik, különböző funkciókra specializálódnak. Ha továbbá figyelembe vesszük a jelátviteli rendszerek nagyfokú konzerváltságát, akkor nyilvánvaló annak a kérdésnek a felvetése, hogyan fordítódnak le a meglehetősen általános

jelátviteli üzenetek nagyszámú specifikus génexpressziós mintázattá. Számomra ez a kérdéskör a fejlődésbiológia egyik legizgalmasabb területe.

A felvetett kérdésre adott válaszok nagyrészt a jelátviteli útvonalak szövevényes kapcsolatában keresendők. Jelátviteli kapcsolatok – *signalling crosstalk* – alapvetően három szinten valósulhatnak meg. Egyrészt az útvonalak "végén", vagyis célgének szabályozó régiójában. A promóterek ui. molekuláris komputerekként működnek; érzékelik és integrálják a bejövő jelátviteli impulzusokat, azaz meghatározzák a bejövő jelek minőségét és mennyiségét, és ennek függvényében állítják be az adott gén expressziós szintjét egy sejtben (*11*). Mivel egyetlen célgén expressziós szintje elviekben tetszőlegesen sokféle lehet, ez a mechanizmus már önmagában is nagyszámú sejttípust tud meghatározni. Példaként a Drosophila *even-skipped (eve)* gén expresszióját említem (*12*). Az *eve* először azokban a progenitorokban expresszálódik, amelyekből a Drosophila dorzális izomzata fejlődik ki. Az *eve* expresszióját számos jelátvitel befolyásolja: a Ras, Dpp (*Decapentaplegic*) és Wg (*Wingless*) útvonalak kombinált aktivitása alakítja ki a megfelelő *Eve* szintet (**7. ábra**).



Ábra. génexpresszió 7. А szabályozása kombinatórikus kóddal. Az eve gén szabályozó (enhanszer) régiójához számos jelátviteli útvonal transzkripciós faktora (TF) (kép jobb oldalán felsorolva) kötődik specifikusan. A kötődő TF-ok minőségének és számának (hány kötőhely van) integrációja dönti el végső soron az eve expressziós szintjét egy adott sejtben. A kialakult Eve szint egy adott sejttípust határoz meg(11).

Az útvonal keresztbeszélgetések második szintje a génexpresszió feletti *upstream* szakasz. Az itt funkcionáló fehérjék (ligandumok, receptorok, kinázok, foszfatázok, *scaffold* fehérjék, stb.) képesek egy másik jelátviteli pálya komponensének aktivitását közvetlenül (pl. fizikai interakcióval) vagy közvetve (genetikai interakcióval) befolyásolni. Erre kitűnő példa a Ras monomerikus G-fehérje működése, amely – a kanonikus MAP kináz-kináz-kinázon túl – az inzulin/IGF-1 útvonalba tartozó foszfatidil-inozitol 3-kinázt (PI3-kináz) is aktiválhatja (2).

Végül a harmadik jelkommunikációs szintet azok a (cél)transzkripciós faktorok képezik, melyek miután aktiválódtak egy jelátviteli input hatására, egy másik jelátviteli pálya *upstream* komponensének expresszióját kontrollálják. Így jönnek létre a "lineáris" útvonal

kapcsolatok. *C. elegans*-ban például a szex-determinációs útvonal terminális transzkripciós faktora, a TRA-1 közvetlenül szabályozza az apoptotikus kaszkád *upstream* elemét kódoló *egl-1*-nek (*egg-laying defective*) az expresszióját (**8. ábra**) (*13*). Ez a szabályozási kapcsolat



------ TRA-1 ---- EGL-1 ---- CED-9 ---- CED-3 ---- CED-3 Szex-determinációs kaszkád Apoptotikus kaszkád

8. Ábra. Az apoptózis szex-specifikus szabályozása *C. elegans*-ban. A képek a HSN neuront mutatják (nyilak) egy hím lárvában. A HSN programozott módon pusztul el hímekben. A szex-determinációs útvonal terminális transzkripciós faktora a TRA-1 (*Transformer*), amely hímnős állatban aktív, hím állatban inaktív. Hímben (TRA-1 hiányában) az EGL-1 aktiválódik és gátolja az anti-apoptotikus CED-9 (*cell death defective*) fehérjét. Ennek eredményeként a CED-4 és CED-3

kaszpázok aktiválódnak (nem gátlódnak CED-9 által), és a sejt elpusztul. Felső panel: Nomarski felvétel, alsó panel: fluoreszcens kép. A képeken látható hím állat transzgénikus egy *egl-1::gfp* riporter rendszerre (zölden világít a HSN-ben). A jelátviteli útvonal a szex-determinációs kaszkád "végét" (az *upstream* részt szaggatott vonal jelöli) és az apoptotikus útvonalat ábrázolja. A TRA-1 közvetlenül szabályozza az *egl-1* transzkripcióját. A talpas nyilak gátlást, a nyilak aktiválást jelölnek.

teszi lehetővé a vulva izomzatot beidegző hermafrodita-specifikus neuron (HSN) elpusztulását hímekben, amelyekben nem fejlődik vulva. A fő jelátviteli útvonalak tehát számos keresztkapcsolaton keresztül képesek kommunikálni egymással, kialakítva a jelátviteli útvonalak bonyolult hálózatát, a *signalling network*öt, amelynek feltárása és megértése a jelen és a közeljövő kutatási feladata (**9. ábra**).



9. Ábra. Jelátviteli komponensek hálózata. A színes gömbök jelátviteli fehérjéket, az összekötő vonalak direkt fizikai interakciókat (pl. foszforilációt) jelölnek.

3.2. Jelátviteli kutatások C. elegans-ban

3.2.1. C. elegans, mint genetikai és fejlődésbiológiai modell

Az értekezésben bemutatott saját eredmények *C. elegans*-on végzett kísérletekből származnak. Ez az élőlény a jelátviteli kutatások egyik legintenzívebben vizsgált modell-

rendszere (a *C. elegans* kutatásokat Sydney Brenner iniciálta 1963-ban az egyedfejlődés és az idegrendszer működésének tanulmányozása céljából; *14*). A *C. elegans* mérsékelt égövi, talajban élő, baktériumokkal táplálkozó, kifejlett állapotban 1,1-1,2 mm hosszú fonalféreg (**10. ábra**). A vad típusú állatok 25°C-on körülbelül 3 nap alatt, négy lárva stádiumon (L1-L4)



10. Ábra. A fonalféreg *Caenorhabditis elegans*. A bal oldali kép egy felnőtt hermafrodita egyedet ábrázol (Nomarski optikával készült kép). Az állatban bizonyos szervek (pl. a bél, garat és ivarszerv - utóbbiban csírasejtek és fejlődő embriók) jól felismerhetők. Számos egyedi sejt is jól látható. A jobb oldali kép egy vegyes stádiumú populációt mutat (sztereo mikroszkópos felvétel).

keresztül fejlődnek ki, és átlagosan 2 hétig élnek. Az állatot speciális ivari dimorfizmus jellemzi: a populációt hím és hímnős egyedek alkotják (*15, 16*). Az önmegtermékenyítő hímnős állatok a tiszta genetikai vonalak fenntartását, a hímek a genetikai vonalak kombinálását teszik lehetővé. A hermafroditáknak 959, a hímeknek 1031 testi sejtjük van. A sejtek egyedfejlődési leszármazása – egyedüliként az eddig vizsgált élőlények között – invariáns és fénymikroszkóp segítségével meghatározott (**11. ábra**). Egyedfejlődése tehát



11. Ábra. A *C. elegans* korai embriógenezise. A középső képen lévő 4-sejtes embrióban a színek az alapító sejteket (sejtmagokat) jelölik (ABa, ABp, EMS és P₂). A P₂-ből fejlődik a csíravonal. A sejtek osztódásával keletkező utódsejtek (sejt-klónok) azonos színnel vannak jelölve. Fénymikroszkóp alatt az állat testfala transzparens, ez teszi lehetővé az egyedfejlődés egyedi sejtszinten történő tanulmányozását. A *C. elegans* teljes sejtleszármazása (*cell lineage*) meghatározott (*10*).

egyedi sejtszinten vizsgálható. Haploid genomja 5 testi és 1 ivari kromoszómába szerveződik, mintegy 100 Mb-ból áll, és körülbelül 19.700 gént kódol. A *C. elegans* gének legalább 50%-a szignifikáns szekvencia homológiát mutat emberi génekkel. A *C. elegans* genom különlegessége, hogy rendkívül kompakt szerveződésű, az egy génre jutó bázisszámot tekintve 20-szor tömörebb az emberi genomnál (*17*). Jellemzője továbbá az operonos

szerkezet (több gén közös szabályozó régióval rendelkezik), amely az eukarióták között csak a fonalférgekben ismert (18). Laboratóriumi körülmények között a C. elegans törzsek a mikroorganizmusokhoz hasonlóan műanyag petri lemezeken vagy folyadékkultúrában tenyészthetők. Az állat cseppfolyós N₂-ben évekig eltartható; így pl. az ún. balanszer törzsekben nem halmozódnak fel háttérmutációk. A C. elegans genom szekvenciája meghatározott, a gének funkciója genom-léptékű géncsendesítéssel (knock-down) kimerített (19), a gének szisztematikus mutáns (knock-out) jellemzése nagymértékben előrehaladott, a génexpresszió genom-szinten feltárt (20). Nagymértékben feltérképezett továbbá a C. elegans fehérje-fehérje kölcsönhatások hálózata (21). Az évek során felhalmozódott C. elegans-ra vonatkozó tudást az egyik első integrált adatbázis, a WormBase tartalmazza (www.wormbase.org). A képi adatbázist a Wormatlas (www.wormatlas.org) foglalja össze. Számos folyamatosan aktualizált irodalmi forrás a Wormbookban (www.wormbook.org) található meg. A nemzetközi törzsgyűjteményt a Minnesotai Egyetemen tartják fent (Caenorhabditis Genetics Center). C. elegans-on végzett kutatásokat 2002-ben (Sydney Brenner, John Sulston és Robert H. Horvitz) és 2006-ban (Andrew Fire és Craig Mello) orvosi Nobel-díjjal, 2008-ban (Martin Chalfie) kémiai Nobel díjjal jutalmazták.

3.2.2. Aktuális jelátviteli kérdéskörök a C. elegans fejlődésbiológiában

A fő jelátviteli rendszerek *C. elegans*-ban történt közel két évtizedes kutatása számos új jelátviteli komponenst és episztatikus viszonyt tárt fel. E vizsgálatokban Robert H. Horvitz és tanítványai meghatározó szerepet játszottak (22). A terület aktuális kutatási frontvonala a közel "teljesen" megismert jelátviteli tengelyek "elejére" és "végére" vonatkozik: mi kapcsolja be az útvonalakat, és mit szabályoznak az útvonalak. Nézzük meg pl. az apoptotikus útvonalat ebből az aspektusból. A *C. elegans* egyedfejlődése során 131 sejt pusztul el genetikai utasításra (*10*). Az útvonal *upstream* eleme az EGL-1, amely gátolja a CED-9 antiapoptotikus fehérjét (**8. ábra**). CED-9 aktvitás hiányában a pro-apoptotikus CED-4 és CED-3 kaszpázok aktiválódnak és lebontják a sejt számos komponensét (*22*). A kérdés az, honnan tudja az EGL-1, hogy melyik sejtben és mikor aktiválódjon. Egy (hímekben) elpusztuló sejtben (HSN) már tudjuk, hogy közvetlenül a TRA-1 transzkripciós faktor hiánya teszi lehetővé az EGL-1 aktiválódását (**8. ábra**) (*22*). De mi adja az utasítást a többi 130 elpusztuló sejtben?

Ugyanilyen izgalmas probléma a vulvaszövet fejlődését szabályozó útvonalak koordinált működése. A vulva fejlődés indukciója az L3 lárva stádium elején történik meg négy jelátviteli rendszer – az RTK/Ras, Wnt, Notch és a synMuv (szintetikus Multivulva)

útvonalak – koordinált működésének eredményeként (*16, 23*). Hogyan konvergálnak ezek a jelátvitelek egy adott sejtben, hogy mindig ugyanazt a vulva sejttípust határozzák meg? A válasz feltehetően abban a célgénben (vagy célgénekben) keresendő, amely integrálja e jelpályák inputját. Csak érdekességképpen jegyzem meg, hogy a 2002-es orvosi Nobel díjat (*"for their discoveries concerning genetic regulation of organ development and programmed cell death*") éppen az apoptózis és a vulva fejlődés szabályozására vonatkozó felfedezésekért kapta Robert H. Horvitz. E két rendszer működésének megértésétől – elsősorban a "hiányzó eleje és vége" okok miatt – azonban még nagyon távol vagyunk.

3.3. Jelátviteli paradigmák C. elegans-ban

Azokat a jelátviteli komponenseket, amelyek funkcióit és jelátviteli kapcsolatait az 5. ("EREDMÉNYEK") fejezetben tárgyalom, alapvetően két paradigmában vizsgáltam. Ezek egyike az autofágia (paradigma I), a másik modell rendszer a fejlődő vulvaszövet (paradigma II) volt. A következőkben e két rendszert mutatom be részletesebben.

3.3.1. Paradigma I: Autofágia

3.2.1.1. Fiziológia és patológia

Az autofágia (a kifejezés a görög *auto* – ön – és *phagein* – evés – szavakból tevődik össze; jelentése sejtes "önemésztés") az eukarióta sejtek szabályozott önlebontó – katabolikus – folyamata, amely során a citoplazma bizonyos részletei lizoszómákba jutnak, ahol savas hidrolázok (lipázok, peptidázok, nukleázok) által lebontódnak (*24*). Az így felszabaduló komponensek újra hasznosulhatnak a felépítő folyamatokban, ill. energiát szolgáltathatnak a sejt számára éhezés során. Az autofágia tehát esszenciális szerepet játszik a sejt anyagainak megújításában, a makromolekulák és sejtszervecskék *turnover*ében, és a sejt túlélésében. A folyamatot először újszülött egér vese epitéliális sejtek elektronmikroszkópos vizsgálata során írták le 1957-ben (*25*).

Az autofág lebontás lizoszómákban (mikrométeres nagyságú membránnal határolt vezikulumok; 26) megy végbe. A lebontásra kijelölt sejtalkotók lizoszómába történő transzportja alapján az autofágia három fő típusát különböztetjük meg: mikroautofágia, *chaperone*-közvetített autofágia és makroautofágia (**12. ábra**) (27, 28). A mikroautofágia során közvetlenül a lizoszóma membránja fűzi le a határoló citoplazma részleteket betűrődéssel (29). A folyamatot élesztőben és emlősökben írták le. A *chaperone*-közvetített autofágia (CMA) bizonyos pentapeptid (KFERQ) motívummal rendelkező fehérjék szelektív lebontását végzi (30). Egy *chaperone* rendszer ismeri fel a KFERQ szekvenciát, majd az így

kialakult *chaperone*-célfehérje komplex egy specifikus lizoszóma membránfehérjén (LAMP-2a; *lysosome-associated membrane protein*-2a) keresztül jut a lizoszóma lumenébe. Emlősökben figyelték meg, és úgy tűnik, hogy a makroautofágiát követő másodlagos sejtválasz része.



12. Ábra. Az autofágia fő formái. CMA: *chaperone*-közvetített autofágia. KFERQ: pentapeptid szekvencia. A sejtszervecskék és fehérjék nem méretarányosak.

A makroautofágia során egy kettős membrán, az ún. izoláló membrán veszi körbe a lebontandó citoplazma részletet. Ezt a folyamatot nevezik szekvesztrációnak. A kettős membrán bezárulásával kialakuló struktúra az autofagoszóma (**13. ábra**). Az autofagoszóma külső membránja képes lizoszómával (vagy endoszómával) fuzionálni. Mivel a lizoszóma



13. Ábra. A makroautofágia sémája. A rajz a makroautofág folyamat főbb lépéseit mutatja. Az izoláló membrán külső része pirossal, belső része kékkel van jelölve. A mitokondriumok és fehérjék (szürke gömbök) jelölve vannak. A jobb oldali képen felül egy élesztő vakuóla (nyíl) (fénymikroszkópos felvétel), alul egy *C. elegans* bélsejtből származó makroautofág struktúra látható (elektronmikroszkópos felvétel) (*31*). Az alsó képen a vonal 0,5 µm-t jelöl.



kisebb az autofagoszómánál, nem a lebontandó citoplazma kerül a lizoszóma belső terébe, hanem a lizoszómális enzimek jutnak az autofagoszóma határoló membránjai közé. A lizoszómális protonpumpáknak és egyéb membránfehérjéknek az autofagoszóma külső membránjában való megjelenésétől kezdve beszélhetünk autofagolizoszómáról vagy élesztőben autofág vakuóláról (**13. ábra**). Az autofagoszóma mérete sejt- és fajfüggő, leggyakrabban 0,1-1 μm. Az autofagoszóma a lizoszómával nemcsak közvetlenül, hanem a heterofág eredetű endoszómával történő fúziót követően is egyesülhet.

Az autofágia élettani funkciói igen változatosak. Részt vesz a sejt felesleges, elöregedett vagy károsodott⁵ (abnormális szerkezetű és funkcióképtelen) komponenseinek lebontásában, valamint az intracelluláris patogének (vírusok és baktériumok) citoplazmából történő eltávolításában. Az autofágia alapvető szerepet játszik a sejt éhezési, hypoxiás (alacsony oxigénszint) és hipertermiás (magas hőmérséklet) stresszre adott válaszában, a sejtnövekedés és sejtosztódás szabályozásában, a stressz-indukált és programozott sejtpusztulásban, az öregedési folyamat szabályozásában, valamint az idegsejtek és az immunrendszer működésében. Az autofág degradáció ugyancsak esszenciális a sejt anyagainak az egyedfejlődés során történő átrendezésében (*32*). A folyamat abnormális működése különböző ráktípusok, korai öregedés (*progeria*), neurodegeneratív betegségek, agysérülés, szélütés (*stroke*), izomsorvadás (*sarcopenia*), szívelégtelenség, valamint baktériumok és vírusok által okozott fertőzések kialakulásában nyilvánul meg (*33-35*).

Érdemes röviden megjegyezni, hogy a másik ismert intracelluláris lebontó mechanizmus a ubiquitin-proteaszóma rendszer, amely elsősorban a rövid életidejű, rosszul feltekeredett fehérjék degradációjáért felelős. Számos fiziológiai és patológiai körülményben az autofágia és a proteaszóma rendszer együtt aktiválódik (*36*).

3.2.1.2. Molekuláris mechanizmus és szabályozás

Fiziológiai, egyedfejlődési és orvosbiológiai jelenősége ellenére az autofágia mechanizmusa és szabályozása sokáig ismeretlen maradt. Ennek a hiányosságnak az oka viszonylag könnyen megmagyarázható: az autofagoszómák mérete mikrométeres nagyságrendű, tehát a folyamatot korábban (a molekuláris faktorok megismerése előtt) csak elektronmikroszkóppal lehetett

⁵ A károsodott sejtalkotók nem egyszerűen csak funkcióképtelen, felesleges molekulák, hanem pl. jelátviteli komponensekkel képesek kölcsönhatásba lépni és ezen keresztül jelátviteli folyamatokat perturbálhatnak. Ezért sejtméregként hatnak, amelynek eltávolítása esszenciális a sejt homeosztázisának fenntartásához. A molekuláris károsodások legfőbb oka az oxidatív stressz (reaktív, oxigén aniont tartalmazó kis molekulákkal történő kölcsönhatás).

tanulmányozni⁶. Ez a sajátosság megakadályozta a hatékony genetikai módszerekkel történő autofágia-specifikus gének és fehérjék azonosítását (nyilvánvaló, hogy senki nem vállalkozott elektronmikroszkópiára épülő mutáns *screen*ekre). Az áttörést az egysejtű élesztőben zajló autofágia tanulmányozása tette lehetővé. Élesztőben ugyanis az autofág vakuólum (a lizoszómával analóg sejtszerv) fénymikroszkóppal is könnyen azonosítható. Ezt a felismerést genetikai *screen*ek sora követte, amelyek révén számos autofág faktort sikerült meghatározni (*37-40*). Az élesztő autofág gének soksejtű ortológjainak meghatározásával megnyílt az út a folyamat molekuláris és funkcionális (genetikai) tanulmányozása előtt magasabbrendű szervezetekben is.

Napjainkig közel 30 autofág (*autophagy-related* röviden *ATG*) gént azonosítottak élesztőben (41), amelyek jelentős része nemcsak az autofágiában, hanem az ún. Cvt (*cytoplasma-to-vacuole targeting*) útvonalban is funkcionál (*39*). Az autofágia indukcióját (nukleációs lépés) egy kináz komplex aktiválódása teszi lehetővé (*42*). Ennek központi eleme az Atg1 kináz, melynek aktív formája indukálja az autofagoszómák képződését. Normál körülmények között a tápanyag-érzékelő TOR (*target of rapamycin*) kináz aktivitása az Atg1 komplex egyik fehérjéjének, az Atg13-nak a foszforilációját eredményezi (**14. ábra**) (*43*). A foszforilált Atg13 az Atg17 fehérjével kapcsolódik, és így nem alakul ki aktív Atg1 komplex. Éhezés során a TOR inaktiválódik, ennek hatására az Atg13 defoszforilálódik és nagy affinitással kötődik az Atg1-hez, kialakítva az autofágiát indukáló aktív Atg1 komplexet. A komplex további tagjai az Atg11, Atg20 és Atg24 fehérjék (**14. ábra**). Noha soksejtűekben nem azonosítottak Atg11 és Atg17 ortológokat, Drosophilában az Atg1 kináz aktivitása szintén szükséges az autofágia indukciójához (*44*).

Az új membrán nukleációját egy III-as típusú PI3-kinázt (Vps34; *vacuole protein sorting*) tartalmazó lipid szignalizációs⁷ komplex serkenti (42). A komplexbe tartoznak még az Atg6/Beclin1 (Bcl2-*interacting*), Atg14 és Atg15 fehérjék. A komplex a Vps15-ön keresztül kapcsolódik az Atg9 transzmembrán fehérje⁸ által megjelölt membránhoz (**15. ábra**), amelyet az izoláló membrán eredetének tekintenek, és élesztőben a sejtmag melletti pre-autofagoszomális struktúrából (PAS) mutatták ki (42). Hasonló képződményt többsejtűekben nem írtak le. A PAS-ra jellemző markerek metazoákban nem egy

⁶ Az autofág folyamat tanulmányozásának legmegbízhatóbb módszere még ma is az elektronmikroszkópia.

⁷ A Vps34 kináz a foszfatidili-inozitol biszfoszfátot [PtdIns $(3,4)P_2$] konvertálja foszfatidili-inozotol trifoszfáttá [PtdIns $(3,4,5)P_3$].

⁸ Az autofágiában részt vevő fehérjék közül egyelőre csak két transzmembrán fehérjéről tudunk, ezek az Atg9 és a z Atg27. Az Atg27 csak nagy mennyiségű autofagoszóma képződésekor vesz részt a folyamatban.

meghatározott helyen összpontosulnak, hanem a citoplazmában elszórtan találhatók. Soksejtűekben tehát a mai napig nem ismert az izoláló membrán forrása (45, 46).



14. Ábra. Az Atg1 kináz komplex. "P" szimbólum foszforilált állapotot jelöl. A piros bekeretezés az aktív Atg1 kináz komplexet jelöli. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást mutatnak.

A formálódó autofagoszómában az Atg9 már nem mutatható ki. Az Atg9 visszanyerésében valószínűleg az Atg2 és Atg18 perifériás membránfehérjéknek van szerepük (47, 48).



15. ábra. A VPS34 kináz komplex és helyzete az autofágia indukciójában. A TOR kináz gátolja az Atg1 komplexet (Atg) (emlősökben mutatva). A Vps34: PI3-K, Beclin1: Atg6. Ptdlns(3)*P*: foszfatidil-inozitol (3)-foszfát.

A formálódó autofagoszóma membránjának fő molekuláris markere az Atg8 (emlősökben LC3) *ubiquitin*-szerű fehérje (*42, 49*). Az Atg8 egy citoplazmában oldható fehérje (Atg8-R vagy LC3-I forma). Az indukciót követően az autofagoszóma membránjához egy *ubiquitin*ációhoz hasonló folyamatban kötődik kovalensen (Atg8-PE vagy LC3-II forma) és így a citoplazmában oldhatatlanná válik (**16. ábra**). A kötés az Atg8 C-terminális végén található glicin aminosavmaradék és a membrán egyik hidrofób lipid komponense, a

foszfatidiletanolamin (PE) között alakul ki. Első lépésben az Atg4 cisztein proteáz lehasítja a



16. Ábra. Atg8/LC3, mint autofágia marker. A fluoreszcens képeken GFP::LC3 expresszió látható HeLa sejtekben. Tápanyag jelenlétében az LC3 diffúz eloszlást mutat a citoplazmában. Éhezés során az LC3 pontszerű struktúrákhoz (formálódó autofagoszómák) lokalizálódik. A jobb oldali gélképen az LC3-I (nem aktivált, oldható forma) és LC3-II (aktivált, membrán-kötött forma) relatív mennyisége normál vs. éhezetett sejtekben.

szolúbilis Atg8 C-terminálisán található arginint, és az így felszabadult Atg8 glicin véget egy E1-szerű (*ubiquitin* aktiváló) Atg7 enzim aktiválja (**17. ábra**). Ezzel a reakcióval parallel az Atg7 egy másik *ubiquitin*-szerű fehérjét, az Atg12-t is aktiválja. Eredményeként kialakul egy Atg5-Atg12/Atg16 komplex, amely ahhoz kell, hogy az aktivált Atg8-at egy E2-szerű (*ubiquitin* konjugáló) Atg3 enzim a PE-hoz kösse (*50*). Az Atg5-Atg12/Atg16 komplex kialakulásához is szükség van egy E2-szerű enzimre, ez az Atg10 (*51*). Az autofagoszóma bezáródása után az Atg8 lehasítódik a membránról. Mivel a kettős membránnal körbevett autofagoszóma külső és belső oldala is Atg8-cal jelölt, a belső térbe került Atg8 a kialakuló üregbe zárul és az autofagoszóma beltartalmával együtt lebomlik.



17. Ábra. Az Atg8/LC3 membrán kötődése. Atg8-R: inaktív szolúbilis forma, Atg8-PE: aktív foszfatidiletanolaminhoz kötött forma. Az Atg8 és Atg12 *ubiquitin*-szerű fehérjék. Atg3 és Atg10: E2 *ubiquitin* konjugáló enzimek, Atg7: E1 *ubiquitin* aktiváló enzim, Atg4: szerin proteáz. Az autofágia szabályozásában elsősorban az energia-szenzorként működő TOR (*target of rapamycin*) Ser/Thr kináz játssza a központi szerepet (52) (**14, 15 és 18. ábrák**). A TOR autofágiát szabályozó funkciójában az AMP:ATP arányt érzékelő AMPK (*AMP-activated protein kinase*) és a TSC1/TSC2 (*Tuberous sclerosis complexes* 1/2) fehérjék vesznek részt (53, 54). A TOR az Atg13 foszforilációján keresztül közvetlenül szabályozza az Atg1 komplex aktivitását (43, 55). Az autofág folyamat represszálásán túl a TOR stimulálja a riboszóma biogenezist és a transzlációt (56, 57).



18. Ábra. Az autofágiát szabályozó jelátviteli rendszerek modellje. Extracelluláris faktorok kékkel, transzkripciós faktorok pirossal, citoplazmás szabályozó fehérjék feketével jelölve. A nyilak aktivációs, a talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek. A fehérjék elnevezésére vonatkozó részletek a szövegben. AS: aminosavak.

Az utóbbi években további autofágiát szabályozó jelátviteli útvonalakat azonosítottak. Az egyik ilyen jelátviteli rendszer az inzulin/IGF-1 útvonal (58). Emlős izom- és bélsejtekben a FoxO közvetlenül aktiválja az ATG8/LC3 és ATG12 gének expresszióját (59, 60). A FoxO transzkripciós faktor az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal effektor komponense (61, 62). Az autofágia szabályozásában ugyancsak kitüntetett szerepet játszik a Ras útvonal. A Ras fehérje a Raf Ser/Thr kinázt foszforilálja, amely egy kináz kaszkádot aktivál. Az útvonal "végén" található transzkripciós faktorok célgénjei között számos autofág gént (ATG1, ATG13 és ATG18) határoztak meg (63). A p53 tumorszuppresszor fehérje komplex módon szabályozza az autofágiát. Transzkripciós faktor aktivitása feltehetően a TOR kináz gátlásán vagy az AMPK aktiválásán keresztül modulálja az autofágiát (64). Genotoxikus stressz körülmények között a p53 potens autofágia induktor (65). Citoplazmás formája ugyanakkor közvetlenül képes gátolni az autofág degradációt (66). Az autofágia komplex szabályozásáról a 7. (FONTOSABB EREDMÉNYEK DISZKUSSZIÓJA) fejezetben írok részletesebben (28, 67).

3.2.1.3. Autofágia C. elegans-ban

2000-ben, amikor az autofágia kutatásába belefogtam, a PubMed adatbázis az "*autophagy*, *C. elegans*" kettős keresésre nem adott találatot. Az elmúlt 10 év alatt jelentős tudás halmozódott fel e folyamat mechanizmusáról, szabályozásáról és funkciójáról a fonalféreg rendszerben is (68) (2010. februárjában már 84 hivatkozás volt található a PubMedben). Ehhez az ismeretbővüléshez a jelen értekezésben bemutatott saját eredmények is – még ha szerény mértékben – hozzájárultak. Ismertté vált, hogy a *C. elegans* sejtekben tipikus autofág struktúrák képződnek és a *C. elegans* genom számos autofág (*ATG*) gént tartalmaz (*31, 69-71*). Mindezek alapján feltételezhető, hogy az autofágia mechanizmusa *C. elegans*-ban alapvetően az élesztő és emlős rendszerekben megismert folyamatokhoz hasonlóan működik (68).

A *C. elegans*-ban folytatott autofágia kutatások legjelentősebb eredményei a folyamat újonnan feltárt biológiai funkcióira vonatkoznak. 2003-ban írták le (egyben ez volt az első *C. elegans* vonatkozású autofágia közlemény), hogy a *bec-1/Atg6* autofág gén funkciója szükséges az inzulin/IGF-1 defektív törzsek hosszú élettartamának kifejeződéséhez (*69*). Ezzel az autofágia területe az öregedési kutatások fókuszába került. Ugyancsak a *C. elegans* volt az első metazoan rendszer, amelyben igazolták, hogy az autofág gének funkciója szükséges a normális élettartam megnyilvánulásához tápanyaghiányos körülmények között is (*72*)⁹. Autofág mutáns állatok testhosszának és sejtméretének vizsgálatával igazolódott továbbá, hogy az autofágia szerepet játszik a sejtnövekedés szabályozásában (*74*). Ioncsatorna hiperaktív mutáns törzsekben autofág gének inaktiválásával szuppresszálni lehetett a neuronok nekrotikus pusztulását (*75, 76*). Az autofágia tehát fontos szerepet játszik az ún. exocitotoxikus sejthalál folyamatokban. Végül nemrégiben mutatták ki, hogy az autofág gének inaktiválása interferál a szóma-csíravonal elkülönülést lehetővé tévő folyamatokkal a korai egyedfejlődés során (*77*).

3.3.2. Paradigma II: A vulva fejlődés szabályozása

3.3.2.1. Mintázatképződés

⁹ Ezzel a közleménnyel közel egy időben írták le az autofágia hasonló funkcióját a gyümölcslégy *Drosophila melanogaster*ben is (73).

A *C. elegans* vulvaszövetének kifejlődése a fejlődésbiológia területének egyik legintenzívebben vizsgált és legjobban megértett szervfejlődési modellje (*22, 78*). A vulva a hermafrodita állatok azon szerve, amelyen keresztül az embriók a külvilágba, a hím spermái a hermafrodita ivarszervébe jutnak. A kifejlett vulvaszövet 22 sejtből épül fel, amelyek 6 ún. vulva elősejt (vulva prekurzor sejt; VPC) egy csoportjából fejlődnek ki (*10, 79*). A VPC-ket elhelyezkedésük szerint P(3-8).p sejteknek is nevezik (**19. ábra**). A vulva valójában a három centrális helyzetű VPC-ből [P(5-7).p] fejlődik ki. Az L3 lárva stádium elejétől a P(5-7).p sejtek három sejtosztódási cikluson mennek keresztül. A sejtek osztódásának síkja és üteme szigorúan meghatározott. Azok a VPC-k, amelyek nem vesznek részt a vulva fejlődésében [P(3,4,8).p], egyszer osztódnak, majd utódaik fuzionálnak a hipodermális szincíciummal (hyp7). Ha a P(5-7).p sejtek valamelyikével gond történik (pl. lézersugárral eltávolítják), akkor a P(3,4,8).p sejtek közül az egyik átveszi funkcióját és normális vulva fejlődik.



19. Ábra A *C. elegans* vulva fejlődés anatómiája. A rajzon a vulva prekurzor sejtek [P(3-8).p] és utódaik elhelyezkedése látható. A korai (A), középső (B) és késői (C) L3 lárva stádium, valamint L4 lárva stádium (D) és fiatal felnőtt stádium (E) történései. Az órák (hr) a petéből való kikeléstől eltelt időt mutatják (25°C-on). AC: *anchor* sejt. A jobb oldali Nomarski objektívvel készült képeken a P6.p első két osztódása követhető nyomon (A-C). A nyílhegy az AC-re mutat, alatta a P6.p (A), a P6.p(p/a) (B) és P6.p(p/a)(l/r) (C). p: *poszterior*, a: *anterior*, l: *left*, r: *right*. A D kép a P6.p "unokákban" specifikusan expresszálódó *egl-1::yfp* (lila) és az AC-ben specifikusan expresszálódó *chd-3::gfp* (zöld) markereket mutatja (jobb oldali panel: Nomarski kép, jobb oldali panel: fluoreszcens kép). Az alsó fluoreszcens képen a *ceh-20::gfp* riporter expressziója figyelhető meg a P(3-8).p sejtekben (nyilak) az L3 stádiumban. A P(3-8).p sejtek közötti kisebb zöld sejtek a *ventral nerve cord* neuronjai.

A vulva fejlődés során a VPC-kben mindig meghatározott sejtsors specifikálódik. A leginkább indukálódott (az AC-hez legközelebb lévő) VPC-ben (P6.p) ún. elsődleges (1°) sejtsors, a szomszédos helyzetű indukálódott VPC-kben [P(5,7).p] másodlagos (2°) sejtsors, míg a távolabbi nem indukálódott VPC-kben [P(3,4,8)] harmadlagos (3°) sejtsors differenciálódik. Vad típusú hermafroditában a P(3-8).p sejtek sztereotipikus sejtsors-mintázata tehát invariáns: 3°-3°-2°-1°-2°-3° (**20. ábra**) (78, 80).

3.3.2.2. Genetikai útvonalak

A vulva sejtsors-mintázat szigorúan koordinált jelátviteli hatások eredőjeként alakul ki (**20. ábra**). Az L3 stádium elején a *gonad*ális AC-ból érkező "induktív jel" a Ras útvonalat aktiválja a legközelebb elhelyezkedő VPC-kben [P(5-7).p] (*80, 81*). Egy ismeretlen forrású kanonikus Wnt útvonal parallel hat a Ras jelátvitellel a vulva indukció során; a Ras hiányát a hiperaktivált Wnt képes kompenzálni (*82*). Induktív jel hiányában nem fejlődik vulva (Vul – *vulvaless* – fenotípus), mindegyik VPC harmadlagos sejttípust alakít ki. A Notch jelátviteli



20. Ábra. A *C. elegans* vulva sejtsorsokat meghatározó genetikai útvonalak. A vulva prekurzor sejtek [P(3-8).p] sztereotipikus sejtsors-mintázata meghatározott: 3°-3°-2°-1°-2°-3°. 1° és 2°: indukált vulva sejtsorsok, 3°: nem indukált vulva sejtsors. 1°: elsődleges vulva sejtsors, 2°: másodlagos vulva sejtsors, 3°: harmadlagos vulva sejtsors. Nyilak aktiválást, talpas nyilak gátlást jelölnek. Piros és zöld nyilak: "induktív jel", kék nyilak: "laterális jel", fekete talpas nyilak: "gátló jel". AC: *anchor* sejt. A Ras jel erőssége az AC-sejttől mért távolság (grádiens) függvénye; ezt vastag, vékony és szaggatott piros nyilak jelzik.

kaszkád a szélső indukált VPC-kben [P(5,7).p] csökkenti a Ras hatását ("laterális jel"), ezáltal másodlagos sejttípust határoz meg (83, 84). Notch aktivitás hiányában mindhárom indukált VPC-ben [P(5-7).p] elsődleges sejtsors alakul ki és ez Pvl – *protruded vulva* – fenotípusban nyilvánul meg. Végül a hipodermiszből kiinduló három parallel ható (redundáns) ún. synMuv (*synthetic Multivulva*) útvonal antagonizál az "induktív jellel", így gátolva a vulva indukciót a VPC-kben ("gátló jel"). Ha a három synMuv útvonalból bármelyik kettő inaktív, akkor a normálisan nem indukálódó VPC-kben [P(3,4,8).p] is indukált vulva sejtsors (1° vagy 2°)

differenciálódik (85, 86). Ennek eredményeként egynél több vulva (Muv – *multivulva* – fenotípus) fejlődik az állatban. Összefoglalva, a Ras, Wnt, Notch és synMuv útvonalak integrációja alakítja ki a VPC-k sejtsorsát: a P6.p elsődleges, a P(5,7).p másodlagos, míg a P(3,4,8).p sejtek harmadlagos – nem indukált – vulva sejtsorsokat differenciálnak (**21 ábra**).



21. Ábra. Vulva fenotípusok *C. elegans***-ban.** A képen felül egy *Vulvaless* (Vul), középen egy vad típusú, alul egy *Multivulva* (Muv) fenotípusú állat látható. A Vul állatban a kikelt lárvák (*bag of worms*), a Muv állaton ventrálisan extra vulva kitüremkedések láthatók. A VPC-k [P(3-8).p] színezett gömbökkel vannak jelölve; világoskék: nem indukálódott (3°) vulva sejtsors, (közép)sötétkék: indukált (2°) vulva sejtsors, (mély)sötétkék: indukált (1°) vulva sejtsors.

A legújabb kutatások szerint a vulva sejtsorsokat meghatározó útvonalak hatása a *lin-39 Hox* gén transzkripciós aktivitását befolyásolja (*82, 87-89*). A *lin-39* tehát a vulva fejlődés központi szabályozó faktora (*90*). A *C. elegans* vulva fejlődést szabályozó útvonalak integrációjának mechanizmusa azonban továbbra is feltárásra váró kutatási feladat.

4. KÉRDÉSFELVETÉSEK

Az egyedfejlődés föbb lépéseit (sejtsors meghatározás és mintázatképződés) és az eukarióta sejtek működését (sejtnövekedés, proliferáció, differenciálódás, sejtpusztulás) jelátviteli útvonalak bonyolult hálózata szabályozza. A jelátviteli kapcsolatok (*signalling crosstalk*) feltárása alapvető jelentőségű e molekuláris szabályozó rendszer megértéséhez. Értekezésemben új jelátviteli kapcsolatok feltárására vonatkozó eredményeket mutatok be. Kísérleti objektumként a fonalféreg *Caenorhabditis elegans*-t, jelátviteli paradigmaként az autofágiát és a vulvaszövet fejlődését használtam.

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott önlebontó (katabolikus) folyamata. Egyedfejlődési, fiziológiai és orvosbiológiai jelentősége ellenére az autofágia mechanizmusáról és szabályozásáról soksejtű rendszerekben 2003-ig nem állt rendelkezésre irodalmi adat. Célul tűztük ki az autofágia mechanizmusának, szabályozásának és sejttani/egyedfejlődési funkcóinak feltárását *C. elegans*-ban. Kiemelten vizsgáltuk az autofág degradációt befolyásoló jelátviteli folyamatokat.

A *C. elegans* vulvaszövetének kifejlődése kiváló kísérletes paradigma a jelátviteli útvonalak koordinált működésének tanulmányozásához. Az eddig megismert vulva fejlődést szabályozó útvonalak a *lin-39 Hox* gén transzkripcióját befolyásolják. Vizsgálatainkban új *lin-39* expressziót szabályozó, és új LIN-39 által szabályozott jelátviteli kaszkádokat kerestünk.

4.1. A C. elegans TOR kináz: jelátviteli kapcsolatok és funkciók

Az autofágiára vonatkozó kutatásaink kezdetén (2001-től kezdődően) olyan *C. elegans* rendszert kívántunk előállítani és jellemezni, amelyben az autofágia folyamata hiperaktiválódik (az autofágia működésének megértése céljából célszerűbbnek tűnt autofág struktúrák jelenlétét, mintsem azok hiányát vizsgálni). A TOR kinázról ekkor ismert volt, hogy élesztőben potensen gátolja az autofágiát (*43*). Kézenfekvőnek tűnt tehát a TOR-t genetikai eszközökkel (mutációkkal és géncsendesítéssel) inaktiválni *C. elegans*-ban. Meg kell jegyeznem, hogy próbálkoztunk éheztetéssel és TOR-gátló rapamycin kezeléssel is, melyek élesztőben remekül működő autofágia indukáló beavatkozások, de ezek a törekvéseink akkor még nem vezetettek eredményre. TOR deficiens nematodák létrehozása után a következő kérdéseket fogalmaztuk meg:

- van-e szerepe a TOR kináznak az autofágia szabályozásában *C. elegans*-ban?
- van-e hatása a TOR kináz blokkolásának (autofágia hiperaktiválásának) a *C. elegans* egyedfejlődésére?
- befolyásolja-e a TOR mint a sejtek energia szenzora az állat öregedési folyamatát?
- ha igen, akkor milyen élethossz-szabályozó genetikai útvonalakkal hat kölcsön?

4.2. Autofág gének és fehérjék C. elegans-ban

A TOR kinázzal végzett kísérletekkel párhuzamosan feltettük azt a direkt kérdést is, hogy vannak-e autofág gének a *C. elegans* genomban; ismert élesztő autofág gének (*ATG*) féreg ortológjait kívántuk bioinformatikai módszerekkel meghatározni. Izgalmas probléma volt annak megvizsgálása, hogy vajon minden ismert élesztő autofág génnek megtaláljuk-e a féreg ortológját, vagy vannak élesztő-specifikus autofág faktorok. Más szavakkal, *C. elegans*-ban az élesztőben feltárt mechanizmushoz hasonlóan zajlik az autofágia folyamata vagy vannak alapvető molekuláris különbségek a két rendszer között? Néhány *C. elegans ATG* gén meghatározása után célszerű volt megvizsgálni a gének expressziós mintázatát. Szerettük

volna tudni, hogy a *C. elegans* autofág fehérjék intracelluláris eloszlása hasonlít-e az élesztő ortológok mintázatához (citoplazmatikus, membránstruktúrákhoz lokalizált). Lizoszómális markerek használatával terveztük megvizsgálni, hogy az autofág fehérjék mutatnak-e lizoszómális lokalizációt. Ugyancsak fontos volt annak a kérdésnek a tisztázása, hogy az autofág gének mikor (mely stádiumokban) és hol (milyen sejtekben) fejeződnek ki az egyedfejlődés során.

4.3. C. elegans autofág gének funkciói

C. elegans autofág gének meghatározása után a géneket mutáns allélek izolálásával és géncsendesítéssel kívántuk inaktiválni. A továbbiakban az autofágia defektív, pontosabban autofág gén deficiens¹⁰ törzsek genetikai (funkcionális) jellemzését szándékoztuk elvégezni. Vizsgálni kívántuk a törzsek életképességét, fertilitását, növekedési ütemét, élettartamát, morfológiáját (pl. az állatok méretét), egyedfejlődését és viselkedését. Érdekes kérdés volt a vizsgált állatok sejtleszármazásának meghatározása. Adott sejttani és egyedfejlődési funkciók meghatározása után olyan útvonalakat kerestünk, amelyek az autofág gének aktvitásán keresztül szabályozzák a kérdéses biológiai folyamatot. Autofág géneket szabályozó jelátviteli rendszereket kívántunk tehát feltárni.

4.4. A C. elegans vulvaszövet kifejlődését szabályozó jelátviteli rendszerek integrációja

A *lin-39 Hox* gén központi szerepet játszik a vulvaszövet kifejlődésében: a gén promótere integrálja a vulva kifejlődést szabályozó útvonalak jeleit. A LIN-39 – mint transzkripciós faktor – konzervált DNS szekvenciát képes felismerni és megkötni. E szekvencia meghatározásával az alábbi kérdésekre kívántunk választ keresni:

- milyen célgéneket szabályoz a LIN-39, és mely célgének vesznek részt a vulva sejtsorsok specifikációjában?
- mely LIN-39 célgének tartoznak szignalizációs rendszerekbe?
- a LIN-39 kofaktoraként prediktált CEH-20/Pbx/Exd fehérje szerepet játszik-e a vulva fejlődés szabályozásában?
- ceh-20 (C. elegans homeobox) hipomorf mutációk hogyan befolyásolják a vulva mintázatképződését?

¹⁰ Az értekezésben szisztematikusan kerülöm az "autofágia funkció" kifejezést, helyette az "autofág gén funció" meghatározást használom. Ennek oka kettős. Egyrészt az autofág gének multifunkciós faktorok. Bizonyított szerepük van olyan autofágia-független folyamatok szabályozásában, mint pl. az endocitózis és a *cvt* útvonal. Másrészt az autofág gének új funkcióinak feltárása során sosem bizonyítottuk egyértelműen az autofág folyamat érintettségét.

Hat-e más jelátvitel a *lin-39* VPC-specifikus expressziójára?

A vulva egy hermafrodita specifikus szerv, hímekben nem fejlődik ki. Ennek a szexspecifikus egyedfejlődési aspektusnak a genetikai háttere mai napig nem tisztázott. A nemi különbségek *C. elegans*-ban alapvetően a szex-determinációs génkaszkád szabályozása alatt állnak. Ez az összefüggés vezetett minket annak a kérdésnek a felvetéséhez, hogy a TRA-1A transzkripciós faktor (a szex-determinációs útvonal terminális faktora) befolyásolja-e, és ha igen, hogyan, a *lin-39* aktivitását a vulva prekurzor sejtekben. *tra-1* lf mutációk mutatnak-e vulva fejlődési defektusokat?

4.5. A TRA-1/GLI transzkripciós faktor célgénjei

A TRA-1A transzkripciós faktor konzervált kötőhelyének meghatározása után a célgéneket genom-szinten kívántuk feltárni. A potenciális célgének bioinformatikai meghatározása után néhány "izgalmas" jelátviteli találatot kísérletesen is meg kívántunk vizsgálni. Ezek egyike a már említett *lin-39* volt. A másik találat, amellyel részletesen kívántunk foglalkozni a *xol-1* "mester kapcsoló" gén volt. A *xol-1* működésének tisztázása érdekében megvizsgáltuk, hogy milyen módon szabályozza a TRA-1A a *xol-1* aktivitását, és milyen hatása lehet ennek a jelátviteli kapcsolatnak az egyedfejlődés globális szabályozására.

5. EREDMÉNYEK ÉS INTERPRETÁLÁSUK

5.1. A TOR kináz szabályozza a C. elegans élethosszát

Háttér: Az evolúciósan konzervált inzulin/IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) jelátviteli útvonal központi szerepet játszik az öregedési folyamat szabályozásában fonalférgekben, rovarokban és emlősökben egyaránt (91-93). DAF-2 (*C. elegans* inzulin/IGF-1 receptor) defektív nematoda törzsek például kétszer hosszabb ideig élnek a vad típusú állatoknál. A *daf-*2(-) (*dauer formation defective*) mutánsok fenotípusa pleiotróp: 20°C-on a mutáns állatok élethossza jelentősen megnyúlik, míg 25°C-on a mutáns állatok *dauer* lárvaként fejlődnek. A *dauer* egy alternatív, metabolikusan inaktív egyedfejlődési állapot, kialakulását kedvezőtlen körülmények (pl. tápanyaghiány) indukálják. A *dauer* lárva ellenálló detergensekkel szemben, nem mozog, nem táplálkozik és nem öregszik (kb. fél évig él – szemben a normálisan fejlődő állat kb. 14 napos élethosszával) (**22. ábra**) (94). Optimális körülmények közé kerülve a *dauer* lárva visszatér a normális egyedfejlődési pályára (recovery). A *daf-2(-)* mutánsok



22. Ábra. A *dauer* egyedfejlődés. A rajz a *C. elegans* életciklusát mutatja. Normális (reproduktív) egyedfejlődési útvonal: embrió – L1 lárva – L2 lárva – L3 lárva – L4 lárva – felnőtt. A lárva stádiumokat vedlési fázisok határolják el. Kedvezőtlen körülmények között az L1 lárva egy alternatív L2d, majd *dauer* lárva állapotba fejlődik. A jobb oldali fotón fent egy L4 lárva (A), alul egy dauer (B) lárva látható.

konstitutív *dauer* és hosszú életidejű (*long-lived*) fenotípusa a DAF-16/FoxO transzkripciós faktor aktivitásának függvénye: a *daf-16* blokkolása szuppresszálja a *daf-2(-)* mutánsok *dauer* fejlődését (25°C-on) és megnyúlt élethosszát (20°C-on) (*91, 95*). A DAF-2 inzulin/IGF-1 receptor funkciója – amely egy kináz kaszkádon keresztül valósul meg – tehát a DAF-16 gátlása (*96*). Ugyanilyen episztatikus reláció működik rovarokban és emlősökben is (*97*).

A TOR kináz – hasonlóan az inzulin/IGF-1 útvonalhoz – tápanyag- és hormonfüggő módon szabályozza a sejtek metabolizmusát, növekedését és osztódását (*58, 98-100*). A TOR egyedfejlődési funkciója és kapcsolata az inzulin/IGF-1 jelátvitellel azonban nagyrészt
ismeretlen maradt (2002 környékén). Ugyancsak kérdéses volt a TOR, mint tápanyag- és energiaszenzor öregedési folyamatban betöltött potenciális szerepe.

Eredmények: A *C. elegans* genomban a *let-363 (lethal*) gén kódolja a TOR kinázt (*101*). A TOR funkcióját géncsendesítéssel (RNSi) inaktiváltuk. A *let-363* duplaszálú (ds)RNS-sel kezelt állatok egyedfejlődése az L3 lárva stádiumban megrekedt. Ez a fenokópia konzisztens volt a *let-363(-)* mutáns állatok fenotípusával (*101*). Bizonyos kísérleti körülmények között azonban (amikor az RNSi gyengén működött) a *let-363(RNSi)* állatok tipikus *dauer* lárvaként fejlődtek (28,3%, N=1880). Felmerült tehát a TOR élethosszt szabályozó potenciális szerepe. Megvizsgáltuk a *let-363(RNSi)* és *let-363(-)* mutáns állatok élettartamát, és azt tapasztaltuk, hogy jelentősen hosszabb ideig élnek, mint a vad típusú L3 lárvák és felnőtt állatok (**23. ábra**) (*102*). Ezek az eredmények egy új jelátviteli rendszer szerepét tárták fel az öregedési folyamat szabályozásában. A TOR jelátvitel tehát egy újonnan azonosított öregedést szabályozó (*longevity*) útvonal. Néhány hónappal később Riddle és mtsi. is hasonló következtetésre jutottak (*103*).



23. Ábra. TOR deficiens állatok élethossza 25°C-on. Vad típusú (\bullet), daf-16(mg50) mutáns (\bigcirc), let-363(h114) mutáns (\square), let-363(h111) mutáns (\blacksquare), let-363(h131) mutáns (\blacksquare), let-363(RNSi); daf-16(mg50) állatok (\blacktriangle) éhező (megrekedt) vad típusú L3 lárvák (\blacklozenge) és éhező (megrekedt) daf-16(mg50) mutáns L3 lárvák (\diamondsuit) élethossz görbéje. A TOR (let-363) mutációk és a TOR (let-363) RNSi kezelés megakasztja az egyedfejlődést az L3 lárva stádiumban. Mivel a TOR inaktiválása megkettőzi az élettartamot, a változások statisztikailag szignifikánsak.

A hosszú életidejű *daf-2(-)* mutánsok egyik jellemzője, hogy a bélsejtekben lipid cseppek halmozódnak fel; e tulajdonság szintén DAF-16-függő (*104*). Ezzel összhangban a

TOR deficiens L3 lárva stádiumú állatok belében jelentős lipid akkumulációt figyeltünk meg, összehasonlítva a vad típusú L3 lárvákkal (**24. ábra**).



24. Ábra. Lipid akkumuláció TOR deficiens állatokban. A felső panel egy vad típusú L3 lárva, az alsó panel egy L3-ban megrekedt *let-363(RNSi)* állat belét mutatja. A lipid cseppeket Nilus vörös vitális festékkel tettük láthatóvá. Mindkét fluoreszcens kép azonos expozíciós idővel készült.

A TOR inaktiválása megakasztja az egyedfejlődést L3 lárva állapotban. A megrekedt L3 lárvák élettartama két- háromszorosa a normálisan fejlődő vad típus állatok élettartamának. Ésszerű volt megvizsgálni, hogy vajon a TOR hiánya a normálisan fejlődő (tehát a teljes életcikluson végighaladó) állatokban is megnöveli-e az élethosszt. Ehhez szintén RNSi kezelést alkalmaztunk. L4 stádiumú (tehát az L3 stádiumon már átjutott) vad típusú lárvákat helyeztünk *let-363* dsRNS-t expresszáló lemezekre, és vizsgáltuk az állatok élethosszát. Ezek a reproduktívan fejlődő *let-363(RNSi)* állatok is hosszú élettartamúak voltak (**23. ábra**). Érdekes módon nem volt jelentősége annak, hogy a TOR RNSi kezelést a korai lárva állapotoktól vagy a felnőtt kor kezdetétől alkalmaztuk; mindkét esetben hasonló élethossz növekedést tapasztaltunk (*102*). Ez azt jelenti, hogy a TOR – a DAF-2/IGF-1 kaszkádhoz hasonlóan (*105*) – felnőtt korban fejti ki élethossz-szabályozó hatását.

A fenti eredményekkel összhangban a *let-363* dsRNS kezelés nem változtatta meg (nem növelte) a daf-2(-) mutánsok élettartamát 25°C-on (a tenyésztést 20°C-on kezdtük, majd a mutáns állatokat az L4 lárva állapot elérése után 25°C-ra helyeztük és ott mértük meg élettartamukat). 20°C-on a daf-2(-) mutánsok hosszú életidejű, normálisan fejlődő állatok (csak ~4%-uk fejlődik dauer lárvaként). Ezen a hőmérsékleten a let-363 RNSi kezelés jelentősen megnövelte a dauer állapotba történő fejlődés penetranciáját daf-2(-) mutáns genetikai háttérben: a vizsgált daf-2(-) mutánsok 4,6%-a (29/630) fejlődött dauerként kontroll (üres vektort expresszáló) RNSi lemezen, míg 17.9%-uk (146/817) fejlődött dauer lárvaként let-363(RNSi) lemezen. Mindent összevetve, ezek az adatok azt sugallták, hogy az inzulin/IGF-1 és TOR jelátviteli útvonalak közös jelátviteli tengelyt alkotnak az öregedési folyamat és az egyedfejlődés szabályozásában. A daf-16 mutációs inaktiválása nem befolyásolta a let-363(RNSi) állatok élethosszát (23. ábra). Ez azt jelenti, hogy a LET-363/TOR downstream hat a DAF-16-tól az élethossz szabályozásában. Valóban, a let-363 promóterben találtunk konzervált DAF-16 kötőhelyet, és megnézve a let-363 expressziós szintjét *daf-16* mutáns háttérben azt tapasztaltuk, hogy a *let-363* transzkripciós aktivitását a DAF-16 befolyásolja (25. ábra). Később az is ismertté vált, hogy a DAF-16 represszálja a

TOR-ral egy komplexben működő *Raptor (TOR interacting protein)* fehérjét kódoló *daf-15* gén expreszióját (103).





Következtetések: A TOR kináz genetikai inaktiválása megduplázza a *C. elegans* természetes élethosszát (*102, 103*). E jelenségre vonatkozó felfedezésünk egy újonnan feltárt élethossz szabályozó jelátviteli rendszert határozott meg. Később a TOR hasonló szerepét írták le Drosophilában (*106*), élesztőben (*107*) és egérben (*108*). A TOR jelátvitel tehát egy evolúciósan konzervált *longevity* útvonalat alkot. Egy tavaly megjelent Nature *News and Views* rovatban írtak arról, hogy az irodalomban – az öregedés biológiát jellemző intenzív kutatások ellenére – a TOR az első olyan fehérje, amelynek élethossz szabályozó szerepét mind a négy leggyakrabban használt öregedési modellben (élesztő, *C. elegans*, Drosophila és egér) bizonyították (*109*). Rövid cikkünket (Vellai és mtsi., *Nature* **426**: 620, 2003) tavaly már 53-szor, összesen 220-szor hivatkozták.

A TOR kináz – mint az eukarióta sejtek fő tápanyag- és energia-érzékelő faktora – molekuláris kapcsolatot jelent a táplálkozás, az anyagcsere és az élethossz között. Régi megfigyelés, miszerint a redukált táplálékfelvétel ("kalorikus restrikció") jótékony hatással van az élettartamra. E jelenség hátterében álló molekuláris mechanizmus motorja, pontosabban karbulátora (ennek jelentőségéről később lesz szó) a TOR.

A TOR öregedési folyamatot szabályozó funkciójának számomra legfontosabb üzenete a fehérje szignalizációs kapcsolatának megismerésében rejlik. *C. elegans*-ban nyert eredményeinkkel ugyanis elsőként szolgáltattunk funkcionális evidenciát arra, hogy a TOR kináz az inzulin/IGF-1 jelátviteli tengely inherens része (**26. ábra**). Mivel a TOR közvetlenül szabályozza a riboszóma biogenezist és a transzlációt (aktiválja a riboszóma kis alegység összeszerelésében résztvevő S6 kinázt és az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-t; *110*), érthetőbbé vált az a mechanizmus, amelyen keresztül az inzulin/IGF-1 útvonal a tápanyag-

ellátottság függvényében szabályozza a sejtnövekedést és ezen keresztül a proliferációt (28, 111, 112). Ennek a jelátviteli kapcsolatnak az orvosbiológiai jelentősége nyilvánvaló. Számos ráktípusban és a diabétesz különböző formáiban kimutatható ugyanis a TOR kináz abnormális működése.



26. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok I: Az inzulin/IGF-1 útvonal és a TOR kináz közös jelátviteli tengely mentén szabályozzák az öregedési folyamatot. DAF-2: inzulin/IGF-1 receptor, AGE-1: I típusú foszfatidil-inozitol 3-kináz, DAF-18/PTEN: foszfatáz és tenzin homológ, PDK: 3'-foszfoinozitid-függő protein kináz, AKT: protein kináz B, DAF-16: *forkhead*-típusú FoxO transzkripciós faktor, TOR: a rapamycin kináz célpontja, eIF-4E: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E, S6K: S6 kináz. A nyilak aktiválási viszonyokat, a talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek. A piros szín az újonnan feltárt jelátviteli kapcsolatot és sejtes funkciót jelöli.

5.2. Az autofágia jellemzése C. elegans-ban

5.2.1. Autofág gének meghatározása C. elegans-ban

Háttér: Autofágia kutatásaink kezdetén (2001-ben) (makro)autofág géneket (*ATG*) és fehérjéket (Atg) csak élesztőből ismertek. (Ez is jól érzékelteti azt a tényt, hogy a biológiai kutatások egyik legújabb forradalma kétségkívül az autofágia mechanizmusának és szabályozásának területén zajlik). Ezeket a faktorokat funkciójuk alapján négy nagyobb csoportba osztályozták: az autofágoszóma képződés iniciálásában résztvevő (Atg1 komplex), az autofagoszóma membrán-növekedésben résztvevő (Vps34-Atg6 komplex), az

autofagoszóma érését lehetővé tevő (Atg8 és Atg12 konjugációs komplexek), és az autofagoszóma kialakulását követő fehérje visszanyerésben résztvevő (Atg2 és Atg18) faktorokra (24, 42). C. elegans-ban az autofágia kutatása 2001-ben még nem kezdődött el. Alapozó munkát kellett tehát elvégeznünk. Ennek keretében először autofág struktúrákat és géneket kerestünk. C. elegans autofág gének meghatározásához bioinformatikai módszerekkel az élesztő ATG gének féreg ortológjait azonosítottuk. Ezután következhetett az autofág gének egyedfejlődési és sejttani funkcióinak feltárása. Ebben a fejezetben a bioinformatikai vizsgálatok és géninaktivációs törekvések eredményeit foglalom össze.

Eredmények: Az autofágia C. elegans-ban történt taulmányozásához a TOR vizsgálatok mellet számos direkt megközelítést alkalmaztunk. Ezek egyike az elektronmikroszkópia volt, amellyel megvizsgáltuk, kimutathatók-e autofág struktúrák nematoda sejtekben. Az erre vonatkozó ultrastruktúrális eredményeket Dr. Kovács L. Attila kollégám MTA doktori disszertációja foglalja össze (2008) (31, 71, 113). Csak röviden említve, tipikus autofág képleteket (korai és késői autofagoszómák) és atipikus autofág struktúrákat (ún. multivezikuláris testek) egyaránt találtunk. Ezzel párhuzamosan bioinformatikai módszerekkel (BLAST kereséssel) élesztő autofág (ATG) gének C. elegans ortológjait azonosítottuk. Érdekes módon számos élesztő ATG gén esetében nem találtunk féreg ortológot, míg egy ATG gén esetében egynél több ortológot határoztunk meg (2. táblázat) (31, 70, 114). Az ATG gének többsége azonban evolúciósan konzervált formában, vagyis egyegy jól definiált ortológ által reprezentálva volt megtalálható a féreg genomban. Ez azt sugallta, hogy az autofágia mechanizmusa C. elegans-ban konzerváltan, az élesztőben megismert masinériához hasonlóan mehet végbe (68, 70, 115).

| 2. I dulaLa | Tablazat. Elesztő ATO genek C. <i>elegáns</i> ortologjál. | | | | | | | |
|-----------------|---|-------------------|------------------------------|---|--|--|--|--|
| Élesztő gén | C. elegans ORF | C. elegans gén | BLAST érték valószínűsége | Funkció élesztőben | | | | |
| ATG1 | Y60A3A.1 | unc-51 | 8e ⁻³⁷ | Ser/Thr kináz, az autofágia indukciója (nukleáció) | | | | |
| ATG3 | Y55F3AM.4 | | e- ³⁴ | E2-szerű enzim, az Atg8-t konjugálja foszfatidil- etanolaminhoz | | | | |
| ATG4 | Y87G2A.3 | | 2e ⁻²⁰ | Cisztein proteáz, az ATG8 C- terminálisán lévő arginint hasítja | | | | |
| ATG6 (VPS30) | <i>T19E7.3</i> | bec-1 | 3e ⁻⁹ | <i>Coiled-coil</i> fehérje, komponense a III típusú PI 3-kináz (VPS34) komplexnek | | | | |
| ATG7 | M7.5 | atg-7 | e ⁻¹¹⁰ | E1-szerű enzim, az Atg8-at és az Atg12-t aktiválja | | | | |
| ATG8 | C32D5.9 | lgg-1 | 6e ⁻³⁰ | Ubiquitin-szerű fehérje, az | | | | |

| 2. | Táblázat. | Élesztő | ATG | gének | C. el | legans | ortológjai. |
|----|-----------|---------|-----|-------|-------|--------|-------------|
|----|-----------|---------|-----|-------|-------|--------|-------------|

| | ZK593.6 | lgg-2 | 2e ⁻¹⁵ | autofagoszóma membránhoz konjugálódik |
|-------|----------|---------|----------------------|--|
| ATG9 | T22H9.2 | atg-9 | 2e ⁻⁴⁷ | Transzmembrán fehérje, a preautofagoszómális membránhoz kapcsolódik |
| ATG12 | BO336.8 | lgg-1 | 2.3e ^{-13*} | <i>Ubiquitin</i> -szerű fehérje, az Atg8 konjugációjához kell |
| ATG13 | D2007.5 | epg-1 | 6.1e ^{-21*} | Az Atg1 komplex tagja, közvetlenül a TOR foszforilálja |
| ATG18 | F41E6.13 | atg-18 | 8e ⁻¹⁵ | Foszfoinozitid-kötő fehérje, az Atg9 leválását segíti a preautofagoszómális membránról |
| VPS34 | B0025.1 | let-512 | 2.7e ⁻⁶⁸ | III típusú PI 3-kináz, az Atg6-tal alkot komplexet |

*Az *lgg-3* és *epg-1* BLAST értékeket a humán ortológokhoz képest adtuk meg (limitált hasonlóság az élesztő *ATG12* és *ATG13* ortológokkal). ORF: nyitott leolvasási keret (*open reading frame*), E1: *ubiquitin* aktiváló enzim, E2: *ubiquitin* konjugáló enzim.

A *C. elegans* autofág gének közül az alábbiak esetében izoláltunk vagy szereztünk be (CGC-től) mutáns törzset:

| <u>gén</u> | <u>allél</u> | <u>citáció</u> |
|------------|--------------|---------------------|
| unc-51 | e369, e1189 | (74, 116) |
| bec-1/Atg6 | ok691, ok700 | (117) |
| atg-7 | tm2976 | (70), nem publikált |
| lgg-1 | tm3489 | nem publikált |
| atg-18 | gk378 | (118) |

RNSi konstrukciót a *bec-1/Atg6*, *lgg-1/Atg8* és *atg-9/Atg9* gének esetében állítottunk elő (*117, 118*). *unc-51(e369)* és *bec-1(ok691)* mutáns állatokban, valamint *bec-1(RNSi)* és *lgg-1(RNSi)* állatokban elektronmikroszkópiával tanulmányoztuk az autofág folyamatot. Meglepetésünkre mindhárom törzsben kimutathatók voltak tipikus autofág struktúrák (*71*). Az RNSi konstrukciók működését a megfelelő transzlációs fúziós (funkcionális) GFP riporterek expressziós analízisével ellenőriztük (**27. ábra**).



27. Ábra. Az lgg-1 RNSi konstrukció működése. GFP::LGG-1 transzlációs fúziós riporter expressziója kontroll RNSi (üres vektort tartalmazó) és lgg-l RNSi lemezeken. Az lgg-l RNSi konstrukció majdnem teljesen eltüntette az expressziót (a halvánv foltok vektor а

garatban megfigyelhető háttér-expressziójából származnak). Az expozíciós idő közel azonos volt.

A mutáns törzsek és RNSi állatok életképtelen (letális) fenotípust mutattak. Kivételt az *unc-51(-)* mutánsok képviseltek, amelyek paralizált, fertilis felnőttekké fejlődtek. Az állatok vagy az embrionális vagy a korai lárva stádiumukban pusztultak el. A pusztulás penetranciája teljes volt a mutáns törzsekben, alacsony volt az RNSi állatokban.

Következtetések: Eredményeink azt mutatták, hogy a C. elegans genom tartalmaz autofág géneket (31, 70, 71, 74, 75, 117, 118). A nukleációs, membránnövekedési, membránérési és fehérje visszanyerési fázisok mindegyikéhez találtunk megfelelő C. elegans ortológokat. Ez azt sugallja, hogy C. elegans-ban alapvetően konzervált módon működik az autofágia mechanizmusa (68). Ez a megállapítás konzisztens azon megfigyeléseinkkel, amelyek tipikus autofág struktúrák jelenlétét írták le ebben az organizmusban (31, 46, 71). A C. elegans tehát objektum az autofágia mechanizmusának és egyedfejlődési funkciójának ideális tanulmányozásához. Öt autofág gén esetében sikerült mutáns (többnyire deléciót, tehát feltételezhetően funkcióvesztéses allélt tartalmazó) törzset izolálnunk vagy beszereznünk. Három autofág gén esetében készítettünk RNSi konstrukciókat, ezek mindegyike funkcionálisnak bizonyult (70, 71, 117, 118). Paradox módon az autofág gének autofágia funkcióját mai napig nem sikerült egyértelműen bizonyítanunk. Az unc-51/Atg1(-), bec-1/Atg6(-), bec-1/Atg6(RNSi) és lgg-1/Atg8(RNSi) állatok mindegyikében találtunk ugyanis autofág struktúrákat (Kovács L. Attila MTA doktori disszertáció, 2008). Talán e megfigyelésünkre vonatkozó értetlenségünk volt autofágia vonatkozású kutatásaink legnagyobb mulasztása: 2009-ben jelent meg az a Nature közlemény, amelyben egy alternatív, ATG génektől független autofág mechanizmust írtak le egérben (119).

Az autofág gének (az *unc-51* kivételével) lf mutációi korai letalitást okoztak. Ezek a gének tehát esszenciálisak az egyedfejlődéshez. Bizonyításra váró kérdés, hogy a gének autofágia funkciója vagy autofágia-független funkciója szükséges az életképességhez.

5.2.2. Autofág gének expressziós analízise

Háttér: *C. elegans* autofág gének azonosítása után a kódolt fehérjék, legalábbis egy részük, intracelluláris lokalizációját és egyedfejlődési expressziós mintázatát kívántuk meghatározni. Élesztő és emlős sejtekben az Atg fehérjék diffúz módon állandóan jelen vannak a citoplazmában, éhezés hatására membránstruktúrákhoz lokalizálódnak (**16. ábra**) (*120*). Hasonló akkumulációs mintázat elviekben tovább erősíthette a meghatározott *C. elegans ATG* ortológok autofágia jellegét.

Eredmények: Két *C. elegans* autofág gén, a *bec-1/Atg6* és az *lgg-1/Atg8* transzlációs fúziós *gfp*-jelölt riporter konstrukcióját készítettük el (**28. ábra**) (*70, 117, 118*). Mivel az LGG-1 C-terminálisa funkcionális (az utolsó aminosav – arginin – lehasítódik, majd az így C-terminusra kerülő glicin aktiválódik), ezért az *lgg-1* esetében a *gfp* kódoló szakaszt az N-terminális régióra fúzionáltattuk. Mindkét riporter rendszer képes volt menekíteni a megfelelő null mutáns állatok embrió-letális fenotípusát. A fúziós fehérjék tehát funkcionálisak. Sőt, a *gfp::lgg-1* transzgén menekítette az *atg-7(tm2976)* mutánsok lárvális életképtelenségét is. Ez további bizonyítékként szolgált az ATG-7 konzervált funkciójára (élesztőben az Atg8-at – LGG-1 ortológ – aktiválja; **17. ábra**).



28. Ábra. *bec-1/Atg6* és *lgg-1/Atg8 gfp-*fúziós riporter rendszerek. A kék boxok exonokat, az összekötő vonalak intronokat jelölnek. A nyilak a transzlációs iniciációs start kodont jelölik. *gfp*: zöld fluoreszcens fehérjét kódoló szekvencia. Promóter elemek hossza kilobázispárban (Kbp) mutatva.

A *bec-1* expressziója citoplazmás és magi lokalizációt egyaránt mutatott (**29. ábra**). Jellemző volt a fehérje citoplazmás jelenlétére, hogy gyakran pontszerű struktúrákhoz lokali-



29. Ábra. A BEC-1 akkumulációja. A fehérje (fluoreszcens képek) minden sejtben a korai embrionális állapotoktól jelen van. A, 16 sejtes embrió (alul a Nomarski kép). B, comma állapotú

embrió. C, bélsejtek (a vonal egy bélsejtet jelöl). D, Fejlődő vulvaszövet (nyíl). E, Konfokális kép, a nyíl a gonád disztális csúcssejtjét jelöli.

zálódott (**29/E. ábra**) (*70, 117*). Ez különösen nyilvánvaló volt a bél, a hipodermális *seam*, és a gonád disztális csúcssejtekben. A GFP-pozitív struktúrák feltehetően autofagoszómális képleteknek felelnek meg. GFP expressziót minden sejtben már a korai embrionális stádiumoktól detektáltunk. Az expresszió megmaradt a teljes egyedfejlődés és a felnőtt kor során is. Érdekes módon a legintenzívebb expressziót a differenciálódó, intenzíven osztódó sejtek (vulva sejtek, *seam* sejtek, a gonád disztális csúcssejtek), valamint a neuronok mutatták (**29.** és **30. ábrák**) (*70, 75, 117*).



30. ábra. *bec-1* expressziója neuronokban. A bal oldali panel a PVM sejtet és a ventrális ideg köteg (VNC) néhány neuronját mutatja (nyilak). A PVM-ből kiinduló axont, amely szintén GFP-pozitív, nyílheggyel jelöltem. A jobb oldali panel egy L3 lárva feji régióját mutatja. A garatideggyűrű területe fehér vonallal jelölt. Fluoreszcens képek.

Az LGG-1 intracelluláris akkumulációja és egyedfejlődési mintázata nagyon hasonló volt ahhoz, amit a BEC-1 esetében detektáltunk (**31. ábra**). A fehérje minden sejtben, de legintenzívebben az osztódó, differenciálódó sejtekben expreszálódott. Intracellulárisan



31. Ábra. *lgg-1* expresszió. A, LGG-1 akkumuláció felnőtt állatokban. Minden sejttípus GFP-pozitív. B, Pontszerű *lgg-1* expresszió egy L4 lárva hipodermiszében. C, Intenzív GFP::LGG-1 punktuáltság egy *daf-2(-)* mutáns felnőtt állatban. D, Diffúz citoplazmás LGG-1 akkumuláció *unc-51(-)* háttérben.

főként a citoplazmában lokalizálódott (70, 75). A citoplazmatikus "fókuszok" száma *daf-2(-)* mutáns háttérben jelentősen növekedett, míg *unc-51(-)* mutánsokban csökkent. A *daf-2* aktivitás hiánya éhezési állapotnak, az *unc-51* hiánya autofágia deficienciának feleltethető meg.

Általánosan elfogadott, hogy az Atg8 pontszerű akkumulációja autofagoszómális struktúrákat jelöl (**16. ábra**, *120*). *C. elegans* embriókban viszont azt találtuk, hogy az LGG-1 az autofagoszómáknál jóval nagyobb méretű membrán-képletekhez is lokalizál (**32. ábra**). Ezeket az ún. "ikerfoltokat", amelyek rendszerint a *seam* sejtekben a mag két oldalán szimmetrikusan helyezkednek el, EM-mel megvizsgáltuk és Golgi struktúraként azonosítottuk (*70*).



32. Ábra. LGG-1/Atg8 lokalizációja a Golgi apparátusban. A, Citoplazmában diffúz és pontszerű LGG-1 akkumuláció embriókban. **B,** "Ikerfolt"-szerű LGG-1 akkumuláció egy L2 lárva *seam* sejtjeiben. Egy egyedi *seam* sejt bekeretezve, az "ikerfoltok" nyilakkal jelöltek. **C,** Az előző panelen bekeretezett *seam* sejt nagyított képe. A vastag nyíl a sejtmagot, a kicsi nyilak az "ikerfoltokat" jelölik. **D,** Egy *seam* sejt EM képe. A vastag nyíl a sejtmagot, a vékony nyilak a Golgi apparátusokat jelölik. A **C** és **D** képek egybevetése alapján az "ikerfoltok" Golgit azonosítanak.

Következtetések: Két *C. elegans* autofág gén, a *bec-1* és az *lgg-1*, az egyedfejlődés során minden szomatikus sejtben expresszálódik (hasonló mintázatot kaptunk egy transzkripciós fúziós *atg-18::gfp* rendszer esetében is), és alapvetően citoplazmatikus eloszlást mutat. Mindkét fehérje azonban a sejtmagban is kimutatható (*70, 117*). Intracelluláris akkumulációjukra a diffúz és pontszerű eloszlás egyaránt jellemző. Pontszerű akkumulációjuk *daf-2(-)* mutáns (inzulin/IGF-1 útvonal deficiens) háttérben intenzívebb, *unc-51(-)* mutáns (autofágia deficiens)¹¹ háttérben csökkent. Az LGG-1 *lysotracker* vörös festékkel jelölt savas

¹¹ Az előző (5.2.1.) fejezetben láttuk, hogy az *unc-51* mutációs inaktiválása nem okozza az autofág struktúrák teljes eltűnését a sejtekből.

kompartmentekhez (lizoszómák) lokalizál (70). Ezen expressziós tulajdonságok tipikus autofág génekre jellemző karakterek.

A két fehérje intenzíven expresszálódik osztódó és differenciálódó sejtekben (**29/D,E. ábra**). Ez felveti annak lehetőségét, hogy az autofág gének – esetleg maga az autofág folyamat – szerepet játszanak a differenciálódási folyamatok szabályozásában: lehetővé teszik például a sejt anyagainak átrendezését (*remodelling*). Ennek a fontos potenciális fejlődésbiológiai funkciónak a bizonyítása a jövő kutatási feladata.

Az Atg8 fehérje pontszerű akkumulációja autofagoszómális struktúrákat jelöl (69, 120). E fontos irodalmi állítással ellentétben azt találtuk, hogy a *C. elegans* LGG-1/Atg8 fehérje Golgi struktúrákhoz is lokalizálódik *seam* sejtekben. Ez egyrészt azt jelenti, hogy nem lehet az Atg8-at (és ortológjait) kizárólagos autofagoszóma markerként használni többsejtű rendszerekben. Másrészt felveti az Atg8 fehérjék multifunkciós szerepét, amelyek egyike Golgi-kapcsolt. Alternatív lehetőségként a Golgi rendszernek lehet valamilyen eddig fel nem tárt funkciója az autofág folyamatban.

5.2.3. Az autofágia szerepe az öregedési folyamat szabályozásában

Háttér: Az öregedési folyamatot elsődlegesen a sejtes károsodások fokozatos felhalmozódása okozza (*121, 122*). Ilyen károsodások lehetnek az oxidált, rosszul feltekeredett, keresztkötött és aggregálódott makromolekulák (elsősorban fehérjék) és sejtszervecskék, amelyek szerkezete abnormális és ezért nem tudják biológiai funkciójukat ellátni. Az ilyen komponensek nem egyszerűen felesleges sejtalkotók, hanem számos biológiai folyamattal interferáló faktorok; jelátviteli komponensekhez tudnak például kötődni és ezáltal jelátviteli rendszerek működését zavarhatják. A sejtes károsodások tehát sejtméregként hatnak. Eltávolításuk esszenciális a sejt működésének (homeosztázisának) fenntartásához.

A sejtes károsodások eltávolításának ma ismert legfőbb folyamata az autofágia (24, 33-35). Meg kell említeni, hogy az autofágia mellett a proteaszóma-*ubiquitin* rendszer és a molekuláris *chaperone*-ok (hősokk fehérjék) is részt vesznek a károsodott sejtalkotók – elsősorban a rövid életidejű fehérjék – lebontásában. Nem véletlen, hogy e két rendszer fontos szerepet játszik az élethossz meghatározásában (123, 124). Az autofágia azonban mennyiségileg és minőségileg a legjelentősebb intracelluláris katabolikus folyamat: bármely makromolekulát és sejtszervecskét képes tömeges méretekben eliminálni (a sejtszervecskék degradációjának kizárólagos ismert mechanizmusa!).

Számos olyan környezeti és endogén faktor ismert továbbá, amelyekről köztudott élethossz befolyásoló szerepük és közvetett kapcsolatuk az autofág folyamattal (97, 122, 125,

126). Az autofágia alapvetően olyan mechanizmus, amely a sejt túlélését biztosítja éhezés során. A moderált éhezés (kalorikus restrikció) élethossz nyújtó hatása pedig már régóta ismert. A tápanyag-érzékelő TOR kináz szintén egy fontos élethossz szabályozó faktor (102, 103, 106-109). A TOR autofágiát gátló szerepe szintén közismert (43). Mindezek a megfontolások felvetették az autofágia öregedési folyamatban betöltött lehetséges szerepét. Az első erre vonatkozó közleményt Levine és mtsi. publikálták a Science-ben (69).

Eredmények: Életképes autofág mutánsok és RNSi kezelt állatok élettartamát vizsgáltuk meg, és azt tapasztaltuk, hogy jelentősen rövidebb ideig élnek a vad típusnál (**33. ábra**) (*118*). Ez a hatás különösen éheztetés során volt szembetűnő (**34. ábra**) (*70*).



33. Ábra. Autofág gén deficiens fonalférgek csökkent élethossza. A, bec-1(-) mutáns állatok élethossza. Mivel a bec-1(-) mutációk embrionális letalitást okoznak, a mutáns állatok életképességét funkcionális BEC-1::GFP transzgénnel menekítettük (**28-29. ábrák**) (*117*). A transzgén extrakromoszómális (instabil) elemként volt jelen a genomban, ezért bizonyos sejtekben (sejtvonalakban) random elveszett. Funkcionálisan ezek az állatok genetikai mozaikok voltak: bec-1(-); swEx[bec-1(+)] genotípus. A bec-1(+) jelölés valójában a BEC-1::GFP transzlációs fúziós konstrukciót jelöli. **B**, unc-51(-) és vab-8(-) mutánsok élethossza. A VAB-8 együtt hat az UNC-51-gyel (*127*). **C**, Életképes atg-18(gk378) mutánsok élethossza. A mutáns állatok közel 60%-a képes fertilis felnőttként fejlődni. **D**, lgg-1(RNSi) és atg-9(RNSi) állatok élethossza. Fertilis felnőtt állapotba fejlődő állatokat teszteltünk. Kontroll: üres RNSi vektort expresszáló vad típusú törzs. RNAi = RNSi. A statisztikai adatokat a Függelékek (**F1. Táblázat**) tartalmazza.



34. Ábra. Autofág gén deficiens L1 lárvák csökkent túlélése éhezés során. Az embriók tápanyagot nem tartalmazó M9 oldatban keltek ki és növekedtek. Az éhező L1 lárvák megrekednek ebben a fejlődési stádiumban (*128*). A túlélő állatok arányát kétnaponta határoztuk meg. *daf-2(-)*: inzulin/IGF-1 jelátvitel deficiens mutáns, *daf-18(-)*: inzulin/IGF-1 jelátvitel hiperaktív mutáns (a *daf-18* a PTEN – az inzulin/IGF-1 jelátvitel negatív szabályozója – féreg ortológját kódolja; *129*).

Az autofág gén deficiens állatok csökkent élethossza azonban nem evidencia az autofág gének élethosszt szabályozó funkciójára. Elképzelhető ugyanis, hogy aktivitásuk hiánya valamilyen "betegséget" okoz, és ezért, nem pedig a gyorsabb öregedési ráta miatt pusztulnak el az állatok korábban. Megvizsgáltuk az állatok öregedési pigmentjének (lipofuscin) felhalmazódási ütemét, valamint mozgási képességük életkor-függő hanyatlását (pontosabban annak rátáját). Közismert ugyanis, hogy a kor előrehaladtával a lipofuscin, amely a lizoszómális lebontás végtermékeiből áll össze, fokozatosan felhalmozódik a sejtekben, ill. az állatok szinuszoid mozgása fokozatosan lelassul, dezorganizálttá (paralizálttá) válik (*130, 131*). Kísérleteinkben az autofág gén deficiens állatok gyorsabban halmoztak fel lipofuscint és gyorsabban bénultak meg, mint a vad típusú állatok (**35. ábra,** *10.1.2.* fejezet) (*118*). Autofág gének inaktiválása tehát felgyorsította az öregedési folyamatot.

A továbbiakban azt kívántuk megvizsgálni, hogy az autofág gének milyen élethossz szabályozó útvonalakkal hatnak kölcsön. A csökkent inzulin/IGF-1 és TOR aktivitás, a redukált mitokondriális respiráció, valamint a kalorikus restrikció mind olyan hatások, amelyek megnövelik a *C. elegans* élethosszát (*91, 97, 102, 103, 125, 132-134*). Ezek a rendszerek tehát öregedési folyamatot szabályozó (*longevity*) útvonalak. Kettős mutánsok elemzésével vizsgáltuk az autofág gének inaktiválásának hatását a hosszú életidejű mutánsok fenotípusát vagy episztatikusan hatott felette (**36. 37. 38.** és **39. ábrák**). A kettős mutánsok tehát jelentősen rövidebb ideig éltek, mint az egyszeres hosszú

életidejű mutánsok. Ez azt jelenti, hogy az autofág gének közvetítik az öregedési folyamatot szabályozó útvonalak hatásait (118).



35. Ábra. Autofág gén deficiens állatok gyorsan öregednek. A, Autofág gén deficiens állatok gyorsabban halmoznak fel öregedési pigmentet (lipofuscin), mint a vad típusú állatok. B, Autofág gén deficiens állatok hamarabb bénulnak le a felnőtt kor során, mint a vad típusú állatok. A *bec-1(-)* mutáns állatok embrionális életképtelenségét funkcionális BEC-1::GFP transzgénnel menekítettük; genotípusa *bec-1(-); swEx[bec-1(+)::gfp]*. Ezek az állatok tehát genetikai mozaikok voltak. Azon egyedek pigment tartalmát és mozgását vizsgáltuk, amelyek fertilis felnőttként fejlődtek. RNAi=RNSi.



36. Ábra. Autofág gének funkciója szükséges a DAF-2/IGF-1 receptor defektív mutáns állatok hosszú élettartamának kifejeződéséhez. A vad típusú állatok élethossz görbéjét pirossal jelöltem. Az autofág gén deficiens egyszeres mutánsok élethossz görbéje itt nincs feltüntetve (**33.** ábrán látható), de mindegyik rövidebb ideig él a vad típusnál. *bec-1(ok691)* mutánsok: *bec-1(-);* Ex[bec-1(+)] genetikai mozaikokat vizsgáltam.

Fontos észrevenni, hogy az autofág gének mutációi nagyobb mértékben csökkentették az élettartamot *daf-2(-)* mutáns háttérben, mint vad típusú genetikai háttérben (**33.** és **36. ábrák, F2. Táblázat**). Ez azt jelenti, hogy az autofág génfunkciók hiánya nem egyszerűen

"megbetegíti" a vad típusú és *daf-2(-)* mutáns állatokat, hanem gyorsítja az öregedési folyamat sebességét.

Az autofág gének mutációja által okozott élethossz rövidülés episztatikus a TOR mutánsok hosszú életidejű fenotípusa felett: *let-363(-); autofág gén(-)* kettős mutánsok rövid életidejűek (37. ábra) (*118*). Az autofág gének tehát egy útvonalban hatnak a TOR kinázzal az élethossz szabályozásában (*3.1.3.* fejezet). A TOR gátolja az autofág géneket ebben a funkcióban (útvonalban).



37. Ábra. Az autofág gének funkciója szükséges a TOR deficiens állatok élettartam növekedési görbéje pirossal jelöltem. Egyszeres autofág gén mutánsok görbéjét nem tüntettem fel. *bec-1(-); Ex[bec-1(+)]* genetikai mozaikokat vizsgáltam. RNAi=RNSi.

Az eat-2(-) (eating defective) mutációk hátrányosan befolyásolják a garat fejlődését, és ezáltal csökkent táplálékfelvételt okoznak. Az így kialakult kalorikus restrikció kb. 50%-kal növeli meg a mutáns állatok élettartamát (134). Autofág gének mutációi episztatikusan hatnak az eat-2(ad1116) mutáció által okozott hosszú élettartam fenotípus felett (**38. ábra**). Az autofág gének közvetítik tehát a kalorikus restrikció élethossz növelő hatását; a két rendszer egy útvonalban hat.



Ábra. Autofág gének 38. közvetítik az *eat-2(ad1116)* mutáció élethossz növelő hatását. Piros: vad típusú élethossz görbe. bec-1(ok691) a bec-1(-); Ex[bec-1(+)] genetikai mozaikokat jelöli. Az egyszeres autofág mutánsok élethossza itt nincs feltüntetve (33. ábrán vannak feltüntetve).

A csökkent mitokondriális respiráció jelentős mértékben megnöveli a *C. elegans* élettartamát (*132, 133*). Az *atp-3 (ATP-synthase*) gén a mitokondriális ATP szintáz komplex egyik komponensét kódolja (*132*). Autofág gének blokkolása teljes mértékben szuppresszálta az élethossz növekedést *atp-3(RNSi)* állatokban (**39. ábra**) (*118*). Az *atp-3* csendesítése tehát az autofág génkaszkádon keresztül növeli meg az élettartamot.



39. Ábra. Az *atp-3(RNSi)* állatok megnyúlt élettartama **autofág gén-függő.** Piros: vad típusú élethossz. *bec-1(ok691)* a *bec-1(-);Ex[bec-1(+)]* genetikai mozaikokat jelöli. RNAi=RNSi.

Következtetések: Az autofágia (gének) inaktiválása *C. elegans*-ban felgyorsítja az öregedési folyamatot és ezáltal jelentős élettartam rövidülést okoz (**36-39. ábrák**) (*69, 118, 135, 136*). Az autofágia, pontosabban az autofág gének, tehát az öregedési folyamat egy újonnan feltárt szabályozó rendszere. Nem meglepő, hogy az autofágia a 2000-es évek közepétől az öregedési kutatások kiemelt vizsgálati területévé vált (*28, 137-139*). Orvosbiológiai jelentősége miatt ki kell emelnem, hogy az autofág gének valójában egy öregedést gátló (*antiaging*) útvonalat alkotnak: az autofág gének mutációja csökkenti az élettartamot (vad típusú funkciójuk tehát növeli az élettartamot). Ezzel szemben az inzulin/IGF-1 útvonal egy öregedési folyamatot gyorsító (*pro-aging*) rendszer: a DAF-2/IGF-1 receptor blokkolása élethossz növekedést eredményez (a receptor normális funkciója rövidíti az élettartamot).

Az autofág gének inaktiválása szuppresszálja a hosszú életidejű mutáns állatok élettartam (*long-lived*) fenotípusát. Kettős mutáns kombinációban például az *autofág gén(-); daf-2(-)* IGF-1 receptor defektív mutánsok rövidebb ideig élnek, mint az egyszeres *daf-2(-)* mutánsok (**33.** és **36. ábrák**) (*118, 135*). Ez azt jelenti, hogy az autofág gének aktivitása szükséges a *daf-2(-)* mutánsok élettartam növekedéséhez. Más szavakkal, az autofág gének *downstream* – egy útvonalban – hatnak a DAF-2 receptortól. Hasonló episztatikus reláció figyelhető meg az autofág génkaszkád és a TOR, a "tápanyag jelátviteli" (*nutrient signalling*) rendszer, valamint a mitokondriális légzési útvonal között is (**33.-39. ábrák**) (*118, 136, 139*). Az autofág gének közvetítik ezen öregedési folyamatot szabályozó útvonalak hatásait. E négy

öregedési (*longevity*) jelátvitel hatása tehát az autofág rendszeren konvergálódik (**40. ábra**). Az autofág fehérjék az öregedési folyamat egyik központi szabályozó mechanizmusát alkotják. A későbbiekben látni fogjuk, hogy ezek a genetikai (szabályozási) kapcsolatok direkt molekuláris kapcsolatokban is megnyilvánulnak, továbbá más sejttani folyamatokra (pl. sejtnövekedés) is érvényesek. Öregedési kutatásaink így vezettek jelentősnek mondható új jelátviteli kapcsolatok feltárásához.



40. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok II. Az inzulin/IGF-1, TOR és "tápanyag" jelátviteli rendszerek, valamint a mitokondrális légzési lánc öregedési folyamatot szabályozó hatásai az autofág rendszeren konvergálódnak. Az autofágia, pontosabban az autofág gének, funkciója közvetíti az élethossz szabályozó útvonalak hatásait. DAF-2: inzulin/IGF-1 receptor, AGE-1: I típusú foszfatidilinozitol 3-kináz, DAF-18/PTEN: foszfatáz és tenzin homológ, PDK: 3'-foszfoinozitid-függő protein kináz, AKT: protein kináz B, DAF-16: *forkhead*-típusú FoxO transzkripciós faktor, TOR: a rapamycin kináz célpontja, eIF-4E: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E, S6K: S6 kináz. "AUTOFÁGIA" autofág fehérjéket jelöl. A nyilak aktiválási viszonyokat, a talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek. A piros szín az újonnan feltárt jelátviteli kapcsolatot jelöli. Lila szín: korábbi fejezetben (**26. ábrán**) bemutatott új jelátviteli kapcsolat és sejtes funkció. A "tápanyag jelátvitel" egyik kulcskomponense az AMPK (AMP-aktivált protein kináz) kináz, amely a sejt AMP:ATP arányát képes érzékeli. Az AMPK szerepét az autofágia szabályozásában nemrég tárták fel (*139*).

5.2.4. Autofág fehérjék szerepe a sejtnövekedés szabályozásában

Háttér: A sejtméret szabályozása inherens módon kapcsolódik a tápanyagok és növekedési faktorok jelenlétéhez, valamint függ a makromolekulák szintézise és lebontása közötti

egyensúlytól (*140*). A sejtek csak egy kritikus méret elérése után tudnak osztódni. Ezért a sejtnövekedés a proliferáció egyik előfeltétele, és abnormális szabályozása tumoros elváltozást okozhat. A sejtnövekedés és sejtosztódás fő szabályozó rendszerei az inzulin/IGF-1, TOR és TGF-β jelátviteli útvonalak (*58, 141, 142*). Az előző fejezetben láttuk, hogy az inzulin/IGF-1 útvonal és a TOR kináz az autofág géneken keresztül modulálják a *C. elegans* élettartamát. Ez a kapcsolat, valamint az autofágia makromolekula *turnover*ben játszott alapvető szerepe felvetette annak lehetőségét, hogy az autofág degradáció szükséges a normális sejtnövekedéshez. Ezzel a felvetéssel összhangban számos autofág génről igazolták rákos elváltozásokban kimutatható szerepüket (*33, 34, 141, 142*).

Eredmények: Életképes *C. elegans* autofág mutáns törzsek testméretét határoztuk meg (74, 149). Ebben az organizmusban a sejtek leszármazása invariáns, tehát a test határozott számú szomatikus sejtből épül fel (10). A testméret így szigorúan korrelál a sejtmérettel, és indikatív a sejtnövekedésre vonatkozóan. Számos testméret mutáns *C. elegans* törzset izoláltak korábban, amelyeket két nagy csoportba, a hosszú (Lon, *long*) és rövid (Sma, *small*) testméret fenotípus kategóriába soroltak (14, 143-148). E testméret változást okozó mutációk klónozása általában az inzulin/IGF-1 és TGF-β útvonalba tartozó komponenseket határozott meg.

Két autofág gén esetében tudtunk könnyen életképes mutáns felnőtteket vizsgálni. Az egyik az *unc-51/ATG1*, amely lf mutációi paralizált mozgású állatokat eredményeznek (*116*). A másik a *bec-1/ATG6*, amelynek inaktiválása embrionális életképtelenséget okoz, de a *bec-1(-); swEx[BEC-1::GFP]* genotípusú mozaik állatok egy jelentős része képes fertilis felnőttként fejlődni (a funkcionális BEC-1::GFP transzgén extrakromoszómális - instabil - elemként marad fent) (*117*). Az *unc-51(-)* mutáns és *bec-1(-); swEx[bec-1(+)]* genetikai mozaik törzsek egyaránt rövid testméretűek voltak (**41. ábra**) (*74, 149*).



41. Ábra. Az unc-51 és bec-1 autofág gének inaktiválása rövid (Sma) testméretet eredményez. A képeken fiatal felnőtt korú állatok láthatók. lon-1: egy TGF-β útvonal komponenst kódoló gén, lf mutációja Lon (hosszú) fenotípust eredményez. Az Ex[bec-1(+)] genotípus egy instabil, funkcionális bec-1 transzgént jelöl, amely részlegesen menekíti a bec-1(-) mutánsok életképtelenségét. A vonalak 0,1 mm-t jelölnek.

A továbbiakban ki szerettük volna zárni annak lehetőségét, hogy az *unc-51* mutáns és *bec-1(-); Ex[bec-1(+)]* mozaik állatok kicsi testmérete kevesebb sejtszámmal és nem kisebb sejtmérettel valósul meg. Ehhez bizonyos szövetek sejtszámát határoztuk meg. A bél pl. 20 sejtből épül fel, amelyek mindegyikében a *tra-1::gfp* és *prk-1::gfp* transzgének aktívak (**42. ábra**). A hipodermális sejtek számát egy *ajm-1::gfp* transzgén segítségével állapítottuk meg. A vizsgálatok minden esetben a vad típussal azonos sejtszámot mutattak.



42. Ábra. C. elegans autofág gének inaktiválása nem változtatja meg a sejtszámot. A, *tra-1::gfp* expresszió egy vad típusú állat bélsejtjeiben. B, tra-1::gfp unc-51(e369) expresszió egy mutáns állat bélsejtjeiben. C, prk-1::gfp expresszió egy unc-51(e369) mutáns belében. **D**, prk-1::gfp expresszió által jelölt garat mögötti bélsejtek kontúrjai (vonallal jelölve) egy vad típusú (fent) és egy unc-51(e369) mutáns (alul) állatban. Jól látható, hogy az unc-51(e369) mutáns állat bélsejtje rövidebb.

A testméret hosszának meghatározása után megmértük a mutáns állatok térfogatát is. Az *unc-51(-)* mutáns és *bec-1(-);* Ex[bec-1(+)] genetikai mozaik felnőtt állatok térfogata kisebb volt a vad típusnál (**3. táblázat**).

| 5. Tablazat. Az ane 51() es bee 1() mutans anatok terrogata kisebb a vad tipusnal. | | | | | | |
|--|-----------------|-------------------|----------------------|--------------|----|--|
| Genotípus | Testhossz | Átmérő | Térfogat | % | Ν | |
| | (mm) | (mm) | (mm ³) | testtérfogat | | |
| Vad típus | 1.2 ± 0.02 | 0.083±0.0015 | 0.00619 ± 0.0002 | 100 | 8 | |
| unc-51(e1189) | 0.86 ± 0.07 | 0.076±0.0013 | 0.0036 ± 0.00019 | 58.17 | 11 | |
| bec-1(ok700); | 1.02 ± 0.15 | 0.083 ± 0.001 | 0.0041 ± 0.0003 | 66.88 | 11 | |
| Ex[bec-1(+)] | | | | | | |

A testtérfogat meghatározását Kammenga és mtsi. szerint végeztük el (150). A mutánsok térfogata szignifikánsan kisebb a vad típusnál: P < 0.001, párosítatlan *t*-teszt. \pm átlagos eltérést jelöl.

Az autofág gének és a sejtnövekedést szabályozó útvonalak kapcsolatának meghatározásához episztázis elemzést végeztünk. A kettős mutánsokban a rövid testméretet eredményező autofág gén mutációkat kombináltuk a hosszú testméretet eredményező inzulin/IGF-1 vagy TGF-β mutációkkal. Mivel a kettős mutáns nem lehetett egyszerre hosszú

is meg rövid is, valamelyik fenotípusnak (vagy a Lon, vagy a Sma) episztatikusnak kellett lennie. Valóban, a kettős mutánsokban az autofág egyszeres mutánsok rövid (Sma) testmérete nyilvánult meg (**4. táblázat**) (74). Az autofág gének tehát episztatikusak a vizsgált inzulin/IGF-1 és TGF- β útvonal komponensek felett: egy útvonalban hatnak ezekkel a komponensekkel és közvetítik azok sejtnövekedést szabályozó hatását.

| Genotípus | | Testhossz (mm) | Ν | Fenotípus |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------|-----|-----------|
| Vad típus | | 1,28 ±0.07 | 241 | normál |
| unc-51(e369) | | $0,87{\pm}0,09$ | 266 | Sma |
| unc-51(e1189) | | $0,9{\pm}0,08$ | 304 | Sma |
| bec-1(ok691); Ex[bec-1 | l(+)] | $0,99{\pm}0,08$ | 157 | Sma |
| bec-1(ok700); Ex[bec-1 | l(+)] | 1,04±0,14 | 154 | Sma |
| lon-1(e185) | $[TGF-\beta]^1$ | $1,72\pm0,08$ | 228 | Lon |
| lon-2(e678) | $[TGF-\beta]^1$ | 1,51±0,09 | 243 | Lon |
| <i>dbl-1(+++)</i> | $[TGF-\beta]^1$ | $1,38\pm0,09$ | 252 | Lon |
| daf-2(e1370) | $[inzulin/IGF-1]^2$ | $1,36\pm0,08$ | 185 | Lon |
| unc-51(e1189); lon-1(e | 2185) | 1,12±0,1 | 288 | Sma |
| unc-51(e1189); dbl-1(- | +++) | $1,05\pm0,06$ | 279 | Sma |
| unc-51(e1189); daf-2(e | 21370) | $0,98{\pm}0,06$ | 250 | Sma |
| unc-51(e369); lon-1(e1 | (85) | $1,07\pm0,06$ | 225 | Sma |
| unc-51(e369); lon-2(et | 578) | 1,16±0,11 | 253 | nem-Lon |
| unc-51(e369); dbl-1(+ | ++) | $1,05\pm0,09$ | 265 | Sma |
| bec-1(ok691); Ex[bec-1 | l(+)]; lon-2(e678) | 1,1±0,22 | 47 | Sma |
| bec-1(ok691); Ex[bec-1 | l(+)]; dbl-1(+++) | 1,04±0,17 | 58 | Sma |
| bec-1(ok700); Ex[bec-1 | l(+)]; lon-2(e678) | 1,08±0,2 | 47 | Sma |
| bec-1(ok700); Ex[bec-1 | l(+)]; dbl-1(+++) | 1,12±0,13 | 42 | Sma |
| bec-1(ok700); Ex[bec-1 | l(+)]; lon-1(e185) | 1,08±0,1 | 65 | Sma |
| <i>bec-1(ok700)</i> ; Ex/bec- | 1(+)]; <i>daf-2(e1370)</i> | $1,02\pm0,09$ | 89 | Sma |

4. Táblázat. Az *unc-51* és *bec-1* autofág gének mutációi szuppresszálják az inzulin/IGF-1 és TGF-β mutánsok hosszú testméret fenotípusát.

¹TGF- β útvonal komponensek, ²inzulin/IGF-1 útvonal komponens. A *dbl-1(+++)* genotípus DBL-1-et túlexpresszáló törzset jelez. DAF-2: inzulin/IGF-1 receptor, DBL-1: TGF- β ligandum, LON-1: TGF- β citoplazmás jeltovábbító, LON-2: proteoglikán, amely negatívan szabályozza a DBL-1-et. Sma: kicsi testméret, Lon: hosszú testméret.

Az inzulin/IGF-1 útvonalhoz hasonlóan a TGF- β útvonal is részt vesz a *C. elegans* egyedfejlődésének szabályozásában. Bizonyos TGF- β útvonal defektív mutánsok normál körülmények között is *dauer* lárvaként fejlődnek (*dauer* konstitutív mutánsok), mások induktív körülmények között sem képesek *dauer* lárva állapotba fejlődni (*dauer* defektív mutánsok) (*94*). Mivel az inzulin/IGF-1 mutánsok dauer egyedfejlődése a DAF-16/FoxO transzkripciós faktor aktivitásától függ (**5.1. fejezet**; *91, 92*), ezért megnéztük, vajon a TGF- β *dauer* konstitutív mutánsok *dauer* egyedfejlődése szintén igényel-e DAF-16 aktivitást. Episztázis elemzésünk szerint a *daf-7* és *daf-1* TGF- β genetikai útvonal komponensek (TGF- β

ligandumokat kódolnak) lf mutációi olyan dauer állatokat eredményeznek, amelyek 2 héten belül elpusztulnak *daf-16(-)* mutáns genetikai háttérben [a *daf-7(-)* és *daf-1(-)* egyszeres mutáns *dauer* lárvák normálisan fél évig élnek] (**5. táblázat**) (*149*). Az inzulin/IGF-1 és TGF- β útvonalak tehát a DAF-16 szintjén egyesülnek, és feltehetően ezután konvergálnak az autofág génkaszkádra a sejtméret és egyedfejlődés szabályozásában.

| Genotípus | % dauer | n |
|----------------------------|---------|-----|
| Vad típus | 0 | sok |
| daf-16(m26) | 0 | sok |
| daf-16(mu86) | 0 | sok |
| daf-1(m40) | 100 | sok |
| daf-7(e1372) | 100 | sok |
| daf-1(m40); daf-16(m26) | 65.7 | 207 |
| daf-1(m40); daf-16(mu86) | 0 | 350 |
| daf-7(e1372); daf-16(m26) | 55.6 | 432 |
| daf-7(e1372); daf-16(mu86) | 2.5 | 280 |

5. Táblázat. A DAF-16/FoxO transzkripciós faktor szükséges a TGF-β mutánsok *dauer* egyedfejlődéséhez.

A vizsgálat 25°C-on történt. *Dauer* % volt meghatározva 2 héttel az embrionális kikeléstől számítva. *daf-7* és *daf-1*: TGF- β ligandumokat kódoló gének, *daf-16*: FoxO transzkripciós faktort kódoló gén.

Következtetések: Az *unc-51* és *bec-1* autofág gének inaktiválása kis testméretet (Sma fenotípust) eredményez (74). Mivel a mutáns fonalférgek sejtszáma normális, a kis testméret redukált sejtnövekedés (kis sejtméret) következménye. Az autofág gének – legalábbis az *unc-51* és *bec-1* – tehát szerepet játszanak a sejtnövekedés szabályozásában. Ez az autofágia egy új sejttani funkciója, amelyet számos parallel tanulmány megerősített (*151-153*). Feltehetően az autofágia makromolekula *turnover*t (elsősorban az elöregedett fehérjék degradációját) szabályozó funkciója teszi lehetővé a normális sejtméret kialakítását.

Az unc-51 és bec-1 deficiens állatok kis (Sma) testmérete episztatikus az inzulin/IGF-1 és TGF-β útvonal defektív mutánsok hosszú (Lon) testméret fenotípusa felett: az autofág gének mutációja blokkolja a nagy sejtméret kialakulását az inzulin/IGF-1 és TGF-β jelátviteli mutánsokban. A két sejtnövekedést meghatározó jelátviteli rendszer hatása tehát az autofág génkaszkádon konvergálódik (**43. ábra**). Elmondható, hogy a sejtnövekedés szabályozásában az autofág masinéria közvetíti e két hormonális tengely funkcióját (*74, 149*).

Mivel mind az inzulin/IGF-1, mind a TGF-β útvonal egyedfejlődést szabályozó szerepe DAF-16/FoxO függő (*149*), a két jelátvitel feltehetően ezen a szinten egyesül, és innentől kezdve közös tengely mentén hatnak az autofág gének aktivitására (**43. ábra**).

Alternatívaként elképzelhető, hogy a sejtnövekedés és dauer egyedfejlődés szabályozásában a TGF-β útvonal a DAF-16-tól *downstream* fejti ki autofág génaktivitást szabályozó hatását.



43. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok III. Az inzulin/IGF-1 és TGF-β útvonalak sejtnövekedést szabályozó hatása az autofág rendszeren konvergálódik. Az autofág gének funkciója közvetíti a két sejtnövekedést szabályozó útvonal hatását. DAF-2: inzulin/IGF-1 receptor, AGE-1: I típusú foszfatidil-inozitol 3-kináz, DAF-18/PTEN: foszfatáz és tenzin homológ, PDK: 3'-foszfoinozitid-függő protein kináz, AKT: protein kináz B, DAF-16: *forkhead*-típusú FoxO transzkripciós faktor, TOR: a rapamycin kináz célpontja, eIF-4E: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E, S6K: S6 kináz, DAF-7 és DBL-1: TGF-β ligandumok, DAF-1: I típusú TGF-β receptor, DAF-4 és SMA-6: II típusú TGF-β receptorok, SMAs: Smad fehérjék, LON-1: CRISP (cisztein-gazdag protein család) fehérje. "AUTOFÁGIA" autofág fehérjéket jelöl. A TGF-β receptorok aktivációkor dimerizálódnak. A nyilak aktiválási viszonyokat, a talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek. A piros szín az újonnan feltárt jelátviteli kapcsolatokat és sejtes funkciót jelöli. Lila szín: korábbi fejezetben (**26.** és **40. ábrákon**) bemutatott új jelátviteli kapcsolatok és sejtes funkció. A szaggatott vonal azt jelzi, hogy a gátlás vagy közvetlenül, vagy a DAF-16-on keresztül valósul meg.

5.2.5. Autofág fehérjék szerepe a neurodegenerációban

Háttér: Az idegsejtek tömeges nekrotikus pusztulása számos neurodegeneratív betegség (pl. Alzheimer, Parkinson és Huntington kór) jellemzője (*35, 154*). A nekrózist gyakran az idegsejtek membránjában lokalizált ioncsatornák hiperaktív működése váltja ki. Ezt hívják excitotoxikus nekrózisnak. A folyamat során az extracelluláris térből bejutó Na⁺ és Ca²⁺ ionok

endoplazmatikus (ER) stresszt okoznak. Ennek hatására az ER-ből nagymennyiségű Ca^{2+} szabadul fel és kerül a citoplazmába, ahol Ca^{2+} -függő kalpain és aszpartil proteázok aktiválódnak. Az aktiválódott proteázok aztán a sejt fehérjéit degradálják, végül a sejt elpusztul.

Az utóbbi évek kutatási eredményei rávilágítottak arra, hogy a nekrózis nem passzív folyamat, hanem számos fehérje működését igényli (44. ábra) (155). Ilyen fehérjék pl. a már említett proteázok. E fehérjék genetikai eszközökkel történő gátlása felfüggeszti a nekrotikus sejthalált. *C. elegans*-ban számos olyan ioncsatorna vagy receptor alegységet kódoló gén ismert, amelyek hiperaktív (gf) mutációja "programozott" módon idézi elő a hat darab mechanikai ingert érzékelő neuron (mechanoreceptor) pusztulását (156-158). Ilyen gének a *mec-4 (mechanosensory abnormality), deg-1 (degeneration of certain neurons*) és a *deg-3*. Érdekes módon a sejtek nekrotikus pusztulása a citoplazma tartalom degradációjával, jelentős membrán átrendeződéssel és vakuóla képződéssel jár együtt (44. ábra) (159). Ezek az eredmények, valamint az autofágia érintettsége számos neurodegeneratív betegségben (160), felvetették az autofág gének potenciális szerepét az excitotoxikus nekrózis folyamatában.



44. Ábra. Vakuolarizáció nekrotizáló neuronban. EM felvétel. Vac: vakuólum, ER: endoplazmatikus retikulum, M: mitokondrium. A rajz a nekrotikus sejthalál útvonalat mutatja. CLP-1 és TRA-3: kalpain proteázok, ASP-3 és ASP-4: aszpartil proteázok. Mivel egyik gén funkcióvesztéses mutációja sem okoz teljes penetranciájú pusztulást, a fehérjék parallel hatnak.

Eredmények: *mec-4(gf)*, *deg-1(lf)* és *deg-3(gf)* mutáns állatokban autofág géneket ínaktiváltunk, és vizsgáltuk a beavatkozás neurodegenerációra kifejtett hatását. A degenerálódó neuronok számát egyrészt egy *mec-4::gfp* riporter alkalmazásával kalkuláltuk (a *mec-4* az élő mechanoreceptorokban expresszálódik, így a GFP-pozitív sejtek számából következtethető az elpusztult sejtek száma), másrészt fénymikroszkóppal közvetlenül vizualizáltuk (a pusztuló sejtek morfológiailag felismerhetők) (**45. ábra**). Az *unc-51/Atg1*, *bec-1/Atg6* és *lgg-1/Atg8* autofág gének inaktiválása jelentősen szuppresszálta a pusztuló sejtek számát ezekben az excitotoxikus modellekben (**46-49. ábrák**). Egy transzlációs fúziós MEC-4::GFP riporter expresszióját megvizsgálva *bec-1* defektív állatokban azt tapasztaltuk, hogy a világító sejtek fluoreszcencia intenzitása összevethető a vad típusú háttérben tapasztalt értékkel. A BEC-1 tehát nem befolyásolja a *mec-4* transzkripcióját. A világító sejtek számának növekedése ezért nem egyszerűen a toxikus MEC-4 fehérje mennyiségének csökkenése, hanem a sejtek túlélése miatt következett be.



45. Ábra. Degenerálódó neuronok ioncsatorna hiperaktív *mec-4(gf)* mutáns törzsben. A, *mec-4::gfp* expresszió hat mechanoreceptor neuronban vad típusú genetikai háttérben. Egyedi neuronok (zöld pontok) jelölve. B, *mec-4::gfp* expresszió egy *mec-4(gf)* mutáns lárvában. Csak 3 darab neuron világít, ami 3 elpusztult neuronra utal (6-3=3). C, Degenerálódó PLMR neuron egy *mec-4(gf)* mutáns lárvában. A pusztuló sejt (PLMR) óriásira felfúvódik és fénymikroszkóppal könnyen azonosítható.



46. Ábra. Az *unc-51* inaktiválása csökkenti a degenerálódó neuronok számát ioncsatorna hiperaktív mutáns állatokban. Az *u231* és *u662* gf allélek, az *u506* lf allél. 200-200 állat vizsgálva mintánként, a változások mindenhol *P*<0,001, párosítatlan *t*-teszt.



47. Ábra. A *bec-1* inaktiválása csökkenti a degenerálódó neuronok számát ioncsatorna hiperaktív mutáns állatokban. A *mec-4(u231)* és *deg-3(u662)* gf allélek, a *deg-1(u506)* lf allél. A

bec-1(-), Ex[bec-1(+)] genetikai mozaikokat jelöl, amelyekben a *bec-1(-)* mutációk által okozott embrionális életképtelenséget egy instabil, funkcionális *bec-1::gfp* transzgén menekít. 200-200 állat vizsgálva mintánként, a változások mindenhol a kontrollokhoz képest P < 0,001, párosítatlan *t*-teszt.



48. ábra. Az *lgg-1* **gén csendesítése csökkenti a degenerálódó neuronok számát ioncsatorna hiperaktív mutáns állatokban.** Az *u231* és *u506* gf mutációk, *u662* lf allél. 200-200 állat vizsgálva mintánként, a változások mindenhol a kontrollokhoz képest *P*<0,01; párosítatlan *t*-teszt.



49. Ábra. Autofág gének inaktiválása csökkenti a neuronok pusztulását mec-4 gf mutáns állatokban. A túlélő neuronok számát a világító (mec-4::gfppozitív) neuronok száma alapján határoztuk meg. 200-200 állat vizsgálva mintánként, a változások mindenhol a kontrollokhoz képest P < 0,01; párosítatlan t-teszt. "Üres vektor": az RNSi kontrollja.

Megvizsgáltunk az lgg-l autofág gén aktivitását degenerálódó neuronokban, és azt találtuk, hogy jelentősen erősebb szinten expresszálódik a pusztuló, mint az intakt környező sejtekben (50. ábra) (75, 161). Ez azt sugallta, hogy az autofág géntermékek részt vesznek a degeneratív folyamat közvetítésében. Feltételezhető, hogy a pusztulás során végbemenő hozzájárul. fehérje degradációhoz az autofágia is Alternatív magyarázatként а autofág gének autofág folyamattól független multifunkcionális funkciója (pl. а vakuolarizációhoz szükséges membránképződés) kell a nekrózishoz.



50. ábra. Intenzív LGG-1/Atg8 expresszió egy degenerálódó neuronban. A nyilak egy pusztuló PVC neuronra mutatnak egy L2 stádiumú lárva farki régiójában. Bal oldali panel: Nomarski kép, középső panel: fluoreszcens kép, jobb oldali panel: egyesített kép.

A következőkben arra a kérdésre szerettük volna választ kapni, hogy az autofág gének csak a hiperaktív ioncsatorna mutációk által előidézett nekrotikus sejtpusztulásban vesznek specifikusan részt, vagy esetleg más típusú nekrotikus folyamatban is közreműködnek. A 6-hidroxidopamin (6-OHDA) neurotoxin szelektíven pusztítja a dopaminerg neuronokat *C. elegans*-ban (*162*). Ezekből az idegsejtekből három pár található a fejben (két pár CEP és egy pár ADE neuron) és egy pár a farki részben. Egy *dat-1::gfp* riporter gén specifikusan expresszálódik mindegyik dopaminerg neuronban (*162*). 6-OHDA-val kezelt autofág gén deficiens nematodákban jelentősen csökkent neuronpusztulást tapasztaltunk, összehasonlítva a vad típusú kezelt állatokkal (**51. ábra**) (*75, 161*).



51. Ábra. Az unc-51 autofág gén lf mutációja gátolja a dopaminerg neuronok pusztulását. A, dat-1::gfp-t expresszáló vad típusú állat fejében látható CEP (két pár) és ADE (egy pár) dopaminerg neuronok. A sejttestből kiinduló dendritek is GFP-pozitívak. **B**, Elhalt dopaminerg neuronok egy 6-OHDA kezelt vad típusú állatban. A dendritek már nem, csupán a sejttest maradványok láthatók. **C**, Dopaminerg neuronok egy unc-51(e369) mutáns állat fejében. **D**, Intakt dopaminerg neuronok egy 6-OHDA kezelt unc-51(e369) mutáns állat fejében. A grafikon az elpusztult dopaminerg neuronok arányát mutatja 6-OHDA kezelt állatokban. A fehér oszlopok a kontroll (víz) kezelést, a szürke oszlopok az 50mM 6-OHDA kezelést mutatják. P<0,01, párosítatlan t-teszt. N= 100 minden mintában. **Következtetések**: Autofág gének inaktiválása gátolja a neuronok pusztulását *C. elegans*-ban (*75, 161, 163*). E gének termékei feltehetően részt vesznek a nekrózishoz szükséges membrán átrendeződésben és a fehérjék degradálásában. Nekrotikus funkciójuk azonban ellentétes azzal, amit az autofágiáról eddig tudtunk: az autofágia alapvetően egy sejtprotektív folyamat, amely segít a sejt számára átvészelni a tápanyaghiányos állapotokat és részt vesz a károsodott sejtalkotók eltávolításában. Valószínűsíthető, hogy az autofág folyamat bazális aktivitása sejtvédő. Nekrózist indukáló körülmények során azonban az autofágia hiperaktiválódhat és ezáltal sejtölő funkciója realizálódhat. E feltételezéssel összhangban nemrég bizonyították az autofágia apoptózis-független sejthalál funkcióját a Drosophila egyedfejlődése során (*164*).

E fejezetben bemutatott eredményeink elsőként igazolták az autofág gének aktív szerepét egy sejthalál paradigmában. Ma már sokféle olyan neurodegeneratív kóresetet ismerünk, amelyekben az autofágia sejtgyilkoló funkciója kimutatott (*35*). Ide vonatkozó eredményeink az autofág géneket a nekrotikus sejthalál útvonalba helyezik el (**52. ábra**). Nemrég írtak le a H⁺-ATP-áz lizoszómális membránfehérje szerepét a nekrotikus folyamatokban (*165*). Feltételezhetően az autofág fehérjék ezen a szinten hatnak az útvonalban.



52. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok IV. Az autofágia feltételezett pozíciója a nekrotikus sejthalál útvonalban. Egyszerűség kedvéért az autofágia többi újonnan feltárt útvonal kapcsolatát itt nem tüntetem fel. Az autofágia feltételezett pozícióját az útvonalban a "?" jel mutatja. CLP-1 és TRA-1: kalpain proteázok; ASP-3 és ASP-4: aszpartil proteázok. "AUTOFÁGIA" autofág fehérjéket jelöl. A kaszkád aktiválódását a citolpazma Ca²⁺ koncentrációjának növekedése iniciálja. A piros felirat az újonnan feltárt sejttani funkciót jelöli.

5.2.6. Az autofágia és az apoptózis kapcsolata

Háttér: Az előző fejezetben az autofágia és a nekrózis kapcsolatáról írtam. A sejtpusztulás egy másik típusa az apoptózis, vagy genetikailag programozott sejthalál. Korábban (*3.1.4.* fejezet) bemutattam az apoptotikus kaszkád komponenseit, most röviden újra összefoglalom az útvonalat (**53. ábra**). Egy *upstream* szignál aktiválja a BH3-*only* EGL-1 fehérjét, amely az anti-apoptotikus CED-9 fehérjéhez kötődik és gátolja annak működését. A CED-9 a humán Bcl-2 (*B-cell lymphoma*) fehérje ortológja és a mitokondrium belső membránján lokalizált. A

CED-9 inaktiválódása az Apaf-1-szerű CED-4 fehérje aktiválódását eredményezi. Az aktív CED-4 a nukleáris membránhoz vándorol és aktiválja a terminális gyilkoló fehérjét, a CED kaszpázt (*22, 166, 167*).



53. ábra. A *C. elegans* apoptotikus útvonal központi része (Robert H. Horvitz Nobel előadásából másolva, 22). A bal oldali panelen az útvonalban szereplő fehérjék, alatta a humán ortológok találhatók. Jobb oldalon a CED-9 "élet-halál ura" fehérje funkciója: a CED-9 aktivitása véd a sejtpusztulástól. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást jelölnek. "on" aktív, "off" inaktív állapotot jelöl.

Az autofágia hiperaktiválódása nekrotikus sejthalálhoz vezethet *C. elegans* neuronokban (**50. ábra**). A humán autofág fehérje Beclin1 továbbá fizikailag kötődik a Bcl-2 fehérjéhez (féreg ortológja a CED-9) (*168*). E kísérleti adatok alapján felvetődött annak lehetősége, hogy az autofág gének szerepet játszanak a szabályozott (egyedfejlődés során kontrollált) vagy stressz-indukált sejthalál folyamatokban. A kérdést a Beclin1 *C. elegans* ortológjának, a BEC-1 fehérjének az analízisével közelítettük meg.

Eredmények: A *bec-1* gént csendesítettük, illetve izoláltunk két *bec-1* mutánst allélt, az *ok691*-et és az *ok700*-at (*117*). *bec-1* deficiens állatok az embrionális vagy a lárvális fejlődés különböző stádiumaiban pusztultak el. A *bec-1* tehát esszenciális az egyedfejlődéshez (**6.** táblázat).

| Allél | Homozigóta | Embrionális | Lárvális | Steril felnőttek |
|--------------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | mutánsok | életképtelenség | életképtelenség | |
| bec-1(ok691) | 2486 (100%) | 2301 (92,7%) | 178 (7%) | 8 (0.3%) |
| bec-1(ok700) | 2326 (100%) | 1979 (85.1%) | 342 (14.7%) | 5 (0.2%) |
| bec-1(RNSi) | 870 (100%) | 59 (6,8%) | 35 (4%) | ND |

6. Táblázat. A bec-1(-) mutánsok pleiotróp fenotípusa.

ND: nem meghatározott.

A *bec-1* mutáns embriókban nagy mennyiségű apoptotikus sejttest (*corpse*) volt megfigyelhető Nomarski optikával (**54. ábra**) (*117*). Az állatok továbbá súlyos morfogenetikai defektusokat mutattak. Szélsőséges esetben az embriók dezorganizált sejthalmazokhoz hasonlítottak. A korai embriógenezis során gyakori volt a citokinezis

defektus, azaz a sejtmagok osztódását nem követte sejtosztódás, és így sokmagvú sejtek alakultak ki (**54. ábra**). Ezekkel a fenotípusokkal egyezően a *bec-1* expressziós aktivitása (mRNS szintje) az embrionális fejlődés során volt a legintenzívebb.



54. Ábra. Korai *bec-1(-)* pleiotróp fenotípusok. A, *bec-1(ok691)* mutáns embrió, ~200 sejtes stádium. A nyilak apoptotikus testeket mutatnak (vad típusú embrióban csak 2-3 sejttest látható ebben a stádiumban). B, *bec-1(ok691)* mutáns embrió, ~100 sejtes stádium. Pusztuló sejtek sokasága. C, 2-sejtes vad típusú embrió. D, Korai *bec-1(ok700)* mutáns embrió, amely hasonló korú a C panelen mutatotthoz. Több sejtmag látható. Jobb oldalon egy egyedfejlődési *Northern blot.* A *bec-1* mRNS szintje az embriókban a legnagyobb. *act-1*: actin, az egyedfejlődés során konstans módon expresszálódó kontroll. *glp-1*: csíravonallal nem rendelkező mutáns. CeIF: csíravonalban is konstans módon expresszálódó gén. L1-4: lárvális stádiumok.

A *C. elegans* csírasejtek közel fele apoptotikus sejthalállal elpusztul az oocita érési fázis során (*169*). *bec-1(-)* mutánsokban tömegesen pusztuló csírasejteket (apoptotikus testeket) találtunk a hermafroditák gonádkarjaiban (**55. ábra**). A sejtek pusztulása apoptózissal ment végbe, mert a folyamatot a *ced-3* inaktiválása felfüggesztette (*117*).



55. Ábra. A *bec-1* autofágia gén csendesítése csírasejt apoptózist indukál. A, Egy vad típusú állat gonádkarja. A nyílhegy azt a régiót mutatja, ahol a csírasejtek normálisan elpusztulnak. Esetenként 2-3 pusztuló sejttest látható csak. B, Egy *bec-1(RNSi)* állat gondákarja. A nyilak sejttesteket mutatnak. Állatonként 10-15 sejttest látható. C, A CED-3 kaszpázt kódoló gén blokkolása meggátolja az apoptózist *bec-1(RNSi)* állatokban.





56. Ábra. A *bec-1* autofág gén inaktiválása apoptózist indukál. A, Apoptotikus sejttestek (*corpse*-ok) száma különböző embrionális állapotokban (300, 390 és 430 perces embriók). A *let-512* gén kódolja a Vps34 fehérjét, amely egy komplexben működik a BEC-1-gyel (*117*). WT: vad típus. RNAi=RNSi. **B**, Apoptotikus sejttestek száma gonádkarokban. *bec-1(RNSi)* állatokban az apoptózis CED-3 kaszpázfüggő módon megy végbe. **C-D**, TUNEL (apoptotikus sejtekre specifikus) festés vad típusú és *bec-1(ok700)* mutáns embrión. WT: vad típus. **E**, TUNEL-pozitív sejtek száma *bec-1* és *let-512* mutáns embriókban. **F-H**, CED-4 antitest festés vad típusú (VT), *ced-9(-); ced-3(-)* kettős mutáns és *bec-1(RNSi)* embriókon. A CED-4 intracelluláris lokalizációja a túlélő sejtekben citoplazmatikusan diffúz, az apoptotikus sejtekben perinukleáris mintázatot mutat. A kettős mutáns embriókban nincs apoptózis (CED-3 inaktív), de a CED-4 perinukleárisan lokalizált (nincs CED-9, ami a

mitokondriumban tartaná). A *bec-1(RNSi)* embrióban majdnem minden sejt perinukleáris CED-4 lokalizációt mutat.α-CED-4: antitest, DAPI: sejtmag festék.

Az apoptotikus sejtek kvantifikálását az embriók fejlődésének rögzítésével (*time lapse* mikroszkópia) és a gonádkarok Nomarski optikával történt elemzésével valósítottuk meg. A vizsgált autofágia deficiens embriókban és hermafrodita állatokban szignifikánsan több sejttestet detektáltunk, mint az azonos stádiumú vad típusú egyedekben. Ezekben az állatokban az apoptózis CED-3-függő módon – tehát a kanonikus útvonalon keresztül – ment végbe (**56. ábra**).

A CED-4 Apaf-1 fehérje perinukleáris lokalizációja szintén kitűnő marker az apoptotikus események detektálásához (*166*). *bec-1(RNSi*) embriókban a CED-4 akkumulációja jellemzően perinukleáris lokalizációt mutatott (**56. ábra**). A Vps34 egy komplexben működik a BEC-1-gyel (*117*). *let-512(RNSi*) embriókban szintén jelentősen megnövekedett az apoptózissal elpusztuló sejtek száma. Látható, hogy a *bec-1* (és kötődő partnere, a *let-512*) autofág gén hiánya apoptózist indukál; a BEC-1 a CED-9-hez hasonlóan egy anti-apoptotikus hatású fehérje. Fehérje-fehérje interakciós vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a BEC-1 és a CED-9 egy komplexben működve fejtik ki sejtvédő funkciójukat (**57. ábra**). Az apoptotikus és autofág útvonalak, amelyeket I és II típusú sejthalál útvonalaknak is neveznek, tehát e komplexen keresztül közvetlenül kommunikálnak egymással.



57. Ábra. A BEC-1 kötődik a CED-9 fehérjéhez. Felső panel: *in vitro pull down* kísérlet. 1 oszlop: *input* (10%-a annak a jelölt CED-9 fehérjének, amennyi a 2. és 3. oszlopokba volt töltve); 2. oszlop: jelölt CED-9 és GST (Glutation-S-transzferáz) önmagában; 3. oszlop: jelölt CED-9 és FBF::GST (negatív kontroll); 4. oszlop: jelölt CED-9 és BEC-1::GST együtt.

Alsó panel: A BEC-1::GFP fehérje ko-immunoprecipitációja CED-9-cel. 1. oszlop: vad típusú extraktum; 2-3. oszlopok: vad típusú extraktum egér IgG (2.) és anti-GFP (3.) antitesttel jelölve; 4. oszlop: bec-1(ok700);[bec-1::gfp+rol-6(su1006)] állatokból származó extraktum; 5. oszlop: bec-1(ok700);[bec-1::gfp+rol-6(su1006)] állatokból származó extraktum egér IgG (5.) és anti-GFP-vel (6.) jelölve.

Következtetések: *C. elegans*-ban a *bec-1* autofág gén genetikai eszközökkel történő inaktiválása apoptózist indukál embriókban és felnőtt hermafrodita állatok csíravonalában (*117*). Összhangban a mutáns fenotípussal, a BEC-1 kötődik a CED-9 anti-apoptotikus fehérjéhez. Ezt a kölcsönhatást humán sejtekben is leírták (*168*). Funkcióvesztéses *bec-1*

allélek embrionális életképtelenséget okoznak, ami a fehérje egyedfejlődésben betöltött esszenciális szerepére utal (a *ced-9* lf mutáns állatok szintén embrióként pusztulnak el; *170*). Ezek az adatok funkcionális – genetikai – evidenciát szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a két sejthalál útvonal egymással kommunikál (**58. ábra**). Összehangolt működésük teszi lehetővé az egyedfejlődés során feleslegessé vált sejtek, valamint a stresszhatások következtében elpusztuló sejtek hatékony eltávolítását.



52. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok V. Az autofág útvonal kölcsönhatása az apoptotikus kaszkáddal. Egyszerűség kedvéért az autofágia többi újonnan feltárt útvonal kapcsolatát itt nem tüntettem fel. Az autofágia nekrotikus útvonalban elfoglalt feltételezett pozícióját az "?" jel mutatja. CLP-1 és TRA-1: kalpain proteázok; ASP-3 és ASP-4: aszpartil proteázok. BEC-1: Beclin1 ortológ, EGL-1: BH3-only fehérje, CED-9: Bcl-2 fehérje, CED-4: Apaf-1 fehérje, CED-3: kaszpáz. "AUTOFÁGIA" autofág fehérjéket jelöl. A piros felirat az újonnan feltárt, a lila felirat a korábban feltárt sejttani funkciót jelöli.

Az **52. ábrán** jól látható, hogy a sejtpusztulásban szerepet játszó útvonalak az autofág rendszeren keresztül kölcsönhatási hálózatot alkotnak. A sejtek pusztulása tehát bonyolult molekuláris interakciók függvénye, amelyben mindhárom – nekrotikus, autofág és apoptotikus – útvonal érintett (*171*). E kölcsönhatások orvosbiológiai vonatkozása jelentős: számos tumoros elváltozás és neurodegeneratív betegség kontrollálatlan sejthalál folyamatok eredményeként alakul ki.

Az autofágia elsődlegesen sejtvédelmi funkciókra evolválódott mechanizmus. Feltehetően az autofág gépezet bazális aktivitása biztosítja a sejtek homeosztázisának fenntartását. Bizonyos körülmények között azonban az autofág funkciók csökkenése vagy hiperaktiválódása feltehetően sejtpusztuláshoz vezet vagy sejtpusztulást közvetít. Az autofágia tehát egy Janus arcú, kétélű rendszer: a sejtek védelme mellett a sejtpusztulás hatékony eszköze is (67, 161).

5.2.7. Addendum I: Az autofág gének szerepe az egyedfejlődésben és sejtpusztulásban

Háttér: Ebben a rövid fejezetben olyan autofágiával kapcsolatos eredményeket mutatok be, amelyek még nem kerültek teljes értékű publikációra, de inherensen kapcsolódnak az előző fejezetekhez. *C. elegans*-ban a pro-apoptotikus gének lf mutációi nem csökkentik az állat életképességét: *ced-3(-)* és *ced-4(-)* mutáns állatok – amelyekben egyébként 131 testi sejttel több van, mint a vad típusban – fertilis felnőttként tudnak fejlődni. Számos autofágia deficiens mutáns szintén normális embriógenezist mutat. Az *unc-51(-)* mutáns állatok paralizált, fertilis felnőttként fejlődnek, az *atg-18(-)* mutánsok jelentős része normális morfológiájú és viselkedésű állat, míg az *lgg-1(-)* mutáns állatok csak a korai lárvális állapotban pusztulnak el. Ezek alapján felmerült a kérdés, hogy a *C. elegans* korai (embrionális) egyedfejlődése miért nélkülönözheti az autofág és apoptotikus folyamatokat.

Eredmények: Apoptózis-autofágia deficiens kettős mutáns törzseket állítottunk elő, és azt tapasztaltuk, hogy a teljes funkcióvesztéses allélokat tartalmazó kettős mutánsok 100%-os penetranciájú embrionális életképtelen fenotípust mutatnak (**53. ábra**). Az autofág gének és az apoptotikus útvonal tehát redundánsan, egymást kiegészítve szabályozzák a *C. elegans* korai egyedfejlődését.



53. Ábra. Az autofág és apoptotikus gének szimultán inaktiválása embrionális életképtelenséget okoz C. elegans-ban. Az n1162 egy erős – genetikai null –, míg az n2273 egy gyenge – hipomorf –

ced-4 mutáció. *atg-18(gk378)* mutáns háttérben az *n1162* mutáció teljes, míg az *n2273* mutáció részleges embrionális életképtelenséget okoz. "let.": életképtelenség.

A fejlődésben megrekedt kettős mutáns embriókat súlyos fejlődési rendellenességekkel lehetett jellemezni (**54. ábra**). Ezek az embriók nem tudtak elongálni (megnyúlni), számos nagyméretű vakuolarizált struktúrát tartalmaztak (amelyek feltehetően az elpusztult sejtek helyén képződtek), és szöveteik mintázatképződése abnormális volt. A sejtek differenciációja (pl. garat-, bél-, hipodermális és izomsejtek) viszont normálisnak tűnt.



55. Ábra. Apoptózis-autofágia deficiens kettős mutáns embriók súlyos morfológiai rendellenességeket mutatnak. A: anterior (feji) vég, P: poszterior (farki) vég. V: vakuóla. A fehér nyílhegyek a garatot, a kicsi nyilak a bél autofluoreszcens granulumait jelölik. A kettős mutáns embriók életképtelenek.

A továbbiakban szekvencia elemzésnek vetettük alá az autofág gének szabályozó régióit, és az *lgg-1* és *bec-1* promóterekben konzervált CES-2/ATF-2 kötőhelyeket találtunk. A *ces-2* és az *atf-2* paralóg gének, a humán bZip-szerű transzkripciós faktorok féreg ortológjait kódolják (*172-174*). A CES-2 fehérje az apoptotikus útvonal *upstream* szabályozó faktora, az *egl-1* expreszióját befolyásolja (*173*). A CES-2 és ATF-2 fehérjék in vitro kötődtek az *lgg-1* és *bec-1* promóterekhez, és hiányuk befolyásolta az *lgg-1* és *bec-1* expresszióját.

Következtetések: Az autofág gének és az apoptotikus útvonal egymást kiegészítve szabályozzák a *C. elegans* korai egyedfejlődését. A két sejthalál útvonalat feltehetően egy közös – CES-2/ATF-2 közvetített – *upstream* szabályozó rendszer aktiválja. Ezek az eredmények felvetik a két sejthalál mechanizmus közös evolúciós eredetét, valamint további bizonyítékot nyújtanak az autofágia sejthalál funkciójára és esszenciális egyedfejlődési szerepére.

5.2.8. Az inzulin/IGF-1 útvonal szerepe a tanulási folyamatban

Háttér: Az értekezés EREDMÉNYEK fejezetének első nagy részét az inzulin/IGF-1 útvonal egy új biológiai funkciójának bemutatásával zárom. Ez a hormonális rendszer szabályozza az

öregedési folyamatot, a glükóz anyagcserét, a sejtek patogén baktériumokkal szembeni stresszválaszát és az egyedfejlődést számos állati taxonban (4). Érdekes módon néhány inzulin/IGF-1 funkció ivarspecifikus sajátossággal jellemezhető: C. elegans-ban pl. a hímek hosszabb ideig élnek a hímnőseknél, illetve ún. táplálék elhagyó (a táplálékként szolgáló baktérium pázsitból kimászó) viselkedést mutatnak (172, 173). Ráadásul az útvonal öregedést szabályozó funkciója az idegrendszerben fejti ki hatását (174). Ezek az eredmények felvetették az inzulin/IGF-1 rendszer asszociatív tanulási képességet szabályozó potenciális szerepét.

Eredmények: Először a hímek és hermafroditák asszociatív tanulási képességét hasonlítottuk össze egy jól definiált viselkedési modellben (56. ábra) (175). Ebben a kísérletben a hermafroditák szignifikánsan jobb asszociatív képességgel rendelkeztek a hímeknél (tanulmányunk ideje alatt jelent meg az a közlemény, amely a főemlősök tanulási képességében igazolt szexspecifikus különbségeket, 176). Vad típusú és him (high incidence of males) mutáns hímek egyformán viselkedtek a vizsgálatokban.



bat talm2031

-0,3

-0,5

-0,7

-0,9

vadtipus

681-21e1370)

□ Naiv

datizinati

681-21e1368)

Kondícionált

pdk-1(saTO9) dat 16 muB6)

39^{e-1}/17546)

dat-21e-1310/dat-16/mu80) 218131U1081-101111001 1218131U1081-10181-1-6 ADIAD

tenyésztettük tápanyag jelenlétében, majd NaCl mentes lemezekre tettük éheztetni. A kondicionált állatokat (NaCl hiányát társították éhezéssel) ezután helyeztük a tesztlemezekre, ahol a NaCl irányába mozdultak el. NaN₃: natrium-azid az állatokat megbénítja (könnyebb számolás). B, Vad típusú és him (high incidence of *males*; nagy %-ban szegregálnak

hímeket) mutáns hímek kevésbé tudták a tápanyaghiányt a NaCl hiányával társítani: a hímek kondicionálás után is gyakran a NaCl mentes hely felé mozogtak. C, Inzulin/IGF-1 jelátvitel deficiens mutáns állatok nem tudták a tápanyag hiányát társítani a NaCl hiányával. Inzulin/IGF-1 jelátvitelben hiperaktív mutánsok [*daf-18(-)* mutánsok; a *daf-18* a féreg PTEN-t kódolja, amely az inzulin/IGF-1 jelátvitel negatív szabályozója]. DAF-2: inzulin/IGF-1 receptor, AGE-1: I típusú PI3K, PDK: 3'-foszfoinozitid-függő protein kináz, DAF-16: FoxO transzkripciós faktor. Kemotaxis index: N_N - N_C/N_T , ahol N_N : NaCl felé vándorló állatok száma; N_C : kontroll (NaCl-mentes) terület felé vándorló állatok száma.

Ezután inzulin/IGF-1 deficiens és hiperaktív mutáns törzsek tanulási képességét vizsgáltuk. Az előbbiek tanulási képessége csökkent, a hiperaktív mutánsok tanulási képessége nőtt ("okosabbak voltak") a vad típusú állatok képességével összehasonlítva (**56. ábra**). Az útvonal tehát szerepet játszik a tanulási folyamat szabályozásában. Végül inzulin/IGF-1 útvonal mutáns hermafrodita és hím állatok tanulási képességét határoztuk meg (**57. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy a DAF-2/IGF-1 receptor csökkent funkciója megszüntette a vad típusban tapasztalható asszociatív tanulási képességben megnyilvánuló nemek közötti



különbséget.

56. Ábra. A *C. elegans* asszociatív tanulási képességében megfigyelhető szex különbségek *daf-2(-)* mutációkkal szuppresszálhatók. Herm.: hermafrodita. P < 0,001, párosítatlan *t*-teszt.

Következtetések: A hermafrodita fonalférgek asszociatív tanulási képessége jobb, mint a hímeké. Ez a nemek között megfigyelhető érdekes különbség konzervált módon megtalálható a főemlősökben, így az

emberben is (176). A hermafrodita nematodák jobb tanulási képessége inzulin/IGF-1 jelátviteli aktivitást csökkentő mutációkkal szuppresszálható. Sőt, az inzulin/IGF-1 jelátvitelben hiperaktív *daf-18/PTEN* lf mutánsok a vad típusnál "okosabb" fonalférgek. Mindent összevetve, a tanulási folyamat szabályozása az inzulin/IGF-1 jelátvitel egy újonnan feltárt biológiai funkciója. Az útvonal effektor faktorai között feltehetően megtaláljuk az autofág masinériát is, ezáltal az életkor, táplálékellátottság és egyéb fiziológiai és környezeti faktorok tanulási folyamatot befolyásoló szerepe jobban megérthetővé válik.
5.3. A LIN-39 HOX fehérje szerepe a C. elegans vulva fejlődésben

5.3.1. A Notch jelátviteli útvonal transzkripciós kontrollja

Háttér: A *C. elegans* vulvaszövetének kifejlődése kitűnő kísérletes paradigma a sejtsors meghatározás tanulmányozásához. A korai lárva stádiumokban a hermafrodita állat középső része egy zárt "cső", melynek ventrális falát később a fejlődő vulva struktúra megnyitja. A vulva hat darab vulva prekurzor sejt [VPC-k vagy P(3-8).p] egy csoportjából, a három centrális helyzetű VPC-ből [P(5-7).p] fejlődik ki, a másik három VPC [P(3,4,8).p] a vulva fejlődés során nem indukálódik. A vulva fejlődés indukciója az L3 lárva stádium elején megy végbe négy jelátviteli rendszer – a Ras, Wnt, Notch és synMuv útvonalak – koordinált működésének eredményeként. E jelátvitelek hatására a VPC-kben három különböző sejtsors alakul ki szigorú mintázat alapján: a P(3-8).p sejtekben $3^{\circ}-3^{\circ}-2^{\circ}-1^{\circ}-2^{\circ}-3^{\circ}$ sejtsors mintázat jön létre (az indukált VPC-ket aláhúztam)¹². A 2° vulva sejtsorsot a LIN-12/Notch jelátvitel determinálja. *lin-12* lf mutáns hermafroditákban az indukált VPC-k mindegyikében 1° sejtsors alakul ki ($3^{\circ}-3^{\circ}-1^{\circ}-1^{\circ}-3^{\circ}$), ami Pvl (*Protruding* - kitüremkedő) vulva fenotípusban nyilvánul meg (**57. ábra**). *lin-12* gf mutánsokban viszont mindegyik VPC-ben 2° sejtsors alakul ki ($2^{\circ}-2^{\circ}-2^{\circ}-2^{\circ}-2^{\circ}-2^{\circ}-2^{\circ}$), ami 6 pici vulva kitüremkedést, azaz Muv (*Multivulva*) fenotípust eredményez (*23, 78, 83*).



57. Ábra. *lin-12(-)* **mutáns állatokban nem alakul ki 2° vulva sejtsors.** Felül: vad típusú L4 lárva (balra) és felnőtt állat (jobbra) vulva struktúrája. A bal oldali kép alatt az indukált VPC-k [P(5-7).p] sejtleszármazása. L: longitudinális (anterior-poszterior) osztódási sík, T: transzverzális (jobb-bal) osztódási sík, N: nem osztódó sejt. Az indukált VPC-k sejtsors mintázata: 2°-1°-2°. Jobb oldali képen

¹² 1°: elsődleges sejtsors, 2°: másodlagos sejtsors, 3°: harmadlagos sejtsors.

nyíl mutatja a vulva normális morfológiáját és pozícióját. Alul: *lin-12(-)* mutáns L4 lárva (balra) és felnőtt állat (jobbra) vulvaszövete. A baloldali kép alatt az O jelentése: ferde osztódási sík. Mindhárom indukált VPC-ben 1° sejtsors alakul ki (1°-1°-1°), L4 stádiumban a vulva "beszakad", felnőtt korban a vulva kitüremkedik (Pvl) a test síkjából (nyíl).

A LIN-12/Notch jelátvitel a VPC-kben komplex módon generálódik (79, 177, 178). Kezdetben mindhárom indukált VPC [P(5-7).p] egyaránt expresszál ligandumot (LAG-2) és receptort (LIN-12) is. Később a ligandum termelés csak a P6.p-re, a receptor termelés a szomszédos P5.p-re és P7.p-re korlátozódik. Így végül a LIN-12/Notch útvonal a P(5,7).p sejtekben aktiválódik, ahol csökkenti a Ras jelátvitel hatását (**20. ábra**) (84). Ennek eredményeként a P(5,7).p sejtekben 2° vulva sejtsors alakul ki. Hogy milyen mechanizmus aktiválja a LIN-12/Notch jelátvitelt a vulva indukció során mai napig nem ismert.

A vulva mintázatképződés központi szabályozó faktora a *lin-39 Hox* gén (90). LIN-39 hiányában a VPC-k már az L1 lárva stádiumban fuzionálnak a hipodermisszel (179). *lin-39(-)* mutánsokban ezért nem történik vulva indukció, az állatok Vul (*Vulvaless*) fenotípusúak lesznek. A LIN-39 működésének kofaktora a CEH-20/Pbx/Exd fehérje: a LIN-39 és CEH-20 egy komplexben működik (180, 181). *ceh-20* hipomorf mutánsokban a vulva részlegesen indukálódik, ezért ezek az állatok alkalmasak a LIN-12/Notch jelátvitel vulva-specifikus analízisére.

Eredmények: *ceh-20* mutáns alléleket izoláltunk (EMS kezelést követően szex-mioblaszt migrációban defektív állatokra szelektáltunk) (**7. táblázat**) (*90*). Funkcióvesztéses *ceh-20* mutációk az L2 lárva stádiumban állították meg az egyedfejlődést. Funkció csökkenést okozó *ceh-20* mutációk fertilis, de abnormális vulva morfológiájú (Pvl vagy Egl – *egg-laying defective* – fenotípusú) állatokat eredményeztek (**58 ábra**). Ezen állatokban nem alakult ki 2° vulva sejtsors.

| ceh-20 allél | Molekuláris változások | Fenotípus |
|-------------------|---|-------------------------------|
| ay9, ay35 | ay9: Met78Ile | SM, Egl |
| ay34, ay36 | <i>ay34</i> : Arg189Cys, <i>ay36</i> : Leu79Ser | SM, Egl, Unc |
| ay13, ay42, n2513 | ay42: Pro214Leu | SM, Egl, Unc, lassú növekedés |
| ay37, ay38 | ay38: Glu102-STOP | Letális |

7. Táblázat. ceh-20 mutánsok fenotípusa.

SM: szex-mioblaszt migrációs defektív, Egl: pete lerakásban defektív, Unc: paralizált mozgású.

ceh-20(ay9) mutáns állatokban a 2° sejtsors hiányát egy EGL-17::GFP riporterrel is igazoltuk (**58. ábra**). Vad típusú álatokban az EGL-17 specifikusan a 2° vulva sejtekben expresszálódik az L4 lárva stádium során (*181*). *ceh-20(ay9)* mutáns L4 lárvákban azonban

nem tapasztaltunk EGL-17 expressziót a P(5,7).p sejtekben. Néhány *ceh-20(ay9)* mutáns állatban a normálisnál több VPC indukálódott, aminek eredményeként 2-3 vulva struktúra is kifejlődött. Érdekes módon az ektopikusan indukálódott vulva sejtekben intenzíven expresszálódott az EGL-17::GFP riporter, míg a normális helyzetű vulvában nem volt detektálható szintű EGL-17::GFP expresszió (nem volt 2° sejttípus).



58. Ábra. ceh-20 hipomorf mutánsok vulva fenotípusa. A, Vulva struktúra egy vad típusú L4 lárvában. A kép alatt az indukálódott VPC-k sejtsorsát tüntettem fel. **B**, Vulva struktúra egy *ceh-20(ay9)* mutáns L4 lárvában. Ebben az állatban a P(5,7).p sejtek nem indukálódtak (3° seitsorsot alakítottak ki). C-D, Ektopikus vulva indukció ceh-20(ay9) mutáns L4 lárvában és felnőtt állatban. A normál vulva nyíllal, az ektopikus vulva nyílheggyel jelölve. E, EGL-17::GFP expresszió egy vad típusú L4 lárvában. Az EGL-17 specifikusan

expresszálódik a 2° leszármazottakban. **F**, EGL-17::GFP expresszió egy *ceh-20(ay9)* mutáns L4 lárvában. A normális pozíciójú vulvában nem, az ektopikusan aktiválódott vulvában (nyílhegy) expresszálódik az EGL-17.

A *ceh-20(a9)* mutánsok abnormális vulva morfológiája tehát a 2° sejtek hiánya miatt alakult ki; ezt az egyedi VPC-k indukciójának kvantifikálásával is igazoltuk (**8. táblázat**). A 2° sejtsors hiányának két oka lehet. Egyrészt a VPC-k ektopikusan fuzionálnak a hipodermisszel még az L1 lárva stádium során (valójában nem is alakulnak ki VPC-k) (*182*), másrészt a kialakult P(5,7).p sejtekben nem tud 2° sejtsors specifikálódni. Egy adherens sejtkapcsolatra specifikus *ajm-1::gfp* (*adherent junction molecule*) riporter (*183*) segítségével

| o. Tablazat. A CEII-20 | . Tablazat. A CEII-20 manya csokkenti a 2 vulva sejtek muukciojat. | | | | | | | | | |
|--|--|-----------------------------|------|------|------|------|----|--|--|--|
| Genotípus | | Egyedi VPC-k indukciója (%) | | | | | | | | |
| | Р3.р | P4.p | P5.p | P6.p | P7.p | P8.p | Ν | | | |
| Vad típus | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 60 | | | |
| ceh-20(ay9) | 0 | 0 | 20,7 | 95,2 | 9,5 | 0 | 63 | | | |
| ceh-20(RNSi) | 4,5 | 9 | 36,3 | 72,7 | 27,3 | 13,6 | 44 | | | |
| <i>lin-39(n1872^{ts})</i> (25°C) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 60 | | | |
| <i>lin-39(n1872^{ts})</i> (15°C) | 0 | 0 | 68,4 | 89,4 | 42 | 0 | 57 | | | |

8. Táblázat. A CEH-20 hiánya csökkenti a 2° vulva sejtek indukcióját.

ts: hőmérséklet érzékeny. ceh-20(RNSi) állatokban ektopikus vulva indukció is történhet.

megállapítottuk, hogy a VPC-k egy része a hipodermisszel fuzionált, egy másik részük azonban intakt módon megmaradt a korai L3 lárva stádiumig (**59. ábra**). A 2° sejtek hiányában tehát mindkét alternatíva szerepet játszhatott.



59. Ábra. *ceh-20(ay9)* mutánsokban a VPC-k ektopikusan fuzionálnak a hipodermisszel. A VPC-k kontúrját egy *ajm-1:gfp* riporterrel tettük láthatóvá. A vad típusban a VPC-ket

[P(3-8).p] számozással és nyíllal jelöltem. A *ceh-20(ay9)* mutáns állatban csak 2 darab VPC [P(5,6).p] nem fuzionált a hipodermisszel.

A következőkben egy transzlációs fúziós CEH-20::GFP riporter rendszert állítottunk elő, és megvizsgáltuk a CEH-20 expressziós mintázatát. A vulva indukció előtt a CEH-20 mindegyik VPC-ben expresszálódott, míg az indukciót követően expressziója a P(5,7).p leszármazottakra korlátozódott (**60. ábra**). Ez a mintázat jellemző a LIN-12 vulva-specifikus expressziójára (*177, 178*).



60. Ábra. CEH-20 expressziója a VPC-kben és leszármazottaikban. Felül: A CEH-20::GFP konstrukció szerkezete. Szürke hasábok: exonok, összekötő vonalak: introni szekvenciák, GFP: zöld fluoreszcens fehérje, ATG: transzlációs iniciációs pont, TAA: STOP kodon, UTR: nem transzlálódó régió. Középen: CEH-20 expresszió a vulva indukció idején (korai L3 lárva stádium). Nyilak a VPC-kre mutatnak. A VPC-k közötti GFP-pozitív sejtek a ventrális idegdúc neuronjai. Alul: CEH-20 expresszió a vulva indukció után. Csak a P(5,7).p leszármazottak GFP-pozitívak.

Eddigi eredményeink felvetették annak lehetőségét, hogy a *ceh-20* – és természetesen a *lin-39 Hox* gén – befolyásolja a LIN-12/Notch jelátvitel 2° vulva sejtsorsot meghatározó aktivitását. A LIN-12 egy másik jól ismert funkciója a gonadális *anchor* sejt (AC) számának meghatározása (*184*). Ezért megvizsgáltuk azt, hogy a *ceh-20* befolyásolja-e az AC számát. *lin-12(-)* mutáns háttérhez hasonlóan a *ceh-20(ay9)* állatokban nem egy, hanem két AC fejlődött (**61. ábra**).



L4

L4

mutatnak. A képek a Nomarski optikával készült és a megfelelő fluoreszcens felvételek egyesítésével készültek.

Megnéztük a csökkent CEH-20 aktivitás hatását lin-12 gf mutáns állatokban is. A lin-12(n137gf) mutáció mindegyik VPC-ben 2° sejtsorsot alakít ki és önálló vulva fejlődést indukál: a mutáns állatok Muv fenotípusúak (83). A ceh-20 és lin-39 gének funkciójának csökkenése jelentősen gátolta a vulva indukciót lin-12(n137gf) mutáns hermafroditákban (9. táblázat). A LIN-12 aktivitása a P(5,7).p sejtekben tehát CEH-20- és LIN-39-függő.

9. Táblázat. A ceh-20 és lin-39 gének inaktiválása gátolja a vulva indukciót lin-12(n137gf) mutáns állatokban.

| Genotípus | % Muv | A vulva indukció átlagos száma | Ν |
|---------------------------|-------|--------------------------------|----|
| Vad típus | 0 | 1 | 20 |
| lin-12(n137) | 100 | 5,1 | 60 |
| lin-12(n137) ceh-20(ay9) | 14,7 | 1,53 | 68 |
| lin-12(n137) lin-39(RNSi) | 33,3 | 2,73 | 60 |

Az n137 allél egy lin-12 funkciónyeréses (gf) mutációt reprezentál.

E funkcionális adatok után – amelyek valószínűsítették a LIN-39 transzkripciós faktor lin-12 expressziójára kifejtett hatását – konzervált LIN-39 kötőhelyet kerestünk a lin-12 promóterében bioinformatikai eszközökkel. Meglepetésünkre nemcsak a lin-12, hanem a ligandumot kódoló lag-2 gén szabályozó régiója is tartalmazott potenciális LIN-39 kötőhelyet. Ezért először megnéztük a lin-12 és lag-2 gének expresszióját vad típusú vs. ceh-20(ay9) mutáns genetikai háttérben. Mindkét gén transzkripciója jelentősen redukálódott ceh-20(ay9) mutáns állatokban (62-63. ábrák).

Az expressziós vizsgálatok után kromatin immunoprecipitációs (ChIP) analízissel igazoltuk, hogy a LIN-39/CEH-20 komplexnek legalább az egyik tagja, a LIN-39 képes kötődni a lin-12 és lag-2 szabályozó régiókhoz in vivo (64-65. ábrák). Mindent összevetve ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a LIN-12/Notch-közvetített laterális jelátvitel - és ezáltal a 2° sejtsorsok specifikációja – közvetlenül a LIN-39/CEH-20 HOX/EXD komplex transzkripciós kontrollja alatt áll. A *lin-39* VPC-specifikus expresszióját a Ras (induktív) jelátvitel szabályozza. Ezért a LIN-12/Notch-közvetített laterális jel végső soron az induktív jel által – a *lin-39*-en keresztül – aktiválódik.



62. Ábra. A *lin-12* VPC-specifikus expresszióját a CEH-20 és LIN-39 fehérjék szabályozzák. A, Egy *lin-12::lacZ* riporter rendszer expressziója egy vad típusú genetikai hátterű L3 lárvában. A VPC-ket fehér nyílhegyek jelölik. B, *lin-12::lacZ* expresszió egy *ceh20(RNSi)* L3 lárvában. Az expresszió teljesen eltűnt. C, Egy LIN-12::GFP riporter VPC-specifikus expressziója vad típusú (fehér oszlopok), *ceh-20(ay9)* mutáns (fekete oszlopok) és *lin-39(RNSi)* (szürke oszlopok) állatokban. 100-100 állatot vizsgáltunk mintánként. Az expressziót a korai L3 lárva stádiumban (vulva indukció ideje alatt) határoztuk meg. A VPC-ket az X tengelyen tüntettem fel [P(3-8).p].



63. Ábra. A lag-2 VPCspecifikus expresszióját a **CEH-20** és **LIN-39** a befolvásolja. A-B, LAG-2::GFP expresszió vad típusú háttérben a vulva indukció előtt (A, minden VPC GFPpozitív) és után (B, csak a P6.p GFP-pozitív). Nyilak a GFP-pozitív VPC-ket jelölik. Fluoreszcens képek. C-D. LAG-2::GFP expresszió а vulva indukció alatt vad típusú (**C**) és *ceh-20(ay9)* mutáns (**D**) háttérben. Fluoreszcens és megfelelő Nomarski (DIC) képek egyesítése. A VPC-ket nyilak jelölik, P6.p kiemelve. LAG-2::GFP E, VPCspecifikus expressziója vad típusú (fehér oszlopok), ceh-(fekete 20(av9)mutáns oszlopok) és lin-39(RNSi)

(szürke oszlopok) állatokban. 100-100 állatot vizsgáltunk mintánként. Az expressziót a korai L3 lárva stádiumban (vulva indukció ideje alatt) határoztuk meg. A VPC-ket az X tengelyen tüntettem fel [P(3-8).p].



64. Ábra. A LIN-39 kötődik a *lin-12* **promóterhez** *in vivo***.** Felül a *lin-12* promóterben található potenciális LIN-39 kötőhelyek pozícióját tüntettem fel. Alul a ChIP kísérlet eredménye. M: molekula marker, LIN-39: LIN-39 antitest, AB: antitest, VT: vad típus.



65. Ábra. A LIN-39 kötődik a *lag-2* promóterhez *in vivo*. A, Potenciális LIN-39 kötőhelyek a *lag-2* promóterben. B, ChIP kísérlet LIN-39 antitesttel. Inp: input, AB, antitest, M: molekula marker, VT: vad típus, *lin-39*: *lin-39(n1790)* mutáns. C, Az (A) panelen kékkel jelölt LIN-39 kötőhely konzerváltan található meg két közel-rokon fajban, a *C. elegans*-ban és a *C. briggsae*-ben. Az aláhúzott nukleotidok a LIN-39 kötőhelyet jelölik.

Következtetések: *ceh-20* hipomorf mutáns és *lin-39* géncsendesített állatokban 2° vulva sejtek nem fejlődnek ki (*90, 182*). A 2° vulva sejtsors specifikációját a LIN-12/Notch laterális jel határozza meg. Ezen eredményekkel összhangban a LIN-39/CEH-20 HOX/EXD transzkripciós komplex közvetlenül szabályozza a *lin-12* és *lag-2* gének expresszióját a VPC-kben (a *lin-12* a Notch receptort, a *lag-2* a Notch ligandumot kódolja) (*90*).

A *lin-39* szabályozó régiója integrálja a Ras és Wnt útvonalak induktív jelét (**20. ábra**) (82, 88). Hatásukra a LIN-39 bazális szintje megnövekszik az indukált VPC-kben [P(5-7).p], és aktiválja a *lin-12* és *lag-2* gének expresszióját. Egy bonyolult visszacsatolási lépés után (184) a *lag-2* a P6.p-ben, a *lin-12* a P(5,7).p sejtekben expresszálódik. Így a LIN-12/Notch

útvonal végül az induktív (Ras) jel hatására aktiválódik a P(5,7).p sejtekben (**66. ábra**). E két sejtben a LIN-12/Notch jelátvitel csökkenti a Ras útvonal vulva indukáló funkcióját (*84*). Mindezen szabályozási kölcsönhatások eredményeként a P(5,7).p sejtekben nem 1° sejtsors, hanem 2° sejtsors alakul ki. Az indukálódott VPC-k sejtsors mintázata végül 2°-1°-2° lesz. LIN-12/Notch hatás nélkül (*lin-12* lf mutánsokban) mindegyik indukálódott VPC-ben 1° sejtsors differenciálódik (1°-1°-1°).



66. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok VI. A LIN-39 HOX fehérje közvetlenül szabályozza a LIN-12 Notch receptort és LAG-2 Notch ligandumot kódoló gének expresszióját a vulva indukció során. A piros gömbök Ras útvonal komponenseket, a kék gömbök Notch útvonal komponenseket, a zöld gömbök Wnt útvonal komponenseket, a szürke gömb a synMuv útvonalakat (A, B és C) jelölnek. A *lin-39 Hox* gén integrálja a Ras, Wnt és synMuv útvonalak jeleit a VPC-kben. E jelátvitelek koordinált hatására LIN-39 fehérje akkumulálódik a VPC-kben. A CEH-20 nincs feltüntetve. A P(5,7).p-ben a LIN-39 transzkripcionálisan aktiválja a Notch jelátvitelt, amely csökkenti a Ras induktív jel hatását e sejtekben. Eredményeként a P(5,7).p sejtekben 2° sejtsors alakul ki. A jobb alsó sarokban a modellt egyszerűsítve ábrázoltam (bekeretezve). Wnt: Wingless, synMuv: szintetikus *Multivulva*. ATG: transzlációs iniciációs hely. Az újonnan feltárt jelátviteli kapcsolatot piros nyíl jelöli. Nyilak aktiválást, talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek.

5.3.2. A LIN-39/HOX szex-specifikus szabályozása

Háttér: A *C. elegans* vulva egy ivar-specifikus szerv: csak a hermafrodita állatokban fejlődik ki. E jelenség mögött meghúzódó szabályozási mechanizmus nem ismert. *C. elegans*-ban a hermafrodita (a szomatikus sejtek két ivari kromoszómát tartalmaznak; XX) és hím (a szomatikus sejtek egy ivari kromoszómát tartalmaznak; XO)¹³ egyedek közötti szexuális különbségek kialakítását a szex-determinációs kaszkád teremti meg (**67. ábra**). Ez az útvonal köti össze a kariotípust az ivari fenotípussal azáltal, hogy szabályozza a szexuálisan dimorf szövetek fejlődését. Az útvonal két szegmensre osztható: *upstream* része párhuzamosan szabályozza a dóziskompenzációt¹⁴ és a szex-determinációt, biztosítva ezzel a két folyamat összehangolását. A HER-1 (*hermaphroditization of XO animals*) fehérjével kezdődő ún. *downstream* szegmens már kizárólag a szex-determinációért felelős. A szex-determinációs útvonal alapvetően egy gátlási lépésekből felépülő kaszkád, aminek hatása a terminális TRA-1A (*transformer*) transzkripciós faktor aktivitásán összegződik (*185-188*).

Szex-determináció



XO:AA = 0.5 - XOL-1 - SDCs - HER-1 - TRA-2 - FEMs - TRA-1A- Hím

67. Ábra. A *C. elegans* szex-determinációs kaszkád. Alapvetően a kariotípus dönti el az egyed nemét. Hermafroditákban két ivari kromoszóma (XX), hímekben egy ivari kromoszóma (XO) található a szomatikus sejtekben. Az ivari kromoszómán (X) található gének egy része (pl. *sex-1/2*, *fox-1*) gátolja a szexuális differenciációt szabályozó "mester" kapcsoló gén, a *xol-1* (*XO lethal*) aktivitását. Az autoszómákon (A) ezzel szemben *xol-1*-et aktiváló gének (pl. *sea-1,2,3*) találhatók. Hermafroditákban a két X-ről érkező gátló jel "erősebb" az autoszómális aktiváló jeleknél, ezért a *xol-1* represszálódik. Hímekben az egy X-ről érkező gátló jel nem tudja felülírni az autoszómák aktiváló hatását, így a *xol-1* transzkripciósan aktív lesz. A *xol-1* tehát hímekben aktív, hermafroditákban inaktív. A *xol-1* aktivitási állapota dönti el a kaszkád komponenseinek aktivált/gátolt viszonyát. A jel végül a TRA-1A terminális transzkripciós faktorra kerül. A TRA-1A hermafroditákban aktív (gátolja a hím-specifikus géneket), hímekben inaktív. Alul az útvonal komponenseinek gátlási viszonya. A

¹³ Az "XO" jelölésben a "O" kromoszóma hiányt jelöl.

¹⁴ A dóziskompenzáció az a mechanizmus, amely biztosítja, hogy az ivari kromoszómákon található gének azonos szinten expresszálódjanak a két nemben.

nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást jelölnek. Fekete szín aktív állapotot, szürke szín inaktív állapotot jelöl. Az XX::AA=1 arány hermafrodita, az XO::AA=0,5 arány hím fejlődést határoz meg.

A HER-1 egy kis szekretált fehérje, ami a hím fejlődést segíti elő azáltal, hogy köti a sejtek membránjában elhelyezkedő TRA-2A fehérje extracelluláris doménjét, így gátolva annak működését (**68. ábra**). A folyamatban más fehérjék is részt vesznek, mint például a TRA-3 kalcium-függő proteáz. A TRA-2A gátolja a citoplazmatikus FEM (*feminization*) fehérjéket. A FEM fehérjék a CUL-2 (*cullin*) fehérjével együtt egy *ubiquitin* komplex létrehozására képesek, amely felismeri TRA-1A N-terminális régióját és lebontja a fehérjét. Ha a FEM komplex működése gátolt, a TRA-1A fehérjéből C-terminálison hasított foszfoizoforma keletkezik, ami a sejtmagba jutva transzkripciós faktorként működik.



68. Ábra. A *C. elegans* szex-determinációs kaszkád működése. Az útvonal terminális transzkripciós faktora a TRA-1A fehérje, amelynek aktivitása dönti el, hogy hermafrodita (TRA-1A aktív) vagy hím (TRA-1A inaktív) fejlődés történjen. A FEM-1, FEM-2 és FEM-3 fehérjék egy diverz fehérjecsaládot alkotnak: a FEM-1 ankirin-domén ismétlődéseket tartalmaz, a FEM-2 egy szerin/treonin fehérje foszfatáz, a FEM-3 pedig szerkezete alapján nem sorolható egyetlen ismert csoportba sem. A boxok között a szex-determinációs génkaszkád látható. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást jelölnek.

A TRA-1A transzkripciós faktor a humán Glioma-kapcsolt fehérjék (GLI) és a Drosophila Cubitus interruptus (Ci) fehérje féreg ortológja (189). A GLI és Ci fehérjék a Hedgehog (Hh) jelátvitel effektor transzkripciós faktorai (186). Mivel *C. elegans*-ban a szomatikus szexuális differenciáció a TRA-1A transzkripciós faktor kontrollja alatt áll,

felvetődött annak lehetősége, hogy a vulva fejlődés egy vagy néhány kulcsgénjét a TRA-1A közvetlenül szabályozza.

Eredmények: Néhány TRA-1A transzkripciós célgént az utóbbi években azonosítottak (*190-194*). E gének ismert kötőhely szekvenciája alapján egy konszenzus TRA-1A kötőhelyet határoztunk meg (**69. ábra**) (*196*), majd ez alapján a *C. elegans* genomban potenciális TRA-1A kötőszekvenciákat kerestünk. A továbbiakban kizárólag azokkal a kötőhelyekkel foglalkoztunk, amelyek gének szabályozó régióiban helyezkedtek el. 42 ilyen *C. elegans* gént találtunk. A következő lépésben a *C. elegans* genomban azonosított lehetséges TRA-1A célgének szabályozó régióit hasonlítottuk össze egy közel-rokon faj, a *C. briggsae* megfelelő ortológ génjeinek genomi környezetével. Amennyiben mindkét fajban hasonló pozícióban van jelen a TRA-1A kötőhely, az a szabályozó mechanizmus evolúciós konzervációjára, vagyis a szekvencia funkcionális voltára utal. A C. *briggsae* célgének lehetséges kötőhelyeit figyelembe véve a potenciális célgének listája 21 génre szűkült (**F3. Táblázat**).



69. Ábra. A TRA-1A konszenzus kötőszekvenciája. A felsorolt gének ismert TRA-1A célgének. *Genome Enhancer* és *Open Genomics* programokat használtuk. Az alsó sor a konzerváció mértékét mutatja.

Listánkon az egyik potenciális célgén a *lin-39* volt (195). Mivel a *lin-39* a vulva fejlődés központi szabályozó faktora, megvizsgáltuk a *tra-1(-)* mutánsok vulva morfológiáját. *tra-1(e1488)* hipomorf mutáns és *tra-1(RNSi)* állatok jellegzetes vulva defektust mutattak (**70. ábra**) (195). A *tra-1(e1488)* mutánsok "interszex" fenotípusúak, azaz egyszerre hordoznak hermafrodita és hím nemi jellegeket. Ezekben az állatokban a hím párzószerv mellet Pvl fenotípusú (*lin-12* lf mutáns-szerű) vulva fejlődött. Hasonló vulva morfológiát mutattak a *tra-1(RNSi)* állatok is. A TRA-1A funkció csökkenése a 2° vulva sejtek hiányához vezetett, ami tipikus *lin-12*, illetve *lin-39/ceh-20* lf mutáns vulva fenotípus (az előzőekben láttuk, hogy a LIN-39/CEH-20 komplex szabályozza a *lin-12* expresszióját).



70. Ábra. TRA-1A deficiens állatok vulva morfológiája. A, Egy tra-1(e1488) mutáns interszex állat. A nyíl a kitüremkedő vulva struktúrát, a nyílhegy a hím párzószervet mutatja. **B**, EGL-17::GFP expresszió egy vad típusú L4 lárvában. A riporter a 2° sejtekben expresszálódik (alul jelölve). **C**, EGL-17::GFP expresszió egy tra-1(e1488) mutáns L4 lárvában. A P5.p leszármazottakban nem expresszálódik az EGL-17, tehát ezekben a sejtekben nem differenciálódott 2° sejtsors. **D**, A kísérletekben használt tra-1 RNSi konstrukciók. A zöld sávok a tra-1 cDNS szekvenciákat, a kettős nyilak az RNSi konstrukciók által lefedett szekvenciákat jelölik. A tra-1 génről két transzkriptum képződik, a tra-1a és a tra-1b. A tra-1a RNSi konstrukció a tra-1a cDNS szekvenciára specifikus.

Mivel a *tra-1(-)* mutáns állatok vulva morfológiája nagyon hasonlított a *lin-12(-)* mutánsokéhoz, megvizsgáltuk a *tra-1* inaktiválás hatását *lin-12(n137)* gf mutáns háttérben. A *lin-12(n137gf)* mutánsok Muv fenotípusúak (mind a hat VPC-ben 2° sejtsors alakul ki). Átlagos vulvaszámuk szignifikánsan emelkedett *tra-1* deficiens genetikai háttérben (**71-72. ábrák**).



71. ábra. A tra-1 funkció befolyásolja a vulva indukciót lin-12(n137gf/+) mutáns állatokban. Az n137 mutáció szemidomináns: a heterozigóta állatok is Muv fenotípusúak (a VPC-kben 2° vulva sejtsors specifikálódik). Kontroll: lin-12(n137gf/+) mutánsok átlagos vulvaszáma. A fem-3 inaktiválása tra-1 hiperaktivációhoz vezet (a fem-3 negatív regulátora a tra-1-nek, **67. ábra**). A kontrollhoz képest mindenhol P<0,001; párosítatlan t-teszt.



72. ábra. A tra-1 inaktiválása fokozza a vulva indukciót lin-12(n137gf) mutáns állatokban. A, Egy tra-1(RNSi) állat Pvl vulva morfológiája. A nyíl a kitüremkedő vulvát mutatja. B, Ektopikus vulva indukció egy tra-1(RNSi) állatban. A normális pozíciójú vulva mellett két másik vulva kitüremkedés is megfigyelhető (nyilak). C, A tra-1 csendesítése ektopikus vulva indukciót okoz egy lin-12(n137gf) mutáns állatban. A piros nyilak azokat a vulvákat mutatják, amelyek egyébként sosem indukálódnak lin-12(n137gf) egyszeres mutáns állatokban. A hím farki struktúrát nyílhegy mutatja (a tra-1 inaktiválás interszex fenotípust eredményez). Alsó panel: A tra-1 csendesítése "szuper" Muv fenotípust okoz lin-12(gf) mutáns háttérben. lin-12(gf) mutáns hermafroditákban maximum hat, lin-12(gf) mutáns hímekben maximum hét, míg lin-12(gf); tra-1(RNSi) "kettős mutáns" állatokban maximum kilenc vulva struktúra fejlődhet.

A *tra-1* deficiens állatok karakterisztikus (*lin-12* lf mutáns-szerű) vulva fenotípusa felvetette a *tra-1* lehetséges funkcióját a VPC-kben. Egy funkcionális GFP::TRA-1 transzgén (*197*) expressziós mintázatát megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a *tra-1* aktív mindegyik VPC-ben, bizonyos VPC leszármazottakban, illetve a hipodermiszben is, amelyből a *synMuv* útvonalak erednek (**73. ábra**) (*198*).



Ábra. 73. TRA-1A akkumuláció a VPC-kben. A, Egy L3 stádiumú lárva. Felül: Nomarski kép, a VPC-ket nyílhegyek mutatják. Alsó kép: a felső képnek megfelelő fluoreszcens kép. VPC-ket а nyílhegyek jelölik. B, Egy fiatal felnőtt állat fluoreszcens képe. A nyilak vulva sejteket, а nyílhegyek hipodermális sejteket mutatnak. C, GFP::TRA-1 pozitív VPC-k %-os meghatározása az L3 lárva stádiumban.

Bioinformatikai vizsgálatok alapján a TRA-1A potenciális transzkripciós faktora a *lin-39*-nek. Gélretardációs (EMSA, *electromobility shift assay*) kísérlettel igazoltuk, hogy a TRA-1A képes a *lin-39* promóterhez kötődni *in vitro* (**74. ábra**). Teljes hosszúságú *tra-1* cDNS-ről szintetizált TRA-1A fehérje megkötötte a vad típusú promóter elemet, de nem tudott kötni a kötőhelyben mutációt tartalmazó promóter elemhez. A TRA-1A tehát szekvencia-specifikus módon kötődik a *lin-39* szabályozó régiójához.



74. Ábra. A TRA-1A szekvencia-specifikusan kötődik a *lin-39* promóterhez *in vitro*. A, *lin-39* genomi környezet. A kék hasábok exonokat, az összekötő vonalak intronokat jelölnek. ATG: transzlációs iniciációs pont. Pirossal jelöltem a promóterben lévő potenciális TRA-1A kötőhely pozícióját. B, A TRA-1A kötőhely konzervált a *C. elegans* és *C. briggsae lin-39* promóterekben. C, Gél-retardációs vizsgálat eredménye. Sorok jelentése: 1: szabad *egl-1* oligo, 2: *egl-1* oligo + lizátum, 3: *egl-1* oligo + TRA-1A + Zn²⁺, 4: *lin-39* oligo + lizátum, 5: *lin-39* oligo + TRA-1A + Zn²⁺, 6: mutáns *lin-39* oligo + lizátum, 7: mutáns *lin-39* oligo + TRA-1A + Zn²⁺, 8: szabad *lin-39* oligo. Oligo: oligonukleotid. *egl-1*: egy ismert TRA-1A célgén (kontroll). A TRA-1A funkciója Zn²⁺ iont igényel.

A fehérje-DNS kötési vizsgálat után *in vivo* is ellenőriztük, hogy a TRA-1A befolyásolja-e a *lin-39* expresszióját a VPC-kben. Ehhez egy funkcionális LIN-39::GFP riporter rendszer VPC-specifikus expresszióját vizsgáltuk meg vad típusú vs. *tra-1(-)* mutáns genetikai háttérben. *tra-1(-)* mutánsokban a LIN-39 detektálhatóan nagyobb mennyiségben halmozódott ezekben a sejtekben (**75. ábra**). Ez azt jelenti, hogy a *lin-39* expresszióját a

TRA-1A, és azon keresztül a szex-determinációs génkaszkád negatívan szabályozza a vulva fejlődés során.



75. Ábra. A LIN-39 VPC-kben történő akkumulációját a TRA-1A befolyásolja. A, LIN-39 expresszió egy XO kariotípusú (hím) vad típusú L3 stádiumú lárvában. A P(3-8).p sejteket nyilakkal jelöltem. Felül: Nomarski kép, alul: megfelelő fluoreszcens kép. A P(3-8).p sejtekben bazális LIN-39 szint detektálható. **B**, LIN-39 expresszió egy XX kariotípusú (hermafrodita) *tra-1(e1099)* mutáns L3 stádiumú lárvában. Felül: Nomarski kép, alul: fluoreszcens kép. A P(3-8).p sejtekben a LIN-39 szintje megnövekedett a vad típusban mért szinthez képest. Az *e1099* allél egy teljes funkcióvesztéses mutációt reprezentál, az XX kariotípusú állat szómáját hím típusúvá transzformálja. **C**, A LIN-39 fehérje relatív mennyisége az egyedi VPC-kben (vad típus vs. mutáns összehasonlításban).

Következtetések: *C. elegans*-ban a vulvaszövet a hermafrodita állatokban fejlődik ki. A szomatikus sejtek ivari dimorfizmusát a szex-determinációs útvonal szabályozza. E megállapításokkal konzisztensen a szex-determinációs kaszkád TRA-1A terminális faktora befolyásolja a vulvaszövet mintázatképződését: *tra-1* aktivitás hiányában nem fejlődnek ki 2° típusú vulvasejtek (*195*). A 2° vulva sejtsors meghatározását a LIN-12/Notch laterális jelátvitel, annak transzkripciós aktivitását pedig a LIN-39/CEH-20 HOX/EXD komplex kontrollálja. A vulva indukció során a TRA-1A csökkenti a LIN-12 jelátvitel működését. A TRA-1A továbbá kötődik a *lin-39* promóterhez *in vitro*, és befolyásolja a LIN-39 mennyiségét a P(3-8).p sejtekben. A TRA-1A által közvetített jelátviteli rendszer (a szex-determinációs kaszkád) tehát egy újonnan feltárt vulva sejtsorsot szabályozó útvonal (**76. ábra**).

A vulva fejlődés során a *lin-39* szabályozó régiója fogadja és integrálja a Ras, Wnt, SynMuv és szex-determinációs útvonalak jeleit, majd ennek hatására adott mennyiségű LIN-39 fehérje képződik a VPC-kben: az indukálódó VPC-kben magas, a nem indukálódó VPCkben alacsony lesz a LIN-39 mennyisége. A P(5,7).p-ben a LIN-39 aktiválja a LIN-12/Notch jelátvitelt, amely aztán csökkenti a Ras útvonal indukáló hatását ezekben a sejtekben. Végeredményként a P6.p-ben magas, a P(5,7).p-ben közepes, a P(3,4,8).p-ben alacsony lesz a LIN-39 szintje. Ezek a LIN-39 szintek figyelemre méltó korrelációt mutatnak a VPC-kben kialakuló sejtsorsokkal.

A szex-determinációs rendszer Notch jelátvitelre kifejtett szabályozó hatását nemrég Drosophilában is felismerték (199). Ez a szabályozási hálózat feltehetően konzerváltan működik még a filogenetikailag távoli taxonokban is.



76. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok VII. A szex-determinációs kaszkád egy újonnan meghatározott vulva fejlődést szabályozó útvonal. A TRA-1A – és ezen keresztül a szex-determinációs kaszkád – szabályozza a *lin-39 Hox* gén expresszióját a vulva indukció során. A piros gömbök Ras útvonal komponenseket, a kék gömbök Notch útvonal komponenseket, a zöld gömbök Wnt útvonal komponenseket, a szürke gömb a synMuv útvonalakat (A, B és C), a barna gömbök szex-determinációs útvonal komponenseket jelölnek. A *lin-39 Hox* gén integrálja a Ras, Wnt, synMuv és szex-determinációs kaszkádok jeleit a VPC-kben. E jelátvitelek koordinált hatására LIN-39 fehérje akkumulálódik a VPC-kben. A P(5,7).p-ben a LIN-39 transzkripcionálisan aktiválja a Notch jelátvitelt, amely csökkenti a Ras induktív jel hatását e sejtekben. A jobb alsó sarokban a modellt egyszerűsítve ábrázoltam (bekeretezve). Wnt: Wingless, synMuv: szintetikus *Multivulva*. ATG: transzlációs iniciációs hely. Az újonnan feltárt jelátviteli kapcsolatot piros szín, a korábban bemutatott új útvonal kapcsolatokat lila szín jelöli. Nyilak aktiválást, talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek.

5.3.3. Addendum II: A C. elegans HOX fehérjék redundáns működése

Háttér: A LIN-39 HOX fehérje (és CEH-20 kofaktora) központi szerepet játszik a vulva fejlődést irányító jelátviteli hatások koordinálásában (**76. ábra**). A LIN-39 jelenléte azonban szükséges, de nem elégséges feltétele a vulva fejlődésnek: a *lin-39* VPC-specifikus hiperaktiválása nem eredményez ektopikus vulva indukciót, azaz Muv fenotípust (*88, 89*). Ez a megfontolás felvetette egy másik – feltehetően *Hox* – gén redundáns szerepét a vulva fejlődés koordinálásában. E rövid fejezetben erre a kérdésre vonatkozó, de még teljes értékű publikációra nem került adatainkat foglalom össze.

Eredmények: A *ceh-13* gén a Drosophila *labial* és emlős *HoxB1* anterior *Hox* gének *C. elegans* ortológja (77. ábra) (200). Az anterior *Hox* gének az egyedfejlődés során az elsőként expresszálódó és anterior testtájon kifejeződő komponensei a *Hox* klasztereknek (201). Ezzel az általános megfigyeléssel szemben – amit kolinearitási elvnek is neveznek – azt találtuk, hogy a *ceh-13* minden testtájon expresszálódik az embrionális és posztembrionális fejlődés során (78. ábra).



77. Ábra. A *C. elegans* és *Drosophila Hox* klaszterek komponensei. Piros szín: anterior paralógok, sárga és zöld szín: középső paralógok, kék szín: poszterior paralógok. Az azonos színek ortológokat jelölnek. A kék kettős nyíl a *ceh-13* és *lin-39* között bekövetkezett inverziót mutatja. A nyilak a *Hox* paralógok expressziós és funkcionális doménjét mutatják.

E szokatlan expressziós mintázattal összhangban a *ceh-13(-)* mutánsokban vulva fejlődési defektusokat (Pvl, Muv fenotípust) detektáltunk (**79. ábra**), valamint a *ceh-13* mutációs inaktiválása csökkentette a vulva indukciót *synMuv AB* kettős mutáns állatokban (**10. táblázat**). Ezek a vulva fenotípusok a *lin-39* hipomorf mutánsokra jellemzőek (*87, 90*). A *ceh-13* inaktiválása továbbá két olyan sejtsors meghatározási paradigmát is befolyásolt, amelyek szintén LIN-39 szabályozás alatt állnak. Egyrészt a Q neuroblaszt utódsejtek vándorlása, másrészt a Pn.p blaszt sejtek hipodermisszel történő fúziója volt abnormális *ceh-13(-)* mutáns állatokban (**80 ábra**).



78. Ábra. A *ceh-13* anterior *Hox* gén a test minden nagyobb doménjében kifejeződik. *C. elegans Hox* gének expressziós mintázata "two-fold" állapotú embriókban. A *ceh-13* expressziós doménje átfed a *lin-39* doménjével. A: anterior, P: poszterior.



79. Ábra. *ceh-13(sw1)* mutánsok abnormális vulva morfológiája. Felnőtt mutáns állatokat vizsgáltunk. A nyilak kitüremkedő (Pvl) vulva struktúrát mutatnak, a nyílhegy egy ektopikusan indukált vulvát jelöl.

| 10. | Táblázat. | А | <i>ceh-13(-)</i> | mutációk | csökkentik | a | vulva | indukciót | synMuv | AB | kettős |
|-----|-------------|----|------------------|----------|------------|---|-------|-----------|--------|----|--------|
| mu | táns háttér | be | n. | | | | | | | | |

| Genotípus | Átlagos vulvaszám | Ν |
|---|-------------------|------|
| Vad típus | 1.0 | 1050 |
| <i>ceh-13(sw1)</i> | 1,2 | 955 |
| lin-8(n111); lin-15B(n765 ^{ts}) | 3,89 | 327 |
| <i>lin-53(n833); lin-15A(n765^{ts})</i> | 3,67 | 165 |
| <i>ceh-13(sw1); lin-8(n111); lin-15B(n765^{ts})</i> | 2,29 | 344 |
| <i>ceh-13(ok737); lin-8(n111); lin-15B(n765^{ts})</i> | 3,04 | 70 |
| <i>ceh-13(sw1); lin-53(n833); lin-15A(n765^{ts})</i> | 2,81 | 162 |

ts: termoszenzitív allél. A *lin-8* és *lin-15A synMuv A* gének, a *lin-15B* és *lin-53 synMuv B* gének.

lin-39(-) mutáns hermafroditákban a Q neuroblaszt sejt leszármazottai nem tudnak anterior irányba vándorolni, illetve a P(3-8).p sejtek (aktuálisan a VPC-k) ektopikusan fuzionálnak a hipodermisszel (182). *ceh-13(-)* mutáns hermafroditákban a Q sejt leszármazottak szintén nem vándorolnak anterior irányba. A Lin-39 sejtfúziós fenotípussal ellentétben azonban a Pn.p sejtek hipodermisszel történő fúzióját a CEH-13 aktivitás hiánya fokozta.



80. Ábra. A *ceh-13* befolyásolja a Q neuroblasztok vándorlását és a Pn.p blaszt sejtek fúzióját. Mindkét folyamat *lin-39* által szabályozott. A bal oldali paneleken *mec-7::gfp* expresszió látható vad típusú és *ceh-13(sw1)* mutáns háttérben. Az AVM vad típusban a fej felé vándorol, *ceh-13(sw1)* mutánsban a test közepén marad. A nyilak két Q leszármazottat mutatnak: AVM és PVM. A jobb oldali paneleken a Pn.p sejtek fúziója látható *ajm-1::gfp* riporter segítségével. Vad típusú háttérben (felül) a hat centrális Pn.p sejt [P(3-8).p] nem fuzionált a hipodermisszel, a többi Pn.p sejt fuzionált. *ceh-13(sw1)* mutáns L2 lárvában (alul) a P(3-8).p sejteken túl más Pn.p sejtek sem fuzionáltak a hipodermisszel. A nem fuzionált Pn.p sejteket nyilak jelölik.

Következtetések: A *ceh-13* egy különleges *Hox* gén. Expressziós és funkcionális doménje nem illeszthető a kolinearitási elvbe. Az anterior testtájon túl a test középső doménjében is számos sejtfunkciót kontrollál. Részt vesz a vulva mintázatképződés, az anterior irányú sejtvándorlás (Q neuroblaszt) és a sejtfúzió (Pn.p sejtek) szabályozásában. Ezeket a folyamatokat a *lin-39 Hox* paralóg is befolyásolja. Feltételezhető tehát, hogy a vulva sejtsorsok kialakításában és a vulva indukció szabályozásában a CEH-13 és LIN-39 HOX fehérjék redundánsan vesznek részt (a *lin-12* szabályozó régiója szintén tartalmaz konzervált CEH-13 kötőhelyet) (**81. Ábra**).



81. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok VIII. A CEH-13 és LIN-39 HOX fehérjék feltehetően együtt szabályozzák a *C. elegans* vulva fejlődést. Piros szaggatott nyíl: újonnan feltárt, de még nem publikált (elbírálás alatt lévő) jelátviteli kapcsolat. Lila szín: korábbi fejezetekben bemutatott új jelátviteli kapcsolatok. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást jelölnek.

5.4. tra-1 funkciók feltárása

5.4.1. A tra-1 egy synMuv B gén

Háttér: Az 5.3.2. fejezetben láttuk, hogy a TRA-1A negatívan szabályozza a *lin-39* expresszióját a vulva fejlődés során (195). Hasonló hatásuk van a synMuv útvonalaknak is

(76. ábra). A három synMuv útvonal (A, B és C) egymást kiegészítve (redundánsan) működik a vulva fejlődés represszálásában: egyszeres synMuv útvonal mutánsokban vad típusú vulva fejlődik, míg bármelyik két synMuv útvonal egyidejű inaktiválása ektopikus vulva indukciót, azaz Muv fenotípust eredményez (*80, 81, 86*). A synMuv gének változatos funkciójú fehérjéket kódolnak (*86*). A *synMuv B* gének azonban kitüntetetten kromatin szabályozó faktorokat határoznak meg. Ezek közé tartoznak például a NuRD nukleoszóma átalakító és hiszton deacetiláz komplex tagjai, mint amilyen a Retinoblasztóma (Rb) fehérje is. Érdekes módon a TRA-1A-val fizikai interakciót mutató TRA-4 fehérjét synMuv B komponensként azonosították (*202*). Felvetődött tehát a *tra-1* potenciális kapcsolata a synMuv rendszerekkel.

Eredmények: Megvizsgáltuk a *tra-1* RNSi-közvetített csendesítésének és hiperaktiválásának hatását *synMuv AB* kettős mutáns állatokban. A csökkent *tra-1* aktivitás fokozta, míg a megnövekedett *tra-1* aktivitás gátolta a vulva indukciót *synMuv AB* kettős mutánsokban (11. Táblázat).

| unutonount | | | |
|---|-----------|-----|----------|
| Genotípus | Átlagos | Ν | Р |
| | vulvaszám | | |
| Vad típus | 1,0 | 210 | - |
| tra-1(RNSi) | $0,4^{a}$ | 378 | - |
| fem-3(e2006) | 1,0 | 200 | - |
| fem-3(RNSi) | 1,0 | 670 | - |
| <i>lin-15(n767); dpl-1(n2994)</i> [synMuv AB] | 4,2 | 100 | - |
| fem-3(e2006); lin-15(n767); dpl-1(n2994) | 3,6 | 100 | < 0,0001 |
| <i>lin-38(n751); lin-36(n766)</i> [synMuv AB] | 3,3 | 100 | - |
| tra-1(RNSi); lin-38(n751); lin-36(n766) | 3,9 | 170 | < 0,0001 |
| fem-3(RNSi); lin-38(n751); lin-36(n766) | 3,0 | 100 | < 0,001 |
| <i>lin-8(n111); lin-35(n745)</i> [synMuv AB] | 3,3 | 100 | - |
| tra-1(RNSi); lin-8(n111); lin-35(n745) | 4,0 | 48 | 0,004 |
| fem-3(RNSi); lin-8(n111); lin-35(n745) | 2,7 | 35 | < 0,0001 |
| <i>lin-38(n751); dpl-1(n3643)</i> [synMuv AB] | 3,3 | 105 | - |
| tra-1(RNSi); lin-38(n751); dpl-1(n3643) | 3,7 | 36 | 0,025 |
| fem-3(RNSi); lin-38(n751); dpl-1(n3643) | 2,9 | 100 | < 0,001 |
| <i>lin-8(n111); lin-36(n766)</i> [synMuv AB] | 3,5 | 100 | - |
| tra-1(RNSi); lin-8(n111); lin-36(n766) | 4,5 | 100 | < 0,0001 |
| fem-3(RNSi); lin-8(n111); lin-36(n766) | 2,8 | 100 | < 0,0001 |

11. Táblázat. A *tra-1* aktivitása befolyásolja a vulva indukciót *synMuv AB* kettős mutáns állatokban.

^aA *tra-1(RNSi)* állatokban megfigyelhető redukált vulva indukció annak eredménye, hogy az állatok ventrális része (ahol a vulva szövet normálisan képződik) maszkulinizálódik. A *fem-3(e2006)* mutáció *tra-1* hiperaktivitást eredményez (a *fem-3* gátolja a *tra-1* működését; **67. ábra**). *synMuv B* gének: *dpl-1, lin-36* és *lin-35; synMuv A* gének: *lin-8, lin-15* és *lin-38*.

A *tra-1(e1099)* funkcióvesztéses mutációnak, amely az XX állatokat hímekké transzformálja, hasonló vulva indukciót serkentő hatása volt *synMuv AB* kettős mutáns állatokban (**12. táblázat**). Ez azért is figyelemre méltó, mert a *tra-1* inaktiválása hím típusúvá transzformálja (maszkulinizálja) az állat ventrális részét, és a VPC-k ezáltal nem vagy alig alakulnak ki. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a *tra-1* parallel vagy egy útvonalban hat a *synMuv* génekkel a vulva sejtsorsok kialakításában.

| mutans XX pszeudo nim egyedekben. | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------|--------------|-----------|-----|--------|--|--|--|
| Genotípus | Kariotípus | Szexuális | Átlagos | Ν | Р | | | |
| | | fenotípus | vulvaszám | | | | | |
| Vad típus | XX | hermafrodita | 1 | 56 | - | | | |
| Vad típus | XO | hím | 0 | 100 | - | | | |
| lin-8(n111); lin-35(n745) | XX | hermafrodita | 3,75 | 100 | - | | | |
| lin-8(n111); lin-35(n745) | XO | hím | 0,65 | 144 | - | | | |
| tra-1(e1099); lin-8(n111); | XX | hím | 1,21 | 100 | < | | | |
| <i>lin-35(n745)</i> | | | | | 0.0001 | | | |

12. Táblázat. A *tra-1* funkció hiánya serkenti a vulva indukciót *synMuv AB* kettős mutáns XX pszeudo hím egyedekben.

A hármas mutánsok 17,3%-ában nem fejlődik vulva (az e1099 mutáció maszkulinizáló hatása miatt). A P értéket (párosítatlan t-teszt) a kettős mutáns XO hímek és a hármas mutánsok összehasonlításával számoltuk.

Végül megvizsgáltuk a *tra-1* inaktiválás hatását synMuv A és B egyszeres mutánsokban. A *tra-1* funkció hiánya vagy csökkent aktivitása nem okozott Muv fenotípust *synMuv B* mutánsokban (**13. táblázat, 82. ábra**), míg *synMuv A* mutáns háttérben ektopikus vulva indukciót (Muv fenotípust) eredményezett. A *tra-1* tehát egy *synMuv B* gén.

| Genotípus | Szexuális fenotípus | % Muv | Ν | Р |
|---|---------------------|-------|------|----------|
| Vad típus | hermafrodita | 0 | 550 | - |
| Vad típus | hím | 0 | 605 | - |
| <i>lin-38(n751)</i> [<i>synMuv A</i>] | hermafrodita | 0 | 326 | - |
| lin-8(n111) [synMuv A] | hermafrodita | 0 | 850 | - |
| tra-1(e1099) | hím | 0 | 210 | - |
| $tra-1(RNSi)^a$ | interszex/hím | 0 | 230 | - |
| tra-1ab(RNSi) | hermafrodita | 0 | 100 | - |
| lin-38(n751); tra-1(e1099) ^b | hím | 0,02 | 2190 | < 0,01 |
| lin-8(n111); tra-1(e1099) ^b | hím | 0,015 | 2950 | < 0,01 |
| lin-38(n751); tra-1(RNSi) | interszex | 14,3 | 320 | < 0,0001 |
| <i>lin-38(n751); tra-1ab(RNSi)</i> | hermafrodita | 3,8 | 644 | < 0,0001 |
| lin-8(n111); tra-1(RNSi) | interszex | 2,1 | 320 | < 0,001 |
| lin-8(n111); tra-1ab(RNSi) | hermafrodita | 1,5 | 395 | < 0,01 |
| <i>lin-35(n745)</i> [<i>synMuv B</i>] | hermafrodita | 0 | 150 | - |

13. Táblázat. A *tra-1* inaktiválása Muv fenotípust eredményez synMuv A mutáns háttérben.

| lin-35(n745); tra-1(RNSi) | interszex | 0 | 889 | - |
|---|--------------|---|------|---|
| <i>lin-36(n766)</i> [<i>synMuv B</i>] | hermafrodita | 0 | 197 | - |
| lin-36(n766); tra-1(RNSi) | interszex | 0 | 2322 | - |

^aKettőnél több vulva állatonként (Muv). ^bA kettős mutáns pszeudohímek, amelyekben vulva indukció történt, általában egy vulva kitüremkedést mutatnak. A kettős mutánsok voltak összehasonlítva a megfelelő *synMuv A* egyszeres mutánsokkal (párosítatlan t-teszt). A *tra-1(-)* mutáció által okozott Muv fenotípus alacsony penetranciája a szóma erős maszkulinizációjával, azaz a *tra-1* pleiotróp funkciójával magyarázható.



82. Ábra. A *tra-1* inaktiválása *Multivulva* fenotípust okoz *synMuv* A mutáns háttérben. A *lin-38* egy *synMuv* A gén. A nyílhegy a hím gonádot mutatja (a *tra-1* blokkolása maszkulinizálja a szóma egy részét), a nyilak a vulva struktúrákat mutatják. *lin-38(n751)*

egyszeres mutáns állatokban csak egy vulva fejlődik.

Következtetések: *synMuv A, B* és *C* egyszeres mutáns állatok vulva morfológiája normális. *synMuv AB, AC* és *BC* kettős mutáns állatokban azonban ektopikus vulva indukció történik (Muv fenotípusúak) (86). A *tra-1* inaktiválása serkenti, a *tra-1* hiperaktiválása (*fem-3* lf mutáción keresztül) gátolja a vulva indukciót *synMuv* kettős mutánsokban (195). A *tra-1* funkció hiánya *synMuv A* mutáns háttérben Muv fenotípust eredményez. A *tra-1* tehát egy *synMuv B* osztályú gén (83. ábra).



83. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok IX. A TRAfehérje synMuv 1A egy B útvonal komponens. A piros szín újonnan feltárt kapcsolatot jelöl. szín: korábbi Lila fejezetekben jelátviteli bemutatott új kapcsolatok. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást jelölnek. synMuv: szintetikus Multivulva.

A *tra-1 synMuv B* funkciója a gén pleiotróp működése miatt csak moderált penetranciával nyilvánul meg a mutánsokban: a szóma maszkulinizációja miatt a vulva indukció mértéke mérsékelt. Mivel a synMuv B útvonal komponensek jelentős része kromatin szabályozó faktor, ezért feltételezhető, hogy a TRA-1A funkciója (a szomatikus sejtek nemének meghatározása) kromatin-alapú szabályozáson keresztül valósul meg. A TRA-1A humán ortológjai a GLI fehérjék, amelyek abnormális működése számos tumoros és egyedfejlődési elváltozásban kimutatható. A TRA-1A kromatin szabályozó jellegének

kimutatása közelebb vihet annak megértéséhez, hogy a GLI fehérjék kontrollálatlan működése milyen mechanizmusokon keresztül vezet rákos transzformációhoz.

5.4.2. A TRA-1A szükséges a sejtfúzióhoz

Háttér: A test ventrális részén a Pn.p sejtek hipodermisszel történő fúzióját a *lin-39 Hox* gén szabályozza (*182*). Mint láttuk, a *lin-39* aktivitását bizonyos Pn.p sejtekben a TRA-1A közvetlenül gátolja. Ez alapján logikus volt arra rákérdezni, hogy a *tra-1* szerepet játszik-e a sejtfúzió szabályozásában. Ez egy új potenciális funkciója a GLI- családba tartozó fehérjéknek.

Eredmények: *tra-1(-)* mutáns állatokban bizonyos Pn.p sejtek nem tudtak fuzionálni a hipodermisszel (**84. ábra**) (*195*). Kontrollként vad típusú hímeket vizsgáltunk meg (a *tra-1* inaktiválása hímekké transzformálja az egyébként XX – tehát "női" – egyedeket), amelyekben a P(3-6, 9-11).p sejtek nem vesznek részt a fúziós folyamatban. Ezzel szemben *tra-1(e1099)* mutáns állatokban a P(7,8).p sejtek sem fuzionáltak a hipodermális szincíciummal. Ez a fenotípus jól megmagyarázza, hogy miért tudott kilenc vulva képződni *lin-12n137gf); tra-1(RNSi)* állatokban ("extra" Muv fenotípus; **72. ábra**).



84. Ábra. A TRA-1A serkenti a sejtfúziót. Felül: egy vad típusú hím lárvában 7 darab Pn.p [P(3-6, 9-11).p] sejt nem fuzionált a hipodermisszel (nyilak jelzik). Alul: egy *tra-*1(e1099) mutáns lárvában 9 darab Pn.p sejt [P(3-11).p] nem vett részt a sejtfúziós

folyamatban (nyilak jelölik). A nem fuzionált sejteket egy *ajm-1::gfp* riporterrel tettük láthatóvá. A sejtfúzió hiánya 18% és 9% penetranciával volt megfigyelhető *tra-1(e1488)* és *tra-1(e1099)* homozigóta mutáns állatokban.

Egy másik *lin-39* által szabályozott sejtfúziós paradigma a hipodermális *seam* sejtek összeolvadása. A felnőtt fonálféregben mindkét oldalon 16 *seam* sejt fejlődik ki, melyek a differenciáció befejezése után egy folytonos laterális szincíciummá olvadnak össze. Ezek a sejtek, illetve az általuk képzett szincícium felelős az *alae*-knak nevezett hosszanti kutikula kitüremkedések kialakításáért (*203*). Vad típusú állatokban az *alae*-k megszakítás nélkül futnak végig az állat két oldalán a *seam* sejtek fölött (**85. ábra**). Ezzel szemben *tra-1(RNSi)* állatok, illetve *tra-1(-)* mutánsok esetében gyakran (53%, n=95) elágazó és megszakadt lefutású *alae*-k voltak megfigyelhetők.



85. Ábra. A *tra-1* befolyásolja a *seam* sejtek fúzióját. A, *ajm-1::gfp* expresszió egy vad típusú állat hipodermiszében. A Nomarski képen (felül) a nyilak az *alae*-kat jelölik. A megfelelő fluoreszcens képen (alul) a nyilak a *seam* sejtek és a hipodermisz adherens kapcsolatát jelzi. A sejtfúzió következtében a kapcsolat egyenes lefutású. **B**, *ajm-1::gfp* expresszió egy *tra-1(e1488)* mutáns állatban. A fluoreszcens képen jól láthatók az adherens kapcsolatok elágazásai és megszakadásai, ami elégtelen sejtfúzióra utal. **C**, *ajm-1::gfp* expresszió egy *tra-1(e1099)* mutáns állatban.

Következtetések: A *tra-1* gén inaktiválása rendellenes sejtfűziót eredményez a vulva és a hipodermisz fejlődése során (195). Mindkét folyamat a LIN-39 negatív szabályozása alatt áll (203). A *tra-1* sejtfűziót szabályozó szerepe tehát feltehetően a *lin-39* gátlásán keresztül valósul meg (**86. ábra**). Eredményeink egy új *tra-1* funkciót azonosítottak: a sejtfűzió szabályozását. Mivel a TRA-1A a humán GLI és Drosophila Ci fehérjék ortológja, a sejtfűzió szabályozása egyben a Hh jelátvitel egy újonnan feltárt funkciója.



86. Ábra. A TRA-1A szabályozza a sejtfúziót. A talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek. A TRA-1A aktiválja, a LIN-39 gátolja a sejtek fúzióját.

5.4.3. A TRA-1A dóziskompenzációs szerepe

Háttér: A TRA-1A kötőhelyek genom-szintű *in silico* meghatározása során azonosítottunk egy intakt kötőszekvenciát a *xol-1* "mester" szex-kapcsoló gén promóter régiójában, 154 bázispárnyira a transzlációs starthely előtt (**F3. Táblázat**). Ez a potenciális kötőhely szinte teljes egyezést mutatott a *mab-3* gén esetében leírt TRA-1A kötőhellyel (*194*).

A kariotípus függvényében a *xol-1* parallel szabályozza – összekapcsolja – a szexdeterminációs és a dóziskompenzációs folyamatokat (**87. ábra**). XX állatokban a *xol-1* inaktív, és ez lehetővé teszi a dóziskompenzációt és a női (hermafrodita) szomatikus fejlődést. XO állatokban a *xol-1* represszálja a dóziskompenzációs masinériát, illetve a *tra-1* gént. Ennek eredménye a hím szomatikus fejlődés. A TRA-1A potenciális *xol-1* szabályozó szerepe magyarázatot adhat arra, hogyan stabilizálódhat a dóziskompenzáció (az ivari kromoszómán lokalizált gének termékeinek kiegyenlítése a két nem között) az XX kariotípusú testi sejtekben.



87. Ábra. A *C. elegans* szex-determinációs és dóziskompenzációs kaszkád. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást jelölnek.

Eredmények: A teljes hosszúságú TRA-1A fehérje képes volt kötődni az intakt kötőhelyet tartalmazó *xol-1* promóter régióhoz *in vitro* (**88. ábra**). A *xol-1* promóter elem TRA-1A kötőhelyének megváltoztatása négy konzervált nukleotid cseréjével meggátolta a fehérje– DNS interakciót. A kötés specifikusságát kompetíciós analízissel is igazoltuk. Vad típusú jelöletlen oligonukleotid sikeresen leszorította a jelölt DNS-t, ezzel szemben a jelöletlen mutáns oligonukleotidok jelenléte nem kompetált a jelölt oligonukleotidok kötődési képességével. A TRA-1A fehérje tehát szekvencia specifikusan kötődik a *xol-1* gén szabályozó régiójához.

Az *in vitro* kötési eredményeket *in vivo* expressziós kísérletekkel is ellenőriztük. Ehhez egy *xol-1::gfp* riportert használtunk (204). A *xol-1* XX embriókban inaktív, XO embriókban a legtöbb szomatikus sejtben expresszálódik (**89. ábra**). A SEX-1 (*signal element on X*) fehérjéről ismert, hogy a hermafroditák XX sejtjeiben gátolja a *xol-1* gén transzkripcióját (205). Ezzel konzisztensen *sex-1(-)* mutáns állatokban a *xol-1::gfp* transzgén ektopikusan expresszálódott. A *tra-1* csendesítése XX embriókban szintén ektopikus *xol-1* expressziót eredményezett. *tra-1(e1488)* hipomorf és *tra-1(e1099)* funkcióvesztéses mutáns XX embriókban a *xol-1* ugyancsak aktív volt.



88. Ábra. A TRA-1A szekvencia specifikusan kötődik a xol-1 promóterhez *in vitro*. Gélretardációs kísérlet. Az oszlopok jelentése: 1: xol-1 oligo (szabad próba), 2: xol-1 oligo + lizátum, 3: mab-3 oligo + TRA-1A (pozitív kontroll), 4: xol-1 oligo + TRA-1A, 5: mutáns xol-1 oligo + TRA-1A, 6-9: xol-1 oligo + TRA-1A + jelöletlen xol-1 oligo, 10-13: xol-1 oligo + TRA-1A + jelöletlen mutáns xol-1 oligo. Oligo: oligonukleotid.

A gátló kölcsönhatás további igazolására egy p(mut)xol-1::gfp riporter transzgént hoztunk létre, amely annyiban különbözött az eredeti pxol-1::gfp konstrukciótól, hogy a TRA-1A fehérje kötőhelyének szekvenciáját megváltoztattuk. Transzgénikus állatok létrehozásával így vizsgálhatóvá vált a TRA-1A fehérje hiányának hatása a xol-1 kifejeződésre. A mutáns riportert hordozó XX embriók GFP-pozitívak voltak (**89/G. ábra**), tehát a TRA-1A fehérje a kötőhely hiányában tehát nem volt képes gátolni a xol-1 transzgén expresszióját *in vivo*.

A SEX-1 gátolja a *xol-1* aktivitását. A *sex-1* inaktiválása XX hermafroditákban ~30% embrionális életképtelenséget eredményez. Ez a fenotípus a *sex-1* gátló hatásának megszűnéséből származó ektopikus *xol-1* expresszióval magyarázható. *tra-1(-)* mutáns állatok szintén jelentős embrionális letalitást mutattak (**14. táblázat**). Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a *tra-1* aktivitás változása a *sex-1* mutáns embriók életképességét. *tra-1(-); sex-1(-)* kettős mutáns állatokban az egyszeres mutánsok embrionális életképtelensége összeadódott. Ez arra utal, hogy a *tra-1* és *sex-1* gének azonos szinten hatva, de parallel szabályozzák (gátolják) a *xol-1* aktivitását. A *tra-1* hiperaktiválódása viszont csökkentette a *sex-1(-)* mutáns embriók életképtelenségét. A *tra-1(gf)* mutáns XX embriók letalitása minimális volt: ezekben az állatokban a *xol-1* amúgy is inaktív.



89. Ábra. A TRA-1A szükséges a *xol-1* **repressziójához XX embriókban.** *xol-1::gfp* expresszió vad típusú (**A**), *him-8(e1489)* mutáns (**B**), *sex-1(gm41)* mutáns (**C**), *tra-1(e1488)* mutáns (**D**), *tra-1(e1099)* mutáns (**E**) és *tra-1(RNSi)* csendesített (**F**) embriókban. **G**, A TRA-1A kötőhelyben elrontott *xol-1::gfp* riporter ektopikusan expresszálódik vad típusú XX embriókban. A vonalak 50µm jelölnek. Az ábrák Nomarski és fluoreszcens képek egyesítésével készültek. A *him-8(-)* mutáció hím utódokat (~37%) eredményez.

Következtetések: A TRA-1A képes kötődni a *xol-1* promóterhez *in vitro* és képes gátolni a *xol-1* expresszióját XX embriókban (*196*). A *tra-1* az elsőként feltárt autoszómás *xol-1* represszor (**90. ábra**).



90. Ábra. Jelátviteli kapcsolatok X. A TRA-1A represszálja a *xol-1* **szex-kapcsoló gént.** A szexdeterminációs és dóziskompenzációs mechanizmus kiterjesztett modellje. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlást jelölnek. A *tra-1* funkciója a dóziskompenzációt aktiválja. Érdemes újra kihangsúlyozni, hogy az autoszómás *tra-1* gén a *xol-1* gátlásán keresztül fenntartja saját aktivitását, így a *xol-1* gátlása és a dóziskompenzáció működése stabil marad. A TRA-1A tehát visszacsatol a szexdeterminációs és dóziskompenzációs útvonal *upstream* részére, megakadályozva ezzel a jelátvitel esetleges random fluktuációjának kedvezőtlen hatását az állat fejlődésének későbbi szakaszaiban. A *tra-1* funkciója másrészt szétkapcsolja a kariotípus és a szomatikus szex közötti szabályozást. Így fordulhat elő, hogy a *tra-1(-)* mutáns XX egyed fertilis hímként tud fejlődni.

| Anyai genotípus | Hőm. (°C) | Embr <mark>iók</mark> (n) | Homozigóta embriók letalitása (%) | t (p <) |
|--------------------------------------|--------------|---------------------------|---|---------|
| Vad típus | 20 | 97 | 0 | - |
| Vad típus | 25 | 91 | 0.9 | - |
| <i>tra-1(e1488/+)</i> | 20 | 1634 | 26.7 | 0.001 |
| <i>tra-1(e1488/+)</i> | 25 | 629 | 41.4 | 0.001 |
| <i>tra-1(e1099/+)</i> | 20 | 160 | 27.5 | 0.001 |
| tra-1(e1099/+) | 25 | 566 | 47.9 | 0.001 |
| <i>tra-1(e1575gf)/</i> + | 20 | 334 | 3.6 | 0.03 |
| <i>tra-1(e1575gf)/</i> + | 25 | 117 | 5.7 | 0.001 |
| fem-3(e2006) | 20 | 376 | 13.3 | 0.001 |
| fem-3(e2006) | 25 | 97 | 20.6 | 0.001 |
| sex-1(gm41) | 20 | 419 | 51.8 | 0.001 |
| sex-1(gm41) | 25 | 325 | 44.9 | 0.001 |
| <i>sex-1(gm41); tra-1(e1488)/+</i> | 20 | 871 | 78.9 | 0.001 |
| <i>sex-1(gm41); tra-1(e1488)/+</i> | 25 | 699 | 77.1 | 0.001 |
| sex-1(gm41); tra-1(e1099)/+ | 20 | 59 | 86.7 | 0.001 |
| sex-1(gm41); tra-1(e1099)/+ | 25 | 283 | 91.5 | 0.001 |
| sex-1(gm41); fem-3(e2006) | 20 | 878 | 22.2 | 0.001 |
| sex-1(gm41); fem-3(e2006) | 25 | 133 | 27.8 | 0.001 |
| <i>sex-1(gm41); tra-1(e1575gf/+)</i> | 20 | 135 | 10.1 | 0.001 |
| <i>sex-1(gm41); tra-1(e1575gf/+)</i> | 25 | 135 | 6.2 | 0.001 |
| sex-1(y263) | 20 | 372 | 39.0 | 0.001 |
| sex-1(y263) | 25 | 535 | 31.4 | 0.001 |
| <i>sex-1(y263); tra-1(e1488)/+</i> | 20 | ND | ND | - |
| <i>sex-1(y263); tra-1(e1488)/+</i> | 25 | 394 | 50.5 | 0.001 |
| sex-1(y263); fem-3(e2006) | 20 | 575 | 33.0 | 0,001 |
| sex-1(y263); fem-3(e2006) | 25 | 160 | 25.6 | 0,001 |

14. Táblázat. A tra-1 aktivitása befolyásolja a sex-1 mutánsok letalitását.

6. FONTOSABB EREDMÉNYEK DISZKUSSZIÓJA

6.1. Autofágia és öregedés

Az öregedési folyamat mechanizmusának és szabályozásának megértése egy izgalmas és alapvető biológiai probléma. A folyamat orvosbiológia jelentősége nyilvánvaló: az öregedési folyamatot látszólag független degeneratív elváltozások kollekciójaként tekintik (*121, 122*). Általánosan elfogadott nézet, hogy az öregedést a sejtes károsodások (abnormális szerkezetű – aggregálódott, keresztkötött, oxidálódott, letekeredett, kovalensen módosult, stb. – és ezért nem funkcionáló makromolekulák, elsősorban fehérjék) élethosszig tartó fokozatos halmozódása okozza. E károsodások interferálnak a sejtes folyamatokkal, sejtméregként hatnak. A sejt működésének (homeosztázisának) fenntartása tehát a károsodott komponensek folyamatos eltávolítását igényli. A sejtes károsodások eltávolításának legfőbb ismert mechanizmusa az autofágia, amely bármilyen típusú makromolekulát és sejtszervecskét képes degradálni.

Az autofágia öregedési folyamatban betöltött központi szerepét csak az utóbbi években ismerték fel. Ennek oka kettős. Egyrészt az autofágia molekuláris mechanizmusának feltárása csak a '90-es évek közepétől kezdődött el. Másrészt az öregedési folyamatot szabályozó faktorok meghatározása sajátos genetikai logikát követ; öregedést szabályozó géneket hosszú élettartamú mutánsok izolálásával azonosítanak. E gének normális (vad típusú) funkciója azonban az öregedési folyamatot gyorsítja, az élettartamot rövidíti. Ezek tehát az öregedési folyamatot serkentő (*pro-aging*) faktorok. Az utóbbi három évtizedben számos ilyen *pro-aging* útvonalat (inzulin/IGF-1, TOR, TGF-β, JNK, Ras) és fehérjét (pl. p53, Sirtuinok, HSF1, CaN) fedeztek fel. Az orvosbiológiai szempontból izgalmas öregedést lassító (*anti-aging*) gének mutációi rövid élettartamot eredményeznek. A legtöbb gén inaktiválása azonban korai pusztuláshoz (rövid élettartamhoz) vezet anélkül, hogy hatnának az öregedési folyamatra. Az ilyen mutációk például valamilyen betegséget, rendellenességet okoznak.

Az autofág gének mutációs inaktiválása élettartam rövidülést okoz (pl. 5.2.3. fejezet). Hosszú élettartamot eredményező mutációkkal kombinálva (kettős mutáns analízis) azonban az autofág gének (pontosabban azok funkcióvesztéses mutációi) episztatikusan hatnak: a kettős mutáns élettartama rövidebb, mint a hosszú életidejű egyszeres mutáns élettartama. E kutatások legjelentősebb megállapítása az volt, hogy egy adott autofág gén inaktiválása nagyobb mértékben rövidíti az élettartamot hosszú életidejű mutáns háttérben, mint a vad típusú háttérben (a kettős mutánsban nagyobb mértékű az élethossz rövidülés, mint az autofág egyszeres mutánsban). A első ilyen eredményeket közlő publikáció 2003-ban jelent meg (69). Azóta direkt módon is igazolták az autofág rendszer élettartam szabályozó szerepét: Drosophilában az Atg8 autofág gén genetikai eszközökkel történő túlműködtetése 50%-al megnövelte az élettartamot (206), míg élesztőben, fonalféregben, rovarokban és emlősökben az autofágia spermidinnel történő aktiválása élethossz növelő hatásúnak bizonyult (207).

Az elmúlt években igazolták, hogy az autofág gének blokkolása majd minden eddig ismert hosszú élettartamú mutánsban élethossz rövidülést okoz. Az élethosszt szabályozó genetikai és környezeti faktorok hatása tehát az autofág génkaszkádon konvergálódik. Izgalmas módon ezeknek a genetikai kapcsolatoknak (az autofág gének *downstream* helyezkednek el a különböző öregedést szabályozó útvonalakban) a többségét azóta direkt molekuláris interakciókkal is bizonyították. A FoxO (inzulin/IGF-1 útvonal), ERK és PKA (Ras útvonal), TOR, eEF2 (LKB1 útvonal), P53, HSF1 és Sirt fehérjék például autofág gének expresszióját szabályozzák vagy autofág fehérjéket módosítanak (pl. acetilálnak) közvetlenül (**91. ábra**). Ez azt jelenti, hogy az autofág gének funkciója közvetíti az öregedési folyamatot szabályozó faktorok hatásait. Az autofág masinéria tehát az öregedési folyamat központi szabályozó mechanizmusa.



91. Ábra. Az öregedési folyamat szignalizációs hálózata. Az öregedési folyamatot szabályozó fehérjék/útvonalak hatásai az autofág génekre konvergálódnak. A sárga gömbök jelátviteli komponenseket, a piros gömbök szabályozó fehérjéket, a kék ovális alakzatok receptorokat jelölnek. A

fehérjéket az emlős ortológok nevével jelöltem. Nyilak aktiváló, talpas nyilak gátló kölcsönhatásokat jelölnek.

6.2. A lin-39/Hox promóter, mint jelátviteli integrátor

Hogyan fordítódnak le a meglehetősen általános jelátviteli üzenetek meglepően nagyszámú sejtsors típussá? A *C. elegans* vulvaszövetének fejlődése kitűnő kísérletes paradigma e kérdés tanulmányozásához. A vulva az állat ventrális részén található hat epidermális, ún. vulva prekurzor sejt [P(3-8).p] egy csoportjából [P(5-7).p] fejlődik ki. Ahogy azt az *5.4.1.* fejezetben bemutattam, legalább öt jelátviteli rendszer szabályozza a P(3-8).p sejtek differenciálódását: a Ras, Wnt, Notch, synMuv és TRA-1A-közvetített útvonalak koordinált hatása határozza meg a különböző vulva sejtsorsok mintázatát (**76. ábra**). E jelátviteli rendszerek működésének eredőjeként a P(3-8).p sejtekben 3°-3°-2°-1°-2°-3° sejtsors mintázat alakul ki (**92. ábra**). Az 1° és 2° sejtek osztódása hozza létre a kifejlett vulvaszövetet, míg a 3° vulva sejtek nem vesznek részt a vulvaszövet kialakításában.

A vulva fejlődést szabályozó útvonalak hatásai a *lin-39 Hox* gén szabályozó régiójában konvergálódnak. A *lin-39* tehát egy molekuláris komputer, amely érzékeli a bejövő jelek minőségét és mennyiségét, és ennek függvényében expresszálódik egy adott Pn.p sejtben. Az induktív Ras jel a gonadális *anchor* sejtből érkezik, amely a P6.p felett helyezkedik el. A szekretált Ras ligandum gradiensének következtében a P(5-7).p sejtek kapják a legerősebb induktív jelet. Potenciálisan mindhárom indukált vulva sejt 1° sejtsorsot alakítana ki. Bennük a LIN-39 szintje magas. A P6.p mellett lévő P(5,7).p sejtekben azonban a LIN-12/Notch útvonal aktiválódik és csökkenti az induktív jel erősségét. Ennek következtében ezekben a sejtekben 2° vulva sejtsors alakul ki, bennük a LIN-39 szintje közepes. Ahogy azt korábban bemutattam, a LIN-12/Notch útvonal aktiválódását éppen a LIN-39/CEH-20 komplex teszi lehetővé. Az *anchor* sejttől távol eső P(3,4,8).p sejtek nem kapnak elegendő induktív jelet, ezért bennük a LIN-39 szintje alacsony lesz. Ezek a sejtek 3° sejtsorsot alakítanak ki és nem indukálódnak a vulva fejlődés során.

Jól látható, hogy a P(3-8).p sejtek sorsát végső soron a LIN-39 fehérje szintje határozza meg (**92. ábra**). A P6.p sejtben magas a LIN-39 szint, ebben a sejtben indukált 1° vulva sejtsors alakul ki. A P(5,7).p sejtekben közepes a LIN-39 szintje, bennük indukált 2° vulva sejtsors differenciálódik. A P(3,4,8).p sejtekben alacsony (bazális) a LIN-39 szintje, ezekben a sejtekben nem indukált 3° vulva sejtsors jön létre.



92. Ábra. Vulva sejtsorsok meghatározása LIN-39 által. A P(3-8).p sejtek alatt a megfelelő vulva sejtsorsok és a LIN-39 relatív mennyisége (zöld hasábok magassága) látható. Magas LIN-39 szint 1°, közepes LIN-39 szint 2°, míg alacsony LIN-39 szint 3° vulva sejtsorsot határoz meg. Jobb oldalt alul a vulva fejlődést szabályozó jelátviteli hálózat modellje látható. A *lin-39* jelátviteli integrátorként funkcionál. A nyilak aktiváló, a talpas nyilak gátló kölcsönhatásokat jelölnek.

A vulva fejlődés példáján jól látható, hogy a sejtsorsokat kialakító jelátviteli üzenetek végső soron néhány integrátor faktor aktivitását szabályozzák. A vulva esetében ez az integrátor a *lin-39 Hox* gén. A *lin-39* aktivitása, vagyis a LIN-39 relatív mennyisége dönti el, hogy milyen sejtsors alakuljon ki egy adott vulva prekurzor sejtben. A *lin-39* expresszióját öt jelátviteli pálya koordinált működése szabályozza. Ez az öt útvonal potenciálisan nagyon sokféle (elviekben korlátlan) LIN-39 szintet tud meghatározni. Ez azt jelenti, hogy egy HOX fehérje és néhány (öt) jelátviteli útvonal nagyszámú sejtsorsot képes kialakítani. Ez a mechanizmus egy magyarázatot ad arra, hogy miért elegendő néhány konzervált jelátviteli útvonal az állati rendszerekben megfigyelhető figyelemre méltóan sokféle sejttípus kialakításához.

6.3. Dóziskompenzációs enigma

A nemi jellegek kialakítása alapvető fontosságú az ivarosan szaporodó élőlények egyedfejlődésében. A váltivarúság viszonylag korán jelent meg az evolúció során és igen elterjedt az élővilágban. Érdekes módon a szexuális fejlődést gyakran eltérő mechanizmusok teszik lehetővé a különböző állati taxonokban. A különböző ivar-determinációs mechanizmusoknak egyetlen közös tulajdonsága van: mindegyik esetben elengedhetetlen az ivari kromoszómákon lokalizált gének dózisának kiegyenlítése, amit dóziskompenzációnak nevezünk. Ez a folyamat biztosítja az ivari kromoszómák géntermékeinek azonos mennyiségét a különböző nemekben. A dóziskompenzáció folyamata is különbözhet az egyes fajokban (**93. ábra**), de minden esetben jelen van egy szabályozó komplex, amely az egyik

nemben az ivari kromoszómá(k)hoz kapcsolódik, és a génaktivitás változtatásával szabályozza a gének dózisát (*188*).



93. Ábra. A főbb dóziskompenzációs mechanizmusok. Az emlősök esetében a női sejtek egyik X kromoszómájának random ínaktivációjával (emberben a keletkezett inaktív kromoszómát Barr-testnek nevezik) valósul meg a dóziskompenzáció. *Drosophilában* a hímek sejtjeiben megduplázódik az X-kapcsolt gének aktivitása, ezáltal kiegyenlítődik az X kromoszómáról átíródó gének dózisa a két nemben. *C. elegans* hermafroditákban mindkét X-kromoszómán felére csökken a génaktivitás. Így hasonló géndózis alakul ki, mint amilyen a hímek egyetlen, teljesen aktív X kromoszómájáról származik.

С. elegans-ban a dóziskompenzáció működését egy kromoszóma-számláló mechanizmus szabályozza. A mechanizmus "szíve" a xol-1 kapcsoló gén (94. ábra), amelynek aktivitását az X kromoszómán elhelyezkedő ún. "számláló" gének gátolják, az autoszómákon elhelyezkedő ún. "nevező" gének aktiválják. Hímekben csak egy X kromoszóma van (XO), ilyenkor a "számláló/nevező" arány kicsi (X:AA = 0,5), ezért a "számlálók" gátló hatását a "nevezők" aktiváló hatása felülírja: a xol-1 aktiválódik. A xol-1 aztán gátolja a dóziskompenzációs komplex működését, és a hím egyetlen X kromoszómája transzkripcionálisan teljesen aktív lesz. Hermafroditákban a két X kromoszómáról ("számláló/nevező" arány: XX:AA = 1,0) érkező "számláló" gátlás felülírja a "nevezők" aktiválását, ezért a xol-1 inaktív lesz. XOL-1 funkció hiányában a dóziskompenzációs komplex aktiválódik és megfelezi az X kromoszómák transzkripciós aktivitását (93. ábra). De akkor hogyan marad fent a xol-1 gátolt állapota? A két X kromoszóma felezett aktivitása ugyanis egy X kromoszóma teljes aktivitásának felel meg, ami hímekben nem elegendő a "nevezők" felülírására és a xol-1 gátlására.



94. Ábra. A *C. elegans* dóziskompenzációs és szex-determinációs génkaszkád. *xol-1* a kromoszóma-számláló gén. "Számláló" gének: *sex-1*, *sex-2*, *fox-1* és *ceh-39*, "nevező" gének: *sea-1*, *sea-2* és *sea-3*. A pirossal jelölt komponensek hermafroditákban aktívak, a kékkel jelölt komponensek hímekben aktívak. A nyilak aktiváló, a talpas nyilak gátló kölcsönhatásokat jelölnek.

Az 5.4.3. fejezetben bemutattam, hogy a TRA-1A, a szex-determinációs kaszkád terminális transzkripciós faktora, közvetlenül gátolja a *xol-1* gén expresszióját (**90. ábra**). A *tra-1* egy autoszómás gén. Ez a tulajdonsága feloldja a fentebb tárgyalt dóziskompenzációs ellentmondást. Nézzük meg, hogyan. XX hermafrodita egyedekben a *xol-1* inaktív, ezáltal a dóziskompenzációs komplex és a *tra-1* is aktiválódik. A dóziskompenzáció megfelezi az X kromoszómán lokalizált gének, így a "számlálók" génaktivitását, de nem befolyásolja az autoszómás gének működését. A TRA-1A tehát fent tudja tartani a *xol-1* gátló funkcióját. A *xol-1* inaktivitása ezáltal a *feedback* mechanizmus által stabilizálódik. A *tra-1* aktiválódásával a *xol-1*-et szabályozó kromoszóma-számláló mechanizmus átvált génszabályozó mechanizmusra.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- 1. Gilbert SF. Cell-cell communication in development. In: *Developmental Biology*. 8th Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts, p.139–174 (2006).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cell communication. In: *Molecular Biology* of the Cell. 4th Edition. Garland Science, NY, p.831–906 (2002).
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Signal transduction pathways: an introduction to information metabolism. In: *Biochemistry*. 5th Edition. W. H. Freeman and Company, p.395–424 (2002).
- 4. Saltiel AR, Kahn RC. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).
- 5. Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-b signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465–471 (1997).
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cécillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserve E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707–710 (1996).
- Pires-daSilva A, Sommer RJ. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat. Rev. Genet.* 4, 39–49 (2003).
- 8. Gerhart J. Warkany lecture: Signaling pathways in development. Teratology 60, 226–239 (1999).
- Chervitz SA, Aravind L, Sherlock G, Ball CA, Koonin EV, Dwight SS, Harris MA, Dolinski K, Mohr S, Smith T, Weng S, Cherry JM, Botstein D. Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. *Science* 282, 2022–2028 (1998).
- Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. *Dev. Biol.* 56, 110–156 (1977).
- 11. Ghazi A, VijayRaghavan K. Control by combinatorial codes. Nature 408, 419-420 (2000).
- Halfon MS, Carmena A, Gisselbrecht S, Sackerson CM, Jiménez F, Baylies MK, Michelson AM. Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* 103, 63–74 (2000).
- 13. Conradt B, Horvitz RH. The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the *egl-1* cell death activator gene. *Cell* **98**, 317–327 (1999).
- 14. Brenner S. The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77, 71-94 (1974).
- 15. Wood WB. The nematode Caenorhabdits elegans. Cold Spring Harbor Lab. Press (1988).
- 16. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR. C. ELEGANS II. Cold Spring Harbor Lab. Press (1997).
- 17. C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012–2018 (1998).
- Spieth J, Brooke G, Kuersten S, Lea K, Blumenthal T. Operons in C. elegans: polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions. *Cell* 73, 521–532 (1993).
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J. Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi. *Nature* 421, 231–237 (2003).

- 20. Dupuy D, Bertin N, Hidalgo CA, Venkatesan K, Tu D, Lee D, Rosenberg J, Svrzikapa N, Blanc A, Carnec A, Carvunis AR, Pulak R, Shingles J, Reece-Hoyes J, Hunt-Newbury R, Viveiros R, Mohler WA, Tasan M, Roth FP, Le Peuch C, Hope IA, Johnsen R, Moerman DG, Barabási AL, Baillie D, Vidal M. Genome-scale analysis of in vivo spatiotemporal promoter activity in Caenorhabditis elegans. *Nat. Biotechnol.* **25**, 663–668 (2007).
- 21. Simonis N, Rual JF, Carvunis AR, Tasan M, Lemmens I, Hirozane-Kishikawa T, Hao T, Sahalie JM, Venkatesan K, Gebreab F, Cevik S, Klitgord N, Fan C, Braun P, Li N, Ayivi-Guedehoussou N, Dann E, Bertin N, Szeto D, Dricot A, Yildirim MA, Lin C, de Smet AS, Kao HL, Simon C, Smolyar A, Ahn JS, Tewari M, Boxem M, Milstein S, Yu H, Dreze M, Vandenhaute J, Gunsalus KC, Cusick ME, Hill DE, Tavernier J, Roth FP, Vidal M. Empirically controlled mapping of the Caenorhabditis elegans protein-protein interactome network. *Nat. Methods* 6, 47–54 (2009).
- 22. Horvitz RH. Nobel Lecture: Worms, Life and Death. Biosci. Rep. 23, 239-303 (2004).
- 23. Sternberg PW. Vulval development, In: *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.6.1 (2005).
- 24. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717–1721 (2000).
- Clark Jr SL. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 349–362 (1957).
- 26. de Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. Annu. Rev. Physiol. 28, 435-492 (1966).
- 27. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. Trends Genet. 24, 604-612 (2008).
- Vellai T, Takács-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity?. *Trends Cell Biol.* 19, 487–494 (2009).
- Mortimore GE, Hutson NJ, Surmacz CA. Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2179–2183 (1983).
- 30. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alphasynuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**, 1292–1295 (2004).
- Kovács AL, Vellai T, Müller F. Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. In: *Autophagy*, ed. Daniel J. Klionsky, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, pp. 219–225 (2004).
- 32. Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121–1125 (2007).
- 33. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 132, 27-42 (2008).
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular selfdigestion. *Nature* 451, 1069–1075 (2008).
- 35. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**, 780–786 (2006).
- 36. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP,
Baehrecke EH, Taylor JP. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* **447**, 859–863 (2007).

- Noda T, Ohsumi Y. Macroautophagy in yeast. In: *Autophagy*, ed. Daniel J. Klionsky, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, pp. 70–83 (2004).
- Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinasedeficient mutants and conditions for its induction. J. Cell Biol. 119, 301–311 (1992).
- 39. Khalfan WA, Klionsky DJ. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae. Curr. Opin. Cell. Biol*, **14**, 468–475 (2002).
- 40. Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, Wolf DH. Isolation of autophagocytosis mutants *of Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **349**, 275–280 (1994).
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* 5, 539– 545 (2003).
- 42. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. J. Cell Sci. 118, 7–18 (2005).
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. J. Cell. Biol. 150, 1507–1513 (2000).
- 44. Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.* **17**, 1–11 (2007).
- 45. Juhász G, Neufeld TP. Autophagy: A forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol.* **4**, e36 (2006).
- Kovács AL, Pálfia Z, Réz G, Vellai T, Kovács J. Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy* 3, 655-662 (2007).
- Wang CW, Kim J, Huang WP, Abeliovich H, Stromhaug PE, Dunn WA. Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 30442– 30451 (2001).
- Obara K, Sekito T, Niimi K, Ohsumi Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* 283, 23972–23980 (2008).
- Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 211–216 (2001).
- Kim J, Huang WP, Klionsky DJ. Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J. Cell. Biol.* 152, 51–64 (2001).
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. A ubiquitinlike system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488–492 (2000).
- 52. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy_in yeast. *J. Biol. Chem.* **273**, 3963–3966 (1998).

- 53. Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino K, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 8, 65–79 (2003).
- 54. Lippai M, Csikós G, Maróy P, Lukácsovich T, Juhász G, Sass M. SNF4Agamma, the Drosophila AMPK gamma subunit is required for regulation of developmental and stress-induced autophagy. *Autophagy* **4**, 476–486 (2008).
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of_phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control_macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 992–998 (2000).
- 56. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. 15, 1926–1945 (2004).
- 57. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).
- Oldham S, Hafen E. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* 13, 79–85 (2003).
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 6, 458–471 (2007).
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.* 6, 472–483 (2007).
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces inzulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans. *Nature* 389, 994–999 (1997).
- Puig O, Tjian R. Nutrient availability and growth: regulation of inzulin signaling by dFOXO/FOXO1. *Cell Cycle.* 5, 503–505 (2006).
- Budovoskaya YV, Stephan JS, Reggiori F, Klionsky DJ, Herman PK. The Ras/cAMPdependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccaromyces cerversiae*. J. Biol. Chem, 279, 20663–20671 (2004).
- 64. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 67, 3043–3053 (2007).
- Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121–134 (2006).
- 66. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernsrakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* **10**, 676–687 (2008).
- 67. Vellai T. Autophagy genes and ageing. Cell Death Differ. 16, 94-102 (2009).
- Meléndez A, Levine B. Autophagy in C. elegans, In: WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.147.1 (2009).

- 69. Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans. *Science* **301**, 1387–1391 (2003).
- Sigmond T, Barna J, Tóth ML, Takács-Vellai K, Pásti G, Kovács AL, Vellai T. Autophagy in Caenorhabditis elegans. *Methods Enzymol.* 451, 521–540 (2008).
- Sigmond T, Fehér J, Baksa A, Pásti G, Pálfia Z, Takács-Vellai K, Kovács J, Vellai T, Kovács AL. Qualitative and quantitative characterization of autophagy in Caenorhabditis elegans by electron microscopy. *Methods Enzymol.* 451, 467–491 (2008).
- 72. Kang C, You YJ, Avery L. Dual roles of autophagy in the survival of Caenorhabditis elegans during starvation. *Genes Dev.* **21**, 2161–2171 (2007).
- Juhász G, Erdi B, Sass M, Neufeld TP. Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in Drosophila. *Genes Dev.* 21, 3061–3066 (2007).
- Aladzsity I, Tóth ML, Sigmond T, Szabó E, Bicsák B, Barna J, Regos A, Orosz L, Kovács AL, Vellai T. Autophagy genes unc-51 and bec-1 are required for normal cell size in Caenorhabditis elegans. *Genetics* 177, 655–660 (2007).
- 75. Tóth ML, Simon P, Kovács AL, Vellai T. Influence of autophagy genes on ion-channel-dependent neuronal degeneration in Caenorhabditis elegans. *J. Cell Sci.* **120**, 1134–1141 (2007).
- Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. Autophagy is required for necrotic cell death in Caenorhabditis elegans. *Cell Death Differ.* 15, 105–112 (2008).
- 77. Zhang Y, Yan L, Zhou Z, Yang P, Tian E, Zhang K, Zhao Y, Li Z, Song B, Han J, Miao L, Zhang H. SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in C. elegans. *Cell* **136**, 308–321 (2009).
- 78. Sternberg PW. Vulval development. In: *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.6.1, (2005).
- 79. Greenwald I. LIN-12/Notch signaling in C. elegans. In: *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, dci/10.1895/Wormbook (2005).
- Sternberg PW, Horvitz HR. Pattern formation during vulval development in C. elegans. *Cell* 44, 761–772 (1986).
- Ferguson EL, Sternberg PW, Horvitz HR. A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of Caenorhabditis elegans. *Nature* 326, 259–267 (1987).
- Gleason JE, Korswagen HC, Eisenmann DM. Activation of Wnt signaling bypasses the requirement for RTK/Ras signaling during C. elegans vulval induction. *Genes Dev.* 16, 1281–1290 (2002).
- Greenwald I, Sternberg PW, Horvitz HR. The lin-12 locus specifies cell fates in Caenorhabditis elegans. *Cell* 34, 435–444 (1983).
- 84. Berset T, Hoier EF, Battu G, Canevascini S, Hajnal A. Notch inhibition of RAS signaling through MAP kinase phosphatase LIP-1 during C. elegans vulval development. *Science* **291**, 1055–1058 (2001).
- 85. Sternberg PW, Horvitz HR. The combined action of two intercellular signaling pathways specifies three cell fates during vulval induction in C. elegans. *Cell* **58**, 679–693 (1989).

- Harrison MM, Ceol CJ, Lu X, Horvitz RH. Some C. elegans class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 103, 16782–16787 (2006).
- Chen Z, Han M. C. elegans Rb, NuRD, and Ras regulate lin-39-mediated cell fusion during vulval fate specification. *Curr. Biol.* 11, 1874–1879 (2001).
- Maloof JN, Kenyon C. The Hox gene lin-39 is required during C. elegans vulval induction to select the outcome of Ras signaling. *Development* 125, 181–190 (1998).
- Guerry G, Marti CO, Zhang Y, Moroni PS, Jaquiéry E, Müller F. The Mi-2 nucleosome-remodeling protein LET-418 is targeted via LIN-1/ETS to the promoter of lin-39/Hox during vulval development in C. elegans. *Dev. Biol.* 306, 469–479 (2007).
- Takács-Vellai K, Vellai T, Chen EB, Zhang Y, Guerry F, Stern MJ, Müller F. Transcriptional control of Notch signaling by a HOX and a PBX/EXD protein during vulval development in C. elegans. *Dev. Biol.* 302, 661–669 (2007).
- 91. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461–464 (1993).
- 92. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS. A mutant Drososphila insulin receptor homolog that extends lifespan and impairs neuroendocrine functions. *Science* **292**, 107–110 (2001).
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloen A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 125–126 (2003).
- Riddle DL, Albert PS. Genetic and environmental regulation of dauer larva development. In *C. elegans II* (eds Riddle, D. L. *et al.*), Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York, p.739–768 (1997).
- 95. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans. *Nature* 389, 994–999 (1997).
- Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. Regulation of the Caenorhabditis elegans longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 28, 139–145 (2001).
- Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*; 408, 255–262 (2000).
- 98. Thomas G, Hall MN. TOR signalling and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 782–787 (1997).
- Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102–1105 (2001).
- 100.Abraham RT. Identification of TOR signaling complexes: more TORC for the cell growth engine. *Cell* **111**, 9–12 (2002).
- 101.Long X, Spycher C, Han ZS, Rose AM, Müller F, Avruch J. TOR deficiency in C. elegans causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Curr. Biol.* **12**, 1448–1461 (2002).
- 102. Vellai T, Takács-Vellai K, Zhang Y, Kovács AL, Orosz L, Müller F. Influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans. *Nature* 426, 620 (2003).

- 103. Jia K, Chen D, Riddle DL. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span. *Development* **131**, 3897–3906 (2004).
- 104.Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. Genome-wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes. *Nature* **421**, 268–272 (2003).
- 105.Dillin A, Crawford DK, Kenyon C. Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in C. elegans. *Science* **298**, 830–834 (2002).
- 106. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S.. Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* **14**, 885–890 (2004).
- 107.Kaeberlein M, Powers III WR, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310**, 1193–1196 (2005).
- 108.Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392–395 (2009).
- 109. Kaeberlein M, Kennedy BK. Ageing: A midlife longevity drug? Nature 460, 331-332 (2009).
- 110. Tavernarakis N. Ageing and the regulation of protein synthesis: a balancing act? *Trends Cell Biol.* **18**, 228–235 (2008).
- 111. Vellai T. Autophagy genes and ageing. Cell Death Differ. 16, 94-102 (2009).
- 112. Vellai T, Takács-Vellai K. Regulation of protein turnover by longevity pathways. In: *Protein synthesis and aging*, ed. Nektarios Tavernarakis, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, *in press* (2009).
- 113.Kovács AL, Pálfia Z, Réz G, Vellai T, Kovács J. Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy* **3**, 655–662 (2007).
- 114. Tian E, Wang F, Han J, Zhang H. *epg-1* functions in autophagy-regulated processes and may encode a highly divergent Atg13 homolog in *C. elegans. Autophagy* **5**, 1–8 (2009).
- 115.Megalou EV, Tavernarakis N. Autophagy in Caenorhabditis elegans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 1444–1451 (2009).
- 116.Ogura K, Wicky C, Magnenat L, Tobler H, Mori I, Müller F, Ohshima Y. Caenorhabditis elegans unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase. *Genes Dev.* 8, 2389–2400. (1994).
- 117. Takács-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovács AL, Müller F. Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in C. elegans. *Curr. Biol.* 15, 1513– 1517 (2005).
- 118. Tóth ML, Sigmond T, Borsos É, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós G, Sass M, Vellai T. Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in Caenorhabditis elegans. *Autophagy* 4, 330–338 (2008).
- 119.Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654–658 (2009).
- 120.Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS,

Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clavé C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Dröge W, Dron M, Dunn WA Jr, Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fésüs L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, González-Estévez C, Gorski S, Gottlieb RA, Häussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Høyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jäättelä M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen T, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, Komatsu M, Kominami E, Kondo S, Kovács AL, Kroemer G, Kuan CY, Kumar R, Kundu M, Landry J, Laporte M, Le W, Lei HY, Lenardo MJ, Levine B, Lieberman A, Lim KL, Lin FC, Liou W, Liu LF, Lopez-Berestein G, López-Otín C, Lu B, Macleod KF, Malorni W, Martinet W, Matsuoka K, Mautner J, Meijer AJ, Meléndez A, Michels P, Miotto G, Mistiaen WP, Mizushima N, Mograbi B, Monastyrska I, Moore MN, Moreira PI, Moriyasu Y, Motyl T, Münz C, Murphy LO, Naqvi NI, Neufeld TP, Nishino I, Nixon RA, Noda T, Nürnberg B, Ogawa M, Oleinick NL, Olsen LJ, Ozpolat B, Paglin S, Palmer GE, Papassideri I, Parkes M, Perlmutter DH, Perry G, Piacentini M, Pinkas-Kramarski R, Prescott M, Proikas-Cezanne T, Raben N, Rami A, Reggiori F, Rohrer B, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Sakagami H, Sakai Y, Sandri M, Sasakawa C, Sass M, Schneider C, Seglen PO, Seleverstov O, Settleman J, Shacka JJ, Shapiro IM, Sibirny A, Silva-Zacarin EC, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Smith MA, Spanel-Borowski K, Srinivas V, Steeves M, Stenmark H, Stromhaug PE, Subauste CS, Sugimoto S, Sulzer D, Suzuki T, Swanson MS, Tabas I, Takeshita F, Talbot NJ, Tallóczy Z, Tanaka K, Tanaka K, Tanida I, Taylor GS, Taylor JP, Terman A, Tettamanti G, Thompson CB, Thumm M, Tolkovsky AM, Tooze SA, Truant R, Tumanovska LV, Uchiyama Y, Ueno T, Uzcátegui NL, van der Klei I, Vaquero EC, Vellai T, Vogel MW, Wang HG, Webster P, Wiley JW, Xi Z, Xiao G, Yahalom J, Yang JM, Yap G, Yin XM, Yoshimori T, Yu L, Yue Z, Yuzaki M, Zabirnyk O, Zheng X, Zhu X, Deter RL. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy 4, 151–175 (2008).

- 121.Kirkwood TBL. A systematic look at an old problem. Nature 451, 644-647 (2008).
- 122. Hekimi S. Guarente L. Genetics and the specificity of the aging process. Science 299, 1351–1354 (2003).
- 123. Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol. Biol. Cell* **15**, 657–664 (2004).
- 124.Ghazi A, Henis-Korenblit S, Kenyon C. Regulation of Caenorhabditis elegans life span by a proteasomal E3 ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5947–5952 (2007).
- 125.Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. Cell 120, 449-460 (2005).
- 126.Bishop NA, Guarente L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 835–844 (2007).
- 127.Lai T, Garriga G. The conserved kinase UNC-51 acts with VAB-8 and UNC-14 to regulate axon outgrowth in C. elegans. *Development* 131, 5991–6000 (2004).
- 128.Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. Caenorhabditis elegans p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* **294**, 591–595 (2001).

- 129.Ogg S, Ruvkun G. The C. elegans PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol. Cell.* **2**, 887–893 (1998).
- 130.Gerstbrein B, Stamatas G, Kollias N, Driscoll M. In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. Aging Cell 4, 127– 137 (2005).
- 131.Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, Sakano Y, Paupard MC, Hall DH, Driscoll M. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans. Nature* 419, 808–814 (2002).
- 132.Dillin A, Hsu AL, Arantes-Oliveira N, Lehrer-Graiwer J, Hsin H, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* 298, 2398–2401 (2002).
- 133.Lee SS, Lee RY, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in C. elegans longevity. *Nat. Genet.* **33**, 40–48 (2003).
- 134.Lakowski B, Hekimi S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13091–13096 (1998).
- 135.Hars ES, Qi H, Ryazanov AG, Jin S, Cai L, Hu C et al. Autophagy regulates aging in C. elegans. *Autophagy* **3**, 93–95 (2007).
- 136.Jia K, Levine B. Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in C. elegans. *Autophagy* **3**, 597–599 (2007).
- 137. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. Trends Genet. 24, 604-612 (2008).
- 138.Levine B, Kroemer G. Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ.* **16**, 1–2 (2009).
- 139.Lippai M, Csikós G, Maróy P, Lukácsovich T, Juhász G, Sass M. SNF4Agamma, the Drosophila AMPK gamma subunit is required for regulation of developmental and stress-induced autophagy. *Autophagy* **4**, 476–486 (2008).
- 140.Leevers SJ, McNeill H. Controlling the size of organs and organisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 604–609 (2005).
- 141.Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672–676 (1999).
- 142.Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891–2906 (2004).
- 143.Krishna S, Maduzia LL, Padgett RW. Specificity of TGF-beta signaling is conferred by distinct type I receptor and their associated SMAD proteins in Caenorhabditis elegans. *Development* **126**, 251–260 (1999).
- 144.McCulloch D, Gems D. Body size, insulin/IGF-1 signaling and aging in the nematode Caenorhabditis elegans. *Exp. Gerontol.* **38**, 129–136 (2003).
- 145.Morita K, Chow KL, Ueno N. Regulation of body length and male tail ray pattern formation of Caenorhabditis elegans by a member of TGF-beta family. *Development* **126**, 1337–1347 (1999).

- 146.Morita K, Flemming AJ, Sugihara Y, Mochii M, Suzuki Y, Yoshida S, Wood WB, Kohara Y, Leroi AM, Ueno N. A Caenorhabditis elegans TGF-beta, DBL-1, controls the expression of LON-1, a PR-related protein, that regulates polyploidization and body length. *EMBO J.* **21**, 1063–1073 (2002).
- 147.Suzuki Y, Yandell MD, Roy PJ, Krishna S, Savage-Dunn C, Ross RM, Padgett RW, Wood WB. A BMPhomolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in Caenorhabditis elegans. *Development* **126**, 241–250 (1999).
- 148.Wang J, Tokarz R, Savage-Dunn C. The expression of TGFb signal transducers in the hypodermis regulates body size in C. elegans. *Development* **129**, 4989–4998 (2002).
- 149. Vellai T, Bicsák B, Tóth ML, Takács-Vellai K, Kovács AL. Regulation of cell growth by autophagy. *Autophagy* **4**, 507–509 (2008).
- 150.Kammenga JE, Doroszuk A, Riksen JA, Hazendonk E, Spiridon L, Petrescu AJ, Tijsterman M, Plasterk RH, Bakker J. A Caenorhabditis elegans wild-type defies the temperature-size rule owing to a single nucleotide polymorphism in tra-3. *PLoS Genet.* **3**, e34 (2007).
- 151.Hosokawa N, Hara Y, Mizushima N. Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. *FEBS Lett.* **580**, 2623–2629 (2006).
- 152. Morck C, Pilon M. C. elegans feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Dev. Biol.* **6**, 39 (2006).
- 153.Neufeld TP, Baehrecke EH. Eating on the fly: function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in Drosophila. *Autophagy* **4**, 557–562 (2008).
- 154.Driscoll M, Gerstbrein B. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 181-194 (2003).
- 155. Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans. Nature* **419**, 939–944 (2002).
- 156.Chalfie M, Wolinsky E. The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans. Nature* **345**, 410–416 (1990).
- 157.Driscoll M, Chalfie M. The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* **349**, 588–593 (1991).
- 158. Treinin M, Chalfie M. A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in *C. elegans. Neuron* **14**, 871–877 (1995).
- 159. Hall DH, Gu G, Garcia-Añoveros J, Gong L, Chalfie M, Driscoll M. Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. J. Neurosci. **17**, 1033–1045 (1997).
- 160. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. Trends Cell Biol. 14, 70-77 (2004).
- 161. Vellai T, Tóth ML, Kovács AL. Janus-faced autophagy: a dual role of cellular self-eating in neurodegeneration? *Autophagy* **3**, 461–463 (2007).
- 162.Nass R, Hall DH, Miller DM, Blakely RD. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 3264–3269 (2002).
- 163. Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. Autophagy is required for necrotic cell death in Caenorhabditis elegans. *Cell Death Differ*. **15**, 105–112 (2008).
- 164.Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila. *Cell* **131**, 1137–1148 (2007).

- 165. Syntichaki P, Samara C, Tavernarakis N. The vacuolar H+ -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in C. elegans. *Curr. Biol.* **15**, 1249–1254 (2005).
- 166.Chen F, Hersh BM, Conradt B, Zhou Z, Riemer D, Gruenbaum Y, Horvitz HR. Translocation of C. elegans CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* **287**, 1485–1489 (2000).
- 167. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770-776 (2000).
- 168.Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. J. Virol. 72, 8586– 8596 (1998).
- 169. Gumienny TL, Lambie E, Hartwieg E, Horvitz HR, Hengartner MO. Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline. *Development* **126**, 1011–1022 (1999).
- 170.Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494–499 (1992).
- 171. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 741–752 (2007).
- 172.Gems D, Riddle DL. Longevity in Caenorhabditis elegans reduced by mating but not gamete production. *Nature* **379**, 723–725 (1996).
- 173.Barrios A, Nurrish S, Emmons SW. Sensory regulation of C. elegans male mate-searching behavior. *Curr. Biol.* **18**, 1865–1871 (2008).
- 174. Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G. Regulation of C. elegans life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* **290**, 147–150 (2000).
- 175. Vellai T, McCulloch D, Gems D, Kovács AL. Effects of sex and insulin/insulin-like growth factor-1 signaling on performance in an associative learning paradigm in Caenorhabditis elegans. *Genetics* **174**, 309–316 (2006).
- 176.Londsdorf EV, Eberly LE, Pusey AE. Sex differences in learning in chimpanzees. *Nature* **428**, 715–716 (2004).
- 177.Levitan D, Greenwald I. LIN-12 protein expression and localization during vulval development in C. elegans. *Development* **125**, 3101–3109 (1998).
- 178. Wilkinson HA, Greenwald I. Spatial and temporal patterns of lin-12 expression during C. elegans hermaphrodite development. *Genetics* 141, 513–526 (1995).
- 179.Liu J, Fire A. Overlapping roles of two Hox genes and the exd ortholog ceh-20 in diversification of the C. elegans postembryonic mesoderm. *Development* **127**, 5179–5190 (2000).
- 180.Streit A, Kohler R, Marty T, Belfiore M, Takacs-Vellai K, Vigano MA, Schnabel R, Affolter M, Müller F. Conserved regulation of the Caenorhabditis elegans labial/Hox1 gene ceh-13. *Dev. Biol.* 242, 96–108 (2002).
- 181.Burdine RD, Branda CS, Stern MJ. EGL-17(FGF) expression coordinates the attraction of the migrating sex myoblasts with vulval induction in C. elegans. *Development* **125**, 1083–1093 (1998).
- 182.Clark SG, Chiscolm AD, Horvitz RH. Control of cell fates in the central body region of C. elegans by the homeobox gene lin-39. *Cell* **74**, 43–55 (1993).
- 183.Mohler WA, Simske JS, Williams-Masson EM, Hardin JD, White JG. Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the Caenorhabditis elegans hypodermis. *Curr. Biol.* **8**, 1087–1090 (1998).

- 184. Wilkinson HA, Fitzgerald K, Greenwald I. Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a C. elegans cell fate decision. *Cell* **79**, 1187–1198 (1994).
- 185. Hodgkin J. More sex-determination mutants of Caenorhabditis elegans. Genetics 96, 649-664 (1980).
- 186.Zarkower D, Hodgkin J. Molecular analysis of the *C. elegans* sexdetermining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins. *Cell* **70**, 237–249 (1992).
- 187.Zarkower D. Somatic sex determination. In *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.84.1 (2006).
- 188.Meyer BJ. X-chromosome dosage compensation. In *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.8.1 (2005).
- 189.Zarkower D, Hodgkin J. Zinc fingers in sex determination: only one of the two *C. elegans* TRA-1 proteins binds DNA in vitro. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3691–3698 (1993).
- 190.Conradt B, Horvitz RH. The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the *egl-1* cell death activator gene. *Cell* **98**, 317–327 (1999).
- 191.Mason DA, Rabinowitz JS, Portman DS. *dmd-3*, a doublesex-related gene regulated by *tra-1*, governs sex-specific morphogenesis in *C. elegans. Development* **135**, 2373–2382 (2008).
- 192.Peden E, Kimberly E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Xue X. Control of sex-specific apoptosis in *C. elegans* by the BarH homeodomain protein CEH-30 and the transcriptional repressor UNC-37/Groucho. *Genes Dev.* 21, 3195–3207 (2007).
- 193. Schwartz HT, Horvitz HR. The *C. elegans* protein CEH-30 protects male-specific neurons from apoptosis independently of the Bcl-2 homolog CED-9. *Genes Dev.* **21**, 3181–3194 (2007).
- 194. Yi W, Ross J, Zarkower D. *mab-3* is a direct *tra-1* target gene regulating diverse aspects of *C. elegans* male sexual development and behaviour. *Development* **127**, 4469–4480 (2000).
- 195.Szabó E, Hargitai B, Regos Á, Tihanyi B, Barna J, Borsos É, Takács-Vellai K, Vellai T. TRA-1/GLI controls the expression of the *Hox* gene *lin-39* during *C. elegans* vulval development. *Dev. Biol.* **330**, 339–348 (2009).
- 196.Hargitai B, Kutnyánszky V, Blauwkamp TA, Steták A, Csankovszki G, Takács-Vellai K, Vellai T. xol-1, the master sex-switch gene in C. elegans, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1. *Development* **136**, 3881–3887 (2009).
- 197.Mathies LD, Schvarzstein M, Morphy KM, Blelloch R, Spence AM, Kimble J. TRA-1/GLI controls development of somatic gonadal precursors in C. elegans. *Development* 131, 4333–4343 (2004).
- 198.Myers TR, Greenwald I. LIN-35 Rb acts in the major hypodermis to oppose Rasmediated vulval induction in C. elegans. *Dev. Cell* **8**, 117–123 (2005).
- 199.Suissa Y, Kalifa Y, Dinur T, Deshpande G, Schedl P, Gerlitz O. Hrp48 Attenuates Sxl Expression to Allow for Proper Notch Expression and Signaling in Wing Development. Under revision for *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009).
- 200.Brunschwig K, Wittmann C, Schnabel R, Burglin T R, Tobler H, Müller F. Anterior organization of the *Caenorhabditis elegans* embryo by the *labial*-like Hox gene *ceh-13*. *Development* **126**, 1537–1546 (1999).
- 201. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. Cell 2, 283-302 (1992).

- 202.Grote P, Conradt B. The PLZF-like protein TRA-4 cooperates with the Gli-like transcription factor TRA-1 to promote female development in C. elegans. *Dev. Cell* **11**, 561–573 (2006).
- 203. Shemer G, Suissa M, Kolotuev I, Nguyen KC, Hall DH, Podbilewicz B. EFF-1 is sufficient to initiate and execute tissue-specific cell fusion in *C. elegans. Curr Biol.* 14, 1587–1591 (2004).
- 204.Nicoll M, Akerib CC, Meyer BJ. X-chromosome-counting mechanisms that determine nematode sex. *Nature* **388**, 200–204 (1997).
- 205.Carmi I, Kopczynski JB, Meyer BJ. The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. *Nature* **396**, 168–173 (1998).
- 206.Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidative stress in adult Drosophila. *Autophagy* 4, 176–184 (2008).
- 207.Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstein B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1305–1314 (2009).
- 208. Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. Nature 395, 854 (1998).
- 209. Mello C, Fire A. DNA transformation. Methods Cell Biol. 48, 451-482 (1995).
- 210.Rocheleau CE, Yasuda J, Shin TH, Lin R, Sawa H, Okano H, Priess JR, Davis RJ, Mello CC. WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transducer anterior/posterior polarity signals in *C. elegans. Cell* **97**, 717–726 (1999).
- 211.Roggo L, Bernard V, Kovacs AL, Rose AM, Savoy F, Zetka M, Wymann MP, Muller F. Membrane transport in *Caenorhabditis elegans*: an essential role for VPS34 at the nuclear membrane. *EMBO J.* **21**, 1673–1683 (2002).
- 212. Chu DS, Dawes HE, Lieb JD, Chan RC, Kuo AF, Meyer BJ. A molecular link between gene-specific and chromosome-wide transcriptional repression. *Genes Dev.* **16**, 805–976 (2002).

8. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

8.1. A doktori értekezésben tárgyalt közlemények listája (IF: impakt faktor):

- 1. Vellai T, Takács-Vellai K, Zhang Y, Kovács AL, Orosz L, Müller F (2003). Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans. Nature* 426 (6967): 620 (IF: 30,979).
- 2. Kovács AL, Vellai T, Müller F (2004). Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. In: *Autophagy*, ed. Daniel J. Klionsky, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, pp. 219-225.
- 3. Takács-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovács AL, Müller F (2005). Inactivation of the autophagy gene *bec-1* triggers apoptotic cell death in *C. elegans. Curr. Biol.* 15 (16): 1513-1517 (IF: 11,732).
- 4. Vellai T, McCulloch D, Gems D, Kovács AL (2006). Effects of sex and insulin/IGF-1 signaling on performance in an associative learning paradigm in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 174 (1): 309-316 (IF: 4,242).
- 5. Takács-Vellai K, Bayci A, Vellai T (2006). Autophagy in neuronal cell loss: a road to death. *BioEssays* 28 (11): 1126-1131 (IF: 5,965).
- 6. Takács-Vellai K, Vellai T*, Chen EB, Zhang Y, Guerry F, Stern MJ, Müller F (2007). Transcriptional control of Notch signaling by a HOX and a PBX/EXD protein during vulval development in *C. elegans. Dev. Biol.* 302 (2): 661-669 (IF: 4,714). **Corresponding author.*
- Tóth ML, Simon P, Kovács AL, Vellai T (2007). Influence of autophagy genes on ion channel-dependent neuronal degeneration in *Caenorhabditis elegans*. J. Cell. Sci. 120 (6): 1134-1141 (IF: 6,383).
- 8. Vellai T, Tóth ML, Kovács AL (2007). Janus-faced autophagy. A dual role of cellular self-eating in neurodegeneration? *Autophagy* 3 (5): 461-463 (IF: 4,657).
- 9. Aladzsity I, Tóth ML, Sigmond T, Szabó E, Bicsák B, Barna J, Regős Á, Orosz L, Kovács AL, Vellai T (2007). Autophagy genes *unc-51* and *bec-1* are required for normal cell size in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 177 (1): 655-660 (IF: 4,001).
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, ..., Vellai T, ..., Russell DL (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4 (2): 151-175 (IF: 5,479).
- 11. Tóth ML, Sigmond T, Borsos É, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós G, Sass M, **Vellai T** (2008). Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 4 (3): 330-338 (IF: 5,479).
- 12. Vellai T, Bicsák B, Tóth ML, Takács-Vellai K, Kovács AL (2008). Regulation of cell growth by autophagy. *Autophagy* 4 (4): 507-509 (IF: 5,479).

- 13. Sigmond T, Barna J, Tóth ML, Takács-Vellai K, Pásti G, Kovács AL, Vellai T (2008). Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Method. Enzymol.* 451: 521-540 (IF: 2,312).
- 14. Sigmond T, Fehér J, Baksa A, Pásti G, Pálfia Z, Takács-Vellai K, Kovács J, Vellai T, Kovács AL (2008). Qualitative and quantitative characterization of autophagy in *Caenorhabditis elegans* by electron microscopy. *Method. Enzymol.* 451: 467-491 (IF: 2,312).
- 15. Vellai T (2009). Autophagy genes and ageing. Cell Death Differ. 16 (1): 94-102 (IF:7,548).
- Szabó E, Hargitai B, Regős Á, Tihanyi B, Barna J, Borsos É, Takács-Vellai K, Vellai T (2009). TRA-1/GLI controls the expression of the *Hox* gene *lin-39* during *C. elegans* vulval development. *Dev. Biol.* 330 (2): 339-348 (IF: 4,416).
- 17. Vellai T, Takács-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ (2009). The regulation of aging does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol.* 19 (10): 487-494 (IF: 13,385).
- Hargitai B, Kutnyánszky V, Blauwkamp TA, Steták A, Csankovszki G, Takács-Vellai K, Vellai T (2009). *xol-1*, the master sex switch gene in *C. elegans*, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1/GLI. *Development* 136 (23): 3881-3887 (IF: 6,812).
- 19. Vellai T, Takács-Vellai K (2009). Regulation of protein turnover by longevity pathways. In: *Protein synthesis and aging*, ed. Nektarios Tavernarakis, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, *in press*.

Az értekezésben tárgyalt közlemények száma: 19 (ezekben első és utolsó szerző: 15)¹⁵

Az értekezésben tárgyalt közlemények összesített impakt faktora: 125,895

Az értekezésben tárgyalt első és utolsó szerzős közlemények összesített impakt faktora:

106,372

8.2. Egyéb közlemények (megjelenés sorrendjében):

- 1. Vellai T, Takács K, Vida G (1998). A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. J. Mol. Evol. 46 (5): 499-507 (IF: 3,271).
- 2. Triga D, Pamjav H, **Vellai T**, Fodor A, Buzás Z (1999). Gel electrophoretic restriction fragment lenght polymorphism analysis of DNA derived from individual nematodes, using the PhastSystem. *Electrophoresis* 20 (6): 1274-1279 (IF: 3,447).
- 3. Pamjav H, Triga D, Buzas Z, Vellai T, Lucskai A, Adams B, Reid AP, Burnell A, Griffin C, Glazer I, Klein MG, Fodor A (1999). Novel application of PhastSystem polyacrylamide gel electrophoresis using restriction fragment lenght polymorphism internal transcribed spacer patterns of individuals for molecular identification of entomopathogenic nematodes. *Electrophoresis* 20 (6): 1266-1273 (IF: 3,447).

¹⁵ A 6. számú közleménynek második, de *corresponding* szerzője vagyok.

- 4. Vellai T, Vida G (1999). The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266 (1428): 1571-1577 (IF: 2,755).
- 5. Vellai T, Kovács AL, Kovács G, Ortutay C, Vida G (1999). Genome economization and a new approach to the species concept in bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266 (1432): 1953-1959 (IF: 2,755).
- 6. Ortutay C, Gáspári Z, Tóth G, Jáger E, Vida G, Orosz L, Vellai T (2003). Speciation in *Chlamydia*: Genomewide phylogenetic analyses identified a reliable set of acquired genes. *J. Mol. Evol.* 57 (6): 672-680 (IF: 3,114).
- Menzel O*, Vellai T*, Takács-Vellai K, Reymond A, Mueller F, Antonarakis SE, Guipponi M (2004). The *Caenorhabditis elegans* ortholog of *C21orf80*, a potential new protein O-fucosyltransferase, is required for normal development. *Genomics* 84 (2): 320-330 (IF: 3,84). **Contributed equally*.
- 8. Szöllősi GJ, Derényi I, **Vellai T** (2006). The maintenance of sex in bacteria is ensured by its potential to reload genes. *Genetics* 174 (4): 2173-2180 (IF: 4,242).
- Kovács AL, Pálfia Z, Réz G, Vellai T, Kovács J (2007). Sequestration revisited. Integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy* 3 (6): 655-662 (IF: 4,657).
- 10. Kassai-Jáger E, Ortutay C, Tóth G, Vellai T, Gáspári Z (2008). Distribution and evolution of short tandem repeats in closely related bacterial genomes. *Gene* 410 (1): 18-25 (IF: 2,578).
- Borsy A, Podani J, Stéger V, Balla B, Kósa J, Gyurján I, Molnár A, Szabolcsi Z, Szabó L, Jáko E, Zomborszky Z, Nagy J, Semsey S, Vellai T, Lakatos P, Orosz L (2009). Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Mol. Genet. Genomics* 281 (3): 301-313 (IF: 2,838).
- 12. Vellai T, Klionsky DJ (2010). A second report from the EMBO conference on autophagy: mechanism, regulation and selectivity of autophagy. *Autophagy* 6 (1): 197-198 (IF: 5,479).

Összes közlemények száma: 31

Összes közlemény összesített impakt faktora: 162,839

Összes hivatkozások száma: 845 (független: 648)

9. FÜGGELÉKEK

9.1. Módszertan

9.1.1. C. elegans *törzsek*

A kísérletekben használt vad típusú törzs: N2, Bristol izolátum (14); a többi törzs genotípusa

az alábbiak voltak (e törzsek keresztezésével előállított kombinációkat nem tüntetem fel):

AH24 gaEx[lin-3::gfp+unc-119(+)]; unc-119(e2498)III AH30 zhIs1[lin-39::gfp + unc-119(+)]IV; unc-119(e2498)III AH35: unc-119(e2498)III; zhIs1[unc-119(+) + lin-. 39::gfp] $AH142 \ zhIs4[lip-1::gfp + unc-119(+)]; \ unc-119(e2498)III$ BU050 daf-2(e1370)III; him-5(e1490)V BU051 daf-2(e1368)III; him-8(e1489)V BU052 daf-18(nr2037)IV; him-8(e1489)V BU053 daf-18(e1375)IV; him-8(e1489)V BU070 Ex[plgg-1::LGG-1::GFP + rol-6(su1006)] BU071 buIs1[GFP::plgg-1::LGG-1] BU099 *hbEx2*[*mut* pxol-1::gfp + unc-119(+) +rol-6(su1006)] BY200 [pdat-1::gfp + rol-6(su1006)], Ex[plgg-1::GFP::LGG-1 + rol-6(su1006)] CB369 unc-51(e369)V CB428 dpy-21(e428)V CB678 lon-2(e678)X CF1038 daf-16(mu86)I CB1189 unc-51(e1189)V CB1370 daf-2(e1370)III CB1375 daf-18(e1375)IV CB1489 him-8(e1489)IV CB1611 mec-4(e1611)X CB2590 tra-1(e1099)/+III; dpy-18(e1096)III CB2810 tra-1(e1575)/+ III; unc-42(e270) him-5(e1490) dpy-21(e428)V CB2823 tra-1(e1488)III; eDp6(III;f) CB3769 tra-1(e1575gf)/+III; tra-3(e1767)IV CB3844 fem-3(e2006)IV CB4088 him-5(e1490)V CB4876 *clk-1(2519*)III CB13515 sIs13209[atg-18::gfp] DH1033 sqt(sc103)II; bIs1[VIT-2::GFP + rol-6(su1006)]X DR466 him-5(e1490)V DR1564 daf-2(m41)III DR1572 daf-2(e1368)III FR297 *swEx226*[*CeTor::gfp* + *rol-6(su1006)*] FR462: bIs1[vit-2::gfp; rol-6(su1006)]X FR758 *swEx520*[pbec-1::BEC-1::GFP + rol-6(su1006)] FR791 swEx543[ceh-20::gfp+rol-6(su1006)] FR811 swEx543[ceh-20::gfp+rol-6 (su1006)]; ceh-20(ay38)unc-36(e251)III FR826 ceh-20(ay9)lin-12(n137)dpy-19(e1259)III FR849 swEx576[hs::lag-2+rol-6(su1006)] FR853 bec-1(ok691)IV; swEx520[pbec-1::BEC-1::GFP + rol-6(su1006)] FR854 bec-1(ok700)IV; swEx520[pbec-1::BEC-1::GFP + rol-6(su1006)] GS956 arIs11[lin-12::lacZ+rol-6(su1006)]III; smg-1(r861)unc-54(r293)I GS1913: arIs37[myo-3::SEL-1(signal sequence)::GFP;dpy-20(+)]I, dyp-20(e1282)IV; him-5(e1420)V GS2146 arIs41[lin-12::gfp+rol-6(su1006)] GR1307 daf-16(mgDf50)I GR1308 daf-2(e1370)III; daf-16(mgDf54)I GR1309 daf-2(e1370)III; daf-16(mgDf47)I JK2868 qIs56[lag-2::gfp+unc-119(+)]IV or V; unc-119(ed3)III JT709 pdk-1(sa709)X KR344 let-363(h98)dpy-5(e61)unc-13(e450)I; sDp2(I;f)

MT111 *lin-8(n111)*II MT688 lin-12(n137)/unc-32(e189)III; him-5(e1490)V MT1522 ced-3(n717)IV MT1806 *lin-15(n767*)X MT1808 *lin-38(n751)*II MT2124 *let-60(n1046gf)*IV MT2375 lin-12(n137)dpy-19(e1259)/lin-12(n676n909)unc-32(e189)III; him-5(e1467)V MT2547 ced-4(n2547)III MT4007 lin-39(n1760)III MT4491 lin-39(n1872)III MT4770 ced-9(n1950)III MT4866 let-60(n2021)IV MT6034 *lin-36(n766)*III MT8878 dpl-1(n2994)II MT10430 lin-35(n745)I MT11147 *dpl-1(n3643)*II NH646 avIs9[egl-17::gfp+dpy-20(+)]V; dpy-20(e1282ts)IV NH2106 ceh-20(av9)III NH2241 ceh-20(av34)III NH2285 ceh-20(ay38)unc-36(e251)III; sDp3(III;f) NH2286 ceh-20(ay37)unc-36(e251)III; sDp3(III;f) NH2332 ceh-20(ay42)unc-36(e251)III NG41 *sex-1(gm41)*X NL1008 *pkEx246*[*cdh-3*::*gfp+dpy-20(+)*]; *dpy-20(e1362)*IV NL2099 rrf-3(pk1426)II, daf-2(e1370)III NS3227 daf-18(nr2037)IV pmec-4::MEC- 4::GFP + rol-6(su1006) pmec-4::gfp + rol-6(su1006)] RA91 ql76 I/hT2 [qls48(tra-1::gfp)](I;III) RA7 rdEx1[tra-1::gfp +rol-6(su1006)] SU93 *jcIs1*[*ajm-1::gfp+rol-6(su1006)+unc-29(+)*]IV TJ1052 age-1(hx546)II TU1366 deg-1(u506)X TU1747 deg-3(u662)V, mec-4(u231)X TY1807 xol-1(v9)X TY2384 sex-1(y263)X TY2431 him-8(e1487)V; xol-1::gfp(vIs34)V VC893 atg-18(gk378)V VC2312 let-363(ok3018)I/hT2[bli-4(e937) let-?(q782)qIs48](I;III)

9.1.2. Élethossz mérések, öregedési ráta vizsgálatok

Az élethossz méréseket 25°C-on végeztük el. Kivételt a daf-2(-) mutánsok képeztek, amelyek 25°C-on nem öregedő ún. dauer lárva állapotba fejlődnek. A dauer lárva egy alternatív egyedfejlődési állapot (diapausa), amelyet vad típusú állatokban a nagy egyedsűrűség és a tápanyagok hiánya indukál. A daf-2(-) mutánsok élethosszának mérése 20°C-on történt; ezen a hőmérsékleten a daf-2 mutánsok normálisan fejlődnek. Az állatok szinkronizálásához 20-30 fiatal felnőtt hermafroditát (P generáció) egy új NGM agar lemezre helyeztünk 4-5 órára, majd az állatokat eltávolítottuk. Az időközben lerakott embriókat fiatal (*non-gravid*) felnőtt állapotig hagytuk fejlődni (F1), majd 50-60 állatot 300 mg/ml FUDR-ot (5-fluoro-2'-deoxyuridine) tartalmazó lemezekre helyeztünk 1 óra időtartamra. Ez volt a t=0 nap időpillanat. A FUDR meggátolja a sejtosztódást, így az állatok sterilekké váltak (a felnőtt

állatban már nem képződik szomatikus sejt, csupán az ivarszerv hoz létre csírasejteket; a csíravonal aktivitása jelentős különbségeket mutat a különböző mutáns törzsek között, és ez a különbség jelentős eltérések forrása lehet az élethossz mérésekben). A steril F1 állatokat aztán a végső *assay* lemezekre helyeztük, és egyedileg meghatároztuk pusztulásuk időpontját. Egy állatot akkor tekintettünk elpusztultnak, amikor a garat mozgása leállt és az állat érintésre nem mozdult meg. Az átlagos élethossz értékek meghatározásához és a statisztikai analízishez az SPSS 14 software-t használtuk. A Kaplan-Meyer növekedési görbék két csoport közötti összehasonlításához a p értéket (0,05-től szignifikánsnak tekintve) *long-rank* (Mantel-Cox) teszttel határoztuk meg.

Az öregedési pigment (lipofuscin) mennyiségének meghatározását fluoreszcens spektroszkópiával (Spex Fluoromax spectrofluorimeter, Edison, NJ, USA) végeztük el. A vizsgálatokhoz mintánként 30 darab állatot gyűjtöttünk kétnaponta, amelyekből mosással távolítottuk el a baktérium szennyeződést. Ezt követően az állatokat szonikálással tártuk fel (Branson Sonifier 250, output level 2, duty cycle 50%, Branson Ultrasonics Corp. Danbury, CT, USA), a mintákat jégen tartottuk 1 ml UP vízben, a lebegő részeket centrifugálással (0,5 perc, 3000 rpm) távolítottuk el. A felülúszóban a Trp (triptofán; kontroll) mennyiségét 290/330 nm (*excitation/emission*) hullámhosszon, a lipofuscin mennyiségét 340/430 nm-en detektáltuk (*130*).

A mozgási vizsgálatokat szinkronizált állatokon végeztük el. 5-10 felnőtt fiatal állatot helyeztünk 1-1 lemezre, majd spontán mozgásukat minden másnap nyomon követtük. Mozgásuk alapján az állatokat két csoportba osztottuk: vad típusú osztály (konstans, színuszoid irányú normális mozgású állatok) és paralizált osztály (nem vagy nehezen mozgó állatok). Mindegyik állat mozgása a vad típusú osztályban kezdődött, majd meghatároztuk azt a napot, amikor a paralizált osztályba átkerült. Az eleve béna mozgású (*uncoordinated*, Unc) törzseket (pl. *unc-51*) kihagytuk a vizsgálatból.

9.1.3. RNS interferencia

Vegyes stádiumú vad típusú populációkból teljes mRNS izolátumot nyertünk TRIZOL felhasználásával (Burdin és Stern, szóbeli közlés). A mRNS templátról reverz transzkiptázzal kb. 600-900 bp hosszúságú cDNS szakaszokat írtunk át. A kapott cDNS fragmentumokat T-vektorba (Promega), majd RNSi vektorba (pPD129.36; 208) klónoztuk. A konstrukciókat speciális tetraciklin rezisztens HT115 *E. coli* törzsbe transzformáltuk, majd 37°C-on történt egyéjszakás növesztés után a tenyészeteket induktív (IPTG-t tartalmazó; 100mM) NGM

(nematode growth medium) lemezekre szélesztettük. A PCR reakciókhoz használt forward és

reverse primerek az alábbiak voltak:

| lgg-1 | 5'-CAT GCC ATG GCA TGT GGG CTT ACA AGG AGG AGA AC-3' és 5'-CAT GCC |
|---------------|---|
| | ATG GCA TGT TCC CTT CTT TTC GAC CTC TCC-3' |
| daf-2 | 5'-TTG GAA GCT CTC GGA ACA ACC AC-3' és 5'-ATG AAC GAC GTT GAA GGA |
| | GAA GG-3' |
| T22H9.2/atg-9 | 5'-AGA ATG GCG GTT ATT TGT GC-3' és 5'-TGG TCA AGC TCG TTG AAG TG-3' |
| let-363/CeTor | 5'-CAT GCC ATG GCA TGA ACA ATT GGC AAA TTT CGT G-3' és 5'-CAT GCC ATG |
| | GCA TGT GCA CGT AAC GAT GGA GAA C-3' |
| atp-3 | 5'-TAA TGG CGC AAC TCA TGA AA-3' és 5'-GCA AGG GCA TCC TTG TAT TT-3' |
| ceh-20 | 5'-ATG ACC ACA TCA ACATCA CCG TCA-3' és 5'-CTA GAATTG ATT GAA AAG |
| | TGG GAA C-3' |
| mab-5 | 5'-ATG AGC ATG TAT CCT GGA TGG-3' és 5'-TCA AGA AGA ATG TTG TTC ATT TTG |
| | C-3'. |
| daf-18 | 5'-CAT GCC ATG GCA TGT TCC ATC ACA ACG ACG CTA C-3' és 5'-CAT GCC ATG |
| U C | GCATGC CGA ACA CTT CGC TCT TTT C-3'. |
| tra-1 | 5'-CTA GCT AGC TAG ACA ATC CGG AGC ATC TCAAG-3' és 5'-GGG GTA CCC CTG |
| | ATG ATG TTG AGC CAG AGC-3' |
| tra-1a | 5'-ACG TGC TCA ACA ACT CAT GG-3' és 5'-TCT AAT GGA CGA CGG GTT ATG-3' |
| tra-1ab | 5'-AGG ATC CCG ATA CGG TTG TC-3' és 5'-TGG CAA CCG TAC TAC CAT TTG-3' |
| fem-3 | 5'-TCC GGG TTC AGA TGA TGT AG-3' és 5'-TCA AAC GGC GAA ATT TGT AAC-3' |
| lin-12 | 5'-CGC TTC ATA TTG GCT CAT GTC-3" és 5'-CCA GCT TCG CAT TTA TTA TTC AC- |
| | 3' |
| xol-1 | 5'-CAT GCC ATG GCA TGG CGC GAA AAC AGT CCA GTC-3' és 5'-CAT GCC ATG |
| | GCA TGG CCG TCG TCG AAA AAT GAG-3' |
| sea-2 | 5'-CAT GCC ATG GCA TGC GGA AAG CTC CTC AAC TCT G-3' és 5'-CAT GCC ATG |
| | GCA TGA CCG TCA CGA ATG AGG TTT C-3' |
| | |

9.1.4. Transzgénikus törzsek létrehozása

Transzgénikus nematoda törzseket *standard* klónozási és transzformációs (mikroinjektálással történő) technikákkal állítottunk elő (*209*). Az expressziós vektorokat Andrew Fire-től (*Standford Univ.*) kaptuk. A BEC-1::GFP riporter konstrukció előállításához egy 9 Kbp hosszúságú genomi (5,6 Kbp szabályozó régiót és – az utolsó stop kodon kivételével – a teljes kódoló régiót tartalmazó) fragmentumot az alábbi primerekkel amplifikáltuk fel: 5'-GCT ACT CCT GCA GGC ATA GCG CGT AAT TAC TAT TGC GTT CTC G-3' és 5'-CGG GAT CCC GAA TAG GCG ATC TGA GAG CAT CG-3'. A PCR terméket *Sbfl* és *BamHI* restrikciós enzimekkel emésztettük és pPD95.75 expressziós vektorba klónoztuk. A csíravonal transzformációhoz 50 µg/ml koncentrációjú DNS oldatot használtunk 30 µg/ml kotranszformációs marker [pRF4 (*rol-6(su1006)*] alkalmazásával. A DNS oldat injektálása immobilizált vad típusú állatok disztális gonádkarjába történt Narashige mikroinjektor és Zeiss Axiovert 135 invert fénymikroszkóp használtával. A transzformás állatok Rol (roller – tengelyük mentén körbe-körbe forognak) fenotípusúak voltak a domináns *rol-6(su1006)* allél következtében. A transzgén menekítette a *bec-1(-)* null mutáns állatok embrióéletképtelen fenotípusát.

Az *lgg-1::gfp* riporter konstrukció előállításához egy 3746 bp hosszúságú genomi régiót amplifikáltunk fel az alábbi primerekkel: 5'-AAC TGC AGA ACC AAT GCA TTG GCC GAG GGA AAA GAC GAA GAG-3' és 5'-TCC CCC GGG GGA CGA CCT CTC CTC CAT ACA CAC-3'. A PCR terméket *PstI* és *SmaI* enzimekkel emésztettük, majd pPD95.75 vektorba klónoztuk. Transzgénikus állatok előállítása a fentebb leírtakhoz hasonlóan ment végbe.

A CEH-20::GFP riporter előállításához egy 10 Kbp hosszúságú (7 Kbp *upstream* promóter elemet tartalmazó) genomi fragmentet sokszorosítottunk az 5'-ACA TGC ATG CAT GTA AGA GTG CGG ACG GTA GAG-3' és 5'-TCC CCC CGG GGG GAA GCATTG TCC ATT TGT TGT TG-3' primerekkel. A PCR terméket pPD95.75 vektorba klónoztuk, transzgénikus állatokat csíravonal transzformációval állítottuk elő. A transzgén *swEx543*[*ceh-20::gfp+rol-6(su1006)*] képes volt menekíteni a *ceh-20(-)* genetikai null mutáns állatok [*ceh-20(ay38);unc-36(e251)*III; *sDp3*(III;f)] lárva-életképtelen fenotípusát.

A mutáns promóter elemet tartalmazó *xol-1::gfp* riporter rendszer (pmut*xol-1::gfp*) létrehozásához két genomi fragmentumot amplifikáltunk az alábbi primerek felhasználásával: 5'-AAG GCG CGC CTT GCA GAA CAG CTT TGA TCG-3' és 5'-TGT TGA CCG TTA CAG GGG TAT TCG CGG GCG TTT GAA AAT AGT G 3'; valamint 5'-CGA ATA CCC CTG TAA CGG TCA ACA CGA CGA AAA CCT CTT GTT CC-3' és 5'-TTG CGG CCG CAA GGA CCC TGC AAC AAA ACG-3'. A PCR termékeket elegyítettük és "fúziós PCR"-rel állítottuk elő a végleges fragmentumot, amelyet *AscI* és *NotI* enzimekkel emésztettük, majd pRH21 expressziós vektorba klónoztuk. Az extrakromoszómális transzgént hordozó állatok expressziós analízisét vad típusú vs. *him-5(e1490)* mutáns háttérben végeztük el.

9.1.5. DNS-fehérje kötési vizsgálatok

A DNS-fehérje kötési (EMSA; *electrophoretic mobility shift assay*) vizsgálatokhoz a TRA-1A fehérjét *in vitro* transzkripcióval és transzlációval állítottuk elő T7-alapú retikulocita lizátum rendszerben (*TNT Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega*). A templátként szolgáló teljes hosszúságú *tra-1* cDNS-t (pDZ118) David Zarkowertől (Univ. of Minnesota) kaptuk. Az *in vitro* transzláció után 50 μ M ZnSO₄-ot adtunk a fehérjéhez. DNS próbaként egyszálú oligonukleotidokat annelláltunk TE oldatban, majd jelöltünk Klenow enzimmel ₃₂P α -dCTP jelenlétében. A felhasznált oligonukleotidok szekvenciája az alábbiak voltak:

*egl-1 L 5'-*GGG GGA GAA TTT TAT GGA CCA CCC GGT TAG GAG TA-3' *egl-1 R 5'-*GGG GGT ACT CCT AAC CGG GTG GTC CAT AAA ATT CT-3' *lin-39 L 5'-*GGG GGT CTT AAA CCA TGA CCA CCC ACT TGA GCA CA-3' *lin-39 R 5'-*GGG GGT GTG CTC AAG TGG GTG GTC ATG GTT TAA GA-3' *lin-39 mut L 5'-*GGG GGT CTT AAA CCA TCG GTA CCC ACT TTC GCA CA-3' *lin-39mut R* 5'-GGG GGT GTG CGA AAG TGG GTA CCG ATG GTT TAA GA-3' *mab-3* L 5'-GGG GGC GTT CTC TAA TTA TCG TCG TGT GAG GTC TTC TAT-3' *mab-3* R 5'-GGG GGA TAG AAG ACC TCA CAC GAC GAT AAT TAG AGA ACG-3' *xol-1* L 5'-GGG GCC CCT GTA AGA CCA CAC ACG ACG AAA ACC TCT TGT T-3' *xol-1* R 5'-GGG GAA CAA GAG GTT TTC GTC GTG TGT GGT CTT ACA GGG G-3' *mut xol-1* L 5'-GGG GGC CCC TGT AAC GGT ACA CAC GAC GAA AAC CTC TTG TT-3' *mut xol-1* R 5'-GGG GGA ACA AGA GGT TTT CGT CGT GTG TAC CGT TAC AGG GG-3'

A termékeket 4%-os natív poliakrilamid gélen futtattuk meg (160-18V), majd a jeleket autoradiográfiás előhívással detektáltuk (Kodak XAR röntgenfilmen).

9.1.6. Co-immunoprecipitáció (Co-IP)

Co-immunoprecipitációt *standard* protokollok szerint végeztük el (*210*). Kevert stádiumú állatokból homogenizátumot készítettünk [lízis puffer: 25 mM HEPES NaOH (pH=7.4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5% TritonX-100, 1mM EDTA NaOH, és proteáz inhibitor koktél (Roche)] POLYTRON homogenizátorral (Kinematica AG). A BEC-1::GFP fúziós fehérjét 1 µg monoklonális anti-GFP antitesttel (3E6, Quantum Biotechnologies) kötöttük ki, majd a komplexet immunoblotton detektáltuk poliklonális 1:1000 hígítású anti-LET-512 antitest (*211*) és poliklonális 1:3000 hígítású anti-CED-9 antitest (Robert Horvitz szívességéből, MIT) felhasználásával.

Az *in vitro* kötési vizsgálathoz S-metionin-jelölt teljes hosszúságú CED-9 fehérjét állítottunk elő *in vitro* transzlációval. BEC-1::GFP és FBF-1::GFP fúziós fehérjéket *E. coli* BL21 törzsben expresszáltuk, izoláltuk, majd glutation-Szefarózhoz kötöttük. 5 μl gyöngyöt adtunk 3 μl *in vitro* szintetizált CED-9 fehérjéhez, és ezt inkubáltuk 1,5 óráig 4°C-on 300 μl kötő-pufferben [50 mM Tris (pH=8), 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 5mM DTT, 0.5% Nonidet P40) enyhe rázatás közben. A gyöngyöket párszor átmostuk, a kötött fehérjéket SDS-PAGE gélen szeparáltuk, és autoradiográfiás módszerrel detektáltuk.

9.1.7. Chromatin-immunoprecipitáció (ChIP)

A ChIP kísérleteket alapvetően Chu és mtsi. (212) leírása szerint végeztük el. Minden reakcióban vad típusból és *lin-39(n1760)* mutánsból származó 3-3 mg teljes fehérje izolátumot inkubáltunk anti-LIN-39 antitesttel (Cynthya Kenyon szívességéből) egy éjszakán át 4°C-on. Kevert stádiumú állatokat M9 pufferben oldott 2% formaldehiddel fixáltuk szobahőmérsékleten 30 percig. A felesleges formaldehidet 0,1M Tris-HCl (pH=7,5) mosás segítségével távolítottuk el. A mintákat ezután M9 pufferben mostuk. Lizátumokat szonikálással állítottuk elő proteáz inhibitor koktélt (Roche) tartalmazó pufferben. A sejtmaradványokat centrifugálással és azt követően Protein A szefaróz szűrő alkalmazásával

távolítottuk el. Lizátumokat 10 µg antitesttel inkubáltuk egy éjszán. A nem-specifikus aggregátumokat centrifugálással távolítottuk el, majd az immunokomplexeket Protein A szefaróz oszlopra kötöttük ki, mostuk háromszor 1 ml ChIP pufferben, mostuk egyszer 1 ml TE pufferben, és végül eluáltuk 1% SDS, 0,01M Tris-HCl (pH= 8) oldatban. A formaldehid keresztkötéseket 0,2M NaCl-ban revertáltuk egy éjszakán át 65°C-on. A fehérjéket Proteináz-K emésztéssel távolítottuk el, a DNS-t QIAquick kittel (QIAGEN) tisztítottuk. 2 µl tisztított precipitátumot használtunk a PCR reakciókhoz. A reakciókhoz használt primerek: 5'-GGT TGA AGA CAA ATG GGT GT-3' és 5'-GCC GTT TTC CAA AAT TTC C-3'; 5'-TTG GAA AAT TTG GAA ATG CAC-3' és 5'-GTT TGA AAT TGC CCC ACA AG-3'; 5'-GGG CTC TCG GTA TCT GTT CC-3' és 5'-ACC TAA GCG GCT GAG CAC AT-3'.

9.1.8. Sejthalál vizsgálatok (TUNEL festés)

Fiatal felnőtt hermafroditákat nagy mennyiségben tartalmazó 4-5 petri lemezről hipoklorit kezeléssel embriókat nyertünk, majd az embriókat fixáltuk. A fixált embriókat egyszer Tris-Triton pufferben (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl pH=4), háromszor PBST pufferben (1X PBS, 0.5% Triton X-100) mostuk, majd végrehajtottuk a TdT reakciót a *Dead End Fluorometric Tunel Assay* kit (Promega) segítségével.

9.1.9. Elektronmikroszkópia

Transzmissziós elektronmikroszkópiához a minták fixálását és beágyazását egyedileg végeztük el (71). 0,2% glutáraldehidet és 3,2% formaldehidet tartalmazó 0,15M kakodilát oldatban az állatokat hosszanti rányban felvágtuk egyszerű fénymikroszkóp alatt. Egy éjszakás inkubálást (4°C-on) követően a mintákat 0,1M kakodilát pufferben mostuk, majd agarba ágyaztuk és utófixáltuk 0.5% OsO₄- tartalmazó 0,1M kakodilát pufferben. A festés 2% uranil acetáttal, dehidrálást etanolban és propilén oxidban, a beágyazás Durcupanba (Fluka) történt. A minták "szeletelését" Reichert-Jung Ultracut-E típusú ultramikrotómmal, a festést ólomcitráttal, a mikroszkópiát JEM100CX II elektronmikroszkóppal végeztük.

9.2. Táblázatok

F1. Táblázat. Autofáia gén deficiens állatok átlagos élethossza.

| Genotípus | Átlagos élethossz ± SEM (napokban) | 50% | Ν | P érték a kontrollhoz |
|-----------------------------------|---------------------------------------|-----|-----|--------------------------|
| | | | | képest |
| Vad típus (N2) | 14.9 ± 0.1 | 13 | 112 | |
| <i>bec-1(ok691); Ex[bec-1(+)]</i> | 10.3 ± 0.1 | 9 | 174 | < 0.0001 |

| <i>bec-1(ok700); Ex[bec-1(+)]</i> | 13.7 ± 0.2 | 12 | 183 | < 0.0181 |
|--|---|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| unc-51(e369) | 13.9 ± 0.3 | 12 | 132 | < 0.0023 |
| unc-51(e1189) | 13.1 ± 0.3 | 10 | 130 | < 0.0046 |
| vab-8(e1017) | 10.1 ± 0.4 | 8 | 84 | < 0.0001 |
| vab-8(gm84) | 8.9 ± 0.3 | 11 | 66 | < 0.0001 |
| atg-18(gk378) | 12.2 ± 0.1 | 10 | 185 | < 0.0001 |
| | | | | |
| | | | | |
| rrf-3(pk1426) [E. coli HT115] | 15.5 ± 0.2 | 14 | 181 | |
| <i>rrf-3(pk1426)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); lgg-1(RNAi)</i> [<i>E.</i> | 15.5 ± 0.2 11.4 \pm 0.1 | 14 9 | 181 147 | < 0.0001 |
| <i>rrf-3(pk1426)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); lgg-1(RNAi)</i> [<i>E. coli</i> HT115] | 15.5 ± 0.2 11.4 ± 0.1 | 14 9 | 181 147 | < 0.0001 |
| <i>rrf-3(pk1426)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); lgg-1(RNAi)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); M7.5(RNAi)</i> [<i>E.</i> | 15.5 ± 0.2 11.4 ± 0.1 12.5 ± 0.5 | 14 9 10 | 181 147 140 | < 0.0001 < 0.0001 |
| <i>rrf-3(pk1426)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); lgg-1(RNAi)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); M7.5(RNAi)</i> [<i>E. coli</i> HT115] | 15.5 ± 0.2 11.4 ± 0.1 12.5 ± 0.5 | 14 9 10 | 181 147 140 | < 0.0001 < 0.0001 |
| <i>rrf-3(pk1426)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); lgg-1(RNAi)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); M7.5(RNAi)</i> [<i>E. coli</i> HT115] <i>rrf-3(pk1426); T22H9.2(RNAi)</i> | 15.5 ± 0.2 11.4 ± 0.1 12.5 ± 0.5 11.9 ± 0.4 | 14 9 10 10 | 181 147 140 136 | < 0.0001 < 0.0001 < 0.0001 |

A kontroll baktérium az üres RNSi vektort expresszálta. Az 50% az az érték, ahol az állatok fele még élt. A P értékek az ún. long-rank teszttel voltak kalkulálva.

| F2. | Táblázat. | Autofág | gének | inaktiválása | szuppresszálja | a hosszú | életidejű | mutánsok |
|-----|--------------|----------|-------|--------------|----------------|----------|-----------|----------|
| meg | gnyúlt élett | artamát. | | | | | | |

| Genotype | Mean lifespan ± | 50% | Ν | P value vs. |
|--|-----------------|-----|-----|-------------|
| | SEM (days) | | | control |
| Vad típus (N2) | 15.5 ± 0.6 | 14 | 73 | |
| daf-2(e1370) | 32.1 ± 0.6 | 31 | 64 | |
| daf-2(e1370); bec-1(ok691); | 26.1 ± 0.5 | 26 | 185 | < 0.0001 |
| Ex[bec-1(+)] | | | | |
| daf-2(e1370); atg-18(gk378) | 24.2 ± 0.5 | 24 | 147 | < 0.0001 |
| <i>daf-2(e1370); vab-8(e1017)</i> | 18.8 ± 0.4 | 19 | 158 | < 0.0001 |
| daf-2(e1370); M7.5(RNAi) | 23.9 ± 0.3 | 24 | 132 | < 0.0001 |
| daf-2(e1370); lgg-1(RNAi) | 26.6 ± 0.5 | 26 | 95 | < 0.0001 |
| daf-2(RNAi) | 28.9 ± 0.3 | 29 | 122 | |
| daf-2(RNAi); atg-18(gk378) | 22.1 ± 0.6 | 22 | 18 | < 0.0001 |
| daf-2(RNAi); vab-8(e1017) | 17.5 ± 0.3 | 17 | 90 | < 0.0001 |
| | | | | |
| Vad típus (N2) [<i>E. coli</i> HT115] | 14.3 ± 0.4 | 14 | 66 | |
| TOR/let-363(RNAi) | 18.4 ± 0.4 | 17 | 88 | |
| <i>let-363(RNAi); bec-1(ok691);</i> | 11.4 ± 0.3 | 9 | 82 | < 0.0001 |
| Ex[bec-1(+)] | | | | |
| <i>let-363(RNAi); vab-8(e1017)</i> | 11.3 ± 0.4 | 10 | 53 | < 0.0001 |
| <i>let-363(RNAi); atg-18(gk378)</i> | 11.7 ± 0.3 | 10 | 46 | < 0.0001 |
| <i>let-363(RNAi); unc-51(e369)</i> | 11.5 ± 0.2 | 10 | 129 | < 0.0001 |
| | | | | |
| Vad típus (N2) | 13.2 ± 0.6 | 11 | 46 | |
| eat-2(ad1116) | 18.7 ± 0.8 | 19 | 53 | |
| eat-2(ad1116); unc-51(e369) | 10.0 ± 0.5 | 10 | 56 | < 0.0001 |
| eat-2(ad1116); bec-1(ok691); | 11.5 ± 0.5 | 11 | 57 | < 0.0001 |
| Ex[bec-1(+)] | | | | |
| <i>eat-2(ad1116)</i> [<i>E. coli</i> HT115] | 12.4 ± 0.8 | 12 | 51 | |
| eat-2(ad1116); T22H9.2(RNAi) | 8.8 ± 0.4 | 9 | 56 | 0.001 |
| Vad típus (N2) [E. coli HT115] | 14.1 ± 0.4 | 14 | 66 | |
| atp-3(RNAi) | 20.4 ± 0.5 | 20 | 69 | |
| <i>atp-3(RNAi); bec-1(ok691);</i> | 11.5 ± 0.8 | 12 | 56 | < 0.0001 |
| Ex[bec-1(+)] | | | | |

| atp-3(RNAi); vab-8(e1017) | 11.7 ± 0.4 | 12 | 113 | < 0.0001 |
|--|----------------|----|-----|----------|
| atp-3(RNAi); atg-18(gk378) | 10.3 ± 1.6 | 10 | 39 | < 0.0001 |
| atp-3(RNAi), unc-51(e369) | 14.2 ± 0.7 | 14 | 55 | < 0.0001 |
| clk-l | 23.5 ± 0.9 | 24 | 75 | |
| <i>clk-1; bec-1(ok691); Ex[bec-1(+)]</i> | 13.2 ± 0.7 | 13 | 54 | < 0.0001 |

F3. Táblázat. Potenciális TRA-1A célgének a C. elegans genomban.

| ORF | Gén | Feltételezett | A kötőhely pozíciója | A C. briggsae |
|----------|---|--|------------------------------------|---|
| | - | biológiai funkció | · | kötőhely pozíciója |
| C06E8.3 | prk-1 (Pim oncogene Related Kinase) | Szerin-treonin protein kináz | promóter (6kb) | promóter (5,6kb) |
| С07Н6.7 | lin-39 (abnormal cell LINeage) | Homeodomén fehérje | promóter (0,9kb) | promóter (1kb) |
| C08C3.3 | mab-5 (Male ABnormal) | Homeodomén fehérje | 3'UTR | 3'UTR |
| C18A11.5 | xol-1 (XO Lethal) | GHMP kináz, a szex- determináció és dóziskompenzáció fő szabályzója | promóter (0,15kb) | promóter (<0,1kb) |
| C41D7.2 | ptr-3 (PaTched Related family) | Patched receptor | promóter (5,5kb) | promóter (1,4kb) |
| C53C11.3 | ptr-5 (PaTched Related family) | Patched receptor | promóter (3,8kb) | promóter (1,7kb, 3kb - 2x) |
| F08B1.1 | vhp-1(VH1 dual- specificity phosphatase family) | MAP kináz foszfatáz | intronok (4x) | intronok (2x) |
| F08F3.9 | | snRNS aktiváló komplex alegység | promóter (0,1kb - 3x) | promóter (0,3kb - 2x) |
| F09E8.7 | lev-1 (LEVamisole resistant) | Acetilkolin receptor | 1. intron (2x) | 1. intron (2x) |
| F13D11.2 | hbl-1 (HunchBack Like) | Transzkripciós faktor | promóter (1,3kb - 2x) | promóter (1,3kb) |
| F17A2.1 | xtr-2 (MX region of TRA-2 Related) | TRA-2-szerű csíravonal szex- determinációs faktor | promóter (1kb - 3x) | promóter (2,5kb - 2x, 1,3kb) |
| F28F5.3 | lim-8 (LIM domain family) | Miozin kölcsönható fehérje | promóter (0,3kb) | promóter (2,2kb) |
| F38E11.2 | hsp-12.6 (Heat Shock Protein) | Hősokk faktor | promóter (0,4kb) | promóter (0,3kb) |
| F48E8.1 | lon-1 (LONg) | TGF-béta jelátvivő | promóter (2,5kb) | promóter (2,3kb) |
| K07D4.7 | tag-218(Temporarily Assigned Gene name) | Guanin nukleotidcserélő fehérie | promóter (1,6kb) | promóter (1,3kb) |
| K10C2.5 | grl-6 (GRound-Like) | Hedgehog-szerű fehérie | promóter (<0,1kb) | promóter (0,1kb) |
| K11G9.2 | | Karboxil-észteráz | promóter (<0,1kb) | promóter (0,2kb) |
| M79.1 | abl-1 (related to oncogene ABL) | SH 2-3 domén nem- receptor tirozin kináz, csíravonal apoptózis szabályozó | 1. intron | 1. intron |
| R06B9.6 | mig-14 (abnormal cell MIGration) | Wntless-szerű transzmembrán fehérje | promóter (3kb*) | promóter (0,2kb) |
| R10E9.1 | msi-1 (MuSashI family) | mRNS hasító és poliadenilációs komplex-alegység | 5'UTR, promóter (2,3kb) | 5'UTR, promóter (5,5kb - 2x) |
| R13H8.1 | daf-16 (abnormal DAuer Formation) | FOXO transzkripciós faktor | promóter (0,25kb), intronok(2x) | promóter (0,25kb), intronok (2x) |
| Y47H9C.4 | ced-1 (CEll Death abnormality) | transzmembrán fehérje, apoptotikus faktor | promóter (0,3kb) | promóter (0,25kb), 3. intron, 6. intron |
| C26C6.2 | goa-1 (G protein,O, Alpha subunit) | heterotrimer G fehérje alfa alegység | 5. exon** | 5. exon** |