

A hősokk transzkripciós faktor HSF-1 szerepe a fonálféreg *Caenorhabditis elegans* intracelluláris patogén válaszában

37. OTDK Biológia Szekció

Biológia alapszak, VI.félév

Készítette:

Vincze Vázsony Viktor

Témavezető:

Barna János, Tudományos munkatárs

Genetika Tanszék

2025.



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM.

Összefoglaló

A HSF1 egy evolúciósan konzervált transzkripciós faktor, mely a sejtes stresszválaszban betöltött funkcióján túl jelentős szerepet játszik alapvető biológiai folyamatokban (egyedfejlődés, anyagcsere, öregedés), továbbá egyes betegségekben (neurodegeneratív rendellenességek, rák). A HSF1 ezeken túl gerinces és gerinctelen élőlények veleszületett immunválaszát is befolyásolja. Csoportunk RNS szekvenálási eredményei azt mutatták, hogy *C. elegans*-ban a HSF-1 aktiválása és inaktiválása paradox módon egyaránt a veleszületett immunitásban szerepet játszó gének indukciójához vezet. Az, hogy a HSF-1 megnövekedett aktivitása hozzájárul a fonálférgek immunitásához ismert, azonban a HSF-1 hiányában aktiválódó immunválaszt korábban még nem írtak le. Kutatásunk célja az volt, összehasonlító transzkriptomikai módszerekkel megvizsgáljuk, hogy pontosan milyen folyamatokban játszanak szerepet a HSF-1 hiányában aktiválódó immungének. Ehhez a kutatócsoport saját, illetve más publikált RNS szekvenálási eredményeit használtuk fel. Célunk volt továbbá, hogy az RNS szekvenálásunk eredményeit kvantitatív real-time PCR és GFP riporter rendszerek segítségével validáljuk. Eredményeink szerint a HSF-1 hiányában a vírusok és más sejten belüli élősködők hatására aktiválódó intracelluláris patogén válasz (IPV) aktiválódik. Vizsgálataink alapján a HSF-1 nem közvetlenül gátolja ezt a folyamatot, hanem a csökkent HSF-1 aktivitás következtében kialakuló fehérjetoxikus stressz vezet az IPV indukciójához.

Rövidítésjegyzék

cDNS: *Complementary DNA*, komplementer DNS

RNS-seq: RNS-szekvenálás

GSEA: *Gene set enrichment analysis*, génszett dúsulási analízis

GO: *Gene Ontology*, gén ontológia

DEG: *Differential gene expression*, eltérően expresszáldó gének

IPV: intracelluláris patogén válasz

***C. elegans*:** *Caenorhabditis elegans*

GFP: Green fluorescent protein

RNSi: RNS interferencia

HSF-1: *heat-shock factor 1*, hősokk transzkripció faktor 1

Hsp: *heat-shock protein*, hősokkfehérje

HSV: hősokk válasz

***N. parisii*:** *Nematocida parisii*

M9: foszfát tartalmú fiziológiás oldat

MATH domén: *meprin-associated Traf homology domain*

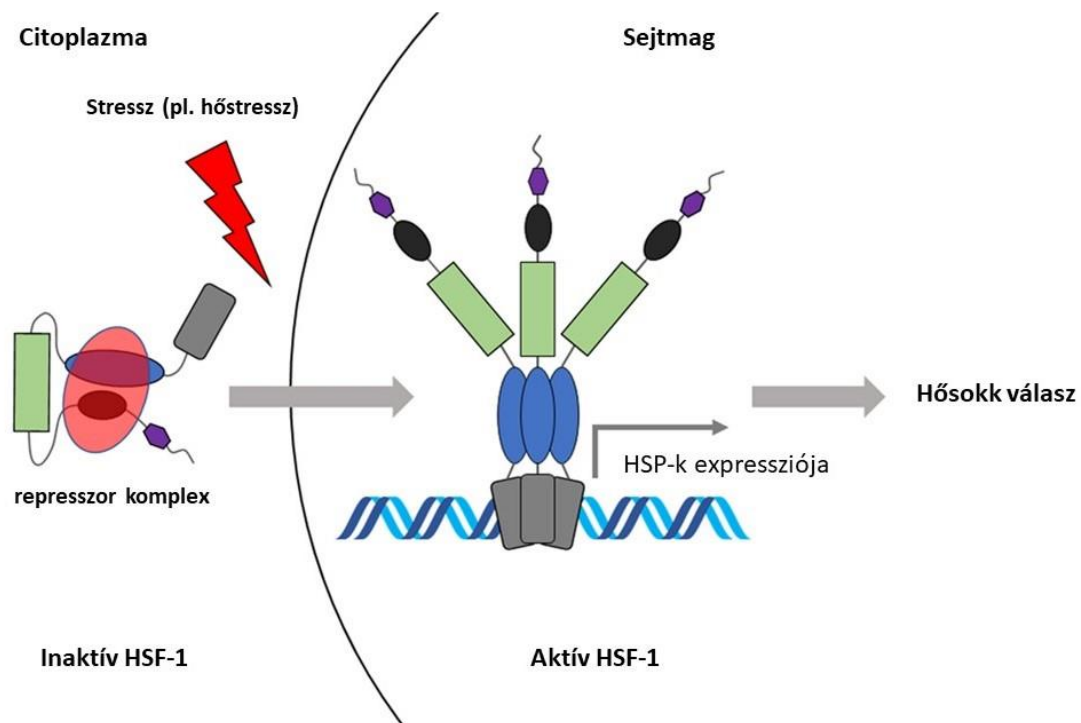
NGM: *Nematode Growth Medium*

PCR: *Polymerase chain reaction*, polimeráz láncreakció

TT: termotolerancia

Bevezető

A legtöbb élőlényhez hasonlóan a fonálféreg *Caenorhabditis elegans*-ban is specifikus stresszválaszok biztosítják a túlélést a változó környezeti körülmények között. Hőstressz hatására a fehérjék térszerkezete károsodhat, így eredeti funkcióikat képtelenek ellátni, aggregátumokat képeznek és gátolják a sejtek működését (Kyriakou et al., 2022). A hő és más fehérje toxikus stressz ellen alakult ki a hősokk válasz (HSV). A HSV-t a hősokk transzkripció faktor HSF-1 (*heat shock transcription factor 1*) aktiválja (Åkerfelt et al., 2010). A HSF-1 stressz mentes környezetben a citoplazmában van és a HSP-90 hősokk fehérjével alkot inaktív komplexet, ami proteotoxikus stressz hatására szétesik, a HSF-1 trimelizálódik és a sejtmagba jut, ahol különböző hősokk fehérjéket (Hsp) kódoló géneket aktivál (Biamonti & Vourc'h, 2010). A Hsp-k helyreállítják a fehérjék natív térszerkezetét vagy megakadályozzák aggregációjukat és lebontásra jelölik ki őket [1. ábra]. A HSF-1 ezen túl szerepet játszik a neurodegeneratív betegségekben és a rákban (Chen et al., 2021).



1.ábra: A hősokk válasz kialakulása, Kovács és munkatársai alapján (Kovács et al., 2022)

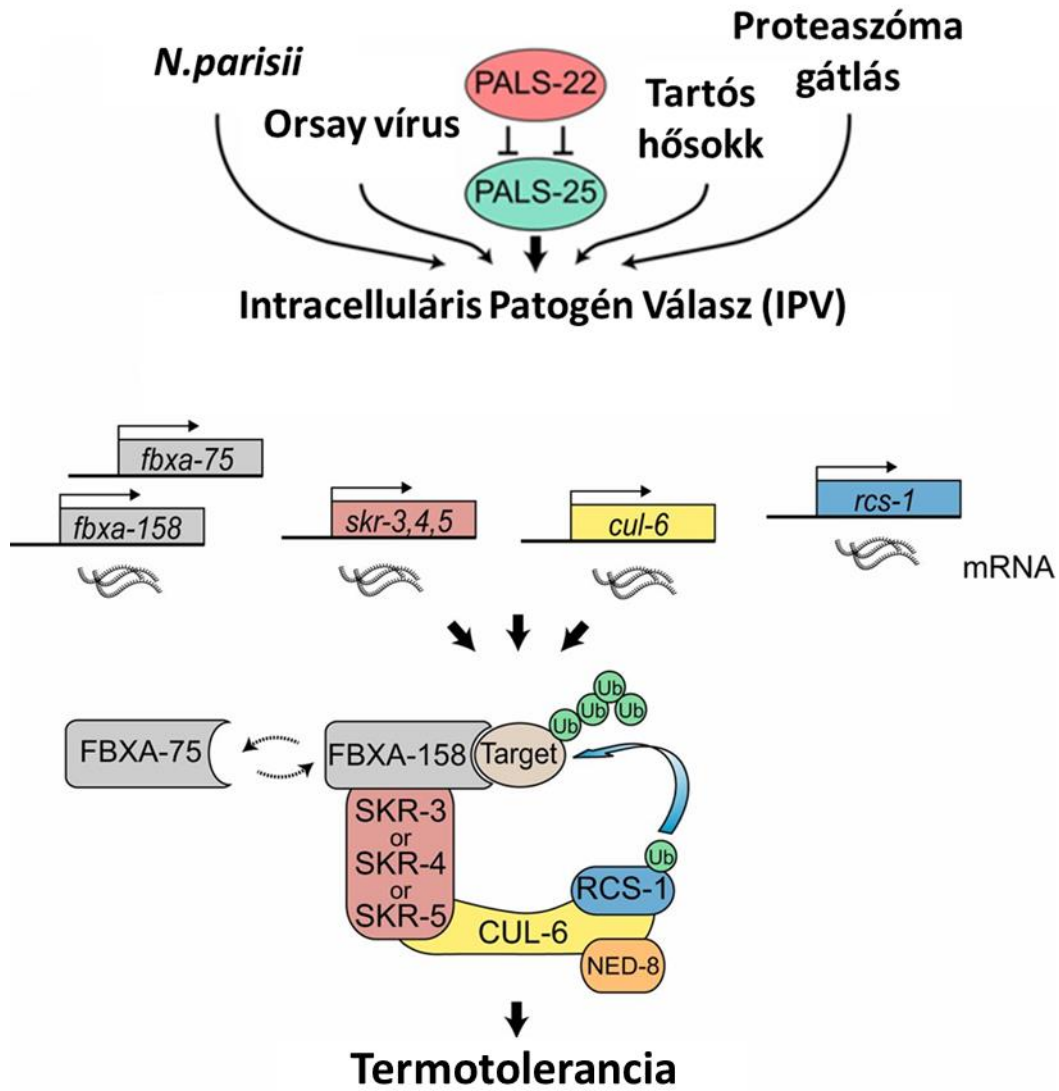
A HSF-1 alapvető a *C. elegans* egyedfejlődésben is. Ezt az is alátámasztja, hogy a null mutáns *hsf-1(ok600)* törzs lárvaletális (Morton & Lamitina, 2012). A *hsf-1(sy441)* hipomorf mutánsok életképesek, noha az *sy441* allél által kódolt HSF-1 fehérjének hiányzik a transzaktivációs doménja (HSF-1 Δ TAD), amely a szakirodalom alapján szükséges a HSF-1 transzkripciós aktivitásához (Hajdu-Cronin et al., 2004). Csoportunk eredményei szerint azonban a HSF-1 Δ TAD csökkent mértékben ugyan, de képes aktiválni a HSV-t és érdekes módon a fiatal felnőtt *hsf-1(sy441)* mutánsok termotoleranciája (TT) a várttal ellentétben magasabb, mint a vad típusé (Kovács et al., 2024). Ez magyarázható azzal, hogy a mutánsban más stresszválaszok indukálódnak, melyek túlkompenzálják a HSF-1 aktivitás hiányát. Ezt támasztják alá csoportunk RNS-szekvenálási eredményei is ugyanis a *hsf-1(sy441)* mutánsban számos a stresszfolyamatban és immunválaszban szerepet játszó gén is aktiválódik, ami hozzájárulhat a mutáns állatok megemelkedett hőstressz tűréséhez (Kovács et al., 2024).

A *C. elegans* más gerinctelenekhez hasonlóan kizárólag a veleszületett immunrendszerére támaszkodik a kórokozók elleni védekezésben. A fertőzés hatásra evolúciósan konzervált jelátviteli utak aktiválódnak, amelyek antimikrobiális peptidek és fehérjék termelését váltják ki (Kim & Ausubel, 2005; Schulenburg et al., 2004). A vírusok és más intracelluláris kórokozók elleni védekezés során a fonálféregben egy speciális immunválasz, az intracelluláris patogén válasz (IPV) indukálódik. Dolgozatomban ezt mutatom be részletesebben.

Az útvonalat a közelmúltban írták le (Reddy et al., 2017). Jelenleg két olyan patogén ismert, amely indukálja az IPV-t. Ilyen az Orsay vírus, ami az egyetlen ismert vírus, amely természetes körülmények között képes megfertőzni az állatot, illetve a *Microspordia* nemzetségbe tartozó egysejtű gomba a *Nematocida parisii* (Bakowski et al., 2014).

Az IPV aktiválódhat a PALS-22 és a PALS-25 molekuláris kapcsolón keresztül (Reddy et al., 2019a). A PALS-22 egy ALS2CR12 domént tartalmazó fehérje, amely gátolja a PALS-25 aktivitását. *pals-22(-)* mutánsokban a PALS-25 aktiválja a ZIP-1 transzkripciós faktort, amely képes számos IPV gén átírását indukálni (Lažetić et al., 2022). A ZIP-1 a PALS-25-től függetlenül is aktiválódhat számos különböző stimuláció hatására (2. ábra). Az IPV effektorai között találunk PALS fehérjéket, C típusú lektineket, lizozimeket és MATH domént és F-Box domént tartalmazó fehérjéket, illetve egy ubikvitin ligáz komplex tagjait: RCS-1, CUL-6, SKR-3,4,5. A közelmúltban

kiderült, hogy az IPV hatására megemelkedik a férgek hőtoleranciája és ebben az említett ubikvitin ligáz komplexnek van kulcsszerepe (Panek et al., 2020).



2.ábra: *C. elegans* intracelluláris patogén válasza Panek és munkatársai alapján (Panek et al., 2020)

Célkitűzések

A projekt során egyik célunk az volt, hogy a kutatócsoport saját, illetve más csoportok által publikált a csökkent HSF-1 aktivitás hatását vizsgáló nyers RNS szekvenálási adatokat egységes módszerrel újra elemezzük és kiértékeljük.

GO (*Gene Ontology*) felülreprezentációs tesztekkel megvizsgáljuk, hogy a csökkent HSF-1 aktivitás hatására indukálódó gének milyen folyamatokban játszanak szerepet. A HSF-1 hiányában eltérően expresszálódó géneket GSEA analízissel összevessük egy olyan génszett gyűjteménnyel, amely publikus RNS-seq adatok alapján készültek el. Ezekben különböző patogének és immun útvonalak által indukált, vagy gátolt gének találhatók. Ezáltal pedig megállapíthassuk, hogy a csökkent HSF-1 aktivitás hatására milyen típusú immunválasz aktiválódik.

Kitűzött céljaink közé tartozott, hogy egyes immun gének esetében kísérletesen validáljuk az RNS szekvenálási adatokat qPCR illetve GFP riporterek segítségével.

Végül célunk volt annak felderítése, hogy a HSF-1 közvetlenül vagy közvetve gátolja az immungének expresszióját.

Anyagok és Módszerek:

Törzsek fenntartása: *Caenorhabditis elegans* fenntartása, ahol nincs külön jelezve 20°C-on, NGM lemezekre szélesztett *E. coli* OP50 pázsiton történt, ami a férgek tápláléka. Az állatokat lúgos embrió preparálással szinkronizáltam (Stiernagle, 2006).

Felhasznált törzsek:

A munka során felhasznált törzsek a CGC-től származnak.

N2 (*Bristol*) – vad típus

PS1740 *hsf-1(sy441)* I.

ERT54 *jyIs8 [pals-5p::GFP + myo-2p::mCherry]* X.

JIN810 *agIs26 [clec-60p::GFP + myo-2p::mCherry]*

JTL611 *hsf-1(ljt3[hsf-1::degron::gfp])* I.; *ieSi57[eft-3p::TIR1::mRuby::unc-54 3'UTR + Cbr-unc-119(+)]* II.; *unc-119(ed3)* III.

Termotolerancia mérés: A szinkronizált férgeket 1 napos felnőtt korban 5 órán át 35°C-on hő sokkoltuk, majd 20°C-ra helyezve 16 órával később meghatároztuk a túlélő állatok arányát. Az auxin indukált degradációs mérések során az állatok csak 2,5 órát töltöttek 35°C-on. A mérések 3 biológiai és 3-3 technikai párhuzamossal végeztük el, mérésenként minimum 90 állattal.

Auxin indukált degradáció: Ehhez a JTL611 törzset használtuk Morphis és munkatársai alapján (Morphis et al., 2022). Az L4 lárvákat 1 mM auxin tartalmú lemezekre helyeztük majd 16 órával később került sor a termotolerancia vizsgálatra. Az auxin etanolban volt oldva, ezért a kontroll lemezek is 0,25% etanolt tartalmaztak.

Mikroszkópos képek készítése: A képek Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal készültek, az állatok M9-ben oldott 100 mM-es nátrium-azid oldattal lettek immobilizálva.

Mikroszkópos képek kiértékelése: A mikroszkópos képek kiértékelését ImageJ segítségével végeztem (Schneider et al., 2012).

RT-qPCR: Az RNS-t RNazol® RT (RN 190) (Molecular Research Center, INC.; 5645

Montgomery Road, Cincinnati, OH 45212, USA) segítségével izoláltuk, majd cDNS író kittel (Thermo Scientific, K1622) (Thermo Fisher Scientific Inc.; 81 Wyman St., Waltham, MA 02451, USA) előállított templáton a qPCR-t a Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific K0222) (Thermo Fisher Scientific Inc.; 81 Wyman St, Waltham, MA 02451, USA) kittel, Roche LightCycler® 96 (F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland) készülékben az 1. táblázatban feltüntetett primerek segítségével végeztük a kontrol gén a vizsgálat során pedig a *cdc-42* volt.

Primerpár	<i>Forward</i> szekvencia (5'→3')	<i>Reverse</i> szekvencia (5'→3')
<i>pals-22</i> RNSi	CGGTTCATGGCTAGATGTCTTCAA ATGAAAATTCAGATG	CGGTATCGATAAGCTTCAAAGTGTA AAACCATTATCAATT
<i>pals-6</i> qPCR	GTTGGTCAGGCACAGGAGAA	AGCCGATGCATCACTTCCAT
<i>skr-5</i> qPCR	AGCAGCGAAGAGCAAGATGT	AATGGAATTGGTTCGCGCTG
<i>lys-7</i> qPCR	GTCTCCAGAGCCAGACAATCC	CCACCGCTGTACACATTCCA
<i>sod-3</i> qPCR	CACTGCTTCAAAGCTTGTTT	ATGGGAGATCTGGGAGAGT
<i>cdc-42</i> qPCR	CTTCGACAATTACGCCGTCAC	CGAAATTTTCAGGCACCCATTTTTC

1.táblázat

RNSi konstrukció elkészítése: Az általam készített *pals-22* RNSi konstrukcióhoz a fragmentet cDNS templátról a megfelelő primerekkel (1. táblázat) amplifikáltam DreamTaq polimerázzal (Thermo Scientific, EP0702). Az L4440 vektort (Addgene; plasmid #1654) NheI és HindIII enzimekkel linearizáltam, majd a TEDA klónozással (Xia et al., 2019) előállított „*nicked*” plazmidokat Inoue módszerrel (Inoue et al., 1990) készített magas kompetenciájú *E. coli* DH5α sejtekben transzformáltam. Az ampicillin tartalmú lemezekben felnőtt kolóniákra pedig *single colony* PCR-rel szűrtem (Bergkessel & Guthrie, 2013), majd az izolált plazmidokat (Thermo Scientific, K0502) emésztéssel ellenőriztem.

RNS-seq elemzés: A nyers RNS-seq adatokat (GSE241011, PRJNA311958, GSE227652) az NCBI publikus szerveréről töltöttem le és a Galaxy EU szerveren dolgoztam fel. Az elemzés során a legújabb *C. elegans* a referencia genomot (WBcel235/ce11) használtam és EdgeR-rel határoztam meg a szignifikáns ($FDR < 0,05$) DEG-eket miután kiszűrtem a nagyon alacsonyan kifejeződő transzkripteket ($CPM < 15$).

Venn-diagramok: A Venny 2.1 segítségével készültek (Oliveros, 2015).

Gén ontológia felülreprezentációs teszt: A GO vizsgálatok ShinyGO 0.81-el (Ge et al., 2020) készültek.

GSEA (preranked) analízis: Az elemzés GSEA v3.0 alkalmazással történt (jel-zaj viszony = 1000 permutáció; ‘no collapse’ opció). A szignifikáns DEG-eket $\log_2FC$ értékük szerint csökkenő sorrendbe állítottuk, majd ezeket összevettük a gén gyűjteményünkkel. A szignifikánsan (NOM $p\text{-val} < 0,05$ és FDR $q\text{-val} < 0,25$) feldúsult génszetteket a hozzájuk rendelt NES értékek alapján sorba rendeztük (Subramanian et al., 2005).

Statisztika: A Venn-diagrammok statisztikáját a *nemates.org* segítségével kalkuláltam. A RT qPCR szignifikancia szintjét Mann–Whitney, az expressziós vizsgálatok szignifikanciáját párosított *t*-teszttel, míg a termotolerancia vizsgálatok p értékét Cochran–Mantel–Haenszel tesztel számítottam ki GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével ($* = p < 0,05$ $** = p < 0,01$ $*** = p < 0,001$).

Eredmények

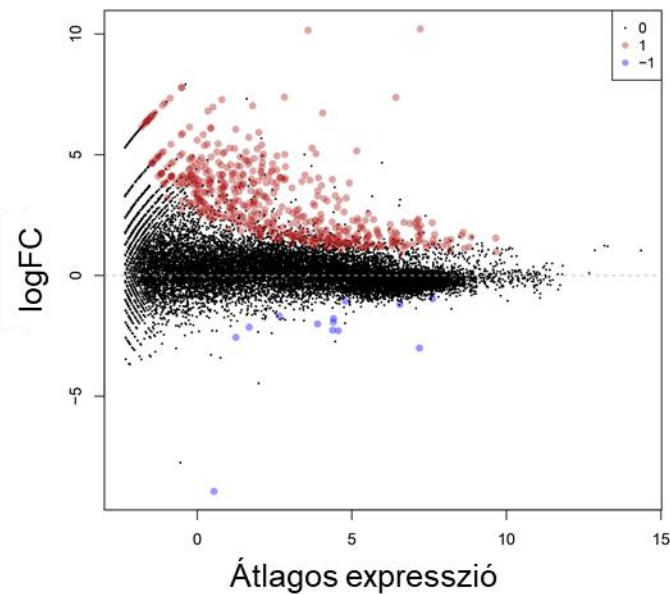
RNS szekvenálási eredmények újra elemzése

Újra elemeztem csoportunk már közzétett vad és a *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben készült RNS-szekvenálásának, valamint két publikált kontrol és *hsf-1 RNSi* nevelt fonálférgekből készült RNS-seq nyers adatait. Erre azért volt szükség, mert azt találtuk, hogy nagy különbségek adódhatnak az eltérő elemzési módszerek miatt a DEG-ek számában annak ellenére, hogy ugyanabból a nyers RNS-seq adatból lettek kielemezve (adat nincs feltüntetve).

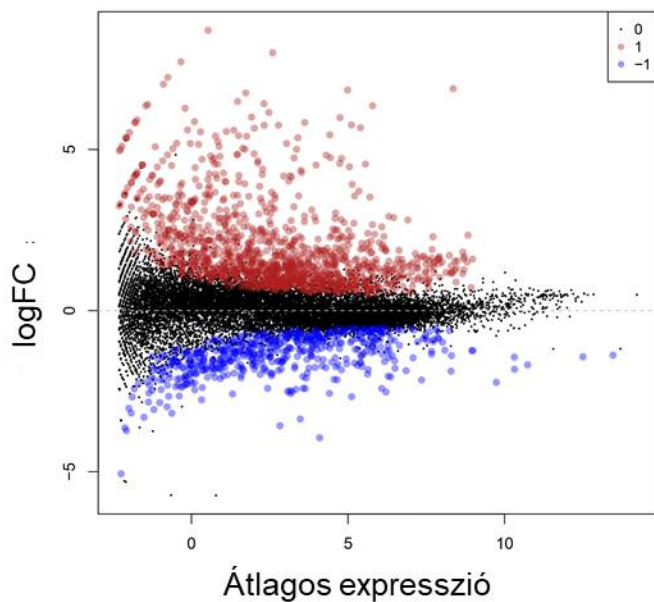
Az adatok feldolgozását a Galaxy.eu szerverin végeztem mely egy online felület, ahol különböző bioinformatikai eszközök használatával célszerűen és egyszerűen lehet különböző elemzéseket elvégezni külső szervereken (Bhargava et al., 2017).

A feltöltött nyers RNS-szekvenálás adatokban található leolvasások (*read*) minőségét FastQC segítségével ellenőriztem. A kapott adatokat pedig MultiQC nevű eszközzel aggregáltam. Mivel az adatok minősége megfelelő volt tovább léptem és a Cutadapt szoftver segítségével eltávolítottam a leolvasásokból az RNS-szekvenálás során hozzáadott adaptorokat, valamint az alacsony minőségű, illetve 20 bázispárnál rövidebb *read*-eket. A következőkben a megszürt leolvasásokat HISAT2 használatával a legújabb *C. elegans* referencia genomra térképeztem (WBcel235/cel11) majd az eredményt MultiQC használatával ellenőriztem. Az így kapott bam formátumban lévő fájlban pedig featureCounts segítségével meghatároztam, hogy adott *C. elegans* génhez hány *read* tartozik. Ezt követően pedig az edgeR segítségével meghatároztam, hogy melyek azok a gének, amelyek statisztikailag szignifikánsan eltérően expresszálódnak a *hsf-1* csendesítés hatására, illetve a *hsf-1(sy441)* mutánsban a kontrol állatokhoz képest. A kapott DEG-eket MD *plot*-on jelenítettem meg [3.ábra], és megvizsgáltam a DEG-ek trendjét és expressziós eloszlását. Az adatok eloszlása és trendje kielégítőnek bizonyultak így ezeket használtam további elemzéseim során.

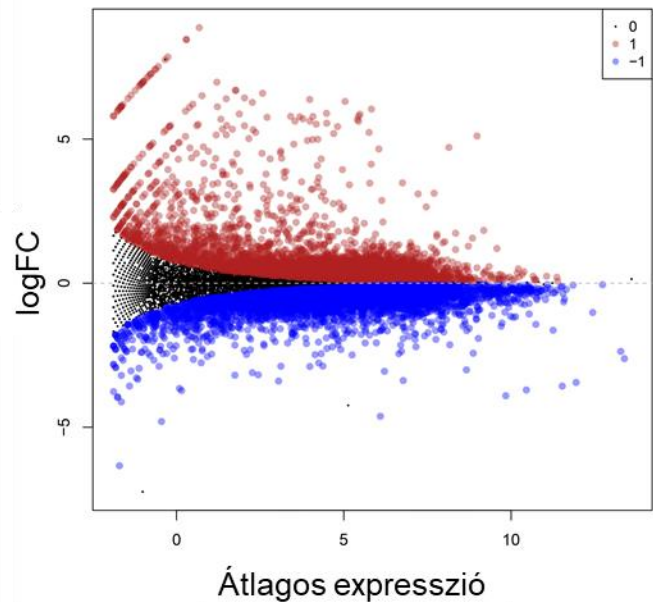
(a) MD Plot: *hsf-1*(sy441) vs N2 (Kovács)



(b) MD Plot: *hsf-1* RNSi vs EV (Bryndon)



(c) MD Plot: *hsf-1* RNSi vs EV (Brunquell)

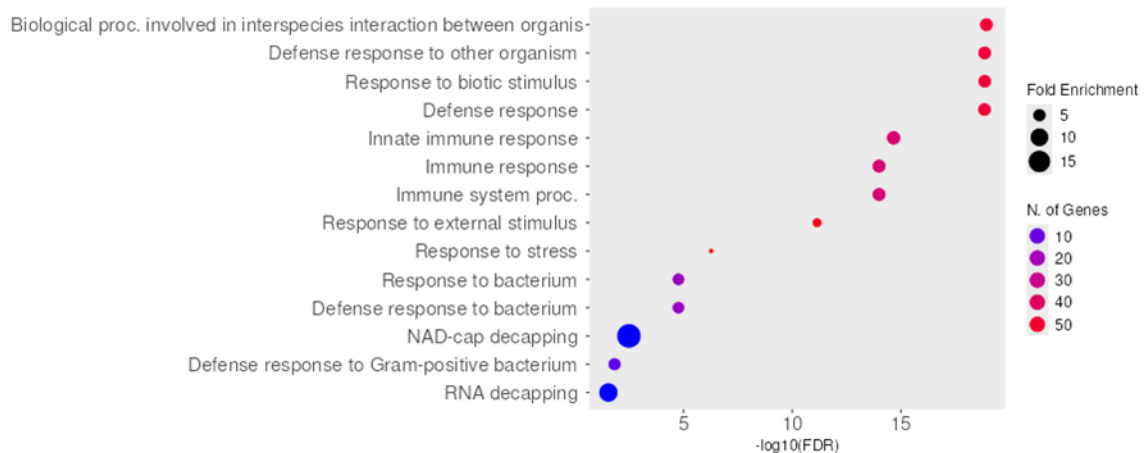


3.ábra: Az újra elemzett RNS-szekvenálás adatokból megkapott DEG-ek ábrázolása MD ploton. A pirossal jelölt pontok a kontrollhoz képest felülszabályozott géneket míg a késsel jelöltek a kontrollhoz képest gátlódó géneket ($FDR > 0.05$) mutatja be az átlagos expresszió (logCPM) és az adott génhez számított logFC alapján.

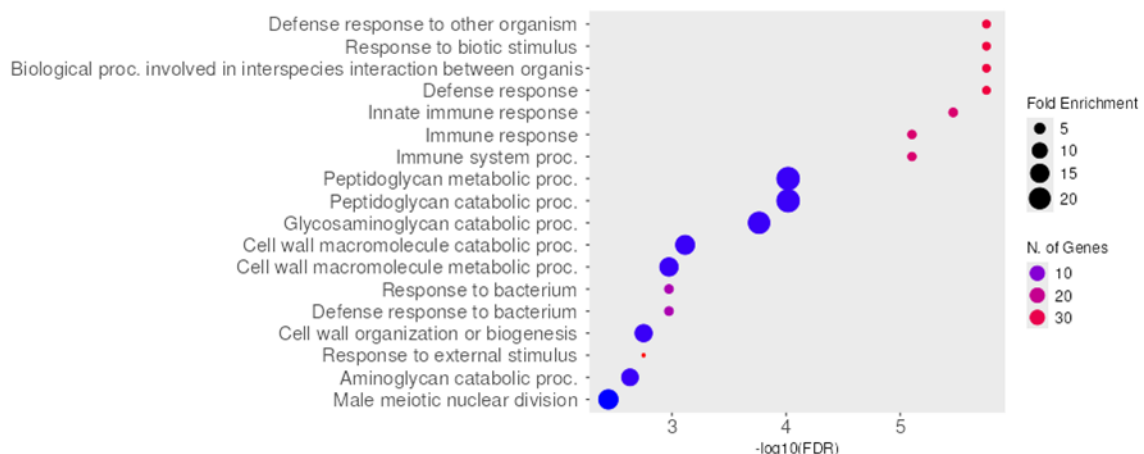
A HSF-1 aktivitás csökkenése IPV gének indukciójához vezet

A következőben az újra feldolgozott RNS-szekvenálás adatokon további bioinformatikai elemzéseket végeztem. Elvégeztem a *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben szignifikánsan felülszabályozott génekhez kapcsolt GO-k vizsgálatát és azt találtam, hogy előzetes eredményeinkkel egyezően a *hsf-1(sy441)* mutánsban immungének vannak felülreprezentálva [4. ábra (a)]. A *hsf-1 RNSi*-n nevelkedett állatokból készült RNS-seq újra elemzését követően kiválasztottam azokat a géneket, amelyek expressziója mindkét kísérletben szignifikánsan megnő *hsf-1(RNSi)* háttérben. Az így kapott gének esetében is elvégeztem a GO felülreprezentációs vizsgálatot, ami azt mutatta, hogy *hsf-1* csendesítés hatására is immungének aktiválódnak [4. ábra (b)].

(a) *hsf-1 (sy441)* mutánsokban indukálódó génekhez rendelt felülreprezentált GO-k



(b) *hsf-1(RNSi)* állatokban indukálódó génekhez rendelt felülreprezentált GO-k



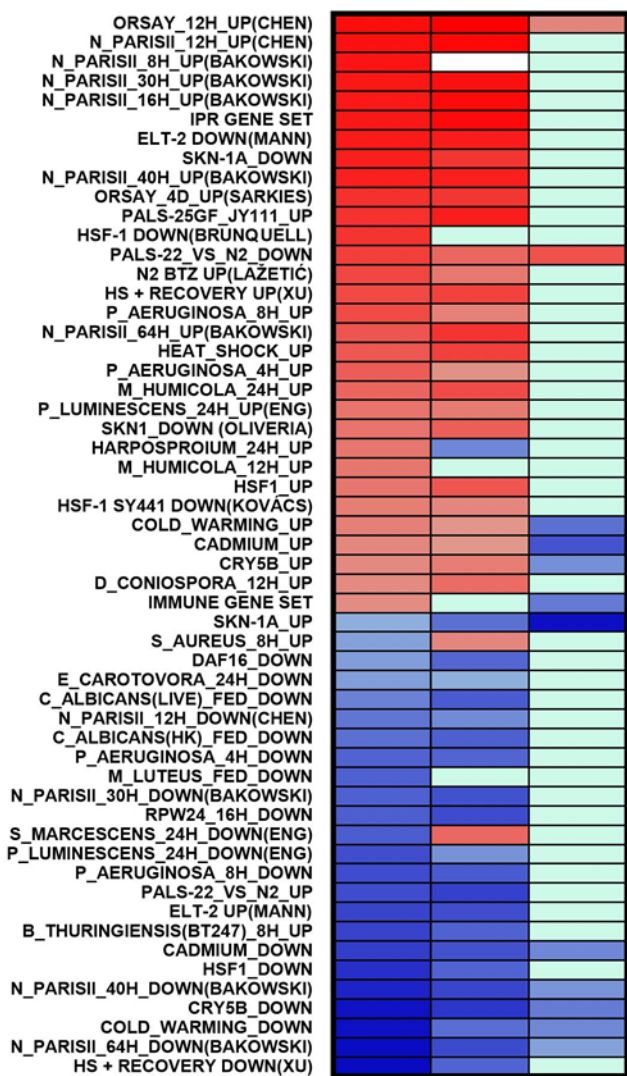
4. ábra: A HSF-1 inaktiválása a veleszületett immunitásban szerepet játszó gének indukciójához vezet
(a) A GO felülreprezentációs vizsgálat szerint a *hsf-1(sy441)* mutánsokban is felülszabályozódnak immungének. (b) A *hsf-1* csendesítése esetén is immunitáshoz kapcsolható gének indukálódnak. A felülszabályozott géneket két független RNS szekvenálási kísérlet nyers adatainak újra elemzésével határoztuk meg. A GO felülreprezentációs teszthez azokat a géneket használtuk fel, amelyek mindkét vizsgálatban szignifikánsan indukálódnak *hsf-1(RNSi)* háttérben a kontrolhoz képest.

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy pontosan milyen típusú immungének aktiválódnak csökkent HSF-1 aktivitás esetén. Ehhez egy már publikált génszett gyűjteményt használtam fel, amely korábban közölt transzkriptomikai kísérletek alapján meghatározott DEG-eket tartalmaz, amelyek különböző biotikus, abiotikus stresszek hatására (pl. bakteriális és virális fertőzés, hő sokk) valamint az immunrendszert befolyásoló mesterregulátorok aktivitásának módosítását követően aktiválódnak vagy gátlódnak (Reddy et al., 2019a). Ezt kiegészítettem néhány további génszettel, amelyeket az eredeti gyűjtemény megjelenését követően publikált hasonló vizsgálatokból származtak (Lažetić et al., 2022; Mann et al., 2016; Sural et al., 2019; Xu et al., 2023). Ezzel vettem össze egyenként az újra elemezett RNS-seq eredményeket génszett feldúsulási analízisekkel (*GSEAPreranked*). Az egyes génszettekhez rendelt normalizált feldúsulási pontszámokat hő térképen ábrázoltam [5. Ábra (a)]. Az analízis azt mutatta, hogy csökkent HSF-1 aktivitás esetén olyan gének indukálódnak, melyek vagy valamilyen intracelluláris kórokozó (pl. az Orsay vírus) hatására aktiválódnak, vagy amelyeket az intracelluláris patogén válaszban szerepet játszó fehérjék szabályoznak (pl. PALS-22).

Ezt követően Venn analízissel összevettem a *hsf-1(sy441)* mutáns és *hsf-1(RNSi)* állatokban aktiválódó géneket a *pals-22(-)* mutánsokban aktiválódó génekkel és mindkét esetben szignifikáns átfedést mutattam ki [5. ábra (b, c)]. A *pals-22* funkció vesztesége az IPV aktiválásához vezet, ezért a *hsf-1(RNSi)* háttérben indukálódó géneket összehasonlítottam egy kanonikus IPV génszettel (Reddy et al., 2019b). Azt találtam, hogy a két halmaz metszetében található gének száma a véletlenszerűen várható érték többszöröse volt [5. ábra (d)].

(a)

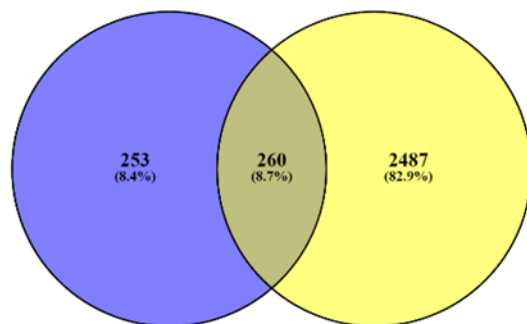
hsf-1 RNSi Bryndon
hsf-1 RNSi Brunquell
hsf-1(sy441) Kovács



(b)

hsf-1 (sy441) mutánsban
indukálódott gének
(KOVÁCS)

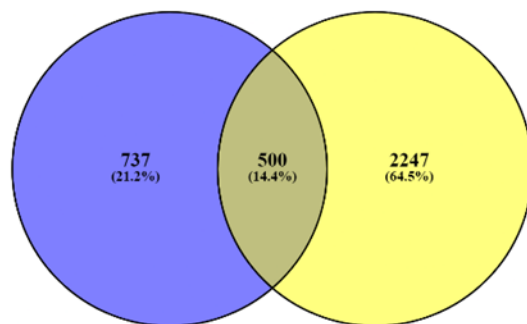
pals-22(-) állatokban
indukálódott gének
(REDDY)



(c)

hsf-1 (RNSi) kezelésre
indukálódott gének
BRUNQUELL $\cap$ BRYNDON

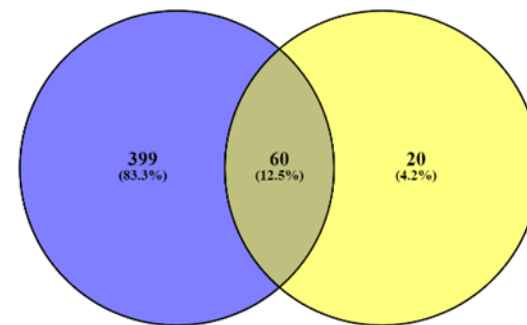
pals-22(-) állatokban
indukálódott gének
(REDDY)



(d)

hsf-1 (RNSi) kezelésre
indukálódott gének
(BRUNQUELL $\cap$ BRYNDON)

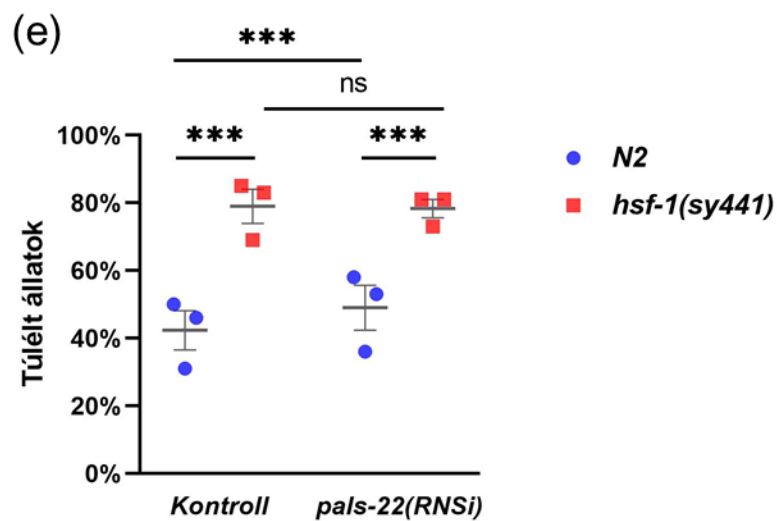
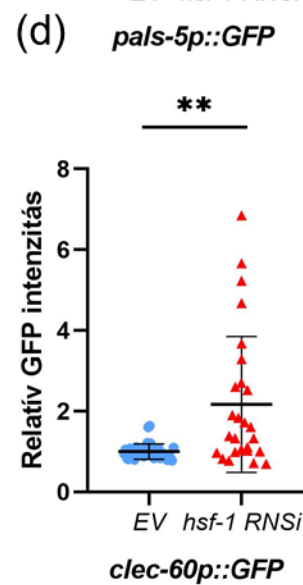
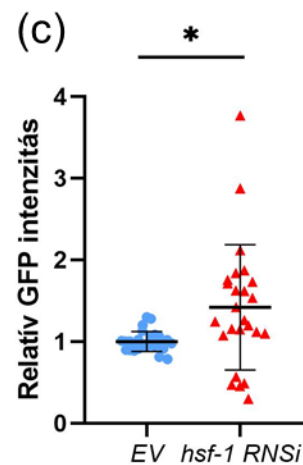
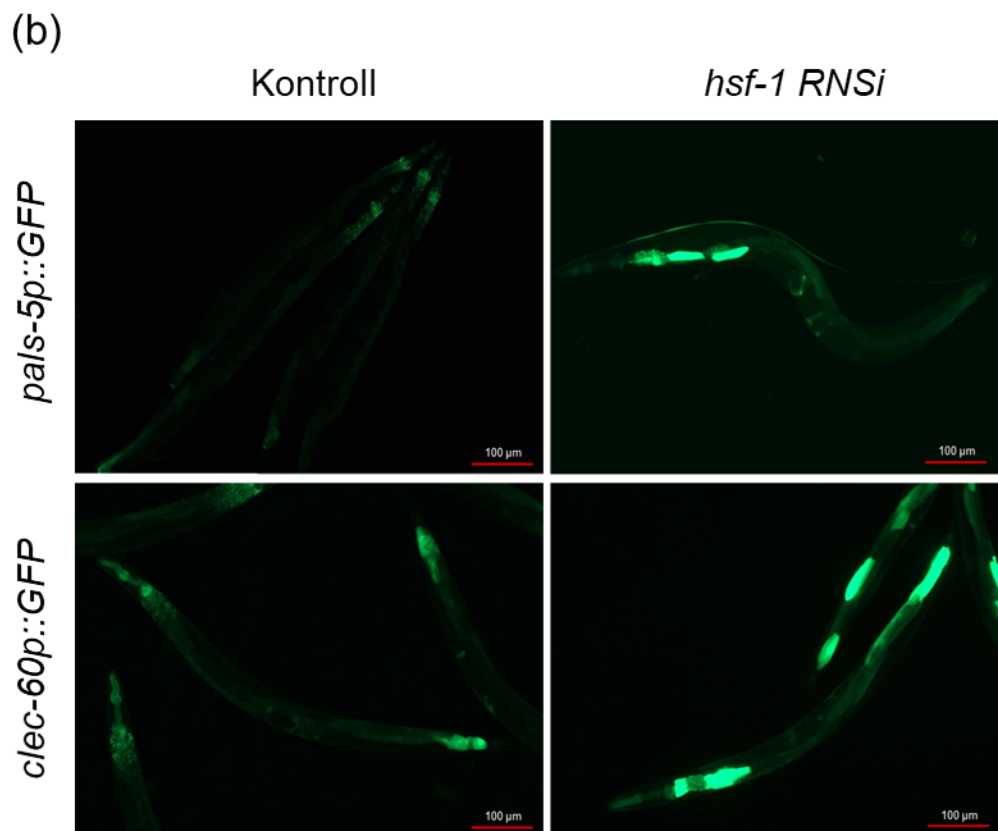
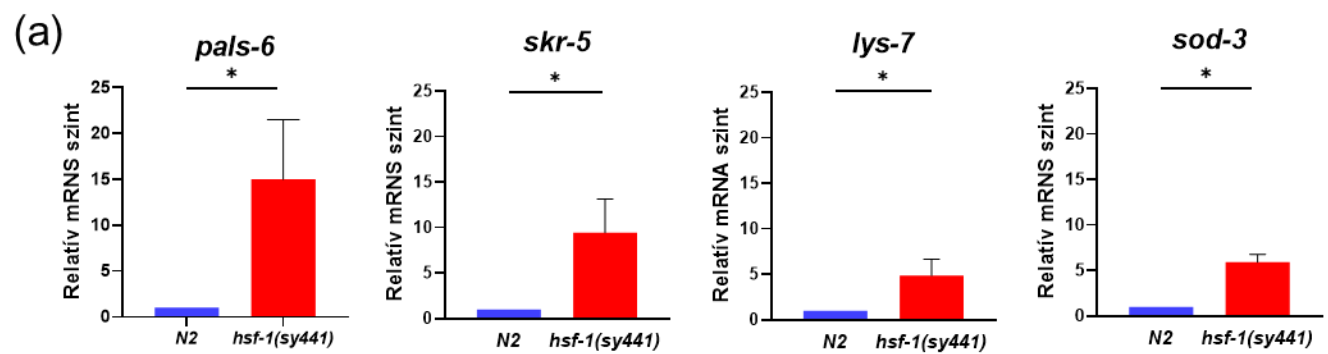
Kanonikus IPV gének
(REDDY)



5. ábra: Csökkent HSF-1 aktivitás esetén intracelluláris patogén válasz gének indukálódnak (a) Két független *hsf-1* RNSi és a *hsf-1(sy441)* mutánsban a vad típushoz képest szignifikáns DEG-ek halmazát egy gén szett gyűjteménnyel vetettük össze GSEA segítségével. A hőterkép a pozitív és negatív normalizált feldúsulási pontszámokat mutatja. A fehér színű mezőkben nem volt szignifikáns az eredmény. A (b), (c) és (d) ábrákon adott génhalmazok átfedése látható Venn-diagramon. Az átfedés eltérése a véletlenszerűen várhatótól (RF) és ennek szignifikancia szintje (p) a *nemates.org* segítségével lett kiszámítva.

Annak érdekében, hogy kísérletesen igazoljam az *in silico* elemzéssel kapott eredményeimet 1 napos *N2* és *hsf-1(sy441)* állatokban RT qPCR segítségével megvizsgáltam egyes kanonikus IPV gének (*pals-6* és *skr-5*) és az IPR-től független immunfolyamatokban szerepet játszó *lys-7* és *sod-3* gének mRNS szintjeit. Eredményeim alapján a *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben szignifikánsan megemelkedett a vizsgált gének expressziója a vad típusú állatokhoz képest [6. ábra (a)]. Mindezek alátámasztják, hogy a *hsf-1(sy441)* mutánsban megnő egyes IPV és más immunitásban szerepet játszó gének aktivitása. Megjegyzendő, hogy a *sod-3* a *pal-22* funkcióvesztéses, míg a *lys-7* a *pals-25* funkció nyeréses mutánsokban is felül szabályozódik (Gang et al., 2022).

Ezután megvizsgáltuk a *hsf-1* csendesítésének hatását a *clec-60p::GFP* és *pals-5p::GFP* riporterek expressziójára. A *clec-60* egy szekretált C-típusú lektint kódol, amely Gram-pozitív baktérium fertőzés hatására aktiválódik (Irazoqui et al., 2010; O'Rourke et al., 2006; Wong et al., 2007), azonban indukcióját az Orsay vírus fertőzés hatására és a *pals-22(-)* mutánsokban is megfigyelték (Reddy et al., 2019b; Tanguy et al., 2017). A *pals-5* egy kanonizált IPV gén, amely Orsay vírus és *N. parisii* fertőzés hatására masszív indukciót mutat (Lažetić et al., 2022). A kísérletet elvégezve azt tapasztaltuk hogy mind a *clec60p::GFP* mind pedig a *pals-5p::GFP* riporterek expressziója szignifikánsan megnövekszik *hsf-1(RNSi)* állatokban az kontrollhoz képest [5.Ábra (b-d)]. Érdekes módon mindkét reporter esetén azt találtuk, hogy *hsf-1* RNSi hatására mozaikosan aktiválódott a GFP expresszió, jellegzetesen a bél első, illetve utolsó sejtjeiben [6.Ábra (b)]. Elképzelhető, hogy a fonálféreg e sejtjei érzékenyebbek a *hsf-1* elvesztésére és ezért aktiválódik bennük erősebben az IPV.



6. ábra: Csökkent HSF-1 aktivitás esetén az IPV és más immunfolyamatok génjei indukálódnak *C. elegans*-ban, ami megnövekedett hőstressztűréshez vezet (a) qPCR eredmények alapján *hsf-1(sy441)* háttérben különböző immungének szintje megemelkedik a vad típushoz képest (* = $p < 0,05$; Mann–Whitney teszt). (b) 1 napos felnőttben a *pals-5::GFP* és *clec-60::GFP* riporterek expressziója megnő *hsf-1(RNSi)* háttérben a kontrollhoz képest (* = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$; párosított *t*-teszt) (c). Az IPV negatív regulátorának (*pals-22*) csendesítése, esetén és a *hsf-1(sy441)* mutánsban egyaránt megnő az állatok termotoleranciája a vad típushoz képest, azonban a *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben a *pals-22* csendesítése nem okoz további hőtolerancia emelkedést.

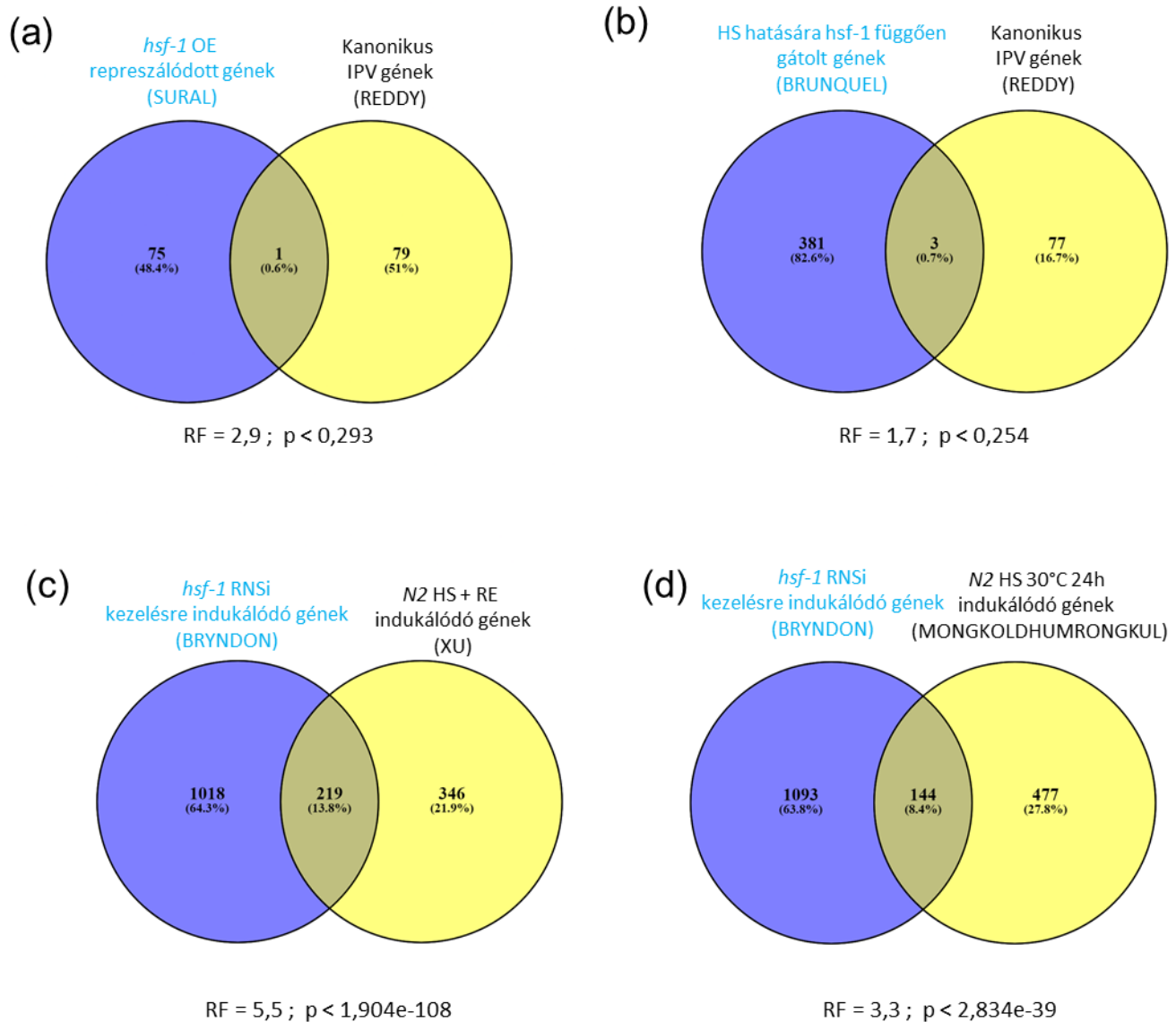
Csoportunk korábban megfigyelte, hogy *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben a fiatal felnőtt állatok termotoleranciája (TT) magasabb a vad típusú állatokénál (Kovács et al., 2024). Érdekes módon a *pals-22(-)* mutáns állatok hőstressz tűrése is magasabb (Reddy et al., 2017), tehát elképzelhető, hogy a mindkét mutánsban az aktiválódó IPV miatt emelkedik meg a TT. Ezért megvizsgáltuk, hogyan alakul az *hsf-1(sy441); pals-22(RNSi)* állatok TT-ja. Eredményeink alapján a *pals-22* csendesítése nem képes tovább emelni az *hsf-1(sy441)* mutáns TT-ját [6.ábra (e)]. Ez az eredmény arra utal, hogy a *pals-22* csendesítése és a *hsf-1(sy441)* egy útvonalban hatnak, vagyis feltételezhető, hogy a *hsf-1(sy441)* mutánsok magasabb hőstressztűrését az IPV aktiválódása okozza.

2. A csökkent HSF-1 aktivitás által kiváltott proteotoxikus stressz indukálhatja az IPV géneket

Miután különböző megközelítésekkel sikeresen validáltuk a *hsf-1* hiányában történő IPV aktiválódást, fel akartuk deríteni, hogy a HSF-1 közvetve vagy közvetlenül idézi ezt elő. Ezért egy publikus RNS szekvenálás eredményt felhasználva (Sural et al., 2019), összevetettük a *hsf-1*-et túltermelő transzgenikus állatban csökkent expressziót mutató géneket, a kanonikus IPV génekkel. Mivel nem találtunk szignifikáns átfedést a két génlista között [7. ábra (a)] ezért feltehetőleg a HSF-1 nem gátolja az IPV géneket. Ezt az is alátámasztja, hogy a hő sokk hatására HSF-1 által gátlódó gének nem fedtek át szignifikánsan a kanonikus IPV gének halmazával [7. ábra (b)].

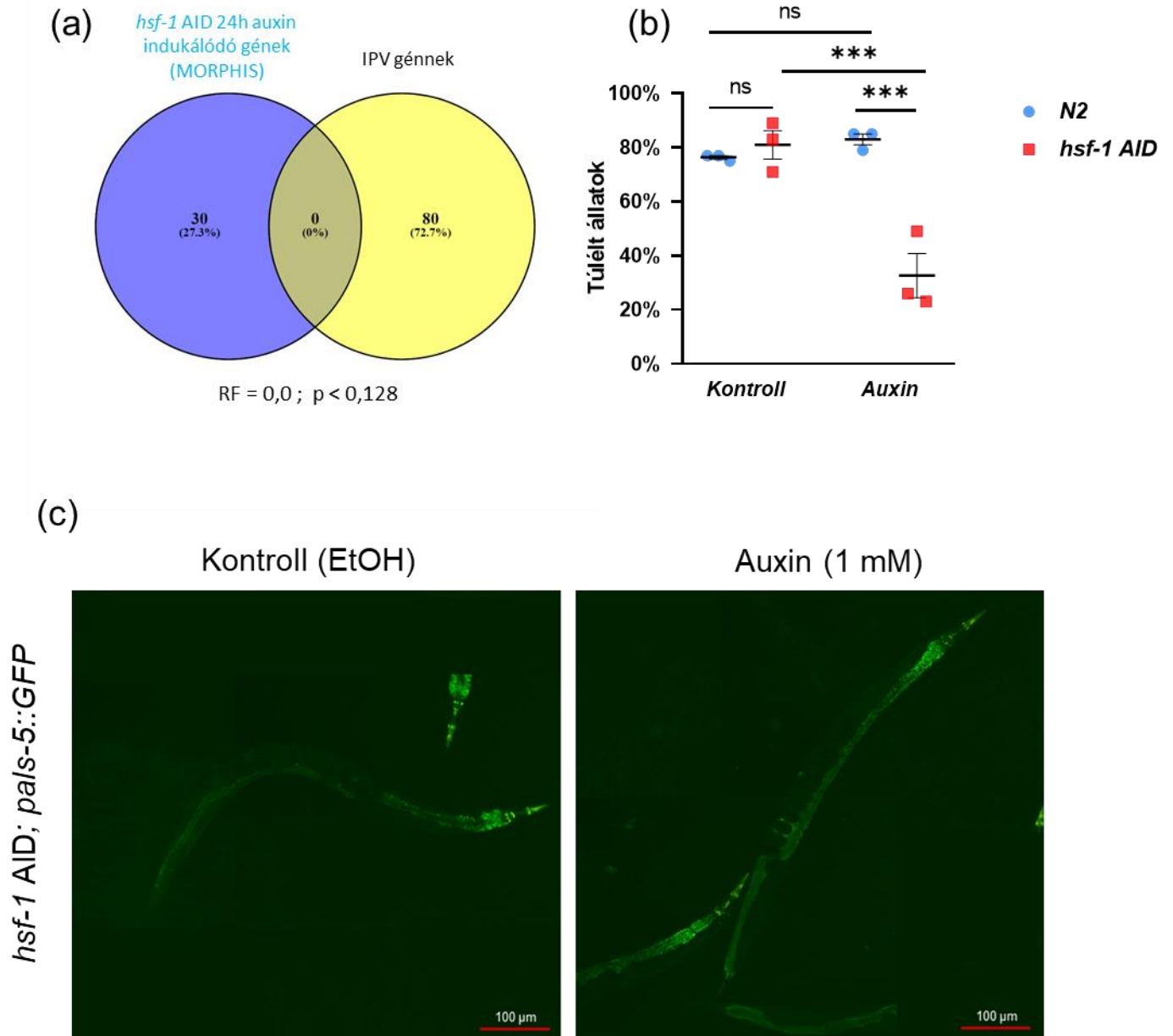
Hosszan tartó, csökkent HSF-1 aktivitás esetén a felhalmozódó hibás térszerkezetű fehérjék proteotoxikus stresszt okozhatnak. Proteotoxikus stresszt számos hatás képes kiváltani (hosszan tartó krónikus hőstressz, a proteoszomális lebontás gátlása, patogének általi fertőzés). Mindezek az IPV-t is indukálják *C. elegans*-ban (Panek et al., 2020). Elképzelhető tehát, hogy a HSF-1 hiányában kialakuló krónikus stressz aktiválja az IPV géneket. Ezt támasztja alá az is, hogy a *hsf-1* csendesítésének hatására aktiválódó gének szignifikánsan átfednek akut hő sokk után 4 órával,

illetve krónikus hősokk hatására aktiválódó génekkel [7. ábra (c, d)].



7. ábra: A HSF-1 nem közvetlenül gátolja IPV géneket, hanem azok feltehetően a HSF-1 hiányában kialakuló krónikus fehérjetoxikus stressz hatására indukálódnak (a-e): adott génhalmazok átfedése Venn-diagramon ábrázolva. Az IPV gének nem fednek át szignifikánsan HSF-1 túltermelés (a) és hősokk indukált HSF-1 aktivitás (b) hatására gátlódó gének halmazával, azonban a *hsf-1*(RNSi) háttérben indukálódó gének szignifikánsan átfednek az akut hősokk után 4 órával (c), illetve krónikus hősokkot (30 °C, 24 óra) követően (d) aktiválódó génekkel. A HSF-1 aktivitás auxin indukált degradáció segítségével való gyors gátlása nem vezet IPV gének mRNS szintjének emelkedéséhez (e). A Venn-diagramokon az átfedés eltérése a véletlenszerűen várhatótól (RF) és ennek szignifikancia szintje (p) a nemates.org segítségével lett kiszámítva. (f) A HSF-1 aktivitás auxin indukált degradációval történő gátlása csökkenti az állatok hőstressz tűrő képességét a kontrolhoz képest.

Ezt az elképzelést megerősítendő, megvizsgáltuk, hogy a HSF-1 aktivitás gátlása rövid távon milyen génexpressziós változásokhoz vezet. Ehhez egy olyan publikus RNS-seq vizsgálat adatait használtuk fel, amelyben a HSF-1 aktivitást auxin indukált degradációval (AID) gátolták (Morphis et al., 2022). A *hsf-1::degron::gfp* transzgenikus állatokban auxin jelenlétében fehérjeszinten történik meg a HSF-1 specifikus lebontása. Ennek ellenére 24 órás auxin kezelés nem indukálta az IPV géneket [8. ábra (a)]. Ez összecseng azzal a megfigyelésünkkel, hogy amikor a HSF-1 aktivitást AID-vel gátoltuk, az állatok TT-ja a vad típushoz képest nem emelkedett meg, hanem szignifikánsan lecsökkent [7. ábra (b)] és ezekben az állatokban a *pals-5p::gfp* riporter sem indukálódott [8. ábra (c)].



8. ábra: A HSF-1 aktivitás auxin indukált degradációval (AID) való gátlása nem indukálja az IPV-t. (a) Nincs szignifikáns átfedés a HSF-1 AID-vel való gátlásának hatására aktiválódó és a kanonikus IPV gének között. (b) A HSF-1 aktivitás AID-vel történő gátlása csökkenti az állatok hőstressz tűrő képességét a kontrollhoz képest ($p < 0.05$ ** = $p < 0.01$ *** = $p < 0.001$; Cochran–Mantel–Haenszel teszt). (c) A *pals-5p::gfp* riporter nem indukálódik a HSF-1 AID-vel való gátlás hatására.

Diszkusszió

Eredményeink alapján mind *hsf-1(RNSi)* és *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben egyaránt aktiválódik az intracelluláris patogén válasz. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a HSF-1 nem közvetlenül gátolja az IPV-t, hanem azt a HSF-1 tartós hiánya miatt kialakuló fehérjetoxikus stressz aktiválja. Az IPV gének indukciója szerepet játszhat abban is, hogy csökkent HSF-1 aktivitás esetén az fonálférgek hőtűrése megemelkedik (Kovács et al., 2024). Bár az korábban is ismert volt, hogy krónikus proteotoxikus stressz hatására *C. elegans*-ban IPV indukálódik (Reddy et al., 2019b), eredményeink mégis újak számítanak, mivel még nem írtak le hasonló *hsf-1* hiányában aktiválódó immunfolyamatot. Megfigyeléseink rámutatnak arra is, hogy a HSF-1 a hőssokk válasz aktiválásán túl fontos élettani folyamatokat is befolyásolhat *C. elegans*-ban.

Érdekes kérdés, hogy vajon mi lehet az oka annak, hogy a krónikus fehérjetoxikus stressz az intracelluláris patogén választ vált ki? A gazdasejtben vírus vagy *Microsporidia* fertőzés esetén nagy mennyiségű patogén eredetű fehérje szintetizálódik, ami rosszul hajtogatott fehérjék és ubikvitinált fehérje aggregátumok felhalmozódásához vezet (Bakowski et al., 2014; Reinke & Troemel, 2015). A vírusfertőzés és a proteosztázis felborulása közti ok-okozati kapcsolatot magasabb rendű állatokban is számos esetben leírták (Aviner & Frydman, 2020). A fehérjetoxikus stressz tehát a patogén támadás hírnöke lehet és hatására immunválasz indukálódik.

Felvetődhet az olvasóban az kérdés is, hogy milyen mechanizmussal indukálja a fehérjetoxicitás az intracelluláris patogén választ? *C. elegans*-ban a proteaszómák gátlását követően IPV gének mellett a proteaszóma alegységek génjei is indukálódnak (Lažetić et al., 2022; Reddy et al., 2019b). Hasonló jelenséget gerincesekben is megfigyeltek (Albornoz et al., 2019; Waad Sadiq et al., 2023). Ez az úgynevezett *bounce-back* válasz, amelyben kulcsszerepet játszik az immunitást is indukáló SKN1/Nrf2 fehérje (Li et al., 2011). Elképzelhető tehát, hogy a *C. elegans*-ban a HSF-1 hiányában kialakuló proteotoxikus stresszt a SKN-1 érzékeli. Erre utal az is, hogy a *hsf-1(sy441)* mutáns állatok megemelkedett termotoleranciáját a *skn-1* csendesítése szupresszálja (Kovács et al., 2024) azonban ennek alátámasztására további vizsgálatok lennének szükségesek. Az mindenesetre ismert, hogy a fonálférgekben az elhúzódó magas hőmérséklet (24 óráig tartó 30 °C-os kezelés) hatására indukálódó intracelluláris patogén válasz indukációjához szükség van a *Basic Leucine Zipper Domain* (*bZIP domain*) családba tartozó ZIP-1 transzkripciós faktor aktivitására (Lažetić et al.,

2022). Nem tudjuk ugyanakkor, hogy ZIP-1 közvetlenül vagy közvetve érzékeli-e a fehérjetoxikus stresszt.

A HSF1 aktivitás hiányának hatását az immunrendszerre magasabb rendű állatokban is kimutatták. Számos eredmény utal arra, hogy a *HSF1(-)* mutáns egerekben a hősök és az endotoxinok sokkal robusztusabb gyulladásos választ váltanak ki, mint a vad típusban. Az intenzívebb gyulladásos válasz részben annak köszönhető, hogy a *HSF1(-)* mutánsokban megnövekedett a TNF α tumor nekrosis faktor expressziója, amely a Nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) fehérjét aktiválja (Xiao et al., 1999). Ezek alapján elképzelhető, hogy ebben az esetben is a HSF1 hiányában kialakuló fehérje toxikus stressz vezet gyulladásához. Kiderült azonban, hogy a HSF1 közvetlenül a TNF α gén promoteréhez köt és gátolja annak expresszióját (Singh et al., 2002), ami megmagyarázza a *HSF1* mutánsokban tapasztalt intenzívebb gyulladásos reakciót. A gyulladásban emellett azonban szerepe lehet olyan HSF-1 által aktivált géneknek is, amelyek az NF κ B fehérjét gátolják (Tan et al., 2023). Mások szerint a *HSF1(-)* gyulladás gátló hatása annak köszönhető, hogy képes gátolni egyes inflammaszómák aktivációját (Shi et al., 2022). Mindezek alapján a HSF1 emlősökben aktívan tartja kordában a gyulladásos immunfolyamatokat.

A fehérje homeosztázis és a veleszületett immunitás közti kapcsolat kutatása egészségügyi szempontból is jelentős eredményekhez vezethet. Megfigyelték például, hogy a proteoszoma diszfunkciójának következtében kialakuló autoinflammatorikus betegeknél aktiválódik a protein kináz R (PKR), amely érzékeli a fehérjetoxikus stresszt és ennek hatására 1-es típusú interferon választ vált ki. Kiderült az is, hogy ha *in vitro* a PKR-t kismolekulájú anyagokkal gátolják, akkor a proteoszóma hibás működésének következtében kialakuló gyulladás enyhül, vagyis elképzelhető, hogy ez a felfedezés a gyógyászatban is alkalmazhatóvá válik (Davidson et al., 2022).

Bár a *C. elegans*-ban leírt IPV nem egy evolúciósan konzervált immunválasz, mechanizmusának megismerése mégis releváns lehet, mivel az IPV mutat bizonyos hasonlóságot az emlősökben megtalálható 1-es típusú interferon válasszal. Például a fonálféregben és emlősökben is hasonló RIG-I-szerű receptoron keresztül aktiválódnak ezek az útvonalak vírus fertőzés hatására, valamint hasonlóság figyelhető meg a két útvonal aktiválódását előidéző egyéb szignálok között is, mint például a proteotoxikus stressz vagy a megváltozott purinmetabolizmus (Lažetić et al., 2022).

Végezetül a HSF1 hiányában indukálódó folyamatok tanulmányozása azért is fontos lehet, mert a HSF1-nek kulcsfontosságú szerepe van a rák kialakulásában, és gátlására rengeteg különböző inhibitort fejlesztettek ki, amelyek potenciális tumorellenes aktivitását jelenleg még a preklinikai fázisban tesztelik (Sharma & Seo, 2018).

Köszönetnyilvánítás

Köszönet témavezetőmnek, Dr. Barna Jánosnak, hatalmas törődésért és támogatásért, amit projekt során nyújtott. Köszönöm Vellai Tibort, tanszékünk vezetőjét, hogy lehetővé tette, hogy itt végezhessem munkám. Köszönet illeti a tanszék további munkatársait, Kovács Dániel, Sigmond Tímea, Hotzi Bernadette, Saqib Ahmed és Kovács Márton, akik rengeteget segítettek munkám során.

Irodalomjegyzék

- Åkerfelt, M., Morimoto, R. I., & Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(8), 545. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>
- Albornoz, N., Bustamante, H., Soza, A., & Burgos, P. (2019). Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3379. <https://doi.org/10.3390/ijms20143379>
- Aviner, R., & Frydman, J. (2020). Proteostasis in Viral Infection: Unfolding the Complex Virus-Chaperone Interplay. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(3), a034090. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034090>
- Bakowski, M. A., Desjardins, C. A., Smelkinson, M. G., Dunbar, T. A., Lopez-Moyado, I. F., Rifkin, S. A., Cuomo, C. A., & Troemel, E. R. (2014). Ubiquitin-Mediated Response to Microsporidia and Virus Infection in *C. elegans*. *PLoS Pathogens*, 10(6), e1004200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004200>
- Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 299–309. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
- Bhargava, M., Viken, K., Wang, Q., Jagtap, P., Bitterman, P., Ingbar, D., & Wendt, C. (2017). Bronchoalveolar Lavage Fluid Protein Expression in Acute Respiratory Distress Syndrome Provides Insights into Pathways Activated in Subjects with Different Outcomes. *Scientific Reports*, 7(1), 7464. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07791-8>
- Biamonti, G., & Vourc'h, C. (2010). Nuclear Stress Bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a000695. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000695>
- Chen, F., Fan, Y., Cao, P., Liu, B., Hou, J., Zhang, B., & Tan, K. (2021). Pan-Cancer Analysis of

the Prognostic and Immunological Role of HSF1: A Potential Target for Survival and Immunotherapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 5551036.

<https://doi.org/10.1155/2021/5551036>

Davidson, S., Yu, C.-H., Steiner, A., Ebstein, F., Baker, P. J., Jarur-Chamy, V., Hrovat Schaale, K., Laohamonthonkul, P., Kong, K., Calleja, D. J., Harapas, C. R., Balka, K. R., Mitchell, J., Jackson, J. T., Geoghegan, N. D., Moghaddas, F., Rogers, K. L., Mayer-Barber, K. D., De Jesus, A. A., ... Masters, S. L. (2022). Protein kinase R is an innate immune sensor of proteotoxic stress via accumulation of cytoplasmic IL-24. *Science Immunology*, 7(68), eabi6763. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abi6763>

Gang, S. S., Grover, M., Reddy, K. C., Raman, D., Chang, Y.-T., Ekiert, D. C., Barkoulas, M., & Troemel, E. R. (2022). A pals-25 gain-of-function allele triggers systemic resistance against natural pathogens of *C. elegans*. *PLoS Genetics*, 18(10), e1010314. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010314>

Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>

Hajdu-Cronin, Y. M., Chen, W. J., & Sternberg, P. W. (2004). The L-Type Cyclin CYL-1 and the Heat-Shock-Factor HSF-1 Are Required for Heat-Shock-Induced Protein Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 168(4), 1937. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.028423>

Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)

Irazoqui, J. E., Troemel, E. R., Feinbaum, R. L., Luhachack, L. G., Cezairliyan, B. O., & Ausubel, F. M. (2010). Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C.*

- elegans by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathogens*, 6(7), e1000982.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000982>
- Kim, D. H., & Ausubel, F. M. (2005). Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Immunology*, 17(1), 4–10.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.11.007>
- Kovács, D., Biró, J. B., Ahmed, S., Kovács, M., Sigmond, T., Hotzi, B., Varga, M., Vincze, V. V., Mohammad, U., Vellai, T., & Barna, J. (2024). Age-dependent heat shock hormesis to HSF-1 deficiency suggests a compensatory mechanism mediated by the unfolded protein response and innate immunity in young *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 23(10), e14246. <https://doi.org/10.1111/accel.14246>
- Kovács, D., Kovács, M., Ahmed, S., & Barna, J. (2022). Functional diversification of heat shock factors. *Biologia Futura*, 73(4), 427–439. <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00138-z>
- Kyriakou, E., Taouktsi, E., & Syntichaki, P. (2022). The Thermal Stress Coping Network of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14907. <https://doi.org/10.3390/ijms232314907>
- Lažetić, V., Wu, F., Cohen, L. B., Reddy, K. C., Chang, Y.-T., Gang, S. S., Bhabha, G., & Troemel, E. R. (2022). The transcription factor ZIP-1 promotes resistance to intracellular infection in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, 13(1), 17.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27621-w>
- Li, X., Matilainen, O., Jin, C., Glover-Cutter, K. M., Holmberg, C. I., & Blackwell, T. K. (2011). Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS Genetics*, 7(6), e1002119.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002119>
- Mann, F. G., Nostrand, E. L. V., Friedland, A. E., Liu, X., & Kim, S. K. (2016). Deactivation of

- the GATA Transcription Factor ELT-2 Is a Major Driver of Normal Aging in *C. elegans*. *PLOS Genetics*, 12(4), e1005956. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005956>
- Morphis, A. C., Edwards, S. L., Erdenebat, P., Kumar, L., & Li, J. (2022). Auxin-Inducible Degron System Reveals Temporal-Spatial Roles of HSF-1 and Its Transcriptional Program in Lifespan Assurance. *Frontiers in Aging*, 3, 899744. <https://doi.org/10.3389/fragi.2022.899744>
- Morton, E. A., & Lamitina, T. (2012). *C. elegans* HSF-1 is an essential nuclear protein that forms stress granule-like structures following heat shock. *Aging Cell*, 12(1), 112. <https://doi.org/10.1111/accel.12024>
- Oliveros, J. C. (2015). Venny 2.1. 0. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. *BioinfoGP of CNB-CSIC*.
- O'Rourke, D., Baban, D., Demidova, M., Mott, R., & Hodgkin, J. (2006). Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Research*, 16(8), 1005–1016. <https://doi.org/10.1101/gr.50823006>
- Panek, J., Gang, S. S., Reddy, K. C., Luallen, R. J., Fulzele, A., Bennett, E. J., & Troemel, E. R. (2020). A cullin-RING ubiquitin ligase promotes thermotolerance as part of the intracellular pathogen response in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(14), 7950–7960. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918417117>
- Reddy, K. C., Dror, T., Sowa, J. N., Panek, J., Chen, K., Lim, E. S., Wang, D., & Troemel, E. R. (2017). An intracellular pathogen response pathway promotes proteostasis in *C. elegans*. *Current Biology : CB*, 27(22), 3544. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.009>
- Reddy, K. C., Dror, T., Underwood, R. S., Osman, G. A., Elder, C. R., Desjardins, C. A., Cuomo, C. A., Barkoulas, M., & Troemel, E. R. (2019a). Antagonistic paralogs control a switch

- between growth and pathogen resistance in *C. elegans*. *PLoS Pathogens*, 15(1), e1007528.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007528>
- Reddy, K. C., Dror, T., Underwood, R. S., Osman, G. A., Elder, C. R., Desjardins, C. A., Cuomo, C. A., Barkoulas, M., & Troemel, E. R. (2019b). Antagonistic paralogs control a switch between growth and pathogen resistance in *C. elegans*. *PLoS Pathogens*, 15(1), e1007528.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007528>
- Reinke, A. W., & Troemel, E. R. (2015). The Development of Genetic Modification Techniques in Intracellular Parasites and Potential Applications to Microsporidia. *PLoS Pathogens*, 11(12), e1005283. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005283>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulenburg, H., Kurz, C. L., & Ewbank, J. J. (2004). Evolution of the innate immune system: The worm perspective. *Immunological Reviews*, 198, 36–58.
<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0125.x>
- Sharma, C., & Seo, Y. H. (2018). Small Molecule Inhibitors of HSF1-Activated Pathways as Potential Next-Generation Anticancer Therapeutics. *Molecules*, 23(11), 2757.
<https://doi.org/10.3390/molecules23112757>
- Shi, X., Li, T., Liu, Y., Yin, L., Xiao, L., Fu, L., Zhu, Y., Chen, H., Wang, K., Xiao, X., Zhang, H., Tan, S., & Tan, S. (2022). HSF1 Protects Sepsis-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *Frontiers in Immunology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.781003>
- Singh, I. S., He, J.-R., Calderwood, S., & Hasday, J. D. (2002). A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4981–4988.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M108154200>

Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–11. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

Sural, S., Lu, T.-C., Jung, S. A., & Hsu, A.-L. (2019). HSB-1 Inhibition and HSF-1 Overexpression Trigger Overlapping Transcriptional Changes To Promote Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 9(5), 1679. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400044>

Tan, H., Huang, F., Huang, M., Wu, X., & Tong, Z. (2023). HSF1 Attenuates the Release of Inflammatory Cytokines Induced by Lipopolysaccharide through Transcriptional Regulation of Atg10. *Microbiology Spectrum*, 11(1), e03059-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03059-22>

Tanguy, M., Véron, L., Stempor, P., Ahringer, J., Sarkies, P., & Miska, E. A. (2017). An Alternative STAT Signaling Pathway Acts in Viral Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *mBio*, 8(5), e00924. <https://doi.org/10.1128/mBio.00924-17>

Waad Sadiq, Z., Brioli, A., Al-Abdulla, R., Çetin, G., Schütt, J., Murua Escobar, H., Krüger, E., & Ebstein, F. (2023). Immunogenic cell death triggered by impaired deubiquitination in multiple myeloma relies on dysregulated type I interferon signaling. *Frontiers in Immunology*, 14, 982720. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.982720>

Wong, D., Bazopoulou, D., Pujol, N., Tavernarakis, N., & Ewbank, J. J. (2007). Genome-wide

investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection. *Genome Biology*, 8(9), R194.

<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r194>

Xia, Y., Li, K., Li, J., Wang, T., Gu, L., & Xun, L. (2019). T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 47(3), e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1169>

Xiao, X., Zuo, X., Davis, A. A., McMillan, D. R., Curry, B. B., Richardson, J. A., & Benjamin, I. J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *The EMBO Journal*, 18(21), 5943–5952. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5943>

Xu, F., Li, R., von Gromoff, E. D., Drepper, F., Knapp, B., Warscheid, B., Baumeister, R., & Qi, W. (2023). Reprogramming of the transcriptome after heat stress mediates heat hormesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, 14(1), 4176. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39882-8>